

· 研究报告 ·

铁甲秋海棠DNA甲基转移酶全基因组 鉴定及表达分析

陈婷欣¹, 符敏³, 李娜², 杨蕾蕾², 李凌飞^{2*}, 钟春梅^{1*}

¹华南农业大学生物质工程研究院, 农业农村部能源植物资源与利用重点实验室, 广东省农林生物质工程技术研究中心,
广州 510642; ²深圳市中国科学院仙湖植物园, 深圳市南亚热带植物多样性重点实验室, 深圳 518004

³中山市农业科技推广中心, 中山 528400

摘要 DNA甲基化是重要的表观遗传修饰之一, 参与调控植物基因组稳定性、发育及胁迫响应等过程。DNA甲基转移酶是DNA甲基化的关键酶。为了解铁甲秋海棠(*Begonia masoniana*) DNA甲基转移酶的功能, 采用生物信息学方法从铁甲秋海棠基因组中鉴定出5个编码DNA甲基转移酶的基因。根据序列特征将其分为CMT、MET和DRM三类。不同类别成员的基因序列长度和内含子数量存在明显差异, 但同类成员的基因结构和保守结构域具有高度保守性。这些蛋白均定位于细胞核, 且基因启动子含有大量的光响应、MYB结合及植物激素响应等元件。激素响应模式分析表明, CMT3类在GA、SA和NAA处理下基因表达显著降低, CMT2类在MeJA和NAA处理下基因表达显著降低, 而MET类和DRM类分别在GA和ABA处理下基因表达显著升高。此外, 组织特异性分析发现, 叶片中*BmaCMT2-5*和*BmaDRM2-2*的表达量明显高于其它组织器官, 且这2个酶的编码基因与*BmaMET1-15*在叶片红色部分的表达高于绿叶部分, 推测这3个DNA甲基转移酶可能在叶斑形成过程中发挥重要作用。

关键词 铁甲秋海棠, 叶斑, DNA甲基转移酶, 植物激素

陈婷欣, 符敏, 李娜, 杨蕾蕾, 李凌飞, 钟春梅 (2024). 铁甲秋海棠DNA甲基转移酶全基因组鉴定及表达分析. 植物学报 59, 726–737.

DNA甲基化是最早发现的重要植物基因组表观遗传修饰方式之一, 通过在DNA分子中引入甲基化基团, 从而改变DNA片段活性(Bennett et al., 2021)。DNA甲基化由DNA甲基转移酶催化, 其过程是将S-腺苷-L-甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)形成的甲基通过共价连接转移至DNA序列中的特定位置, 然后形成N4-甲基胞嘧啶(N4-methylcytosine, N4-mC)、5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5-mC)、N6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenine, N6-mA)或者7-甲基鸟嘌呤(7-methylguanine, 7-mG) (夏晗等, 2008)。植物中, DNA甲基化主要发生在CG、CHG和CHH的5个碳位的胞嘧啶主链上, 由胞嘧啶5-DNA甲基转移酶调控(Parrilla-Doblas et al., 2019)。DNA甲基转移酶主要分为4大类, 即甲基转移酶(methyltransferase,

MET)、染色质甲基化酶(chromomethylases, CMT)、结构域重排甲基化酶(domains rearranged methylase, DRM)和从头DNA甲基转移酶2 (de novo DNA methyltransferase 2, DNMT2)。

有研究表明, DNA甲基化参与调控植物叶色、花色及叶斑的形成。DNA甲基化调控观叶植物花叶君子兰(*Clivia miniata* var. 'Variegata') (Wang et al., 2016)和观赏海棠(*Malus spectabilis*) (Tian et al., 2017)叶斑与叶色的形成, 并且能通过影响叶片主要次生代谢物的合成控制白化茶(*Camellia sinensis*)玉金香叶色的转变(Xu et al., 2020)。Wu等(2020)研究发现, DNA甲基化还参与忍冬(*Lonicera japonica*) (Yu et al., 2023)和桃(*Prunus persica*)花花色的形成。此外, DNA甲基化也参与激素调控的植物生长发育过程。研究发现,

收稿日期: 2024-01-22; 接受日期: 2024-05-07

基金项目: 广东省自然科学基金(No.2021A1515011315)和深圳市城管科研项目(No.202408, No.202205)

* 通讯作者。E-mail: lingfei_li@szbg.ac.cn; zhongchunmei@scau.edu.cn

苹果(*M. domestica*) *MdAFR5*启动子的甲基化程度决定生长素对乙烯合成的诱导作用(Yue et al., 2020); 在辣椒(*Capsicum annuum*)成熟过程中, 低DNA甲基化抑制生长素、赤霉素以及细胞分裂素相关基因的表达, 但诱导ABA合成相关基因的表达(Xiao et al., 2020); 在愈伤组织形成过程中, 生长素信号转导与甲基化调控之间存在一定的协调作用(Ma et al., 2022)。

秋海棠属(*Begonia*)物种丰富, 叶斑多样, 是研究叶斑形成的理想材料。铁甲秋海棠(*B. masoniana*)是秋海棠属下的1个特有种, 原产于我国广西大新和凭祥大屏山, 为多年生草本耐阴植物, 叶片斑纹独特美丽, 在不同的发育时期叶色呈现粉红、深绿和浅绿, 是一种观赏价值较高的观叶植物。本研究以铁甲秋海棠为研究材料, 基于其基因组数据(Li et al., 2022), 对DNA甲基转移酶基因进行全基因组鉴定及表达模式分析, 以期挖掘参与调控秋海棠叶斑形成的基因资源, 为秋海棠属植物种质资源创制和新品种培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用铁甲秋海棠(*Begonia masoniana* Irmsch. ex Ziesenh.)取自深圳市中国科学院仙湖植物园。基因时空表达模式分析共选取10个不同组织器官, 包括根、根茎、S5期(叶斑明显且叶斑以外部分为绿色的时期)(杨婷等, 2021)叶片绿色部分、S5期叶片红色部分、花梗、雌花、雄花、雄蕊、子房和柱头。激素响应表达分析是选取2月龄组培养苗叶片, 分别在外源施加5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 赤霉素(gibberellins, GA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)和萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid, NAA), 6小时后取材, 以ddH₂O处理为对照。上述所有材料每组设3次生物学重复。液氮速冻后, 保存于-80°C冰箱备用。

1.2 总RNA提取

分别取上述0.1 g材料浸润于液氮, 用液氮研磨成粉末后使用多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司, LS1040)提取总RNA, 具体操作

步骤参照其说明书。然后, 使用1.2% (质量体积比)琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性, 并用超微量分光光度计(Implen, 德国)检测RNA的浓度与纯度。

1.3 基因鉴定及蛋白理化性质分析

以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Furner and Matzke, 2011)、甘蓝型油菜(*Brassica napus*) (Fan et al., 2020)以及水稻(*Oryza sativa*) (Ahmad et al., 2014)等的DNA甲基转移酶蛋白序列为参考序列, 通过BLASTP (设置 $E < 1 \times 10^{-5}$)比对铁甲秋海棠蛋白数据库, 筛选出铁甲秋海棠DNA甲基转移酶; 随后, 通过PfamScan软件(版本1.6)对秋海棠蛋白数据库进行预测, 找出具有DNA甲基转移酶保守结构域的基因; 人工校对确认筛选得到的基因, 并参考拟南芥等其它植物对铁甲秋海棠DNA甲基转移酶进行命名。通过在线工具EMBOSS (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/)分析氨基酸序列并确定蛋白质等电点以及分子量, 使用在线工具NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)对氨基酸的糖基化位点进行分析, 使用Softberry中的ProtComp-9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=prot-comppl&group=programs&subgroup=proloc>)预测蛋白亚细胞定位。利用TBtools软件进行可视化分析。

