

## 栉孔扇贝、虾夷扇贝及其杂交子代的 MSAP 分析

于涛<sup>1,2</sup>, 杨爱国<sup>1\*</sup>, 吴彪<sup>1</sup>, 周丽青<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室,山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

**摘要:** 运用甲基化敏感扩增多态性(methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术对栉孔扇贝(♀)、虾夷扇贝(♂)及其杂交子一代、子二代基因组 DNA 胞嘧啶甲基化水平进行了研究,并分析了 DNA 甲基化与各性状的相关性及其与杂种优势的关系。结果表明,(1) DNA 甲基化率与壳宽、总重等表型值呈正相关的关系,而与壳长、壳高、软体重和闭壳肌重 4 个性状表型值呈负相关的关系,其中闭壳肌重与甲基化率的相关性达到极显著水平( $P < 0.01$ );(2) 虾夷扇贝、栉孔扇贝、F<sub>1</sub>代、F<sub>2</sub>代的总甲基化率分别为 32.79%、24.13%、19.98%、20.18%,杂交种 F<sub>1</sub>代的甲基化水平低于双亲,是两种扇贝杂交的结果;F<sub>1</sub>代的甲基化模式经过了重新调整,其变化相对其亲本主要有 4 种类型:甲基化水平相同、去甲基化、超甲基化、次甲基化,且去甲基化位点多于超甲基化位点。结果证实杂种优势的产生与杂交种 F<sub>1</sub>代基因组 DNA 甲基化模式的改变和重新调整有关,丰富了杂种优势机理研究内容。

**关键词:** 栉孔扇贝; 虾夷扇贝; DNA 甲基化; 甲基化敏感扩增多态性; 杂种优势

**中图分类号:** S 917

**文献标识码:** A

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是我国北方传统养殖经济贝类,虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)为原产于日本、俄罗斯远东及朝鲜部分水域的冷水性贝类,以栉孔扇贝为母本,虾夷扇贝为父本进行远缘杂交,已取得成功。杂交子代外形偏向母本,但与栉孔扇贝相比具有生长快、抗逆性强等优点,在夏季高温季节存活力大大提高,显现出较强的杂种优势<sup>[1]</sup>。

关于杂种优势的遗传机理有很多学说,“杂种优势是基因的差异表达所致”是其中的一个<sup>[2-5]</sup>,越来越多的研究表明,在杂种子一代中某些基因确实存在着差异表达,有的是增强表达,有的是减弱表达,二者共同作用,表现出杂种优势<sup>[2,6-7]</sup>。有关基因何时、何地表达以及基因表达程度的调控主要包括甲基化、乙酰化、磷酸化等,其中 DNA 甲基化是真核生物 DNA 最常见的复制后调节方式之一,其通过图式和数量的改变,对

生物遗传信息进行调节<sup>[8]</sup>。Cedar 等<sup>[9]</sup>的研究结果表明,基因组 DNA 甲基化程度及分布与基因表达率显著相关。因此,DNA 胞嘧啶甲基化水平与杂种优势的表现有一定的内在联系。

目前,用于分析 DNA 甲基化的方法较多,甲基化敏感扩增多态性(methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术由于其简便、高效、可靠而得到广泛应用。MSAP 分析是基于选择性 PCR 的一种新技术,是 AFLP 技术的延伸,由 Reyna-López 等<sup>[10]</sup>于 1997 年首次报道,其独特之处是利用两个对 DNA 甲基化敏感程度不同的内切酶(*Hpa* II 和 *Msp* I),分别与一个对 DNA 甲基化不敏感的内切酶(*Eco*RI)一起对基因组 DNA 进行双酶切,然后再接上相应的限制性内切酶的接头,利用接头序列设计引物进行常规 AFLP 分析,通过特异扩增不同的图谱,以辨别哪些位点存在甲基化。目前该技术已经应用于真菌 *Mucor rouxii*,

收稿日期:2010-04-19 修回日期:2010-07-07

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A408);国家科技支撑计划专题(2006BAD01A00);山东省自然科学基金青年基金项目(ZR2009DQ006);青岛市科技计划基础研究项目(09-1-3-12-jch);黄海所基本科研业务费(2009-chb-06)

通讯作者:杨爱国, Tel:0532-85811982, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

