

## • 药材与资源 •

## 醇型和酮型广藿香 DNA 甲基化的 MSAP 分析

谢宜杰<sup>1</sup>, 刘晓莹<sup>1</sup>, 罗可可<sup>1</sup>, 靳磊<sup>1</sup>, 严寒静<sup>1,2</sup>, 张宏意<sup>1,2</sup>, 何梦玲<sup>1,2\*</sup>

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点实验室, 广东 广州 510006

**摘要:**目的 使用 MSAP 技术对 2 种化学型广藿香 *Pogostemon cablin* 的基因组 DNA 进行甲基化分析。方法 使用甲基化敏感扩增多态性 (methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP) 技术检测 2 种化学型、共计 197 个广藿香样本的 DNA 甲基化程度。结果 4 类 MSAP 位点信息的 Shannon 多态性指数的最高值或较高值均在阳春、德庆、高州大垌、禄步、广宁 5 个产地中产生; 石牌广藿香 (酮型) 与其余产地的广藿香 (醇型) 形成 2 个分支; 广藿香居群间的变异所占百分比远大于居群内变异所占百分比, 达 60.66%; 共筛选出 10 条石牌产地与其余产地的差异性片段并进行测序分析, 其中一条属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族。结论 可通过 MSAP 技术在不同来源的样品中鉴别出石牌产地的广藿香; 广藿香不同化学型的形成与其 DNA 甲基化水平有着密切的联系, 尚需更进一步的研究。

**关键词:** 广藿香; 甲基化敏感扩增多态性; DNA 甲基化; 广藿香醇型; 广藿香酮型

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)20-5293-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.20.023

MSAP analysis of DNA methylation between pogoston-type and patchouliol-type of *Pogostemon cablin*XIE Yi-jie<sup>1</sup>, LIU Xiao-ying<sup>1</sup>, LUO Ke-ke<sup>1</sup>, JIN Lei<sup>1</sup>, YAN Han-jing<sup>1,2</sup>, ZHANG Hong-yi<sup>1,2</sup>, HE Meng-ling<sup>1,2</sup>

1. College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Production &amp; Development of Cantons Medicinal Materials, Guangzhou 510006, China

**Abstract:****Objective** To analyze the DNA methylations between two chemical types of *Pogostemon cablin* using MSAP technique. **Methods** Methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique was used to detect the DNA methylation degree of two chemical type and a total of 197 *P. cablin* samples. **Results** The highest or higher values of the Shannon polymorphism index of the four types of MSAP locus information were produced in the five areas of Yangchun, Deqing, Gaozhou Datong, Lubu, and Guangning. It formed two branches with *P. cablin* Shipaiensis (Pogostone-type) and the rest (Patchouliol-type). The percentage of variation among the populations was 60.66%, which was far greater than that within the population. A total of 10 differential fragments were screened out, sequenced and analyzed, one of those belongs to the serine/threonine protein kinase family. **Conclusion** The MSAP technique can be used to identify the different origins of *P. cablin*. The formation of different chemical types of *P. cablin* closely related to its DNA methylation level, and further research is needed.

**Keywords:** *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; MSAP; DNA methylation; pogoston-type of *Pogostemon cablin*; patchouliol-type of *Pogostemon cablin*

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 属唇形科刺蕊草属草本或半灌木, 具芳香化浊、发表解暑等功效, 主治湿浊中阻、脘痞呕吐等症<sup>[1]</sup>。目前根据主要化学成分含量的差异, 可将广藿香分为 2

种化学型: 广藿香醇型 (广州、肇庆市高要区产“牌香类”) 和广藿香酮型 (广东湛江地区吴川、遂溪、雷州产“琼香类”) <sup>[2]</sup>。由于广藿香的核苷酸序列并未发生变化, 因此化学型的差异属于表观

收稿日期: 2020-02-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81773829); 广东省重点领域研发计划 (2020B020221002); 广东省科技计划项目 (2015A030302084); 广东省科技计划项目 (2017A030303082); 广东省科技计划项目 (2017A030303081); 广东省中医药管理局项目 (20163010)

作者简介: 谢宜杰, 男, 硕士, 从事中药资源开发与品质评价研究工作。E-mail: 1030781862@qq.com

\*通信作者 何梦玲, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 从事中药资源开发与品质评价研究工作。E-mail: hmlldf@126.com

遗传变异的范畴。DNA 的甲基化是一种重要的表观遗传修饰,与基因表达、基因组防御、细胞分化、染色质失活和基因组印记的调节有关。近年研究发现,植物在发育和分化过程中通过改变甲基化的状态来调节基因的表达<sup>[3]</sup>,DNA 甲基化水平在不同植物中都与其生长阶段存在着密切的联系<sup>[4-5]</sup>。MSAP 技术是研究 DNA 甲基化的有效技术。该技术能够检测全基因组范围内 5'-CCGG 位点的甲基化模式,分析不同居群的甲基化位点信息,还可针对特异性片段进行切胶测序,以明确与表观遗传变异相关的基因,适合于本研究中对于不同化学型广藿香的分析。目前有关广藿香的研究包括百秋李醇的代谢途径<sup>[6-7]</sup>及使用分子生物学技术<sup>[8-9]</sup>对不同种群的广藿香进行研究,但尚未发现有学者对不同化学型的广藿香进行分子生物学研究。MSAP 技术被广泛应用于研究不同居群、不同品种植物的 DNA 甲基化模式及多态性等。Li 等<sup>[10]</sup>的研究发现,MSAP 标记技术可以有效地检测野生大麦种群内和种群之间的 DNA 甲基化模式;在 Ocana 等<sup>[11]</sup>的研究中,23 个稳定的 MSAP 条带能够区分 92.5%