1.4 系统发育、基因结构和保守结构域分析

使用MEGA软件(版本7.0)构建铁甲秋海棠、拟南芥、甘蓝型油菜和水稻的DNA甲基转移酶系统发育树。采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树, Bootstrap运行次数设置为1 000, 其它参数为默认值。

利用GSDS2.0网站(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>)分析铁甲秋海棠DNA甲基转移酶的基因结构, 并使用TBtools软件基于铁甲秋海棠基因组数据库GFF3文件结合筛选出的DNA甲基转移酶绘制基因结构图, 依次对其基因结构呈现的内含子和外显子进行特性分析。通过在线工具NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrp-sb/bwrpsb.cgi>)对提交的蛋白序列进行保守结构域分析, 同时利用MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)分析蛋白质序列的保守基序, 保存TBtools可视化文件用于绘制保守结构分析图和motif结构图。

1.5 启动子顺式作用元件分析

提取铁甲秋海棠的全基因组数据，得到编码DNA甲基转移酶基因起始密码子ATG上游2 000 bp序列，作为DNA甲基转移酶基因的启动子序列，利用在线软件PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测并分析不同成员启动子的顺式元件特性。使用Excel软件对数据进行统计和图表绘制，通过TBtools软件绘制顺式元件分布图。

1.6 qRT-PCR分析

使用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa, 日本)对总RNA进行逆转录合成cDNA。利用在线工具Primer-3Plus (<http://primer-3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>)设计特异性引物(表1)，委托生工生物工程(广州)股份有限公司进行引物合成。以ACT7为内参基因，在伯乐CFX96仪器中进行qRT-PCR。扩增程序为：95°C30秒；95°C5秒，60°C30秒，40个循环；65°C5秒，95°C5秒(Melt Curve)。每个样品进行3次独立的重复实验，反应结束后由软件生成溶解曲线。根据溶解曲线分析每对基因引物的扩增特异性，并对定量所得数据进行整理和分析，以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因相对表达量。

表1 铁甲秋海棠DNA甲基转移酶qRT-PCR引物

Table 1 DNA methyltransferase qRT-PCR primers for *Begonia masoniana*

Gene name	Gene ID	Primer sequence (5'–3')	
<i>BmaCMT2-5</i>	Bma021768.1	F: CTGCTGGCTGCTATGGTCTT	R: ACATCATGTGTGGGTAGCGG
<i>BmaCMT3-11</i>	Bma005730.1	F: CCAACAGTAGTTACACGCGCGG	R: CCGGAAAACCTTGCAGTCTCGC
<i>BmaCMT3-14</i>	Bma011172.1	F: TGCCGAGCAAACGTCAAGCG	R: ACTTCAGGCGCCGAAGAAGC
<i>BmaMET1-15</i>	Bma013045.1	F: CGGCTAACGCTTGCATCGCT	R: AGGAGCAGCCGCCCATATGA
<i>BmaDRM2-2</i>	Bma014831.1	F: CTGCCGCAAGAAAGAGAGGT	R: GAAGGCCACCACTTCCTTGT

表2 铁甲秋海棠DNA甲基转移酶基本理化性质分析

Table 2 Analysis on the physical and chemical properties of DNA methyltransferase in *Begonia masoniana*

Gene name	CDS (bp)	Protein			Chr.	N-glycosyl-sites	Subcellular localization
		Amino acid (aa)	pI	Molecular weight (Da)			
<i>BmaCMT2-5</i>	2547	848	6.3013	97206.68	Chr.5	4	Nucleus
<i>BmaCMT3-11</i>	2892	963	6.0700	109079.09	Chr.11	4	Nucleus
<i>BmaCMT3-14</i>	2511	836	4.7815	94618.65	Chr.14	4	Nucleus
<i>BmaMET1-15</i>	3645	1214	6.3066	136797.74	Chr.15	6	Nucleus
<i>BmaDRM2-2</i>	1773	590	4.8922	66506.45	Chr.2	2	Nucleus

CDS: 编码序列; pI: 等电点。CDS: Coding sequence; pI: Isoelectric point.

数据显示为平均值±标准差。使用SPSS25软件进行单因素方差分析，使用Excel软件对数据进行统计和图表绘制。

2 结果与讨论

2.1 DNA甲基转移酶成员鉴定及蛋白质特性

通过对铁甲秋海棠基因组数据库进行搜索比对，鉴定获得5个编码DNA甲基转移酶的基因。利用拟南芥、甘蓝型油菜和水稻，结合铁甲秋海棠DNA甲基转移酶蛋白序列构建系统发育树。结果显示，5个DNA甲基转移酶可分为CMT、MET和DRM三类(图1A)，进一步根据基因所在染色体位置进行命名(最后的数字表示染色体所在位置)，结果如表2所示。CMT大类有3个基因，包括*BmaCMT2-5*、*BmaCMT3-11*和*BmaCMT3-14*；MET大类和DRM大类均仅有1个基因，分别为*BmaMET1-15*和*BmaDRM2-2*。蛋白质理化性质分析结果显示，这些蛋白的氨基酸序列长度为590–1 214 aa；等电点为4.781 5–6.306 6，均为酸性蛋白(pI< 7.0)；分子量为66 506.45–136 797.74 Da；预测蛋白质糖基化位点2–6个(表2)。亚细胞定位预测分析结果显示，5个DNA甲基转移酶均定位于细胞核(表2)。