*Yarrowia lipolytica*, *Ustilago maydis*<sup>[10]</sup>、水稻 (*Oryza sativa*)<sup>[11]</sup>、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)<sup>[12]</sup>、牛 (*Bos taurus*)<sup>[13]</sup>、猪 (*Sus domesticus*)<sup>[14]</sup>、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)<sup>[15]</sup>等多种生物的基因组 DNA 甲基化研究中。

本研究将 MSAP 技术应用到贝类,首先对表型性状与甲基化水平进行相关性分析,然后比较了亲子代间甲基化水平的差异及甲基化模式的变化,重点讨论了 DNA 胞嘧啶甲基化与杂种优势间的关系,并探讨了远缘杂交过程中杂种优势这一复杂的遗传学现象。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

性成熟的雌性栉孔扇贝与雄性虾夷扇贝均取自山东长岛海区,经杂交产生 F<sub>1</sub>代, F<sub>1</sub>代自交得到 F<sub>2</sub>代。从母本栉孔扇贝、父本虾夷扇贝、F<sub>1</sub>代、F<sub>2</sub>代 4 个群体中分别随机选取 30 个个体作为研究材料,活体运回实验室,取闭壳肌于 -80 °C 保存备用。

### 1.2 DNA 提取

分别提取所取材料肌肉组织的 DNA,用于本实验研究。DNA 提取采用常规的酚-氯仿法,参考《分子克隆实验指南》<sup>[16]</sup>,稍作改动:取材料约 0.1 g,剪碎,放入消化液(475 μL TE、25 μL 10% 的 SDS、5 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K)55 °C 水浴 3 h,然后等体积的饱和酚抽提一次,酚:氯仿:异戊醇混合液(体积比 25:24:1)抽提 2 次,氯仿抽提 1 次;乙醇沉淀,超纯水溶解。1% 的琼脂糖和核酸定量仪检测并测定 DNA 的质量和浓度。

### 1.3 MSAP 分析

MSAP 分析参照 Xiong 等<sup>[11]</sup>的方法,并作适当改动、优化。对于每份 DNA,同时设置 *EcoR* I

+ *Msp* I 和 *EcoR* I + *Hpa* II 两种酶切反应,反应体系包括 400 ng DNA, 3 U *Hpa* II/*Msp* I (Fermentas), 3 U *EcoR* I (Fermentas), 2 μL 10 × Buffer Tango<sup>TM</sup>, 37 °C 水浴 6 h, 65 °C 酶切变性 10 min。连接体系为 20 μL: 5 μL 酶切产物, 50 pmol HM 接头, 10 pmol E 接头, 5 U T<sub>4</sub> DNA Ligase (Fermentas), 4 μL 5 × T<sub>4</sub> DNA Ligase Buffer, 补水至 20 μL, 于 16 °C 连接过夜,产物稀释 10 倍用于预扩增。预扩增体系为 20 μL: 1 μL 稀释连接产物, 20 pmol E<sub>0</sub>和 HM<sub>0</sub>预扩引物, 0.1 U *Taq* DNA Polymerase (Tiangen), 40 pmol Mg<sup>2+</sup>, 4 pmol dNTPs, 2 μL 10 × *Taq* Buffer, 补水至 20 μL, 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共进行 25 个循环, 72 °C 10 min, 产物稀释 30 倍。选择扩增体系为 20 μL: 3 μL 稀释的预扩增产物, 20 pmol HM<sub>n</sub>和 5 pmol E<sub>n</sub>选扩引物, 其它相应组分与预扩增体系内的相同,选扩程序为 94 °C 预变性 5 min, 第一轮扩增为 13 个循环(94 °C, 30 s; 65 °C, 30 s; 72 °C, 1 min), 退火温度每个循环降低 0.7 °C, 降低到 56 °C 为止;第二轮扩增为 27 个循环(94 °C, 30 s; 56 °C, 30 s; 72 °C, 1 min), 72 °C 延伸 5 min。所用接头和引物组合见表 1。(通过对 MSAP 各个条件的优化,筛选出 9 对重复性好、多态性好、条带清晰地选择扩增引物组合用于本实验的研究,9 对引物组合分别是 E<sub>1</sub>HM<sub>4</sub>、E<sub>1</sub>HM<sub>8</sub>、E<sub>2</sub>HM<sub>3</sub>、E<sub>2</sub>HM<sub>5</sub>、E<sub>3</sub>HM<sub>1</sub>、E<sub>3</sub>HM<sub>3</sub>、E<sub>3</sub>HM<sub>6</sub>、E<sub>5</sub>HM<sub>1</sub>、E<sub>5</sub>HM<sub>3</sub>。)