的葡萄克隆个体;李宁等<sup>[12]</sup>使用 MSAP 技术分析不同辣椒品种果实发育过程中的 DNA 甲基化时,发现辣椒 DNA 甲基化的位点既存在于 DNA 的编码区,也存在于非编码区。以上这些研究都说明 MSAP 技术是分析种群结构、探究物种之间变异的有效工具。

本实验以不同化学型广藿香为材料,使用 MSAP 技术对广藿香基因组的甲基化情况进行研究,并利用得到的分子标记数据对不同化学型广藿香的遗传结构、遗传分化程度、遗传距离和遗传多样性等内容进行分析探讨,初步探索不同化学型广藿香的分子生物学上的区别。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

样品为采自 10 个不同居群的广藿香种质,共计 197 份,经广东药科大学严寒静教授鉴定为广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth., 样品信息来源如表 1 所示。从每株广藿香上采集 20 片生长良好、无病虫害的叶片,硅胶干燥并放入 -20 °C 冰箱中保存备用。

表 1 不同产地广藿香样品信息

Table 1 Sample informations of *P. cablin* from different origins

| 样品编号   | 采集地点           | 纬度      | 经度       | 数量 | 采集时间    |
|--------|----------------|---------|----------|----|---------|
| BS1-20 | 海南白沙县珠碧江农场一队   | 19.39°N | 109.30°E | 20 | 2016-11 |
| SX1-20 | 广东湛江市遂溪县城月镇后溪村 | 21.21°N | 110.07°E | 20 | 2016-12 |
| GZ1-18 | 广东茂名市高州市大垌村    | 21.89°N | 110.66°E | 18 | 2017-01 |
| YC1-20 | 广东阳江市阳春市潭水镇禾乡村 | 22.03°N | 111.59°E | 20 | 2016-11 |
| DQ1-23 | 广东肇庆德庆县武莖镇罗冲村  | 23.29°N | 112.23°E | 23 | 2016-11 |
| LT1-20 | 广东肇庆高要区莲塘镇牛暗坪村 | 22.95°N | 112.47°E | 20 | 2016-11 |
| LB1-20 | 广东肇庆高要区禄步镇上升村  | 22.92°N | 112.48°E | 20 | 2016-11 |
| GN1-20 | 广东肇庆广宁县宾亨镇君良村  | 23.39°N | 112.78°E | 20 | 2016-11 |
| SH1-21 | 广东肇庆四会县迳口镇新围村  | 23.50°N | 112.78°E | 21 | 2016-11 |
| SP1-15 | 广东省广州市天河区上社社区  | 23.21°N | 113.37°E | 15 | 2017-01 |

### 1.2 试剂

3 种限制性内切酶 *Hpa* II (10 U/μL)、*Msp* I (20 U/μL)、*Eco*R I (20 U/μL)、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL)、ATP (0.01 mol/L)、NEB buffer 4 均购自 NEB (北京) 有限公司; BSA (20 mg/μL) 购自宝日医生物技术有限公司; 植物 DNA 提取试剂盒、Marker 购自北京庄盟有限公司; 酶切产物纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; 普通引物、接头序列由华大基因公司合成; 带荧光修饰的引物由武汉天一辉远公司合成; DTT 试剂、PCR tubes、1.5 mL 离心管购自 Axygen 有限公司。

### 1.3 仪器

DL-600C 型电泳仪 (北京东林昌盛生物科技有限公司); BG-subMIDI 型水平电泳槽 (北京百晶生物技术有限公司); Tocan-4100 型全自动凝胶成像系统 (上海领成生物科技有限公司); K5500Plus 型超微量分光光度计 (北京凯奥科技发展有限公司); 3K15 型台式高速冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); MJ-54A 型高压蒸汽灭菌锅 (美国施都凯仪器设备有限公司); 3730XL 型毛细管电泳分析仪 (Applied Biosystems 公司)。

## 2 方法

### 2.1 毛细管凝胶电泳

使用庄盟植物 DNA 提取试剂盒提取 DNA，通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和超微量紫外分光光度计检测所提取 DNA 的质量、浓度与纯度。提取之后，稀释至 20 ng/μL，-20 °C 保存。

根据 Guevara 等<sup>[13]</sup>的方法进行酶切、连接和 PCR 扩增。将选择性扩增产物进行毛细管凝胶电泳检测，可得到经 2 组酶切、扩增后，包含广藿香样品的基因组 DNA 的 MSAP 位点信息的 fsa 文件以及荧光检测图。经同一组酶切、选择性扩增后，石牌产地含有而其他产地不含有的 MSAP 片段作为差异片段进行测序分析。其中，使用的接头及引物的序列如表 2 所示。

### 2.2 数据处理

**2.2.1 不同产地广藿香 MSAP 位点信息** 参考自 Schulz 等<sup>[14]</sup>及 Mix Scoring2 软件获取 MSAP 位点信息。

表 2 广藿香 MSAP 分析引物筛选使用的引物和接头序列  
Table 2 Sequence of primers and adaptors used in selection of MSAP analysis primers of *P. cablin*