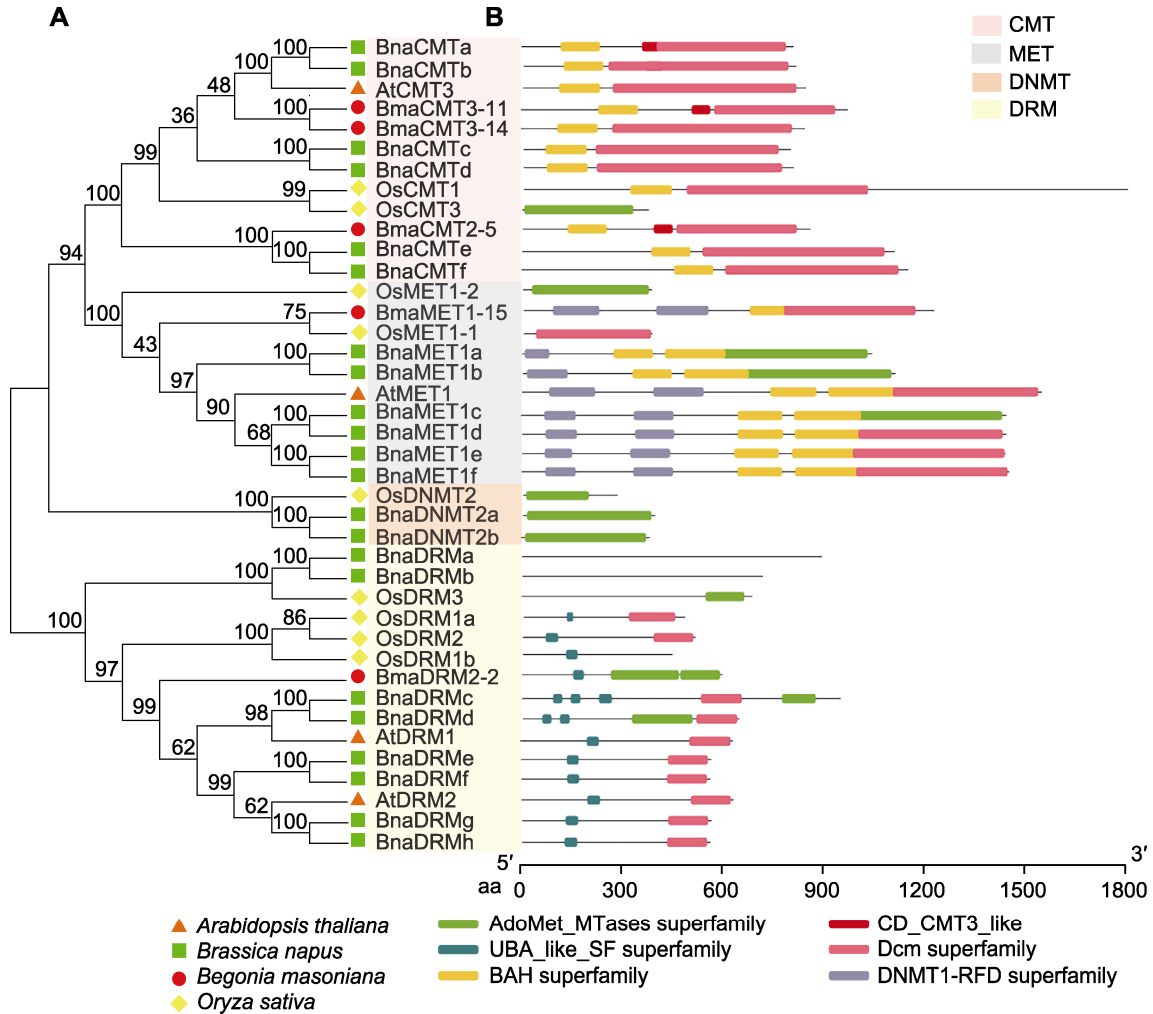


图1 拟南芥(*At*)、甘蓝型油菜(*Bna*)、水稻(*Os*)和铁甲秋海棠(*Bma*) DNA甲基转移酶系统发育树(**A**)与蛋白结构域分布图(**B**)
采用MEGA7, 邻接法。Bootstrap值为1 000。数字表示自展值。CMT: 染色质甲基化酶; MET: 甲基转移酶; DNMT: 从头DNA甲基转移酶; DRM: 结构域重排甲基化酶; aa: 氨基酸

Figure 1 DNA methyltransferase phylogenetic tree (**A**) and protein domain map (**B**) of *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Brassica napus* (*Bna*), *Oryza sativa* (*Os*) and *Begonia masoniana* (*Bma*)

Using the Neighbor-joining method in MEGA 7 software. The value of bootstrap is 1 000. Numbers indicate bootstrap values. CMT: Chromomethylases; MET: Methyltransferase; DNMT: de novo DNA methyltransferase; DRM: Domains rearranged methylase; aa: Amino acid

铁甲秋海棠单倍型共有15条染色体。染色体分布分析显示, 这些基因主要分布在铁甲秋海棠基因组的5条染色体上, *BmaDRM2-2*位于Chr.2染色体, *BmaCMT2-5*位于Chr.5染色体, *BmaCMT3-11*位于Chr.11染色体, *BmaCMT3-14*位于Chr.14染色体, *BmaMET1-15*位于Chr.15染色体(表2)。

2.2 基因结构和蛋白保守结构域分析

内含子数量以及位置对基因表达有重要的调控作用

(Parra et al., 2011)。不同类别的DNA甲基转移酶的基因序列长度和内含子数量存在明显差异(图2A), CMT类基因包含19–20个内含子, 其中*BmaCMT3-11*内含子的数量最多(20个); *BmaMET1-15*含11个内含子; *BmaDRM2-2*内含子最少(7个)。

蛋白结构域分析发现, 与拟南芥、水稻和甘蓝型油菜的DNA甲基转移酶的蛋白结构相似, 铁甲秋海棠CMT类和MET类均含有BAH superfamily与Dcm superfamily结构域; 但不同的是, 铁甲秋海棠DRM

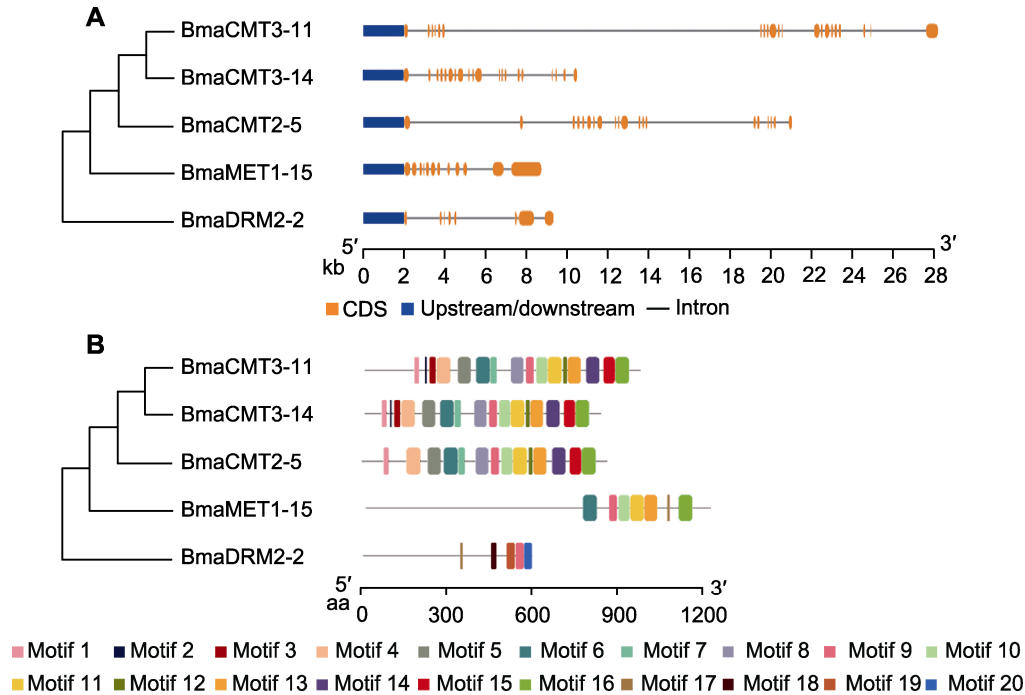


图2 铁甲秋海棠(*Bma*) DNA甲基转移酶基因结构(A)和保守基序分布图(B)
CDS同表2。

Figure 2 Gene structure of DNA methyltransferase (A) and distribution map of conserved motif (B) of *Begonia masoniana*
CDS is the same as shown in Table 2.

类蛋白仅含有AdoMet_MTases superfamily结构域, 无Dcm superfamily结构域(图1B)。保守基序分布显示, DNA甲基转移酶共包含20个motif结构, 但不同类别的motif数量和种类不同(图2B)。CMT类包含motif 1–16, 其中motif 3–5组成了BAH superfamily, motif 8组成了CD_CMT3_like, motif 9–16组成了Dcm superfamily结构域。MET类包含7个motif, 分别为motif 6、motif 9、motif 10、motif 11、motif 13、motif 16和motif 17, 构成BAH superfamily和Dcm superfamily结构域。DRM类包含5个motif, 其中motif 9、motif 18、motif 19和motif 20组成了AdoMet_MTases superfamily结构域。

2.3 基因启动子顺式作用元件分布规律

为探究铁甲秋海棠DNA甲基转移酶基因启动子顺式作用元件的分布规律, 利用PlantCARE数据库对5个DNA甲基转移酶基因的启动子区域(起始位点上游2 000 bp区域)进行分析。结果显示, 这些基因启动子中含有大量的光响应、植物激素响应、胁迫响应和植物生长发育相关作用元件, 其中光响应元件最多, 为

57个(34.55%), 其次是激素响应元件45个(27.27%), 胁迫响应元件26个(15.75%), MYB结合元件22个(13.33%), MYC结合元件11个(6.66%)及与植物生长发育相关元件4个(2.4%) (图3)。