扩增产物与等量的变性上样缓冲液混合后, 95 °C 变性 10 min, 迅速冰浴 5 min, 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 60 W 恒功率电泳 2.5 h, 电泳结束后采用银染法显色。

表 1 所用接头和引物组合  
Tab. 1 List of MSAP primers and adapters used

	<i>EcoR</i> I	<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II
接头 adapters	EA <sub>1</sub> : 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3' EA <sub>2</sub> : 5'-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3'	HMA <sub>1</sub> : 5'-GAT CAT GAG TCC TGC T-3' HMA <sub>2</sub> : 5'-CGA GCA GGA CTC AGA A-3'
预扩引物 preamplification primers	E <sub>0</sub> : 5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'	HM <sub>0</sub> : 5'-ATC ATG AGT CCT GCT CGG G-3'
选扩引物 selective amplification primers	E <sub>1</sub> : 5'-E <sub>0</sub> + ACA-3' E <sub>2</sub> : 5'-E <sub>0</sub> + AGT-3' E <sub>3</sub> : 5'-E <sub>0</sub> + AAC-3' E <sub>4</sub> : 5'-E <sub>0</sub> + GTC-3' E <sub>5</sub> : 5'-E <sub>0</sub> + GCT-3'	HM <sub>1</sub> : 5'-HM <sub>0</sub> + CTGA-3'; HM <sub>2</sub> : 5'-HM <sub>0</sub> + CTGT-3' HM <sub>3</sub> : 5'-HM <sub>0</sub> + CTAT-3'; HM <sub>4</sub> : 5'-HM <sub>0</sub> + CTAC-3' HM <sub>5</sub> : 5'-HM <sub>0</sub> + CTCA-3'; HM <sub>6</sub> : 5'-HM <sub>0</sub> + CTCT-3' HM <sub>7</sub> : 5'-HM <sub>0</sub> + CTTC-3'; HM <sub>8</sub> : 5'-HM <sub>0</sub> + CTTA-3'

#### 1.4 数据统计与分析

同一 DNA 分别用 *Hpa* II 和 *Msp* I 酶切后选扩,根据带的有无会出现 3 种类型的扩增结果<sup>[17]</sup>:(1)都有带,该酶切位点无甲基化;(2)*Hpa* II 酶切后无带而 *Msp* I 酶切后有带,该酶切位点为双链内甲基化,为全甲基化;(3)*Hpa* II 酶切后有带而 *Msp* I 酶切后无带,该酶切位点为单链外甲基化,为半甲基化。统计 50 ~ 1 500 bp 之间的条带,计算各个群体的全甲基化率、半甲基化率及总甲基化率,利用 SPSS 17.0 进行方差分析及多重比较。以栉孔扇贝为材料,研究甲基化与其各性状的相关性,测量栉孔扇贝的壳长、壳宽、壳高、总重、软体重及闭壳肌重等性状,利用 SPSS 17.0 进行相关性分析。

#### 1.5 差异片段的回收和检测

参照 Xiong 等<sup>[11]</sup>的方法,取特异性片段,捣碎,加入 50  $\mu$ L H<sub>2</sub>O,99  $^{\circ}$ C 保温 5 min,37  $^{\circ}$ C 浸泡过夜,离心取上清,用原来的引物组合和反应体系重新选扩,并用 1% 的琼脂糖凝胶进行检测。取 5  $\mu$ L 重新选扩的产物进行酶切反应,反应体系同前,*Hpa* II 酶切反应体系对应 H 泳道回收的片段,*Msp* I 酶切反应体系对应 M 泳道回收的片段,酶切产物与先前的重新选扩产物一起进行琼脂糖电泳。

## 2 结果

### 2.1 甲基化与各性状的相关性

DNA 甲基化水平百分比与各性状表型值的相关性分析结果见图 1。壳宽、总重与甲基化率呈正相关,相关系数分别为 0.195 5、0.242 6,没有达到显著的水平;壳长、壳高、软体重和闭壳肌重 4 个性状表型值与甲基化率均呈负相关的关系,其相关系数分别为 -0.237 3、-0.115 4、-0.211 6、-0.686 8,其中闭壳肌重与甲基化率的相关性达到极显著水平 ( $P < 0.01$ )。由此可见,DNA 甲基化水平和基因的表达有一定的相关性。

