

低温对罗非鱼基因组 DNA 甲基化的影响

朱华平¹, 卢迈新^{1*}, 黄樟翰¹, 高风英¹, 可小丽¹,
刘志刚¹, 李庆勇^{1,2}, 刘玉姣^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室,广东 广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

摘要:以经过连续多代抗寒选育获得的尼罗罗非鱼耐寒品系为实验材料,采用 DNA 甲基化敏感扩增多态性(methylation sensitive amplified polymorphism,MSAP)分析方法从全基因组水平上探讨了低温适应对罗非鱼 DNA 序列中 CCGG 位点的甲基化水平的影响。结果显示,选用的 18 对选择性扩增引物共检测到 849 个位点。耐寒品系检测到的位点数为 411 个,对照组为 438 个,其中发生甲基化的位点数分别为 72 和 104 个,总甲基化率分别为 17.52% 和 23.74%;全甲基化位点分别为 37 个和 65 个,全甲基化率分别为 9.00% 和 14.84%;半甲基化位点分别为 35 个和 39 个,半甲基化率分别为 8.52% 和 8.90%。结果分析表明,尼罗罗非鱼耐寒品系的总甲基化水平、全甲基化水平和半甲基化水平较对照组均有一定程度的下降。与对照组相比,尼罗罗非鱼耐寒品系基因组 DNA 甲基化总体水平下降了 6.22%,其中以全甲基化位点变异为主,其下降幅度比例明显,为 5.84%。由此可见,经过连续多代的低温胁迫可导致尼罗罗非鱼 DNA 甲基化水平发生改变,发生了去甲基化反应,表现为基因组甲基化程度降低的特征,说明了 DNA 甲基化与罗非鱼抗寒性反应密切相关。

关键词:尼罗罗非鱼;低温;DNA 甲基化;甲基化敏感扩增多态性

中图分类号:Q 784; S 917.4

文献标志码:A

DNA 甲基化作为细胞内普遍发生的一种修饰过程和反应,是基因组 DNA 的一种主要表观遗传修饰形式,也是调节基因功能的重要手段^[1]。DNA 甲基化的生物学作用主要体现在维持基因组的稳定性和基因表达调控 2 个大方面。DNA 甲基化的状态与机体内的生命现象密切相关,如基因组和染色体结构的稳定^[2]、X 染色体失活^[3]、基因组印迹^[4-5]、基因的转录调节和转座子元件的活性和基因沉默^[6]等。DNA 甲基化状态的改变可导致基因结构和功能改变,可促进新的表型产生,并且这种改变又可随细胞的有丝分裂和减数分裂遗传下去^[7]。近年来的一些研究表明,逆境(如温度胁迫、盐度胁迫)对 DNA 的甲基化水平会造成影响,可以诱导基因组产生 DNA

甲基化多态性,而且许多受甲基化变化诱导的基因同胁迫反应有关,说明了 DNA 甲基化参与环境胁迫下基因的表达调控过程^[8]。DNA 甲基化作为近年来表观遗传学研究领域最为关注的热点之一^[9],将为农业带来重大影响,为选择适应特定环境的生物等育种工作提供帮助。

罗非鱼作为世界性的重要养殖鱼类之一,在国际淡水鱼贸易中已跃居第 3 位,仅次于鲑鱼和鳟鱼。但罗非鱼属热带鱼类,对低温的耐受能力差,在中国大部分地区不能自然越冬,而且由于对低温环境敏感,常常导致罗非鱼生长缓慢乃至大量死亡,耐寒能力差一直是制约罗非鱼产业发展的瓶颈之一。近年来在全球变暖的大背景下,中国极端灾害性天气频发,使得罗非鱼养殖业面临

收稿日期:2013-03-11 修回日期:2013-05-24

资助项目:国家自然科学基金项目(31001108);中国水产科学研究院基本科研业务费(2012A0404);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-49);广东省自然科学基金项目(9451038001003595)