光响应元件分析结果表明, 这些基因均包含G-box、Box 4、GT1-motif以及TCT-motif等光响应元件, 其中CMT类和MET类数量较多, *BmaMET1-15*有15个, *BmaCMT2-5*以及*BmaCMT3-14*分别有12个, *BmaCMT3-11*有11个, *BmaDRM2-2*数量最少, 仅7个。激素响应元件分析发现, 这些基因启动子包含与GA、ABA、MeJA、auxin和SA等激素相关顺式作用元件, 其中*BmaMET1-15*所含激素响应元件数量最多, 包括4个auxin响应元件、14个MeJA响应元件和1个ABA响应元件, 其次是*BmaCMT3-11*, 包括4个auxin响应元件、1个ABA响应元件、1个GA响应元件以及8个MeJA响应元件。此外, *BmaCMT3-11*与*BmaCMT3-14*所含GA响应元件数量相同。*BmaCMT3-14*所含激素响应元件数量最少, 包括1个ABA响应元件、1个GA响应元件和2个MeJA响应元件。MYB结合元件分析结果表明, *BmaMET1-15*所含MYB结合元件

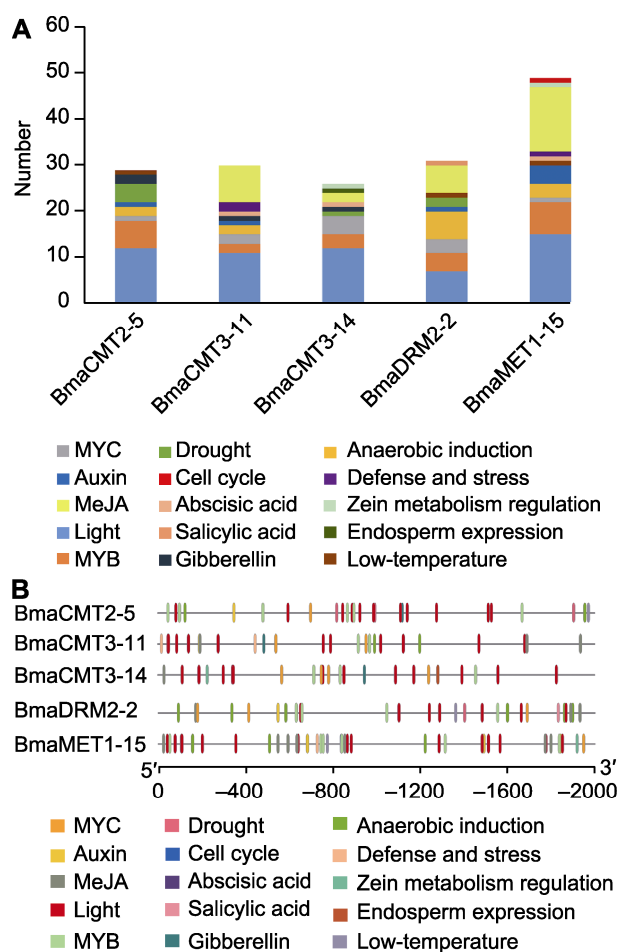


图3 铁甲秋海棠DNA甲基转移酶基因启动子序列顺式元件数量(A)和分布(B)

MeJA: 茉莉酸甲酯

Figure 3 Number (A) and distribution (B) of *cis*-elements in DNA methyltransferase gene promoter sequence of *Begonia masoniana*

MeJA: Methyl jasmonate

数量最多, 共7个, 其次是*BmaCMT2-5* (6个)和*BmaDRM2-2* (5个), *BmaCMT3-11*和*BmaCMT3-14*含MYB结合元件数量较少, 分别为2个和3个; *BmaCMT3-14* (4个)和*BmaDRM2-2* (3个)还含有丰富的MYC结合元件。此外, 这些基因启动子也含有多种应激反应调控元件。

2.4 组织特异性表达模式

组织特异性表达模式分析结果表明, 铁甲秋海棠DNA甲基转移酶基因在各组织器官中广泛表达, 但是具有明显的组织特异性(图4)。这些基因在雌花和叶片中的表达丰度最高, 其中*BmaCMT2-5*、*BmaMET1-15*和

*BmaDRM2-2*在叶片红色部分的表达量均显著高于绿色部分。与雌性生殖器(如雌花、子房和柱头)的高表达丰度不同, 相对其它组织器官, 这些基因(除*BmaCMT2-5*外)在雄蕊中的表达量极低, 而*BmaCMT2-5*在雌花中的表达量相对较低。此外, *BmaCMT3-11*和*BmaCMT3-14*在根中的表达量远高于其它组织器官。

2.5 植物激素响应分析

根据基因启动子顺式作用元件分布规律分析结果, 进一步选用GA、ABA、SA、MeJA以及NAA进行激素响应分析。结果发现, 不同植物生长调节剂处理铁甲秋海棠, 其DNA甲基转移酶基因表达响应具有明显的差异(图5)。与对照相比, GA处理下, *BmaCMT3-11*和*BmaCMT3-14*基因的表达极显著降低($P<0.01$), *BmaMET1-15*基因的表达则显著增高($P<0.01$); ABA处理下, *BmaDRM2-2*基因的表达显著增高, 其余基因不响应ABA; SA处理下, *BmaCMT3-11*和*BmaCMT3-14*基因的表达显著降低($P<0.05$); MeJA处理下, *BmaCMT2-5*和*BmaMET1-15*基因的表达显著降低($P<0.05$); NAA处理下, *BmaCMT2-5*、*BmaCMT3-11*以及*BmaCMT3-14*基因的表达显著降低($P<0.05$)。

2.6 讨论

2.6.1 铁甲秋海棠DNA甲基转移酶的保守性与特异性

本研究组在铁甲秋海棠基因组中挖掘出5个编码DNA甲基转移酶的基因, 根据基因和蛋白结构特征及系统发育树分析结果将其分为CMT、MET和DRM三类。该分类结果与拟南芥、小麦(*Triticum aestivum*) (Gahlaut et al., 2020)、水稻、甘蓝型油菜、草莓(*Fragaria × ananassa*) (Gu et al., 2016)、菜蓟(*Cynara scolymus*) (Gianoglio et al., 2017)和番茄(*Solanum lycopersicum*) (Cao et al., 2014)等植物的DNA甲基转移酶分类结果基本一致。

铁甲秋海棠DNA甲基转移酶与聚类关系较近的拟南芥、水稻和甘蓝型油菜的DNA甲基转移酶具有相似的保守结构域。例如, CMT类和MET类均含有BAH superfamily与Dcm superfamily保守结构域; 而DRM类含有AdoMet_MTases superfamily保守结构域, 但不含Dcm superfamily结构域, 表明不同物种的DNA甲基转移酶在一定程度上是保守的, 但不同物种具有