### 2.2 亲子代 DNA 甲基化水平

9 对引物对 4 个群体的扩增结果表明,亲子代间 DNA 甲基化水平有较大的差异(图 2)。父本群体的甲基化率平均为 32.79%,其中全甲基化率为 29.01%,半甲基化率为 3.78%;母本群体的甲基化率平均为 24.13%,全甲基化率为 19.10%,半甲基化率为 5.03%;F<sub>1</sub> 代的甲基化率平均为 19.98%,全甲基化率为 16.77%,半甲基

化率为 3.21%;F<sub>2</sub> 代的甲基化率为 20.18%,全甲基化率为 17.27%,半甲基化率 2.91%。方差分析和多重比较的结果为,F<sub>1</sub> 代和 F<sub>2</sub> 代的 DNA 甲基化水平无显著差异,F<sub>2</sub> 代的甲基化率有升高的趋势;子代与双亲之间的 DNA 甲基化水平存在极显著差异 ( $P < 0.01$ )。

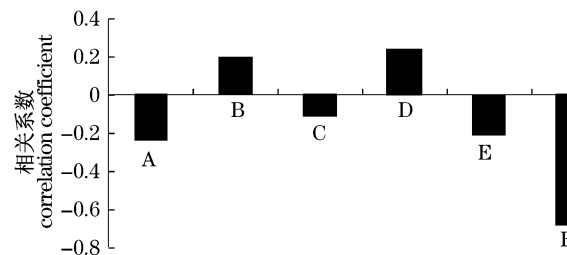


图 1 DNA 甲基化与表型性状的相关性

A: 壳长, B: 壳宽, C: 壳高, D: 总重, E: 软体重, F: 闭壳肌重。

Fig. 1 Correlation between methylation rates and phenotypic traits in *C. farreri*

A: the shell length, B: the shell width, C: the shell height, D: the gross weight, E: the weight of soft body, F: the weight of adductor muscle.

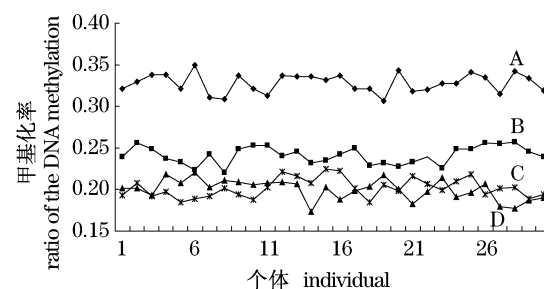


图 2 亲子代 DNA 甲基化水平的差异

A、B、C、D 分别为虾夷扇贝、栉孔扇贝、F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 4 个群体的所有个体的 DNA 甲基化率,每一个点代表一个个体用 9 对引物扩增后平均的甲基化率。

Fig. 2 Methylation rates of parental lines and hybrid

A: *P. yessoensis* group; B: *C. farreri*; C: F<sub>1</sub> group; D: F<sub>2</sub> group.

Each group chose 30 individuals; each site stands for the average methylation rate of 9 pairs of primers.

### 2.3 子一代甲基化模式的变化

进一步比较了亲本和 F<sub>1</sub> 之间扩增带型差异,这些差异带型主要分为 4 种类型(表 2)。第一种类型(A 类)是亲本和 F<sub>1</sub> 都表现为相同的甲基化。9 对引物一共检测出 24 个位点上亲本和 F<sub>1</sub> 存在相同的甲基化,其中 17 个属内胞嘧啶甲基化,7 个是外胞嘧啶半甲基化。在亲本和 F<sub>1</sub> 间也检测到一些甲基化多态性扩增带,这些多态性又分为 3 种类型

(表 2, B, C 和 D 类): B 类甲基化多态性反映的是两个亲本在相同位点的甲基化差异而且其中一个亲本的带型(有扩增带的亲本)与  $F_1$  一致(即表现为显性), B 类甲基化位点约占总甲基化位点的 46.5%。C 类甲基化差异带型反映的是一些来源于  $EcoRI + MspI$  酶切的带出现在 1 个或 2 个亲本中

但不出现在  $F_1$  (即表明这些酶切位点在  $F_1$  中甲基化增强)。而 D 类甲基化差异带型则反映了在  $F_1$  中甲基化减弱, 即亲本中只有在一种酶切( $EcoRI + MspI$ )中有扩增而在  $F_1$  中两种酶切中都有扩增。C 类和 D 类甲基化多态性的比例不高, 各占总甲基化位点的 19.3% 和 6.9%。