| 引物                                      | 序列                        |
|-----------------------------------------|---------------------------|
| EcoRI-adapter 1 (接头)                    | 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'   |
| EcoRI-adapter 2 (接头)                    | 5'-AATTGGTACGCAGTC-3'     |
| HpaII/MspI-adapter 1 (接头)               | 5'-GACGATGAGTCTCGAT-3'    |
| HpaII/MspI-adapter 2 (接头)               | 5'-CGATCGAGACTCAT-3'      |
| EcoRI+1 (预扩增引物)                         | 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'   |
| HpaII/MspI+1 (预扩增引物)                    | 5'-GATGAGTCTCGATCGGC-3'   |
| EcoRI+AA-FAM <sup>1</sup> (选择性扩增引物)     | 5'-GACTGCGTACCAATTCAA-3'  |
| EcoRI+AG-HEX <sup>2,3</sup> (选择性扩增引物)   | 5'-GACTGCGTACCAATTTCAG-3' |
| EcoRI+AC-ROX <sup>4,5,6</sup> (选择性扩增引物) | 5'-GACTGCGTACCAATTTCAC-3' |
| HpaII/MspI+CAA <sup>2,4</sup> (选择性扩增引物) | 5'-GATGAGTCTCGATCGGCAA-3' |
| HpaII/MspI+CAT <sup>1,5</sup> (选择性扩增引物) | 5'-GATGAGTCTCGATCGGCAT-3' |
| HpaII/MspI+CTA <sup>3</sup> (选择性扩增引物)   | 5'-GATGAGTCTCGATCGGCTA-3' |
| HpaII/MspI+CTT <sup>6</sup> (选择性扩增引物)   | 5'-GATGAGTCTCGATCGGCTT-3' |

上标的相同数字表示选择性扩增反应中一对引物组合

The same number in the superscript indicates a pair of primer combinations in the selective amplification reaction

**2.2.2 UPGMA 聚类分析及 PCoA 主坐标分析** 使用 NTSYS-2.10e 软件对 MSAP 位点信息数据进行 UPGMA 聚类分析及 PCoA 主坐标分析，可得到 197 个广藿香个体的树状聚类图及 PCoA 分析图。

**2.2.3 AMOVA 分子方差学分析** 使用 Arlequin-ver3.5 软件对 MSAP 位点信息数据进行 AMOVA 分析，通过 MSAP 位点信息计算与广藿香基因组 DNA 甲基化有关的广藿香物种遗传变异的来源以及各个 MSAP 位点的统计学意义。

**2.2.4 差异片段的回收测序分析** 根据 UPGMA 等分析的结果，筛选出经同一组酶切后，将测序分析所得到的 MSAP 序列信息与本课题组的广藿香转录组序列进行本地 Blast 比对，以找出差异片段可能存在的基因中，哪些与广藿香醇或酮的代谢通路相关。在数据计算中，多态性位点比例和 Shannon 多态性指数计算公式如下：

多态性位点比例 = 多态性位点数 / 该类型 MSAP 位点总数

Shannon 多态性指数 =  $-\sum p_i \log_2 p_i$

其中  $p_i$  指 MSAP 标记中评分为“1”的标记占该种群内所有标记的百分比。

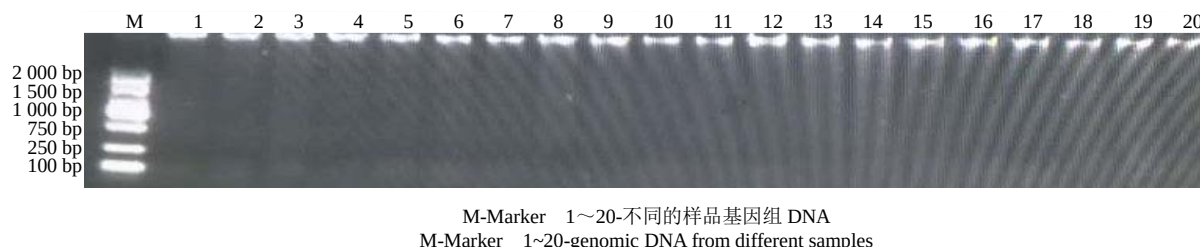
## 3 结果与分析

### 3.1 样品 DNA 的检测结果

基因组 DNA 需满足 2 个条件，方可进行后续实验。第一，基因组 DNA 经超微量紫外分光光度计检测  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.7~1.9；第二，经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果为仅出现一条明亮的条带，无拖尾等基因组降解现象，如图 1 所示。不满足任意一个条件的 DNA 样本需重新提取检测。

### 3.2 毛细管凝胶电泳分析结果

毛细管电泳结果如图 2 所示。每个样品经 2 组酶切、6 对选扩引物扩增后，共有 12 张荧光 PCR 检测图，本实验挑选 2 对引物的荧光检测图作为代表说明。荧光 PCR 检测图中的横轴表示各个 MSAP 位点的 bp 值，纵轴表示该位点序列的 DNA 浓度，如图 2-B