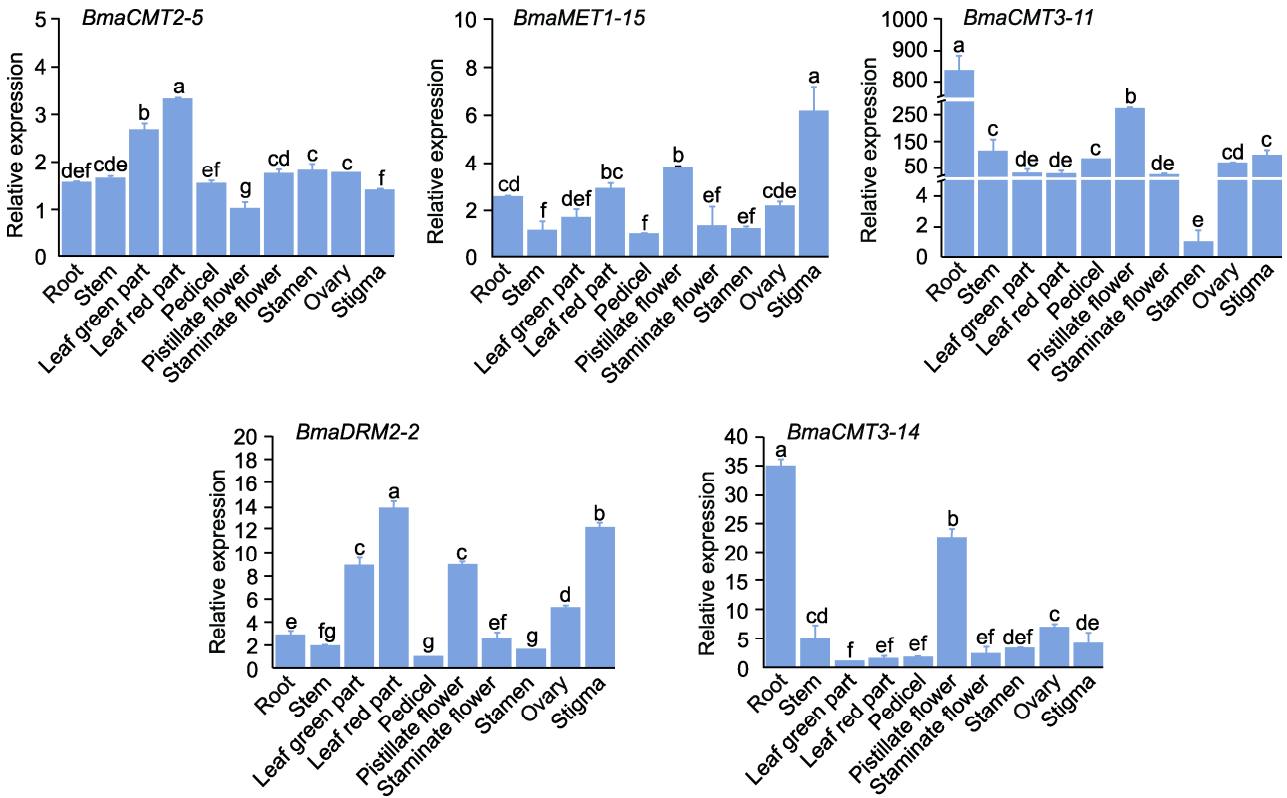


图4 铁甲秋海棠DNA甲基转移酶基因在不同组织器官中的相对表达量
*ACT7*为内参基因，基因相对表达量为平均值 $\pm$ 标准差。DNA甲基转移酶在不同组织中的最小表达量视为“1”。不同小写字母表示各处理间差异显著($P < 0.05$)。

Figure 4 Relative expression levels of DNA methyltransferase genes in different tissues and organs of *Begonia masoniana*. *ACT7* was the internal reference gene and the relative gene expression was means $\pm$ SD. The minimum expression of DNA methyltransferase in different tissues is regarded as “1”. Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments ($P < 0.05$).

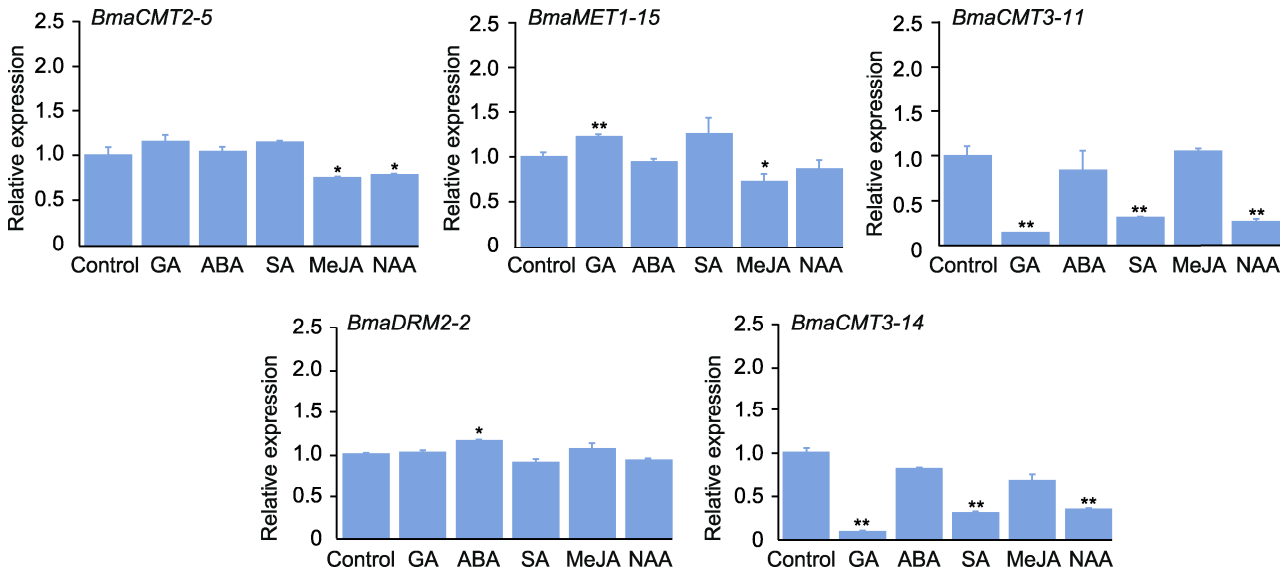


图5

Figure 5

图5 铁甲秋海棠DNA甲基转移酶基因在GA、ABA、SA、MeJA和NAA处理(6小时)下的相对表达量

将对照组的相对表达量视为“1”。GA: 赤霉素; ABA: 脱落酸; SA: 水杨酸; MeJA: 茉莉酸甲酯; NAA: 萘乙酸。*表示处理组与对照组差异显著($P<0.05$); **表示处理组与对照组差异极显著($P<0.01$)。

Figure 5 Relative expression levels of DNA methyltransferase genes in *Begonia masoniana* treated with GA, ABA, SA, MeJA and NAA (6 h)

The relative expression of control is regarded as “1”. GA: Gibberellin; ABA: Absciscic acid; SA: Salicylic acid; MeJA: Methyl jasmonate; NAA: 1-naphthalene acetic acid. * indicate that the difference between treatment group and control group is significant ($P<0.05$); ** indicate that the difference between treatment group and control group is extremely significant ($P<0.01$).

其特异性。保守基序分析还发现, 铁甲秋海棠的DNA甲基转移酶的BAH superfamily、Dcm superfamily和AdoMet_MTases superfamily保守结构域中均包含motif 9, 推测motif 9是铁甲秋海棠DNA甲基转移酶结构的关键基序, 可能具有重要功能。有研究表明, 内含子的数量与位置对该基因的表达具有重要影响(Hong et al., 2006; 关峰等, 2011)。基因结构分析结果表明, 不同类别的DNA甲基转移酶内含子的数量和位置有明显差异, 暗示这些基因在秋海棠生长发育过程中的表达差异较大, 进一步的组织特异性表达模式分析也证实了这一推论。亚细胞定位是研究基因功能不可或缺的技术手段(李立奇和万瑛, 2009)。铁甲秋海棠DNA甲基转移酶均定位于细胞核, 这与DNA甲基转移酶参与DNA甲基化功能相一致。

2.6.2 铁甲秋海棠DNA甲基转移酶的多样性

目前, 有关DNA甲基化酶基因功能的研究主要集中在表观遗传修饰方面(Jiang and Guo, 2020; 周陈平等, 2022)。本研究发现铁甲秋海棠DNA甲基化酶基因不仅可能参与雌性生殖器官的发育和非生物胁迫, 还可能参与叶斑的形成, 具有功能多样性。