表 2 亲代间甲基化模式的差异

Tab. 2 Patterns of cytosine methylation in the *C. farreri*, *P. yessoensis* and their  $F_1$  hybrid

模式 patterns	虾夷扇贝 <i>P. yessoensis</i>		栉孔扇贝 <i>C. farreri</i>		$F_1$		位点 number of sites
	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	
A1	-	+	-	+	-	+	17
A2	+	-	+	-	+	-	7
B1	-	+	-	-	-	+	3
B2	-	-	-	+	-	+	14
B3	+	+	-	+	+	+	2
B4	-	+	+	+	+	+	22
C1	-	+	-	-	-	-	11
C2	-	-	-	+	-	-	5
C3	-	+	-	+	-	-	1
D1	-	+	-	-	+	+	0
D2	-	-	-	+	+	+	6

注:“-”代表此酶切位点没有带,“+”代表此酶切位点有带。

Notes:“-”indicates that no band was found at the site; “+”indicates that a band was found at the site.

#### 2.4 差异片段的回收及检测

如果聚丙烯酰胺凝胶上的条带是特异性的扩增,则应该可以回收并被再次扩增出来,即在琼脂糖凝胶上是一条明亮的条带。45 条特异性条带经回收再扩增,其中 41 再扩增条带的电泳条带为一条明亮的带(图 3-A),说明扩增出的条带都是特异性的,能用于后面的实验分析。有 4 条再扩

增条带的电泳结果是两条带,一条比较亮,另一条比较暗且片段较短,对其重新进行扩增,结果则是一条明亮的带,说明先前较暗的带可能是操作上的原因,产生了引物二聚体。重新选扩的产物经酶切后,结果仍为一条明亮的带(图 3-B),说明第一步的酶切反应完全,条带是特异性扩增,可以应用于接下来的实验分析。

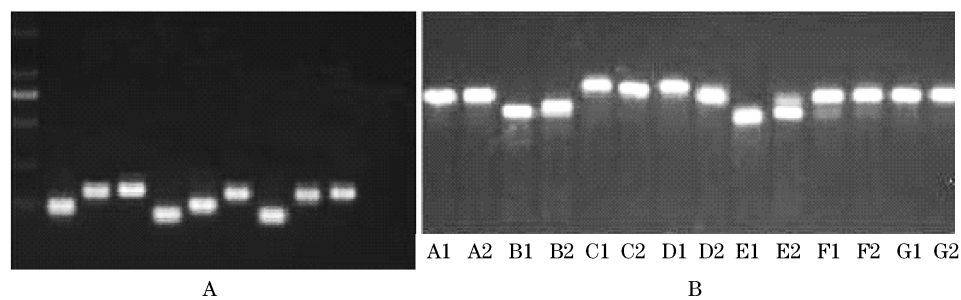


图 3 特异性条带回收、扩增结果

A: 重新选扩产物电泳图; B: 重新选扩酶切电泳图, 其中, A1、B1、C1、D1、E1、F1、G1 为重新选扩产物对照组, A2、B2、C2、D2、E2、F2、G2 为酶切产物组。

Fig. 3 Result of re-amplified action

A: re-amplified action; B: re-amplified action (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2) and re-digestion (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1).

### 3 讨论

MSAP 技术简单、成本低、效率高,是研究基因表达与 DNA 甲基化的相互关系的一个十分有效的方法,在水稻<sup>[11]</sup>中 DNA 甲基化产生的多态性得到了 Southern 杂交的验证;在拟南芥<sup>[12]</sup>、猪<sup>[14]</sup>的研究中,通过序列测定和比较分析证明了 MSAP 检测结果的有效性和可靠性;进行数据处理时,并不计算“遗传多样性”、“遗传距离”等遗传学参数,因此并不涉及“等位基因”、“非等位基因”等概念,限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hpa* II 只对“CCGG”位点进行酶切,实验材料的纯合与否对其活性并没有影响,对带型也就无影响,最后只是计算发生甲基化的“CCGG”位点的比率,因此,无论是纯合性较高的作物材料还是杂合性较高的水产材料,其结果的科学性、准确性、可靠性并没有区别。MSAP 技术不仅广泛应用于二倍体材料,甚至还被用来检测多倍体生物基因组的甲基化水平,王春国等<sup>[18]</sup>利用 MSAP 技术研究了二倍体、三倍体、四倍体西瓜的 DNA 甲基化率的变化;孟庆磊<sup>[19]</sup>利用 MSAP 技术研究了二倍体、异源三倍体扇贝甲基化率的变化。因此本文应用 MSAP 技术得到的结果是科学、准确、可靠的,是能用于后续分析的。