M-Marker 1~20-不同的样品基因组 DNA  
M-Marker 1~20-genomic DNA from different samples

图 1 YC1-20 广藿香样品的基因组 DNA 检测图

Fig.1 Genomic DNA detection map of YC1-20 of *P. cablin*

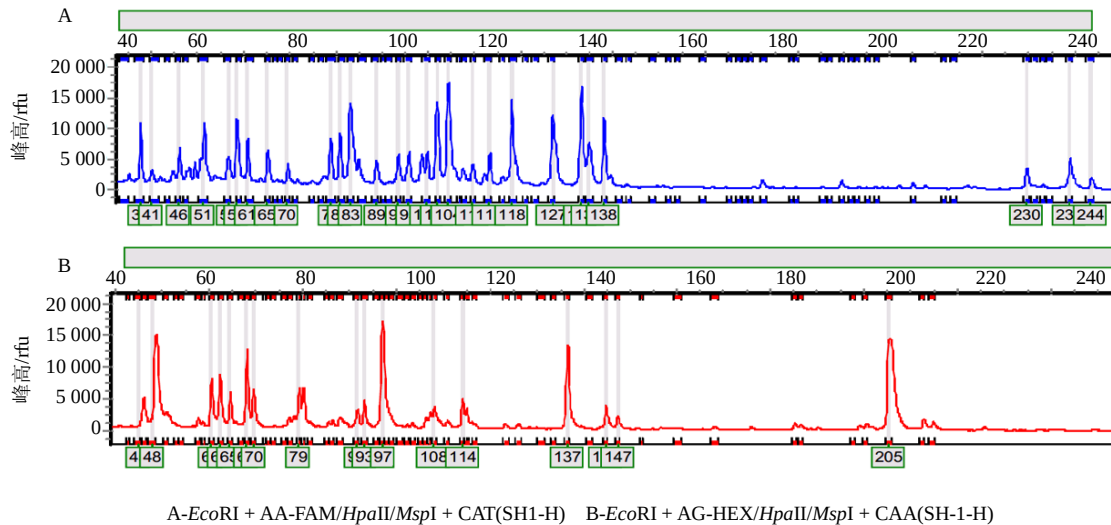


图 2 2 对选择性扩增引物的毛细管电泳图

Fig.2 Capillary electrophoresis of two pairs of selective amplification primers

中 205 bp 处存在峰高为约 15 000 rfu 的位点。

### 3.3 数据与分析

**3.3.1 不同产地广藿香基因 DNA 的 MSAP 位点信息** 在本实验中, 使用了 6 对选择性扩增引物对 10 个产地共计 197 个广藿香样品进行了 MSAP 分析, 一共得到 2 427 个 MSAP 位点, 其中类型 I 占 33.83%, 类型 II 占 33.25%, 类型 III 占 32.92%(类型划分标准见表 3)。其中的 1 053 个多态性位点内一共检测到了 78 297 条 MSAP 条带, 每对引物组合检测到的多态性位点数量范围是 137~210。大多数原始数据矩阵中的多态性位点经过 Mix Scoring2 评分方法转换后都有多种类型的 MSAP 条带, 少数仅占一种类型。在最终得到的多态性位点中, 821 个包含未甲基化的 DNA 片段, 807 个 DNA 片段含有甲基化类型为 HMECG-或 MECG- (记为“M”型) 的位点, 799 个 DNA 片段含有甲基化类型为 HMECCG (记为“H”型) 的位点。

不同产地广藿香的 MSAP 总体位点信息见表 4, “H”型/“M”型/非甲基化甲基化位点信息见表 5。其中, 多态性位点指至少包含 2 种类型, 且含样品量少(样品数目 $\geq 2$ )的位点, 独有位点数指某产地至少有一个样品含有, 而其他产地的样品不含有的位点。

从表 4、5 中可以看出, 多态性位点数、多态性位点比例、Shannon 多态性指数这 3 个指数的最高值或较高值均在阳春、德庆、高州大垌、禄步、广宁这 5 个产地中, 而四会、遂溪、莲塘这 3 个产地的 Shannon 多态性指数均为最低值, 猜测可能农

表 3 *Hpa* II 酶和 *Msp* I 酶对 5'-CCGG 位点不同甲基化类型的敏感度

Table 3 Sensitivity of *Hpa* II and *Msp* I enzymes to different methylation types at 5'-CCGG sites

| 甲基化状态      | <i>Hpa</i> II | <i>Msp</i> I | 类型  |
|------------|---------------|--------------|-----|
| 非甲基化       | +             | +            | I   |
| 内部胞嘧啶全甲基化  | -             | +            | II  |
| 内部胞嘧啶半甲基化  | -             | +            | II  |
| 外部胞嘧啶半甲基化  | +             | -            | III |
| 外部胞嘧啶全甲基化  | -             | -            | IV  |
| 两个胞嘧啶的全甲基化 | -             | -            | IV  |
| 两个胞嘧啶的半甲基化 | -             | -            | IV  |

“+”表示能够酶切,“-”表示不能酶切

“+” means that it can be digested,“-” means that it cannot be digested

户之间的频繁引种导致 5 个产地中的广藿香种源混乱, 而后 3 个产地则与之相反。

石牌产地的样品, 虽然其样品数目较少, 但其独有总位点数、独有“H”型甲基化位点数却处于较高水平, 独有“M”型甲基化位点数更是为所有产地样品中最高, 此外, 其非甲基化位点为所有产地中相对较低。石牌产地样品测得 Shannon 多态性指数在不同的类型中均处于较低水平, 这说明其种源单一的可能性较大。

**3.3.2 UPGMA 聚类分析** 所有产地广藿香样品 UPGMA 聚类图如图 3 所示, 其中分支 1 为海南白沙产地所有样品聚成; 分支 2 为遂溪、高州大垌、德庆、莲塘、禄步、广宁、四会 7 个产地的样品聚成; 分支 3 为阳春产地所有样品聚成; 分支 4 为石牌产地所有样品聚成。从整体上看, 石牌产地的样

表 4 不同产地广藿香 MSAP 总体位点信息

Table 4 Informations of MSAP totalsites of *P. cablin* from different origins

| 产地   | 样品编号   | MSAP 位点数 | 多态性位点数 | 多态性位点比例/% | 独有位点数 | Shannon 多态性指数 |
|------|--------|----------|--------|-----------|-------|---------------|
| 海南白沙 | BS1-20 | 625      | 465    | 20.03     | 112   | 0.12          |
| 遂溪   | SX1-20 | 337      | 337    | 13.89     | 40    | 0.07          |
| 高州大垌 | GZ1-18 | 956      | 809    | 34.84     | 56    | 0.21          |
| 阳春   | YC1-20 | 755      | 651    | 28.04     | 203   | 0.18          |
| 德庆   | DQ1-23 | 833      | 764    | 32.90     | 87    | 0.17          |
| 莲塘   | LT1-20 | 359      | 359    | 14.79     | 63    | 0.08          |
| 禄步   | LB1-20 | 942      | 775    | 33.38     | 57    | 0.22          |
| 广宁   | GN1-20 | 921      | 850    | 36.61     | 122   | 0.21          |
| 四会   | SH1-21 | 439      | 438    | 18.86     | 73    | 0.09          |
| 广州石牌 | SP1-15 | 541      | 376    | 16.19     | 124   | 0.11          |

