

河南宝丰气象因子与烤烟 DNA 甲基化关系分析

贾峰¹, 杜铮¹, 李亚男², 谢世诚³, 孙博³, 刘卫群³

(1. 河南农业大学烟草学院, 郑州 450002; 2. 叶县气象局, 河南 叶县 467200; 3. 河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002)

摘要: 通过建立宝丰气象因子与烤烟烟叶 DNA 甲基化的数学模型, 找出影响宝丰烟叶 DNA 甲基化的主要气象因子, 为研究宝丰烟叶品质和风格的形成提供一种方法。以灰色关联分析筛选出对 DNA 甲基化影响大的 4 个气象因子为自变量, 把 DNA 甲基化作为因变量, 建立修正的 Logistic 数学模型并进行分析。结果表明, 单因子对 DNA 甲基化影响程度依次为平均最小湿度、平均日照时数、平均气温差, 且为正相关; 总降水量与 DNA 甲基化水平呈负相关。两因素交互效应分析表明, 平均最小湿度、平均气温差、平均日照时数之间对 DNA 甲基化水平均具有协同效应, 总降水量与平均最小湿度和平均气温差之间对 DNA 甲基化的影响有拮抗作用。

关键词: 烤烟; DNA 甲基化; 气象因子; 修正的 Logistic 模型

中图分类号: S572; Q142

文献标识码: A

文章编号: 1673-7148(2011)02-0001-06

引言

气象因子在烤烟香气风格的形成过程中起着重要的作用, 但其分子机理尚不清楚^[1]。前人对气象因子与烤烟品质关系的研究, 大多集中在气象因子与烟叶最终化学成分之间的相关关系分析上^[2-8]。烟叶的化学成分是烟草生长代谢的最终产物, 受到烟叶生长代谢过程中基因和关键酶(蛋白质)的调节, 虽然二者之间有较好的相关关系, 但是不能够揭示气象因子影响烟叶形成最终化学产物的途径。多年的实践和研究表明, 气象因子对烟叶香气风格的影响并没有引起传统意义上的 DNA 突变, 烤烟这种基因型未发生变化而香气风格却发生了改变的现象属于 DNA 序列外的遗传方式^[9]。

DNA 甲基化可以通过遗传修饰影响基因和蛋白质的表达使植物适应外界环境的变化^[10-11], 研究气象因子对烤烟烟叶 DNA 甲基化影响的规律, 能够从 DNA 分子层面解释河南的气候条件有利于烤烟形成浓香型烟叶^[12-13]。前人的研究表明, 不同气象

因子对 DNA 甲基化的作用不尽相同, 在 *E. coil* 中发现了一种类似组蛋白核小体结构的因子 (histone-like nucleoid structuring, H-NS), 在低温时能够与 DNA 形成复合体, 阻止 DNA 被甲基化, 当气温升高时, 该因子与 DNA 脱离, 使得 DNA 甲基化升高^[14]。太阳光可能通过小 RNA、RdDM 元件、染色质重塑等途径调控 DNA 甲基化^[15]。潘雅姣等的研究表明, 干旱胁迫能够通过组蛋白的修饰途径使水稻的 DNA 甲基化升高^[9]。Granot 等的研究表明, 沙漠植物从雨季 (wet) 到旱季 (dry) 的过程中, 通过显著减少细胞核的尺寸和组蛋白 H3 氮末端 (N-terminal tail) 的转录后修饰来调节基因的表达^[16]。因而, 要评价气象因子与 DNA 甲基化之间的关系, 就必须从诸多的气象因子中, 综合筛选出与 DNA 甲基化关系密切的气象因子, 与 DNA 甲基化建立数学方程, 来研究气象因子对 DNA 甲基化及烟叶香气风格形成的影响。

在分析方法上, 灰色关联分析能够在数据相对较少的情况下, 较为真实和全面地反映人们对生物

收稿日期: 2010-11-22; 修订日期: 2011-03-10

基金项目: 河南省烟草专卖局科技项目 (20081225) 资助

作者简介: 贾峰 (1974-), 女, 河南禹州人, 博士研究生, 从事特色烟叶栽培、生理生化及形成机理研究。E-mail: mrjiafeng@163.com