组织特异性表达分析结果表明, *BmaCMT3-11*和*BmaCMT3-14*在根中表达量最高, 其次是雌花; 其余基因在雌花和叶片中的表达丰度最高, 其中*BmaCMT2-5*、*BmaMET1-15*和*BmaDRM2-2*在叶片红色部分的表达量均显著高于绿色部分。除*BmaCMT2-5*外, 这些基因在雄蕊中的表达量相对较低。上述结果暗示, *BmaCMT3-11*和*BmaCMT3-14*可能参与秋海棠根与雌性生殖器官的发育过程, *BmaCMT2-5*、*BmaMET1-15*和*BmaDRM2-2*则可能参与叶斑的形成过程。铁甲秋海棠作为一种耐阴植物, 具有较强的光敏感度(李景秀等, 2021)。研究发现, 光照强度、时间以及光质均能够影响叶色的形成(Wang et al.,

2018)。启动子顺式作用元件分布规律显示, 不同类别的铁甲秋海棠DNA甲基转移酶基因启动子的顺式元件数量和类型差异较大, 但均含有大量的光响应和MYB结合元件, 推测可能与其生长习性(弱光下生长)有关。此外, 花青素的生物合成受到MYB、bHLH和WD40类转录因子形成的三元复合体MBW直接调控(Chiu and Li, 2012; Zheng et al., 2019), 其中MYB作为主要调控因子直接结合下游靶基因启动子元件。根据叶斑形成的原因可划分为5种类型, 分别为叶绿素型、非光合色素型、表皮型、空隙型和附属物型, 大多数植物叶斑的形成由2种或者以上联合作用(杨凯如等, 2022; 戴若惠等, 2023; 冉浩然等, 2024)。研究发现, 铁甲秋海棠叶斑属于非光合色素型, 这种类型叶斑是由于叶片中花青素和黄酮类化合物的局部积累形成(崔卫华和管开云, 2013; 杜文文等, 2018)。*BmaCMT2-5*、*BmaMET1-15*和*BmaDRM2-2*含有大量的MYB结合元件, 推测这些基因的启动子受MYB调控, 从而参与花青素的生物合成过程。同时, 有研究表明, DNA甲基转移酶中的DRM类和MET类可通过影响花青素相关基因的合成而影响植物花青素的含量(Yao et al., 2020), 这进一步佐证了上述推论。激素响应模式分析发现, *BmaCMT3-11*和*BmaCMT3-14*的表达受GA和NAA负调控; 启动子顺式作用元件分布规律也表明, *BmaCMT3-11*和*BmaCMT3-14*基因的启动子含有GA和auxin响应元件。有研究表明, auxin和GA均参与生殖器官的形成(Carey and Krogan, 2017; Zhang et al., 2017), 其中auxin还参与根的发育(Yan et al., 2023)。综上, 推测*BmaCMT3-11*和*BmaCMT3-14*在根和生殖器官的形成过程中发挥重要作用。

此外, 这些基因启动子还含有丰富的MeJA和胁迫相关响应元件。MeJA作为一种抗性激素在植物抵抗生物以及非生物胁迫过程中发挥重要作用, 同时参

与调节植物生长发育的诸多过程(黎家和李传友, 2019)。其中, *BmaCMT2-5*和*BmaMET1-15*基因的启动子所含MeJA响应元件最多, 激素响应模式分析结果也表明, MeJA对*BmaCMT2-5*和*BmaMET1-15*的表达具有明显的抑制作用。推测MeJA是DNA甲基转移酶调控铁甲秋海棠响应生物或非生物胁迫的关键激素。在启动子顺式元件中还发现ABA和SA等植物激素响应元件及干旱和低温等逆境胁迫响应元件, 但分布位置和数量不同, 表明DNA甲基转移酶在铁甲秋海棠的生长发育与抗逆性方面功能不同。

上述研究表明, 不同类别铁甲秋海棠DNA甲基转移酶的结构与功能差异显著, 但同类成员的基因结构、保守结构域、保守基序, 以及进化方面均具有高度的保守性, 且可能参与不同的组织器官生长发育及各种生物或者非生物胁迫响应过程。进一步根据*BmaCMT2-5*、*BmaMET1-15*和*BmaDRM2-2*基因在叶片斑区和非斑区的表达差异, 结合其启动子中富含花青素合成相关的MYB类调控元件, 推测它们可能参与叶斑的形成。鉴于目前对这些甲基转移酶基因的功能主要基于推测, 未来的研究应聚焦在功能验证方面, 可利用反向遗传学手段结合表型观测明确其是否参与相关的生物学过程, 也可通过生理生化及分子生物学手段明确其作用机制。本研究结果对揭示DNA甲基转移酶在铁甲秋海棠重要园艺性状形成及其逆境胁迫响应等方面的作用具有一定的参考价值。

作者贡献声明

陈婷欣: 完成实验和撰写论文; 符敏: 提供技术支持; 李娜: 分析数据; 杨蕾蕾: 分析数据并提供技术支持; 李凌飞: 设计实验及实验指导; 钟春梅: 构思、设计、指导实验及论文修改。

参考文献

- 崔卫华, 管开云 (2013). 中国秋海棠属植物叶片斑纹多样性研究. 植物分类与资源学报 **35**, 119–127.
- 戴若惠, 钱心好, 孙静蕾, 芦涛, 贾绮玮, 陆天麒, 路梅, 饶玉春 (2023). 水稻叶色调控机制及相关基因研究进展. 植物学报 **58**, 799–812.
- 杜文文, 段青, 马璐琳, 瞿素萍, 贾文杰, 王祥宁, 崔光芬 (2018). 7种秋海棠叶片斑纹结构及遗传特性分析. 西北植

- 物学报 **38**, 2045–2052.
- 关峰, 韦正乙, 王云鹏, 林春晶, 邢少辰, 马景勇 (2011). 内含子数量改变*GUS*基因的瞬时表达调控. 基因组学与应用生物学 **30**, 571–576.
- 黎家, 李传友 (2019). 新中国成立70年来植物激素研究进展. 中国科学: 生命科学 **49**, 1227–1281.
- 李景秀, 管开云, 孔繁才, 李爱荣 (2021). 中国秋海棠属植物资源概述. 中国野生植物资源 **40**(12), 35–44.
- 李立奇, 万瑛 (2009). 蛋白质的亚细胞定位预测研究进展. 免疫学杂志 **25**, 602–604.
- 冉浩然, 张毓, 陈简村, 于超, 张启翔, 罗乐 (2024). 观赏植物叶斑的研究进展. 植物遗传资源学报 **25**, 704–717.
- 夏晗, 刘美芹, 尹伟伦, 卢存福, 夏新莉 (2008). 植物DNA甲基化调控因子研究进展. 遗传 **30**, 426–432.
- 杨凯如, 贾绮玮, 金佳怡, 叶涵斐, 王盛, 陈芊羽, 管易安, 潘晨阳, 辛德东, 方媛, 王跃星, 饶玉春 (2022). 水稻黄绿叶调控基因*YGL18*的克隆与功能解析. 植物学报 **57**, 276–287.
- 杨婷, 薛珍珍, 李娜, 郎校安, 李凌飞, 钟春梅 (2021). 铁十字秋海棠斑叶发育过程内参基因筛选及验证. 园艺学报 **48**, 2251–2261.
- 周陈平, 杨敏, 郭金菊, 邝瑞彬, 杨护, 黄炳雄, 魏岳荣 (2022). 番木瓜成熟过程中全基因组DNA甲基化和转录组变化分析. 园艺学报 **49**, 519–532.
- Ahmad F, Huang X, Lan HX, Huma T, Bao YM, Huang J, Zhang HS (2014). Comprehensive gene expression analysis of the DNA (cytosine-5) methyltransferase family in rice (*Oryza sativa* L.). *Genet Mol Res* **13**, 5159–5172.
- Bennett M, Cleaves K, Hewezi T (2021). Expression patterns of DNA methylation and demethylation genes during plant development and in response to phytohormones. *Int J Mol Sci* **22**, 9681.
- Cao DY, Ju Z, Gao C, Mei XH, Fu DQ, Zhu HL, Luo YB, Zhu BZ (2014). Genome-wide identification of cytosine-5 DNA methyltransferases and demethylases in *Solanum lycopersicum*. *Gene* **550**, 230–237.
- Carey NS, Krogan NT (2017). The role of AUXIN RESPONSE FACTORS in the development and differential growth of inflorescence stems. *Plant Signal Behav* **12**, e1307492.
- Chiu LW, Li L (2012). Characterization of the regulatory network of *BoMYB2* in controlling anthocyanin biosynthesis in purple cauliflower. *Planta* **236**, 1153–1164.
- Fan SH, Liu HF, Liu J, Hua W, Xu SM, Li J (2020). Systematic analysis of the DNA methylase and demethylase