通信作者:卢迈新,E-mail:mx-lu@163.com

新的考验。特别是 2008 年的冰冻灾害给中国南方多个省市渔业生产造成巨大经济损失,其中广东省有 17 万 t 养殖罗非鱼被冻死,约占全省罗非鱼年产量的四分之一。因此,开展罗非鱼耐寒性相关研究,提高其耐寒能力,对于降低养殖成本,提高养殖效益,促进罗非鱼产业的可持续健康发展具有十分重要的意义。

罗非鱼具有广泛的生态适应性,在基因组进化和性别决定分化等研究方面已得到广泛的关注^[10-11]。关于罗非鱼基因组 DNA 甲基化的研究以及温度胁迫对 DNA 甲基化水平有何影响,迄今鲜见报道。本研究应用 DNA 甲基化敏感扩增多态性 (methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP) 技术检测和分析本实验室经多年选育得到的尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 耐寒品系基因组 DNA 甲基化水平,为研究尼罗罗非鱼抗寒性状与基因组 DNA 甲基化变化之间的关系以及从 DNA 水平上揭示罗非鱼对低温胁迫的反应机制提供一定的理论依据,探索 DNA 甲基化在罗非鱼抗寒选育中的应用潜力,为鱼类遗传改良研究提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用尼罗罗非鱼由珠江水产研究所高要水产种质工程基地提供,该实验材料为本课题组采用连续多代的抗寒选育而获得的耐寒品系 (F_8),体质量为 (73.89 ± 2.21) g。对照组为从耐寒品系选育的基础群体中随机采集的样品 (即 F_0),体质量为 (80.43 ± 3.18) g。通过室内低温胁迫实

验 (每 12 h 降温 1 °C) 表明,耐寒品系的死亡温度范围为 7.3 ~ 8.5 °C,半致死低温 LT_{50} 为 7.81 °C。对照组的死亡温度范围为 8.6 ~ 9.8 °C,半致死低温 LT_{50} 为 9.26 °C。通过微卫星分子标记技术对耐寒品系和对照组的遗传差异分析表明,它们之间的遗传分化系数 F_{st} 值为 0.032 17 ($F_{st} < 0.05$),表明耐寒品系和对照组群体间的遗传分化程度很小 ($P > 0.05$)。每个群体各取 20 尾剪取鳍条提取基因组 DNA。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用天根生物有限公司的 Universal Genomic DNA Extraction Kit 提取基因组 DNA,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,使用紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度,经 TE 溶液 (pH 8.0) 稀释,将各处理样品的浓度调整成一致,于 -20 °C 保存备用。

1.3 甲基化敏感扩增多态性 (MSAP) 分析

甲基化敏感扩增多态性 (MSAP) 实验步骤主要参照 Xiong 等^[12] 的方法。基因组 DNA 分别利用限制性内切酶双酶切 (*EcoR*I/*Hpa*II 和 *EcoR*I/*Msp*I),酶切体系为 15 μ L,其中含有 300 ng 基因组 DNA,*EcoR*I、*Hpa*II 和 *Msp*I 各 3 U,3 μ L 5 \times 酶切缓冲液 (0.05 mol/L Tris-HCl、0.05 mol/L MgAc₂、0.25 mol/L KAc)。37 °C 水浴酶切 8 h。酶切结束后,采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果。随后在酶切产物中分别加入 *EcoR*I 接头引物 50 pmol,*Hpa*II-*Msp*I 接头引物 5 pmol,*T*₄ DNA 连接酶 1.5 U,2 μ L *T*₄ DNA 连接酶缓冲液,补充双蒸水至 20 μ L,于 16 °C 连接过夜。接头引物序列见表 1。连接产物稀释 10 倍后用于预扩增。

表 1 接头、预扩增和选择性扩增引物序列
Tab.1 Adapters,pre-and selective amplification primer sequences