表 5 不同产地广藿香 “H” 型/“M” 型/非甲基化位点信息

Table 5 "H" type/"M" type/non-methylation site information of different origins *P. cablin*

| 产地   | “H” 型/“M” 型/<br>非甲基化位点数 | 多态性 “H” 型/<br>“M” 型/非位点数 | 多态性 “H” 型/“M”<br>型/非甲基化位点比例 | 独有 “H” 型/“M”<br>型/非甲基化位点数 | “H” 型/“M” 型/非<br>Shannon 多态性指数 |
|------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| 海南白沙 | 174/211/240             | 149/173/143              | 19.89/22.04/18.15           | 32/36/44                  | 0.13/0.13/0.12                 |
| 遂溪   | 152/87/98               | 152/87/98                | 19.02/10.78/11.94           | 26/5/9                    | 0.09/0.05/0.06                 |
| 高州大垌 | 238/281/437             | 238/281/290              | 31.78/35.80/36.80           | 18/25/13                  | 0.18/0.21/0.24                 |
| 阳春   | 237/274/244             | 211/258/182              | 28.17/32.87/23.10           | 79/68/56                  | 0.19/0.20/0.14                 |
| 德庆   | 232/298/303             | 232/298/234              | 30.97/37.96/29.70           | 35/34/18                  | 0.15/0.20/0.17                 |
| 莲塘   | 134/109/116             | 134/109/116              | 16.77/13.51/14.13           | 21/18/24                  | 0.08/0.07/0.08                 |
| 禄步   | 253/228/461             | 253/228/294              | 33.78/29.04/37.31           | 19/19/19                  | 0.25/0.16/0.24                 |
| 广宁   | 277/269/375             | 277/268/305              | 36.98/34.14/38.71           | 52/21/49                  | 0.17/0.23/0.23                 |
| 四会   | 158/140/141             | 158/140/140              | 21.09/17.83/17.77           | 25/30/18                  | 0.10/0.08/0.10                 |
| 广州石牌 | 180/257/104             | 141/166/69               | 18.83/21.15/8.76            | 42/71/11                  | 0.13/0.14/0.06                 |

品形成独立分支，与其余 9 个产地的样品形成第 1 分支；在其余产地的样品构成的分支中，阳春产地的样品形成独立分支，与剩余 8 个产地的样品形成第 2 分支；在剩余 8 个产地的样品形成的分支中，GN13（肇庆广宁 13）样品与其余样品形成第 3 分支；第 4 分支则由白沙产地样品聚成的单支与其余产地样品共同聚成的一支组成。

从结果上看，本实验用于 MSAP 分析 10 个产地样品中，仅海南白沙、阳春与广州石牌 3 个产地形成独立分支，而其余 7 个产地的样品中，不同产地的样品互相交叉，居群之间较为混乱（图 4）。从地理位置上看，同样来源于广东省产区的 9 个产地样品并没有与海南白沙产地的样品构成两大分支，同样来源于广东省肇庆市的德庆、禄步、广宁、莲塘 4 个产地的样品同样没有聚成一支，说明

通过 MSAP 分析得到的不同广藿香居群聚类信息与地理位置无明显的相关性；从传统药材市场上的分类来看，属于“石牌藿香”的广州石牌样品与其余样品可以区分开，这与传统意义上以“石牌藿香”作为道地药材的观念相符；从样品来源与栽培方法上看，广州石牌产地的样品保留了单一的种质，没有从其他产地引种，并由老农户以其独特的栽培方法种植，而其余产地的样品引种频繁，样品来源混乱，种植技术较为粗糙，这是造成其居群内种质混乱的原因之一；从本课题组对于不同产地样品的化学成分测定结果上看<sup>[15]</sup>，归类于“酮型”的石牌广藿香与其余产地广藿香分成了两大分支，但归类于“酮型”的莲塘产地广藿香并没有与石牌产地广藿香聚成一支，这表明，DNA 甲基化仅仅是广藿香出现不同化学型的原因之一。