- gene families in rapeseed (*Brassica napus* L.) and their expression variations after salt and heat stresses. *Int J Mol Sci* **21**, 953.
- Furner IJ, Matzke M (2011). Methylation and demethylation of the *Arabidopsis* genome. *Curr Opin Plant Biol* **14**, 137–141.
- Gahlaut V, Samtani H, Khurana P (2020). Genome-wide identification and expression profiling of cytosine-5 DNA methyltransferases during drought and heat stress in wheat (*Triticum aestivum*). *Genomics* **112**, 4796–4807.
- Gianoglio S, Moglia A, Acquadro A, Comino C, Portis E (2017). The genome-wide identification and transcriptional levels of DNA methyltransferases and demethylases in globe artichoke. *PLoS One* **12**, e0181669.
- Gu TT, Ren S, Wang YH, Han YH, Li Y (2016). Characterization of DNA methyltransferase and demethylase genes in *Fragaria vesca*. *Mol Genet Genomics* **291**, 1333–1345.
- Hong X, Scofield DG, Lynch M (2006). Intron size, abundance, and distribution within untranslated regions of genes. *Mol Biol Evol* **23**, 2392–2404.
- Jiang S, Guo YC (2020). Epigenetic clock: DNA methylation in aging. *Stem Cells Int* **2020**, 1047896.
- Li LF, Chen XL, Fang DM, Dong SS, Guo X, Li N, Campos-Dominguez L, Wang WG, Liu Y, Lang XA, Peng Y, Tian DK, Thomas DC, Mu WX, Liu M, Wu CY, Yang T, Zhang SZ, Yang LL, Yang JF, Liu ZJ, Zhang LS, Zhang XT, Chen F, Jiao YN, Guo YL, Hughes M, Wang W, Liu XF, Zhong CM, Li AR, Sahu SK, Yang HM, Wu E, Sharbrough J, Lisby M, Liu X, Xu X, Soltis DE, Van de Peer Y, Kidner C, Zhang SZ, Liu H (2022). Genomes shed light on the evolution of *Begonia*, a mega-diverse genus. *New Phytol* **234**, 295–310.
- Ma J, Li Q, Zhang L, Cai S, Liu YY, Lin JC, Huang RF, Yu YQ, Wen MZ, Xu TD (2022). High auxin stimulates callus through SDG8-mediated histone H3K36 methylation in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* **64**, 2425–2437.
- Parra G, Bradnam K, Rose AB, Korf I (2011). Comparative and functional analysis of intron-mediated enhancement signals reveals conserved features among plants. *Nucleic Acids Res* **39**, 5328–5337.
- Parrilla-Doblas JT, Roldán-Arjona T, Ariza RR, Córdoba-Cañero D (2019). Active DNA demethylation in plants. *Int J Mol Sci* **20**, 4683.
- Tian J, Li KT, Zhang S, Zhang J, Song TT, Zhu YJ, Yao YC (2017). The structure and methylation level of the *McMYB10* promoter determine the leaf color of *Malus crabapple*. *HortScience* **52**, 520–526.
- Wang QM, Wang L, Zhou YB, Cui JG, Wang YZ, Zhao CM (2016). Leaf patterning of *Clivia miniata* var. *variegata* is associated with differential DNA methylation. *Plant Cell Rep* **35**, 167–184.
- Wang Y, Liu S, Tian X, Fu Y, Jiang X, Li Y, Wang G (2018). Influence of light intensity on chloroplast development and pigment accumulation in wild-type and etiolated mutant plants of *Anthurium andraeanum* 'Sonate'. *Plant Signal Behav* **13**, e1482174.
- Wu XX, Zhou Y, Yao D, Iqbal S, Gao ZH, Zhang Z (2020). DNA methylation of *LDOX* gene contributes to the floral colour variegation in peach. *J Plant Physiol* **246–247**, 153116.
- Xiao K, Chen J, He QXM, Wang YX, Shen HL, Sun L (2020). DNA methylation is involved in the regulation of pepper fruit ripening and interacts with phytohormones. *J Exp Bot* **71**, 1928–1942.
- Xu P, Su H, Jin R, Mao YX, Xu AN, Cheng HY, Wang YF, Meng Q (2020). Shading effects on leaf color conversion and biosynthesis of the major secondary metabolites in the albino tea cultivar 'Yujinxiang'. *J Agric Food Chem* **68**, 2528–2538.
- Yan M, Yan Y, Wang P, Wang YP, Piao XM, Di P, Yang DC (2023). Genome-wide identification and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in *Panax ginseng* indicates its possible roles in root development. *Plants* **12**, 3943.
- Yao MQ, Chen WW, Kong JH, Zhang XL, Shi NN, Zhong SL, Ma P, Gallusci P, Jackson S, Liu YL, Hong YG (2020). *METHYLTRANSFERASE1* and ripening modulate vivipary during tomato fruit development. *Plant Physiol* **183**, 1883–1897.
- Yu H, Cui N, Guo K, Xu W, Wang HF (2023). Epigenetic changes in the regulation of carotenoid metabolism during honeysuckle flower development. *Hortic Plant J* **9**, 577–588.
- Yue PT, Lu Q, Liu Z, Lv TX, Li XY, Bu HD, Liu WT, Xu YX, Yuan H, Wang AD (2020). Auxin-activated *MdARF5* induces the expression of ethylene biosynthetic genes to initiate apple fruit ripening. *New Phytol* **226**, 1781–1795.
- Zhang Y, Zhao GY, Li YS, Mo N, Zhang J, Liang Y (2017). Transcriptomic analysis implies that GA regulates sex expression via ethylene-dependent and ethylene-independent pathways in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Front Plant Sci* **8**, 10.
- Zheng J, Wu H, Zhu HB, Huang CY, Liu C, Chang YS, Kong ZC, Zhou ZH, Wang GW, Lin YJ, Chen H (2019). Determining factors, regulation system, and domestication of anthocyanin biosynthesis in rice leaves. *New Phytol* **223**, 705–721.

Identification and Expression Analysis of DNA Methyltransferase in *Begonia masoniana*

Tingxin Chen¹, Min Fu³, Na Li², Leilei Yang², Lingfei Li^{2*}, Chunmei Zhong^{1*}