从我们的试验结果看,壳宽、总重与甲基化率呈正相关,壳长、壳高、软体重和闭壳肌重 4 个性状表型值与甲基化率均呈负相关的关系,其中闭壳肌重与甲基化率的相关性达到显著水平( $P < 0.01$ ),说明甲基化含量对一些重要生产性状具有一定的效应,但对于不同的性状作用方向不同。表型性状是基因表达的结果,DNA 甲基化与表型值有一定的相关性,也就说明 DNA 甲基化与参与表型性状形成的基因的表达有相关性,某些性状表现出杂种优势,与 DNA 甲基化的变化可能有内在联系。甲基化水平与杂种优势的表现性状之间的相关性,也被一些学者所证实,如万亚琴<sup>[13]</sup>从群体水平对重庆山地黄牛及其  $F_1$  代群体进行了亲子代及不同杂交组合间甲基化差异与杂种优势关系的探讨,结果表明,甲基化水平对体斜长、胸围、体重等性状有显著或极显著影响,对体高、体直长、管围无显著影响;蒋曹德<sup>[14]</sup>对猪个体基因组 DNA 甲基化的差异水平与杂种优势进行关联分析,发现杂种一代同一位点甲基化的变化

对不同性状作用不同,不同位点相同的甲基化的变化对不同性状作用也不同;梁秋菊<sup>[20]</sup>对猪亲本及其杂种 DNA 甲基化差异与杂种优势的关系研究发现,DNA 甲基化率与眼肌高、眼肌面积的相关性极显著,与板油重、6~7 肋骨间背膘厚的相关性显著,与内脂率的相关性接近显著水平。

本研究的另外一个目的是从甲基化的角度分析杂种优势的遗传机理。现在很多学者认为,杂种优势是不同的基因差异表达的结果<sup>[2-5]</sup>,在新的体系中,亲本的基因型彼此协调、相互促进,有效地控制基因的表达。Romagnoli 等<sup>[3]</sup>首先研究了基因表达与玉米杂种优势的关系,认为杂种优势产生与杂交种中许多基因的差异表达有关,因为有 33% 的差异表达产物在杂交种中更丰富或特异表达。Sun 等<sup>[7]</sup>以两个时期叶片(拔节期叶片和抽穗期旗叶)为材料,分析了一套双列杂交组合的 20 个杂交种及其亲本之间的基因差异表达模式,并与 9 个农艺性状杂种优势进行了相关分析,结果发现,在两个时期,杂交种和亲本之间都存在明显的基因差异表达。也有学者认为,杂合子在新的遗传体系中产生了不同于亲本品种的性状表现,这种性状表现可能与亲本基因在杂合状态下表达调控方式的改变有关<sup>[21]</sup>,调控方式的改变,其结果也是基因表达的改变。而越来越多的研究表明 DNA 甲基化对基因的表达具有调控作用<sup>[22]</sup>。因此 DNA 甲基化状态在杂种与亲本的变化和杂种表现的关系也受到了许多学者的关注。研究发现杂种一代甲基化程度比纯系低<sup>[4-5]</sup>,由此认为甲基化降低是杂交一代的杂种优势表现的原因之一。

本研究发现,杂交子代甲基化率明显比亲本任何一方都要低,这和万亚琴<sup>[13]</sup>、蒋曹德<sup>[14]</sup>等的结果相似。栉孔扇贝和虾夷扇贝的甲基化率相差较大,理论上二者杂交,子代的甲基化率应该处于二者之间,但实际结果是比二者都低;子一代自交得到的子二代,其甲基化率与子一代的并无显著差异,这就说明,子一代甲基化率的降低是发生在杂交过程中的,而自交并没有明显改变其甲基化率。从甲基化模式的变化看,在子一代中,去甲基化和超甲基化都有发生,但去甲基化位点多于超甲基化位点,说明在杂合子中,来自双亲的甲基化模式进行了丰富的调整,在保持大多数稳定传递的同时,又进行了复杂的甲基化与去甲基化变