引物 primer	<i>EcoR</i> I (5'-3')	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I (5'-3')
接头 1 adapter1	CTCGTAGACTGCGTACC	GATCATGAGTCCTGCT
接头 2 adapter2	AATTGGTACGCAGTC	CGAGCAGGACTCATGA
预扩增引物 pre-amplification primer	GACTGCGTACCAATTCA	ATCATGAGTCCTGCTCGGT
	E1:GACTGCGTACCAATTCAAC	HM1:ATCATGAGTCCTGCTCGGTAA
	E2:GACTGCGTACCAATTCAAG	HM2:ATCATGAGTCCTGCTCGGTAC
	E3:GACTGCGTACCAATTCAAT	HM3:ATCATGAGTCCTGCTCGGTAG
选扩引物 selective amplification primer	E4:GACTGCGTACCAATTCACA	HM4:ATCATGAGTCCTGCTCGGTCA
	E5:GACTGCGTACCAATTCACC	HM5:ATCATGAGTCCTGCTCGGTCC
	E6:GACTGCGTACCAATTCAGA	HM6:ATCATGAGTCCTGCTCGGTCT
	E7:GACTGCGTACCAATTCAGC	HM7:ATCATGAGTCCTGCTCGGTTA
	E8:GACTGCGTACCAATTCATA	HM8:ATCATGAGTCCTGCTCGGTGA

预扩增反应体系 20 μL , 其中含连接产物稀释液 1 μL , 1 \times PCR Buffer, 200 μmol dNTPs, 预扩增引物(序列见表 1)各 10 μmol , 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶。扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共进行 20 个循环。预扩增产物稀释 20 倍用于选择性扩增, 选择性扩增反应体系与预扩增体系相同。PCR 程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ (每个循环下降 0.7 $^{\circ}\text{C}$) 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共进行 10 个循环, 接着 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共进行 25 个循环。取 3 μL 扩增产物与等量的 DNA 上样缓冲液混合后, 沸水浴变性 5 min, 迅速放置冰上 2 min, 进行 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后采用银染法显色。为确保后续数据分析的可靠性, 对于每对选扩引物进行 3 次独立扩增试验, 选取重复性高且清晰的条带用于后续数据分析。

1.4 MSAP 数据分析

对由扩增重复性高的选扩引物所产生的聚丙烯酰胺电泳条带进行分析。同一位点, 有带计为“1”, 无带计为“0”, 统计位于 50 ~ 1 000 bp 之间的清晰可辨条带并对带型进行分析。同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 都可以识别和切割基因组内的 5'-CCGG-3' 核苷酸位点(真核生物中主要的甲基化位点), 但对甲基化的敏感程度不同。*Hpa* II 对甲

基化敏感, 如果双链中内外侧胞嘧啶都甲基化及任一个胞嘧啶甲基化(双链甲基化), 则不能识别并切割($\text{C}^{\text{m}}\text{CGG}/\text{GGC}^{\text{m}}\text{C}$), 但能切割半甲基化序列(只有 1 条链上胞嘧啶甲基化, 即 $^{\text{m}}\text{CCGG}/\text{GGCC}$)。而 *Msp* II 能识别和切割单链或双链上内侧胞嘧啶甲基化($\text{C}^{\text{m}}\text{CGG}/\text{GGC}^{\text{m}}\text{C}$) 序列, 但不能切割半甲基化序列($^{\text{m}}\text{CCGG}/\text{GGCC}$)。不论是 *Hpa* II 还是 *Msp* I 与 *EcoR* I 组合酶切后, 所扩增出来的每条片段, 都代表一个 5'-CCGG-3' 的识别位点, 由于二者对该位点胞嘧啶甲基化的反应不同, 经 PCR 反应扩增出多态性片段就反映出该位点的甲基化状态及程度。只在 *EcoR* I / *Hpa* II 双酶切样品中出现的扩增条带代表一个半甲基化位点, 只在 *EcoR* I / *Msp* I 双酶切样品中出现的扩增条带代表一个全甲基化位点, 它们的扩增条带总和为甲基化位点数。在 2 组中都出现的扩增条带计为非甲基化位点数。

2 结果

2.1 MSAP 图谱分析

从 32 对 *EcoR* I + 3N 和 *Hpa* II / *Msp* I + 3N 的选择性扩增引物组合中, 优选出 18 对重复性好、条带清晰的引物组合, 进行 MSAP 选择性扩增, 扩增展现一定的多态性(图 1)。在 PAGE 胶