通讯作者: 刘卫群 (1965-), 女, 河北临城人, 教授, 博导, 从事特色烟叶栽培、生理生化及形成机理研究。E-mail: liuweiqun2004@126.com

系统的认识程度,并成功地在农艺性状和生理生化分析^[17]、作物新品种的综合评估^[18]和烟叶生产^[19]中应用。修正后的 Logistic 模型可以引入多个自变量因子,在番茄单个果实生长规律中的应用取得了很好的效果^[20]。然而把灰色关联分析与修正的 Logistic 模型有机地结合起来进行的研究未见报道。

本研究通过灰色关联方法筛选出了 4 个与 DNA 甲基化关系紧密的气象因子,并与 DNA 甲基化水平建立了 Logistic 数学模型,使 4 个气象因子与 DNA 甲基化之间可以进行量化分析,从而为深入研究气象因子对 DNA 甲基化影响的分析提供依据,为探明气象因子对烟叶品质和风格的形成和调控提供一种分析的方法。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

2007—2009年5—9月烟草大田生长阶段,在河南省平顶山市宝丰县石桥镇进行试验,试验地土壤类型为黄棕壤,轮作,前茬作物为小麦。烟田土壤 pH 值为 6.7,有机质为 15.8 g/kg、速效氮为 75.03 mg/kg、铵态氮为 6.18 mg/kg、速效磷为 5.93 mg/kg、有效钾为 147.42 mg/kg。烤烟专用无机复合肥(N:P:K 为 1:1:2),其中含硝态氮 ≥ 450 mg/g。供试烤烟(*Nicotiana tabacum* L.)品种为 NC89,种植行距 120 cm,株距 60 cm。其他栽培管理措施按宝丰县优质烟叶生产栽培措施进行。

1.2 试验设计

试验采用完全随机排列。小区面积为 100 m² (20 m × 5 m),重复 3 次。在烟草移栽后 50 d 时,选取第 18 片(自下而上数)生长一致的烟叶 100 株挂牌,移栽后 60 d 开始取样,样品采集第 18 片叶同一部位,迅速置于液氮中保存,用于检测 DNA 甲基化水平。以后每隔 10 d 取样一次。

1.3 测定方法

采用 CTAB 方法提取烟叶 DNA^[21],总 DNA 甲基化水平测定参考贾峰等的方法^[22]。

1.4 气象数据的获取与统计分析处理

气象数据是河南省宝丰县气象局提供的宝丰 2007—2009年5—9月的资料,烟草移栽后 60 d 为第一个阶段,以后每隔 10 d 为一个阶段,把 3 a 同期的气象数据平均得到相应气象因子的值。例如:把 3 a 平均最高气温(24 h)计算后记为平均最高气温,把

3 a 平均最低气温(24 h)计算后记为平均最低气温。另外,把气象因子的统计结果分为平均值和累积值两大类。平均值指从移栽到第一次取样时及以后每隔 10 d 的气象因子平均后的数值,包括平均气温、平均最高气温、平均最低气温、平均气温差、平均最小湿度、平均日照时数、平均气压、平均水汽压等 8 个因子;累积值指从移栽到每次取样时间这一段时间之间气象因子累积后的数值,包括总降水量、总日照时数、 ≥ 5 °C 积温、 ≥ 10 °C 积温、 ≥ 15 °C 积温和 ≥ 20 °C 积温等 6 个因子。

采用《灰色系统理论及其应用》第三版配套建模软件 V2.1 版本进行灰色关联分析^[23-24],采用 Excel 2003 软件进行修正后的 Logistic 模型的计算,采用 SigmaPlot 10.0 和 DPS V6.5 软件进行数据的制图。

1.5 修正后的 Logistic 模型构建

为了能够使 DNA 甲基化与 4 个气象因子之间建立数学模型,将 Logistic 方程修正为

$$Dm = \frac{K}{1 + e^{a + bx + cy + dz + em}} \quad (1)$$

式中: Dm 为 DNA 甲基化水平(%); K 为 DNA 甲基化的极值,最大取值为 100%; x, y, z, m 为气象因子; a, b, c, d, e 为修正后 Logistic 模型的参数,其当参数的值为正时表示与 DNA 甲基化水平为负相关,参数的值为负值时表示与 DNA 甲基化水平为正相关,参数值的大小代表影响 DNA 甲基化变化的幅度大小。