化,在环境的参与下最终形成一个适应生存并综合表现双亲性状的状态。

一般说来,DNA 甲基化与基因表达呈负相关,不仅启动子区高甲基化与基因表达呈负相关,基因内部的甲基化与基因表达也存在着弱的负相关,而启动子区低甲基化与基因表达呈正相关<sup>[9]</sup>。应用 MSAP 检测甲基化位点时,蒋曹德<sup>[14]</sup>对序列分析研究表明,显著影响杂种表现的甲基化位点位于 CpG 岛,而且位于基因启动子中。熊立仲<sup>[6]</sup>对那些对杂种优势有效应的甲基化片段进行序列分析并推测 DNA 甲基化可能主要发生在非编码区,特别是调控区,显然这对调控有关杂种优势的基因更有效。也就说明本研究得到的甲基化位点很可能也是位于调控区的,去甲基化能使基因大量表达,超甲基化能使基因降低表达,但是大量表达的基因要比降低表达的基因多,整体上是子一代相对于亲本,其基因是大量表达的,因而显现出杂种优势,这也和从基因表达角度研究得出的结果相吻合。

研究表明,在动物中,表观遗传通过有丝分裂传递时是不变的,但是在配子形成、合子形成、胚胎发育过程中,表观遗传是发生改变的,具体变化是“擦除-重建”<sup>[23-25]</sup>,也就是说杂交子一代甲基化的降低是发生在重建过程中,至于去甲基化发生的机制则应该是以后研究的重点,Grewal 等<sup>[26]</sup>初步研究表明 DNA 甲基化的改变是组蛋白脱乙酰基酶、组蛋白转甲基酶和其他的结构蛋白共同作用于端粒和着丝点的结果。当然,杂种优势的表现还有基因间的相互作用及外部环境的作用等其他因素共同作用,并不能只从 DNA 甲基化的角度就完全弄明白杂种优势的遗传机理,以后还要做大量的工作才有可能彻底阐明杂种优势这一复杂的遗传现象。

子一代自交得到的子二代,两个群体甲基化水平虽然没有显著的差异,但 F<sub>2</sub> 的甲基化水平已有升高的趋势,Nakamura 等<sup>[27]</sup>认为,自交衰退是由于高的甲基化率而导致基因表达的降低所致,而杂种优势的产生是低的甲基化率使某些基因大量表达。在上个世纪,由于对栉孔扇贝的养殖没有进行科学的管理,经过多代的自交、近交,其甲基化得到累积、提高,某些基因的表达就会受到影响甚至被抑制,导致其种质下降,加之环境的影响,出现了大规模死亡的现象,造成了巨大的损

失。而将栉孔扇贝与虾夷扇贝杂交,得到的子代具备双亲的一些优良性状,生长、抗逆性等方面的性状都得到显著提高,创造了很好的经济效益。这就提示我们,在进行育种时,应制定科学的育种计划,将选择育种和杂交育种结合起来,在对优良性状进行提纯时,适时对其复壮,这对种质的保持及可持续发展有重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] 杨爱国,王清印,刘志鸿,等. 栉孔扇贝与虾夷扇贝杂交及子一代的遗传性状[J]. 海洋水产研究, 2004,25(5):1-5.
- [2] Leonardi A, Damerval C, Hebert Y, *et al.* Association of protein amount polymorphism (PAP) among maize lines with performances of their hybrids [J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 1991, 82: 552-560.
- [3] Romagnoli S, Maddaloni M, Livini C. Relationship between gene expression and hybrid vigor in primary root tips of young maize plantlets [J]. Theor Appl Genet, 1990, 80(6):767-775.
- [4] Tsaftaris A, Kafka M, Polidoros A, *et al.* Epigenetic changes in maize DNA and heterosis [J]. Cimmyt, 1997:112.
- [5] Tsaftaris S. Molecular aspects of heterosis in plants [J]. Physiologia Plantarum, 2006, 94:362-370.
- [6] 熊立仲. 基因表达水平上水稻杂种优势的分子生物学基础研究[D]. 武汉:华中农业大学, 1999.
- [7] Sun Q, Wu L, Ni Z, *et al.* Differential gene expression patterns in leaves between hybrids and their parental inbreds are correlated with heterosis in a wheat diallel cross [J]. Plant Science, 2004, 166: 651-657.
- [8] 宫时玉,蒋曹德,邓昌彦. DNA 甲基化及其生物学功能 [J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(6): 651-657.
- [9] Cedar H. DNA methylation and gene activity [J]. Cell, 1988, 53(1):3-4.
- [10] Reyna-López G E, Simpson J, Ruiz-Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphism [J]. Mol Gene Genet, 1997, 253(6):703-710.
- [11] Xiong L Z, Xu C C, Saghai M A, *et al.* Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique [J]. Mol Gen