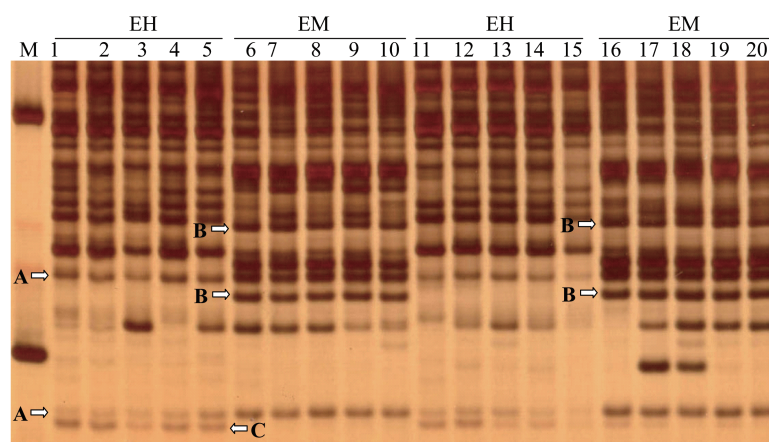


图 1 尼罗罗非鱼基因组 DNA 甲基化 MSAP 选择性扩增图谱(引物组合为 *EcoR* I + AAC 和 *Hpa* II / *Msp* I + TAA)

M. DNA 分子量标准; 1 ~ 10 为罗非鱼耐寒品系样品, 11 ~ 20 为对照组罗非鱼样品; 1 ~ 5 和 11 ~ 15 为 *EcoR* I / *Hpa* II (EH) 双酶切样品, 6 ~ 10 和 15 ~ 20 为 *EcoR* I / *Msp* I (EM) 双酶切样品。A. 非甲基化位点; B. 全甲基化位点; C. 半甲基化位点

Fig. 1 Genomic DNA MSAP patterns of Nile tilapia amplified by primer combination *EcoR* I + AAC and *Hpa* II / *Msp* I + TAA

M. the DNA molecular weight marker; Lanes 1 - 10 represent samples from cold tolerant Nile tilapia; Lanes 11 - 20 represent samples from the control. 1 - 5 and 11 - 15; *Hpa* II + *EcoR* I double digestion; 6 - 10 and 15 - 20; *Msp* I + *EcoR* I double digestion. A. non-methylated sites; B. full-methylated sites; C. hemi-methylated sites

上得到的谱带数即是被检测到的 CCGG 位点数,可出现 4 种谱带模式:(1)都有扩增带,代表该位点无甲基化;(2) *Hpa* II/*Eco*R I 酶切后扩增无带而 *Msp* I/*Eco*R I 酶切后扩增有带,代表该位点为双链内甲基化,即 CCGG 位点双链内侧的胞嘧啶甲基化,称为全甲基化(C^m CCGG);(3) *Hpa* II/*Eco*R I 酶切后扩增有带而 *Msp* I/*Eco*R I 酶切后扩增无带,代表该位点为单链外甲基化,即 CCGG 位点单链外侧的胞嘧啶甲基化,称为半甲基化

(m CCGG);(4)都无带,有 3 种情况,代表该位点存在双链内外侧甲基化、双链外甲基化或无 CCGG 序列。

2.2 基因组 DNA 甲基化水平分析

采用上述带型判别方法统计甲基化位点的数量,18 对引物共扩增出 849 个位点,其中耐寒品系全甲基化位点为 37 个,半甲基化位点为 35 个。对照组罗非鱼全甲基化位点为 65 个,半甲基化位点为 39 个(表 2)。

表 2 18 对 MSAP 引物组合在尼罗罗非鱼耐寒品系和对照组中的甲基化检测结果
Tab. 2 Genomic DNA methylation bands amplified using 18 pairs of primer combinations in cold tolerance Nile tilapia and the control Nile tilapia