2 结果与分析

2.1 气象因子与烟叶 DNA 甲基化的测定结果

在烟草移栽后 60—100 d 之间,大田的平均气温、平均最高气温、平均最低气温和平均水汽压都在升高,其中,最低气温的升高幅度小于最高气温的升高幅度,表现在平均气温差逐渐增大。平均最小湿度也有增加的趋势;而平均日照时数在移栽 60 d 后持续上升,在 80 d 时有一个明显降低,随后上升;平均气压在移栽后 60—100 d 持续下降;4 个积温因子(≥ 5 °C 积温、 ≥ 10 °C 积温、 ≥ 15 °C 积温和 ≥ 20 °C 积温)均呈现逐渐增加趋势。烟草移栽后 60—100 d 烟叶 DNA 甲基化水平变化结果(表 1)显示,在移栽后 60—70 d 烟叶 DNA 甲基化先有一个显著的升高,随后随着烟叶的成熟逐渐增高。

2.2 DNA 甲基化与气象因子之间的灰色关联分析

将烟叶 DNA 甲基化水平与气象因子之间进行

表 1 烟草移栽到取样时的气象因子与烟叶总 DNA 甲基化测定结果

气象因子	移栽后天数/d				
	60	70	80	90	100
平均气压/0.1 hPa	9916.66	9908.10	9905.02	9901.69	9901.99
平均气温/℃	24.13	24.56	25.02	25.01	25.29
平均最高气温/℃	28.48	29.39	31.35	31.22	31.13
平均最低气温/℃	21.11	21.50	21.61	21.72	21.90
平均气温差/℃	7.37	7.89	9.75	9.49	9.23
平均水汽压/0.1 hPa	172.00	185.38	195.16	205.34	211.01
平均最小湿度/%	34.70	36.01	38.86	41.99	44.17
平均日照时数/h	5.58	7.44	6.99	7.54	7.46
总降水量/mm	106.30	164.20	235.95	322.20	353.35
总日照时数/h	351.95	422.20	436.70	480.60	513.75
≥5℃积温/℃·d	1331.15	1669.85	1905.40	2217.80	2482.00
≥10℃积温/℃·d	1331.15	1648.20	1860.55	2152.00	2395.75
≥15℃积温/℃·d	1324.30	1641.35	1853.70	2145.15	2388.90
≥20℃积温/℃·d	1179.95	1506.20	1718.55	2010.00	2263.25
DNA 甲基化水平/%	10.91	33.33	44.80	48.09	50.00

灰色关联分析,关联度选择 $\theta = 0.5$,排序结果为表 2 所示:关联度、相对关联度和综合关联度的排序基本相同,即气温的相关指标与 DNA 甲基化变化相关程度高,总降水量与总日照时数与 DNA 甲基化水平变化的相关性较差。绝对关联度的排序表明,总降水量和总日照时数的变化对 DNA 甲基化水平变化的影响大于积温对 DNA 甲基化水平变化的影响。因此,选取能够较全面反映当地气象条件的平均最低气温、平均日照时数、平均最小湿度、总降水量等 4 个气象因子进行 Logistic 回归分析。

表 2 气象因子与烟叶总 DNA 甲基化水平灰色关联分析结果

关联度次序	关联度	相对关联度	绝对关联度	综合关联度
1	平均日照时数	平均日照时数	平均最高气温	平均日照时数
2	平均气温差	平均气温差	平均日照时数	平均气温差
3	平均最高气温	平均最高气温	平均气温差	平均最高气温
4	平均气温	平均气温	平均气温	平均气温
5	≥5℃积温	≥5℃积温	平均最低气温	≥5℃积温
6	≥20℃积温	≥20℃积温	平均最小湿度	≥20℃积温
7	≥10℃积温	≥10℃积温	总降水量	≥10℃积温
8	平均最小湿度	平均最小湿度	平均水汽压	平均最小湿度
9	≥15℃积温	平均最低气温	总日照时数	平均最低气温
10	平均最低气温	≥15℃积温	≥20℃积温	≥15℃积温
11	平均气压	平均气压	≥5℃积温	平均气压
12	总日照时数	总日照时数	≥10℃积温	总日照时数
13	平均水汽压	平均水汽压	≥15℃积温	平均水汽压
14	总降水量	总降水量	平均气压	总降水量