- Genet,1999,261(3):439-446.
- [12] Cervara M T, Ruin-Garcia L, Martinez-Zapater J M. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers [J]. Mol Genet Genomics, 2002, 268(4):543-552.
- [13] 万亚琴. DNA 甲基化与肉牛杂种优势关系的初步研究[D]. 重庆:西南大学,2008.
- [14] 蒋曹德. 猪 DNA 甲基化与杂种表现的关系及遗传多样性分析[D]. 武汉:华中农业大学,2004.
- [15] 曹哲明,丁炜东,俞菊华. 草鱼全同胞鱼苗不同个体甲基化位点的差异[J]. 动物学报,2007,53(6):1083-1088.
- [16] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002:463-471.
- [17] 王子成,李忠爱,李锁平. MSAP 技术及其在植物上的应用[J]. 生物技术通报,2006(增刊):195-196.
- [18] 王春国,古瑜,陈成彬,等. 不同倍性西瓜基因组 DNA 甲基化水平与模式的 MSAP 分析[J]. 分子细胞生物学报,2009,42(2):118-126.
- [19] 孟庆磊. 扇贝异源多倍体与四倍体培育技术研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2009.
- [20] 梁秋菊. 猪亲本及其杂种 DNA 甲基化差异与杂种优势的关系[D]. 武汉:华中农业大学,2006.
- [21] 孙其信. 农作物杂种优势机理研究及展望[J]. 作物杂志,1998(4):31.
- [22] Finnegan E, Peacock W, Dennis E. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2000, 10:217-223.
- [23] Riddle N C, Richards E J. The control of natural variation in cytosine methylation in *Arabidopsis* [J]. Genetics, 2002, 162(1):355-363.
- [24] Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development [J]. Development, 1987, 99(3):371.
- [25] Cubas P, Vincent C, Coen E. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry [J]. Nature, 1999, 401:157-161.
- [26] Grewal S, Elgin S. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2002, 12:178-187.
- [27] Nakamura S, Hosaka K. DNA methylation in diploid inbred lines of potatoes and its possible role in the regulation of heterosis [J]. Theor Appl Genet, 2010, 120(2):205-214.

## Analysis of *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis* and their offspring using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP)

YU Tao<sup>1,2</sup>, YANG Ai-guo<sup>1\*</sup>, WU Biao<sup>1</sup>, ZHOU Li-qing<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Yellow Sea Fisheries

Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** DNA methylation is related to a number of epigenetic phenomena and plays an important role in gene expression. In this study, the technique of methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) was used for the first time to analyze the DNA cytosine methylation of *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis*,  $F_1$  and  $F_2$ , and we made a concrete analysis between the methylation ratio and phenotypic traits, assessed the extent and pattern of cytosine methylation between the parents and the offspring, and emphasized the discussion on the molecular basis of heterosis in terms of the DNA methylation. The results showed that, (1) DNA methylation was negatively related to the shell length, shell height, soft body weight and adductor muscle weight, but positively related to the shell wideness and gross weight, and there was great correlativity between the DNA methylation and the adductor muscle weight ( $P < 0.01$ ); (2) there was a significant difference between the parents and the offspring; the methylation ratio of 5'-CCGG sites was 32.79% in *P. yessoensis*, 24.13% in *C. farreri*, 19.98% in  $F_1$ , and 20.18% in  $F_2$  respectively, the methylation ratio of  $F_1$  was less than the parents and there was no significant difference between  $F_1$  and  $F_2$ , the alteration of the DNA methylation was the result of the cross of the parents; four classes of MSAP patterns, A, B, C and D, among hybrids and their parents were detected; pattern A, methylation levels were not changed in both parents and  $F_1$ ; pattern B, demethylation, both or one of the parent was methylated, but there was no methylation in the same site in  $F_1$ ; pattern C, hypermethylation, the methylation level in  $F_1$  was higher than those in both parents; pattern D, hypomethylation, methylation ratio in  $F_1$  was lower than those in both parents. The patterns of the  $F_1$  DNA methylation experienced change and adjustments in order to coordinate the expression of the gene from the parents, and the DNA methylation has something to do with the expression of heterosis.

**Key words:** *Chlamys farreri*; *Patinopecten yessoensis*; DNA methylation; methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP); heterosis

**Corresponding author:** YANG Ai-guo. E-mail: yangag@ysfri.ac.cn