引物组合 primer combination	甲基化位点数 number of methylated site	耐寒品系尼罗罗非鱼 cold tolerance Nile tilapia		对照组 the control	
		半甲基化位点 hemi-methylated site	全甲基化位点 fully methylated site	半甲基化位点 hemi-methylated site	全甲基化位点 fully methylated site
1 (E1 + HM1)	22	6	5	3	8
2 (E2 + HM3)	12	1	2	4	5
3 (E3 + HM6)	16	2	3	2	9
4 (E3 + HM7)	8	1	2	1	4
5 (E4 + HM2)	8	2	1	2	3
6 (E4 + HM6)	10	2	3	3	2
7 (E4 + HM8)	9	2	1	2	4
8 (E5 + HM4)	6	1	1	3	1
9 (E5 + HM5)	9	0	3	1	5
10 (E6 + HM1)	11	3	4	2	2
11 (E6 + HM3)	6	0	2	2	2
12 (E6 + HM8)	9	3	1	3	2
13 (E7 + HM3)	8	3	2	0	3
14 (E7 + HM5)	7	1	2	2	2
15 (E8 + HM1)	7	1	0	2	4
16 (E8 + HM2)	5	2	0	2	1
17 (E8 + HM5)	7	3	1	2	1
18 (E8 + HM8)	16	2	4	3	7
总计 total	176	35	37	39	65

结合未发生甲基化的 5'-CCGG-3' 位点数量, DNA 的甲基化水平(表 3)。计算了耐寒品系罗非鱼和对照组罗非鱼基因组

表 3 耐寒品系罗非鱼和对照组罗非鱼基因组 DNA 甲基化水平
Tab. 3 Genomic DNA methylation level of cold tolerance Nile tilapia and the control Nile tilapia based on MSAP analysis

实验材料 material	非甲基化位点 none-methylated site	半甲基化位点 hemi-methylated site	全甲基化位点 fully methylated site	甲基化位点合计 total of methylated sites
尼罗罗非鱼耐寒品系 cold tolerance Nile tilapia	339(82.48%)	35(8.52%)	37(9.00%)	72(17.52%)
对照组 the control	334(76.26%)	39(8.90%)	65(14.84%)	104(23.74%)

对照组罗非鱼基因组 DNA 甲基化分析表明(表 3),基因组中非甲基化位点数为 334 个,占总检测条带数的 76.26%。总的甲基化水平为 23.74%,其中,完全甲基化位点占 14.84%,半甲基化位点占 8.90%。罗非鱼耐寒品系基因组的非甲基化位点数为 339 个,占总检测条带数的 82.48%,而总的甲基化率为 17.52%,其中完全甲基化位点占 9.00%,半甲基化位点占 8.52%。与对照组相比,尼罗罗非鱼耐寒品系基因组的半甲基化和全甲基化率及总甲基化率均存在下降的现象,总甲基化率下降了 6.22%,其中以全甲基化率下降为主,达到 5.84%。方差分析表明,耐寒品系与对照组的总甲基化率存在显著性差异($P < 0.01$)。

3 讨论

近年来的研究表明,DNA 甲基化是基因组 DNA 的一种主要表观遗传修饰形式,它可以引起 DNA 高级结构的变化,从而引发一系列的生物学功能变化^[13],并且该甲基化修饰在多种表观遗传机制中起着协调的中心作用,确保了记忆向后代忠实传递^[14-15]。表观遗传学与农业生产密切相关,已成为生命科学研究的重要前沿和新的增长点^[16]。

3.1 尼罗罗非鱼基因组 DNA 甲基化水平

本研究结果显示,对照组罗非鱼基因组 DNA 的甲基化修饰检出率为 23.74%,耐寒品系尼罗罗非鱼基因组 DNA 的甲基化修饰检出率为 17.52%,这与建鲤(*Cyprinus carpio* var. *Jian*) (18.6% ~ 20.7%)^[17]、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*) (10.98% ~ 16.72%)^[18]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) (32.79%)和虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*) (24.13%)^[19]等水产动物及水稻(*Oryza sativa*) (15.9% ~ 24.2%)^[20-21]等物种基因组 DNA 甲基化修饰检出率较为相近,但显著低于草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)初孵鱼苗的基因组甲基化水平(75.9%)^[22]。也低于畜禽类如猪(*Sus scrofa*)、鸡(*Gallus gallus*) 40% ~ 50%^[23-24]或植物类如黑麦(*Secale cereale*) 51.72%^[25]、小麦(*Triticum turgidum*) (41.56% ~ 44.83%)^[26]等其它动、植物物种的基因组 DNA 甲基化率。这种不同物种间 DNA 甲基化水平的差异,一方面可能与检测方法(如引