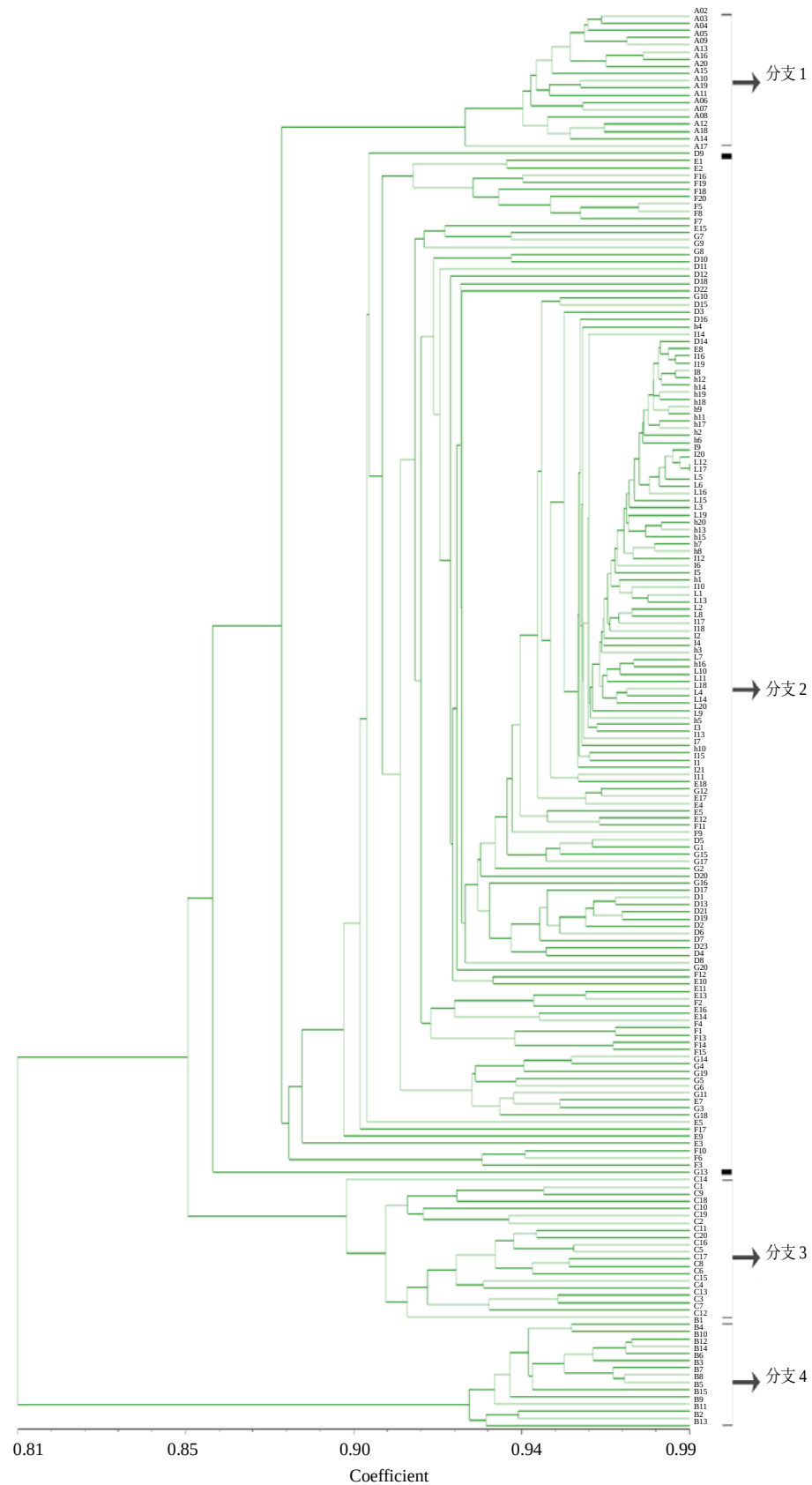


图 3 不同产地广藿香样品 UPGMA 聚类图

Fig.3 UPGMA cluster map of *P. cablin* samples from different origins

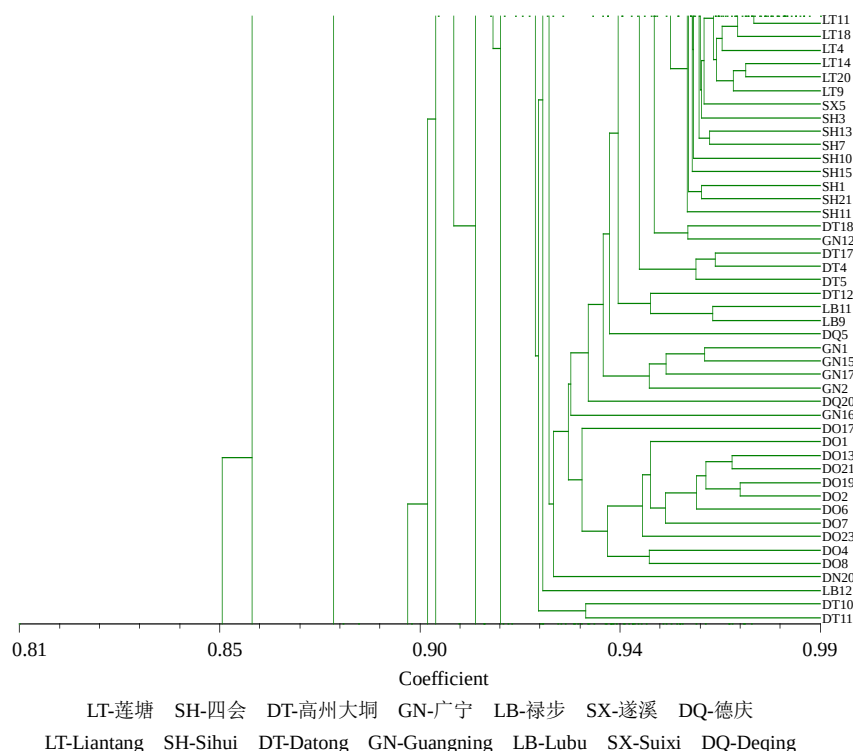


图 4 出现种群内混乱的 7 个广藿香居群部分样品聚类图

Fig.4 Cluster diagram of partial samples of seven *P. cablin* populations that appear chaotic within population