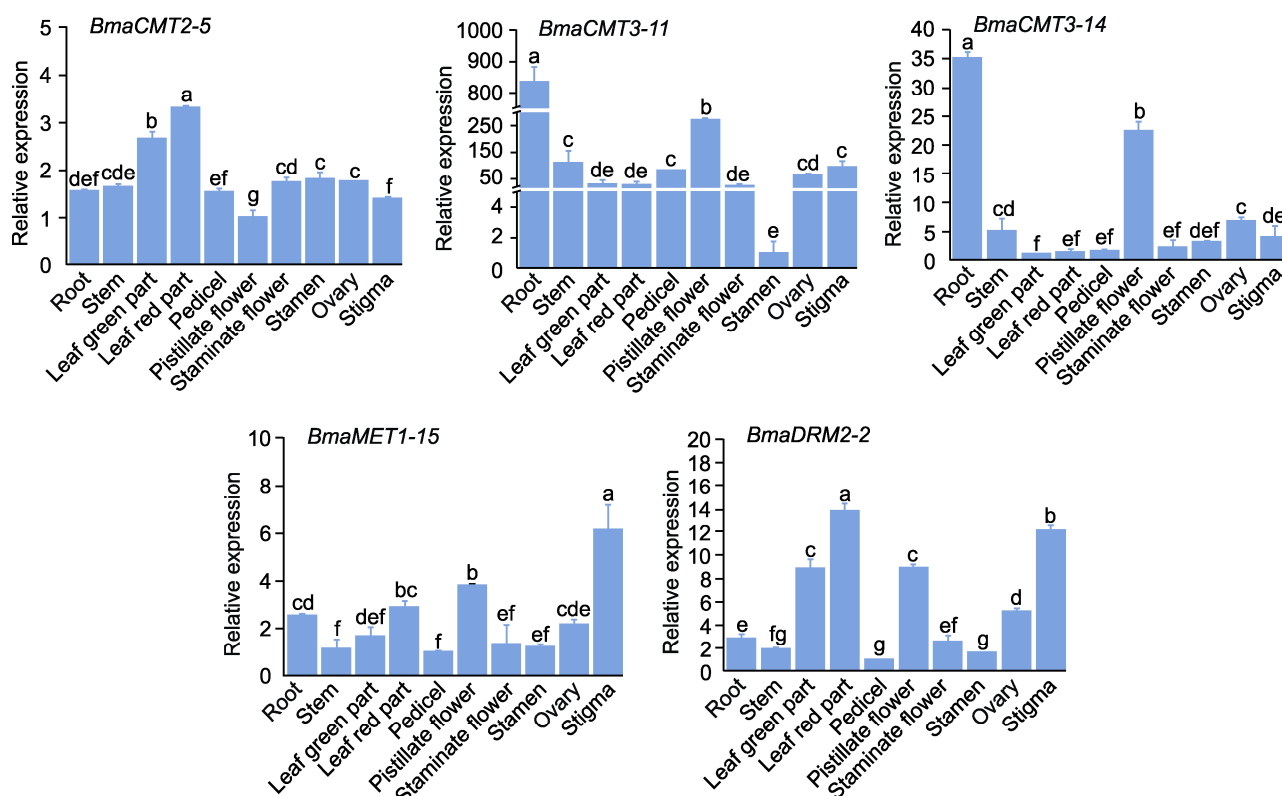
¹Guangdong Engineering Technology Research Center of Agricultural and Forestry Biomass, Key Laboratory of Energy Plants Resource and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Biomass Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; ²Key Laboratory of Southern Subtropical Plant Diversity, Fairy Lake Botanical Garden, Shenzhen & Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518004, China; ³Zhongshan Agricultural Science and Technology Extension Center, Zhongshan 528400, China

INTRODUCTION: DNA methylation is one of the important epigenetic modifications involved in the regulation of plant genome stability, development and stress responses. DNA methylation introduces methylation groups into DNA molecules, thereby altering the activity of DNA segments. DNA methylation is catalyzed by DNA methyltransferase, a process by which methyl groups formed from S-adenosyl-L-methionine are transferred via covalent links to specific locations in the DNA sequence to form N4-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-methyladenine, or 7-methylguanine. However, there are few reports about the effects of DNA methyltransferase on leaf variegation formation and stress response of *Begonia*.

RATIONALE: Studies have shown that DNA methylation is involved in regulating the formation of leaf color, flower color and leaf variegation, as well as responses to stresses and hormones. As an endemic species of *Begonia*, *Begonia masoniana* has unique and beautiful leaf markings, pink, dark green and light green in different developmental stages. It has high ornamental value and is an excellent foliage plant. Therefore, based on the genomic data, this study conducted genome-wide identification and expression pattern analysis of DNA methyltransferase genes, aiming to explore the genetic resources that regulate the formation of leaf variegation.

RESULTS: To investigate whether DNA methyltransferase is involved in the regulation of leaf variegation formation and stress response in *B. masoniana*, bioinformatics analysis was used to identify the genes encoding DNA methyltransferase. Five genes were obtained from the genome of *B. masoniana*. According to the protein structural characteristics, their encoded proteins were divided into three categories including CMT, MET and DRM. The sequence length and intron number of these genes were significantly categorized into different subgroups, but their structure and conserved domains in the same subgroup were highly conserved. In addition, all the encoded proteins were predicted to locate in the nucleus. The promoters of these genes contain a large number of *cis*-acting elements such as light response, MYB binding, and plant hormone response elements. Analysis of hormone response patterns showed that the gene expression of CMT3 was significantly decreased under GA, SA and NAA, and the gene expression of CMT2 was significantly decreased under MeJA and NAA, while MET-type and DRM-type genes displayed significantly increased expression under GA and ABA treatments. In addition, tissue specific analysis showed that the expression levels of *BmaCMT2-5* and *BmaDRM2-2* in leaves were significantly higher than those of other tissues, while the expressions of these two genes and *BmaMET1-15* in red part of leaves were significantly higher than that of green part, implying that these three genes may be involved in regulating the formation of leaf variegation.

CONCLUSION: The structure and function of DNA methyltransferase genes vary significantly across different categories in *B. masoniana*. However, within each category, members display high conservation in gene structure, conserved domains, motifs, and evolutionary patterns. These genes are likely to play crucial roles in the growth and development of diverse tissues and organs, as well as in responding to various biological and abiotic stresses. Moreover, based on the differential expression patterns of *BmaCMT2-5*, *BmaMET1-15*, and *BmaDRM2-2* genes between leaf variegation and non-variegation areas, coupled with the abundance of MYB regulatory elements related to anthocyanin synthesis in their promoters, it is hypothesized that these genes may contribute to the formation of leaf variegation. As the current understanding of the functional roles of these methyltransferase genes is largely speculative, future research should focus on their functional validation, which will involve utilizing reverse genetics techniques coupled with phenotypic observations to determine their involvement in specific biological processes. Additionally, physiological, biochemical, and molecular biological methods should be employed to elucidate the precise mechanisms of their actions.



Relative expression levels of DNA methyltransferase genes in different tissues and organs of *Begonia masoniana*

Key words *Begonia masoniana*, leaf variegation, DNA methyltransferase, phytohormones

Chen TX, Fu M, Li N, Yang LL, Li LF, Zhong CM (2024). Identification and expression analysis of DNA methyltransferase in *Begonia masoniana*. *Chin Bull Bot* **59**, 726–737.

* Authors for correspondence. E-mail: lingfei_li@szbg.ac.cn; zhongchunmei@scau.edu.cn

(责任编辑: 孙冬花)

通讯作者/团队简介

钟春梅, 华南农业大学生物质工程研究院副教授, 硕士生导师, 农业农村部能源植物资源与利用重点实验室副主任兼秘书, 中国植物生理与分子生物学学会能源植物专业委员会委员。主要从事薯蓣属药食两用植物的品质调控与品种培育等研究。主持国家自然科学基金等项目4项, 以第一或通讯作者(含共同)在 *Plant Physiology*、*Horticulture Research* 和 *Journal of Experimental Botany* 等期刊上发表论文20余篇, 其中SCI论文14篇。授权国家发明专利5件。

李凌飞, 深圳市中国科学院仙湖植物园副研究员, 硕士生导师, 中国野生植物保护协会秋海棠专业委员会副主任委员, 广东省植物学会理事, 《广东农业科学》青年编委。主要从事园艺植物种质资源收集与利用、植物基因组学及园艺品质形成分子生物学等研究。主持国家自然科学基金等项目6项, 以第一或通讯作者(含共同)在 *Nature Plants*、*New Phytologist* 和 *Journal of Experimental Botany* 等期刊发表论文30余篇, 其中SCI论文13篇。授权国家发明专利6件, 获登录或评定植物新品种6个。