物数目、扩增条件、显带方法等)和实验材料(如不同的发育时期、不同的组织等)有关,另一方面可能是不同物种基因组间甲基化修饰水平存在差异的结果。本研究的材料来源相同,用于提取 DNA 的鳍条都来自于相同发育期的成鱼,可以减少实验误差。另外,由于 *Hpa* II 和 *Msp* I 这 2 种内切酶只能检出发生于 CCGG/GGCC 位点的胞嘧啶甲基化修饰现象,而不能对这一位点以外的胞嘧啶甲基化修饰进行检出,因此实验统计的甲基化水平可能比实际的要低。但因为 CCGG/GGCC 位点多位于 CpG 岛重复区内,而且真核生物甲基化修饰主要发生在该区域内,有研究表明这 2 种内切酶所不能识别的甲基化类型出现的频率很低,多数研究者认为 CCGG/GGCC 位点的甲基化修饰检出比例能够客观反映基因组甲基化修饰水平^[26-27]。

此外,本研究表明尼罗罗非鱼耐寒品系基因组 DNA 的甲基化修饰中,完全甲基化比例和半甲基化比例相近,分别占 9.00% 和 8.52%,这与 Xu 等^[24]对成年家鸡的研究结果较为相似。而对照组罗非鱼基因组 DNA 的完全甲基化比例占 14.84%,半甲基化比例占 8.90%,以完全甲基化为主的甲基化方式,这与水稻^[21]相似,而在黑麦^[25]和萝卜—芥蓝异源四倍体基因组^[28]中,DNA 甲基化以半甲基化方式为主。通常在利用 MASP 分析 1 种生物的基因组甲基化水平时,以非甲基化条带所占比例较大,而全甲基化和半甲基化方式更容易倾向哪一种,可能不同的物种所占的比例不一样,目前还没有定论。表明 DNA 甲基化作为真核生物基因调控的手段之一,不同的甲基化方式在不同真核生物基因调控中所占重要性不一样。

3.2 低温对尼罗罗非鱼基因组 DNA 甲基化的影响

生物在环境刺激下基因组 DNA 甲基化水平会发生动力学改变,说明了 DNA 甲基化水平的改变与不同的环境胁迫有关,认为 DNA 甲基化水平的变化是为了适应生存环境而变化的一种自我修饰^[16]。罗非鱼耐寒品系与对照组相比,基因组 DNA 甲基化总体水平下降了 6.22%。结果表明,经过连续多代的低温胁迫可引起尼罗罗非鱼 DNA 甲基化水平及状态发生改变,也说明 DNA 甲基化与罗非鱼抗寒性反应密切相关。并且尼罗

罗非鱼耐寒品系的基因组 DNA 甲基化水平变异以全甲基化位点为主,其下降幅度比例明显(5.84%),这与萝卜—芥蓝异源四倍体 F_4 和 F_{10} 世代 DNA 甲基化变异以 CCGG 全甲基化位点为主的结果相似^[28]。

环境温度变化使生物基因组 DNA 甲基化发生改变的现象也存在于其它物种,如水稻在冷处理 48 h 后,基因组中一些 CCGG 位点甲基化模式和水平发生明显改变^[29]。利用差异显示技术分离到了 16 个导致表型异常的基因,序列分析表明一半以上的基因与逆境反应有关,推测外部逆境可能影响单个基因的甲基化状态^[8]。在经冷处理的玉米(*Zea mays*)中得到相似的研究结果,认为去甲基化可能是作为受环境因子调控的许多基因的公共开关,在环境刺激下生物体可以通过激活其 DNA 甲基化状态的改变而对逆境做出响应^[16]。Wada 等^[8]认为外界环境因子如温度、干旱以及重金属可以引起氧化胁迫,形成含有对细胞成分包括脂质、核酸和蛋白质具有破坏性的活性氧原子团或活性氧元素,有可能是甲基化或去甲基化的开关。