**3.3.3 PCoA 分析** 不同产地的 PCoA 分析如图 5 所示, 其显示的结果与 UPGMA 聚类结果类似。在对产生分类具有 47% 影响因素的 Dim-1 轴上, 石牌产地的样品与其余产地的样品可以明显区分开; 而在对产生分类具有 29% 影响因素的 Dim-2 轴上, 先是将阳春产地的样品区分成一个居群, 然后是白沙产地的样品形成一个居群, 其中虽然 BS17 样品(海南白沙 17)与大部分样品形成的居群有一定距离, 但仍可将其余样品视作一个居群; 最后是剩余产地的样品所形成的居群, 可以看出居群之间非常混乱, 已无法区分开。PCoA 分析的结果同样揭示了不同产地广藿香样品通过 MSAP 分析得出其基因组 DNA 甲基化情况的显著区别。

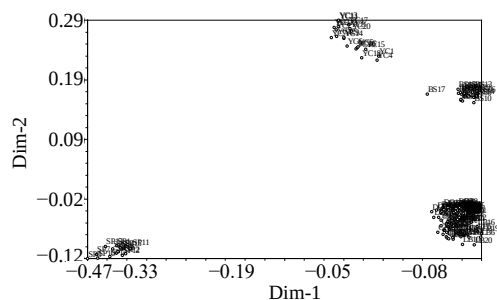


图 5 不同产地广藿香的 PCoA 分析

Fig.5 PCoA analysis of *P. cablin* from different places

**3.3.4 AMOVA 分子方差学分析** 居群的 AMOVA 分子方差学分析结果如表 6 所示。可以看出居群间的变异所占百分比远大于居群内变异所占百分比, 此结论与 PCoA 以及 UPGMA 分析结果一致。此外, 对 Mix Scoring2 评分方法转换得到的所有位点进行位点之间的 AMOVA 分析 (locus by locus), 结果发现, 2 427 个位点中, 58.90% 的位点具有显著性差异 ( $P < 0.05\%$ ), 共计 1 429 个。

表 6 不同产地广藿香样品 MSAP 位点信息的 AMOVA 分子方差学分析结果

Table 6 Results of AMOVA of MSAP site information of *P. cablin* samples from different origins

| 变异来源 | 自由度 | 平方和        | 变异组分       | 百分率/% |
|------|-----|------------|------------|-------|
| 居群间  | 9   | 21 917.465 | 120.399 21 | 60.66 |
| 居群内  | 186 | 14 521.081 | 78.070 33  | 39.34 |

所有位点的  $F$  统计固定指数平均值为 0.61

The average value of  $F$  statistical fixed index for all sites is 0.61

**3.3.5 差异片段的回收测序分析** 根据以上分析的结果, 可以发现石牌产地的样品与其他产地的样品存在较大差异。为寻找可能含有差异片段 DNA 序列的功能基因, 将石牌产地 2 组酶切-选扩后的



条带分别与其他产地的进行对比,并筛选出仅石牌产地含有,其他产地不含有的选扩条带,一共 10 条。

将这些条带测序后,以本课题组测序所得广藿香转录组序列为数据库,进行本地 Blast 比对,比对结果如表 7 所示。其中由引物组合 *EcoRI*+*AG-HEX/HpaII/MspI*+CTA 选扩得到的序列长为 252 bp 的条带,该序列与 c387882.graph\_c0 序列成功匹配,其评分为 127, *E* 值为  $3 \times 10^{-29}$ ,表明该

条带与该段序列同源性较好,该段序列属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,这些激酶参与蛋白质的磷酸化作用,其磷酸化过程已被证实参与到光、高盐、激素、干旱等信号传导途径中,此外,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因在植物抗病途径中也发挥重要作用<sup>[16]</sup>。后续研究中将挑选更多的差异性片段进行测序与比对,以期筛选出与广藿香醇/酮代谢通路中的关键基因或关键酶。

表 7 石牌产地与其他产地差异片段测序结果

Table 7 Sequencing results of different fragments between Shipai origin and other origins

| 序列号               | 评分  | <i>E</i> 值          | 匹配的功能基因或蛋白序列   |
|-------------------|-----|---------------------|----------------|
| c387 882.graph_c0 | 125 | $1 \times 10^{-28}$ | 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶    |
| c343 486.graph_c0 | 60  | $5 \times 10^{-9}$  | 小檗碱桥酶          |
| c258 136.graph_c0 | 44  | $3 \times 10^{-4}$  | 大麻二酚酸合成酶       |
| c389 114.graph_c2 | 36  | 0.079               | 寡聚高尔基复合体亚基     |
| c394 311.graph_c1 | 36  | 0.079               | 吡啶-3-甘油磷酸合成酶   |
| c388 970.graph_c1 | 36  | 0.079               | 小檗碱桥酶          |
| c338 980.graph_c0 | 36  | 0.079               | 大麻二酚酸合成酶       |
| c388 518.graph_c0 | 34  | 0.31                | SNW/SKI-相互作用蛋白 |
| c395 411.graph_c0 | 34  | 0.31                | 锌指蛋白           |

#### 4 讨论

本研究以广藿香叶片作为材料,使用 MSAP 技术分别研究 10 个不同产地广藿香基因组 DNA 的甲基化情况,并使用 UPGMA、AMOVA、PCoA 等方法对数据进行处理,对比前人对于广藿香的居群分析研究,本研究有以下创新之处:(1)分析的样本量较大。包括 10 个不同产地的 197 个样本,能够较全面地反映广藿香居群信息;(2)第一次使用了在 5'端添加荧光修饰的 *EcoR* I-选择性扩增引物,并使用毛细管电泳法代替了以往使用的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法分析广藿香居群,在增加了能检测到扩增条带的同时,避免了使用数码相机结合人工识别条带的误差。(3)本研究第一次对石牌产地的样品与其他产地的样品经选择性扩增后存在的差异条带进行了回收测序分析,为后续对于广藿香表观遗传的深入研究奠定了基础。