实验结果表明,罗非鱼在抗寒选育过程中,经受了低温胁迫和适应的过程,在这个过程中可能其基因组原来的甲基化模式受到影响,产生或启动对胁迫的能动应激机制,发生去甲基化作用,诱发相关基因的激活而转录、表达,导致表观遗传变异发生,从而增强对胁迫的抵抗力,使罗非鱼能够更好地适应环境的需要。具体哪些特定的去甲基化位点与罗非鱼耐寒性状表现密切相关,这些位点的遗传模式及其对基因结构和功能的影响,以及这些基因如何调节低温胁迫应激反应的机制还有待下一步深入研究。总之,通过研究鱼类应对环境胁迫对 DNA 甲基化的影响,有助于解释 DNA 甲基化的作用机理和寻找与环境适应力相关的重要基因,为进一步探索 DNA 甲基化在罗非鱼抗逆育种的应用提供新的思路 and 理论参考。

参考文献:

- [1] Downen R H, Pelizzola M, Schmitz R J, *et al.* Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(32): 2183–2191.
- [2] Law J A, Jacobsen S E. Establishing, maintaining and

modifying DNA methylation patterns in plants and animals [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(3): 204–220.

- [3] Okamoto I, Otte A P, Allis C D, *et al.* Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development [J]. *Science*, 2004, 303(5658): 644–649.
- [4] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory [J]. *Genes and Development*, 2002, 16(1): 6–21.
- [5] Trasler J M. Gamete imprinting: Setting epigenetic patterns for the next generation [J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2006, 18(1–2): 63–69.
- [6] Gong Z Z, Morales-Ruiz T, Ariza R R, *et al.* ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase [J]. *Cell*, 2002, 111(6): 803–814.
- [7] Calarco J P, Borges F, Mark T A D, *et al.* Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA [J]. *Cell*, 2012, 151(1): 194–205.
- [8] Wada Y, Miyamoto K, Kusano T, *et al.* Association between up-regulation of stress responsive genes and hypo-methylation of genomic DNA in tobacco plants [J]. *Molecular Genetic Genomics*, 2004, 271(6): 658–666.
- [9] Laird P W. The power and the promise of DNA methylation markers [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3(4): 253–266.
- [10] Kocher T D. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2004, 5(4): 288–298.
- [11] 朱华平, 莫媛媛, 卢迈新, 等. 17 α -甲基睾酮和来曲唑对尼罗罗非鱼类固醇激素合成酶基因表达的影响 [J]. *水产学报*, 2011, 35(9): 1302–1309.
- [12] Xiong L Z, Xu C G, Maroof M A S, *et al.* Patterns of cytosine methylation pattern in an elite rice hybrid and its parental lines detected by a methylation sensitive amplification polymorphism technique [J]. *Molecular and General Genetics*, 1999, 261(3): 439–446.
- [13] Goll M G, Bestor T H. Eukaryotic cytosine methyltransferases [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2005, 74: 481–514.
- [14] Mathieu O, Reinders J, Caikovski M, *et al.* Transgenerational stability of the *Arabidopsis* epigenome is coordinated by CG methylation [J]. *Cell*, 2007, 130(5): 851–862.

- [15] Bruce T J A, Matthes M C, Napier J A, *et al.* Stressful “ memories ” of plants: Evidence and possible mechanisms [J]. *Plant Science*, 2007, 173 (6): 603 – 608.
- [16] Steward N, Ito M, Yamakuchi Y, *et al.* Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (40): 37741 – 37746.
- [17] 曹哲明,杨健. 不同浓度 Cd^{2+} 对鲤鱼基因组 DNA 的影响 [J]. *应用与环境生物学报*, 2010, 16 (4): 457 – 461.
- [18] 王丙莲,张迎梅,谭玉凤,等. 镉铅对泥鳅 DNA 甲基化水平的影响 [J]. *毒理学杂志*, 2006, 20 (2): 78 – 80.
- [19] 于涛,杨爱国,吴彪,等. 栉孔扇贝、虾夷扇贝及其杂交子代的 MSAP 分析 [J]. *水产学报*, 2010, 34 (9): 1335 – 1342.
- [20] Dong Z Y, Wang Y M, Zhang Z J, *et al.* Extent and pattern of DNA methylation alteration in rice lines derived from introgressive hybridization of rice and *Zizania latifolia* Griseb [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113 (2): 196 – 205.
- [21] 潘雅姣,傅彬英,王迪,等. 水稻干旱胁迫诱导 DNA 甲基化时空变化特征分析 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42 (9): 3009 – 3018.
- [22] 曹哲明,丁炜东,俞菊华,等. 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.
- [23] 蒋曹德,邓昌彦,熊远著. 猪个体 DNA 甲基化百分差异与胴体性状的关系 [J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13 (2): 179 – 185.
- [24] Xu Q, Sun D X, Zhang Y. F-MSAP: A practical system to detect methylation in chicken genome [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50 (18): 2039 – 2044.
- [25] 张勇,邓科君,张韬,等. 黑麦基因组 DNA 甲基化修饰位点的 MSAP 分析 [J]. *麦类作物学报*, 2009, 29 (4): 559 – 564.
- [26] Zhang Y, Liu Z H, Liu C, *et al.* Analysis of DNA methylation variation in wheat genetic background after alien chromatin introduction based on methylation sensitive amplification polymorphism [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2008, 53 (1): 58 – 69.
- [27] Salmon A, Ainouche M L, Wendel J F. Genetic and epigenetic sequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae) [J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14 (4): 1163 – 1175.
- [28] 李象松,魏丽华,李炫丽,等. 萝卜—芥蓝异源四倍体 F_4 和 F_{10} 世代 DNA 甲基化变异的 MSAP 分析 [J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29 (1): 96 – 100.
- [29] 华扬,陈学峰,熊建华,等. 水稻冷胁迫诱导的甲基化差异片段 CIDM7 的分离和分析 [J]. *遗传*, 2005, 27 (4): 595 – 600.

Effect of low temperature on genomic DNA methylation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ZHU Huaping¹, LU Maixin^{1*}, HUANG Zhanghan¹, GAO Fengying¹, KE Xiaoli¹,
LIU Zhigang¹, LI Qingyong^{1,2}, LIU Yujiao^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

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

Abstract: In this study, using the methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) method, we globally assessed the effect of low temperature adaptation on the level and variations of cytosine methylation alterations at CCGG sites of genomic DNA in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strains with good cold-resistance characters developed by the successive and directional selection breeding of multi-generations. Total of 849 fragments were identified by 18 pairs of selective primer combinations of which 411 and 438 were detected in cold-resistance tilapia strain and the control, respectively. Among these fragments, the methylation sites were 72 and 104, and the corresponding total-methylation levels were at 17.52% and 23.74%, respectively. The full methylation sites at the internal Cs were 37 and 65, and the corresponding full methylation levels were at 9.00% and 14.84%, respectively, and the hemi-methylation sites at the external Cs were 35 and 39, and the corresponding hemi-methylation levels were at 8.52% and 8.90% in cold-resistance tilapia strain and the control, respectively. Further analysis of DNA methylation indicated that a statistically decrease in the overall level of total-methylation levels and both methylation types was detected in cold-resistance tilapia strain compared with the control (decrease at 6.22%, 5.84% and 0.38%, respectively), and the changes of DNA methylation pattern were recognized mainly in the full methylation sites. The level of decrease in DNA methylation suggested that the levels of genomic DNA methylation were changed during the successive cold stress of multi-generations in tilapia, and it also indicated that DNA methylation alteration in tilapia treated with cold stress was mainly through de-methylation that occurred in some CCGG sites. All these results implied that the change of DNA methylation was closely associated with cold tolerance of tilapia. The present findings are valuable to further explore the application potential of DNA methylation alteration in tilapia genetic improvement and provide a new method and theoretical basis for fish stress resistance breeding.

Key words: Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*); low temperature; DNA methylation; methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP)

Corresponding author: LU Maixin. E-mail: mx-lu@163.com