在对不同产地的 MSAP 位点信息的检测及对比中,本研究得到 10 个不同产地的 MSAP 总体位点信息、“H”型甲基化位点信息、“M”型甲基化位点信息和非甲基化位点信息。其中,四类信息中 Shannon 多态性指数的最高值或较高值均在阳春、德庆、高州大垌、禄步、广宁 5 个产地中产生,表

明这 5 个产地之间出现频繁引种,种源不清的可能性较大。

在对不同产地的 UPGMA 聚类分析中,从图 3 可以明显看出石牌广藿香(酮型)与其余产地的广藿香(醇型)形成两个分支,且在对不同产地的 PCoA 分析结果(图 5)中,石牌产地的样品也能与其余产地的样品明显区分,这与不同化学型广藿香在其性状及化学成分含量出现较大差异的结果吻合。此外,高达 60.66%的居群间变异来源占比(表 6)也说明了此结论。

罗集鹏等<sup>[2]</sup>在对 6 个产地广藿香挥发油主要成分的研究中,将广州、肇庆地区高要产广藿香“酮型广藿香”,而吴川、遂溪、雷州及海南产广藿香归类为酮型广藿香。本课题组<sup>[15]</sup>在根据不同产地广藿香挥发油的主要成分进行聚类时,得到了相似的结论:龙洞、莲塘、石牌 3 个“酮型”广藿香聚成一支,海南白沙产广藿香聚成一支;其余产地的广藿香聚成一支。但在研究结果中,属“酮型”广藿香的莲塘产地样品却没有与石牌产地的样品聚成一支,而是与遂溪、高州大垌、德庆、禄步、广宁、四会 6 个产地的样品构成了一支,其原因可能如下:(1)DNA 甲基化是表观遗传变异发生的重



要过程,但除此之外,非编码 RNA 以及染色质中同样可产生可遗传的表观变异,植物表观变异来源的多样性是导致本结论与化学型聚类出现差异的重要原因;(2)MSAP 仅能检测 5'-CCGG 位点存在的胞嘧啶甲基化,因此MSAP技术分析的结果不能完全代表广藿香基因组中 DNA 甲基化的类型及比例;(3)广藿香主要化学成分的代谢过程受多种酶及功能基因的影响,由于基因变异存在不确定性,若产生变异的基因不参与广藿香的主要化学的代谢过程,则很难对广藿香化学型分类产生影响。

为了寻找可能导致石牌产地与其他产地广藿香出现遗传变异的功能基因,在对差异片段的测序分析中,本研究发现,变异的形成可能与 c387882.graph\_c0 序列密切相关,该段序列属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,在蛋白质的磷酸化及植物抗病途径中发挥重要作用。在后续的研究中,可以进一步挖掘差异片段所属基因的转录或其下游基因的功能等,以期进一步完善导致不同化学型广藿香形成的基因表达过程。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 罗集鹏,刘玉萍,冯毅凡,等. 广藿香的两个化学型及产地与采收期对其挥发油成分的影响 [J]. 药学学报, 2003, 38(4): 307-310.
- [3] Dhar M S, Pethe V V, Guota V S, *et al.* Predominance and tissue specificity of adenine methylation in rice [J]. *Theor Appl Genet*, 1990, 80(3): 402-408.
- [4] Baurens F C, Nicolleau J, Legavre T, *et al.* Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker [J]. *Tree Physiol*, 2004, 24(4): 401-407.
- [5] 郭广平,顾小平,袁金玲,等. 不同生理年龄毛竹 DNA 甲基化的 MSAP 分析 [J]. 遗传, 2011, 33(7): 794-800.
- [6] 陈英. 广藿香中百秋李醇的动态积累及 PTS 基因的克隆与表达研究 [D]. 海口: 海南大学, 2015.
- [7] 刘信丹,张英,吴孟华,等. 广藿香醇合成酶基因 Pc-PTS<sub>1</sub> 的克隆和生物信息学分析 [J]. 中药材, 2018, 41(2): 302-308.
- [8] 李颖,李劲平. 广藿香道地性的 RAPD 研究 [J]. 现代医药卫生, 2006, 22(13): 2027-2028.
- [9] 席秀丽,胡珊,邬龙怡,等. 不同产地广藿香的 SCoT 分子鉴定 [J]. 湖北农业科学, 2019, 58(2): 86-90.
- [10] Li Y, Shan X, Liu X, *et al.* Utility of the methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) marker for detection of DNA methylation polymorphism and epigenetic population structure in a wild barley species (*Hordeum brevisubulatum*) [J]. *Ecological Res*, 2008, 23(5): 927-930.
- [11] Ocana J, Walter B, Schellenbaum P. Stable MSAP markers for the distinction of vitis vinifera cv pinot noir clones [J]. *Mol Biotechnol*, 2013, 55(3): 236-248.
- [12] 李宁,帕提古丽·艾斯木托拉,杨生保,等. 不同辣椒品种果实发育过程中 DNA 甲基化的 MSAP 分析 [J]. 新疆农业科学, 2018, 55(9): 1601-1607.
- [13] Guevara M Á, Nuria de M, Enrique S L, *et al.* Analysis of DNA cytosine methylation patterns using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1456: 99-112.
- [14] Schulz B, Eckstein R L, Durka W. Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies [J]. *Mol Ecol Res*, 2013, 13(4): 642-653.
- [15] 胡贞贞,黄伟展,卢昌华,等. 不同产地广藿香非靶向代谢组学研究 [J]. 中药材, 2019, 42(2): 271-278.
- [16] Finnegan E J, Brettell R I, Dennis E S. The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression [J]. *Exs*, 1993, 64(64): 218-261.