2.3 关键气象因子与烟叶 DNA 甲基化的 Logistic 模型构建

用 x, y, z, m 分别代表平均最低气温、平均最小湿度、平均日照时数和总降水量等 4 个气象因子。把 5 次气象因子的观测值与 DNA 甲基化水平代入设定的 Logistic 方程求解,得出 a, b, c, d 和 e 的值分别为 20.18、-0.82、-0.50、-0.33 和 0.01,则 4 个气象因子与 DNA 甲基化之间的 Logistic 数学模型为

$$Dm = \frac{100}{1 + e^{20.18 - 0.82x - 0.50y - 0.33z + 0.01m}} \quad (2)$$

F 检验表明,建立的数学方程达到极显著水平 ($P = 0.0023$),相关系数 $R = 0.8971$,表明建立的 Logistic 模型的拟合度良好;Durbin-Watson 统计分析结果 $d = 1.93$,表明方程 4 个气象因子之间自相关性的可能性不大。由模型中标准偏回归系数的大小可以看出,4 个气象因子对 DNA 甲基化水平的影响大小顺序依次为平均最小湿度、平均日照时数、平均气温差、总降水量。由此可知,平均最小湿度和平均日照时数对 DNA 甲基化的影响较大,是烟草栽培和管理中应该重点考虑的气象因子。

2.4 单因子对 DNA 甲基化影响的效应分析

连续改变其中一个气象因子,其他 3 个气象因子数值固定在第一次取样时的值,可以得到单一气象因子对 DNA 甲基化影响的效应图(图 1)。从图 1 可以看出,平均最小湿度、平均日照时数、平均气温差与 DNA 甲基化水平呈正相关。其中,平均最小湿度的改变对 DNA 甲基化水平的升高影响最大,平均日照时数和平均气温差对 DNA 甲基化水平的影响为分别位于第二和第三位。总降水量与 DNA 甲基化水平呈负相关,总降水量的增加能够使烟叶的 DNA 甲基化水平下降,尽管其系数绝对值较小,但是总降水量的数值较大,所以对降低 DNA 甲基化水平的影响仍然较大。

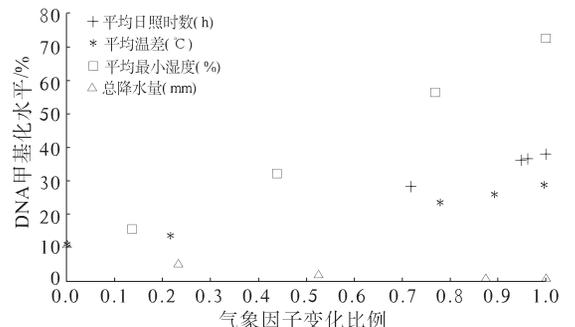


图 1 单一气象因子变化对 DNA 甲基化影响的效应图

2.5 两因子对 DNA 甲基化影响的交互效应分析

改变两气象因子,而把其他两个气象因子值固定在第一次取样时的值,可以得到相应两气象因子与 DNA 甲基化影响的交互效应图(图 2)。由图 2a 可以看出,总降水量不变时平均最小湿度增高的情况下 DNA 甲基化水平上升,但当总降水量增大时,烟叶 DNA 甲基化水平大幅降低,说明总降水量和平均最小湿度对 DNA 甲基化有拮抗作用。由图 2b 可以看出,总降水量达到一定水平后,平均气温差对

DNA 甲基化影响会变小,在总降水量较低的情况下,平均气温差升高能够促进 DNA 甲基化水平升高,但低于平均最小湿度对 DNA 甲基化的影响。从图 2c 可以看出,平均日照时数不变时总降水量越大,去甲基化越明显,而总降水量较低时,平均日照时数越高,烟叶 DNA 甲基化程度也越高。平均日照时数与平均气温差二者对 DNA 甲基化影响有明显协同作用,两者增加时会导致 DNA 甲基化水平大幅提高(图 2d)。平均日照时数与平均最小湿度有较

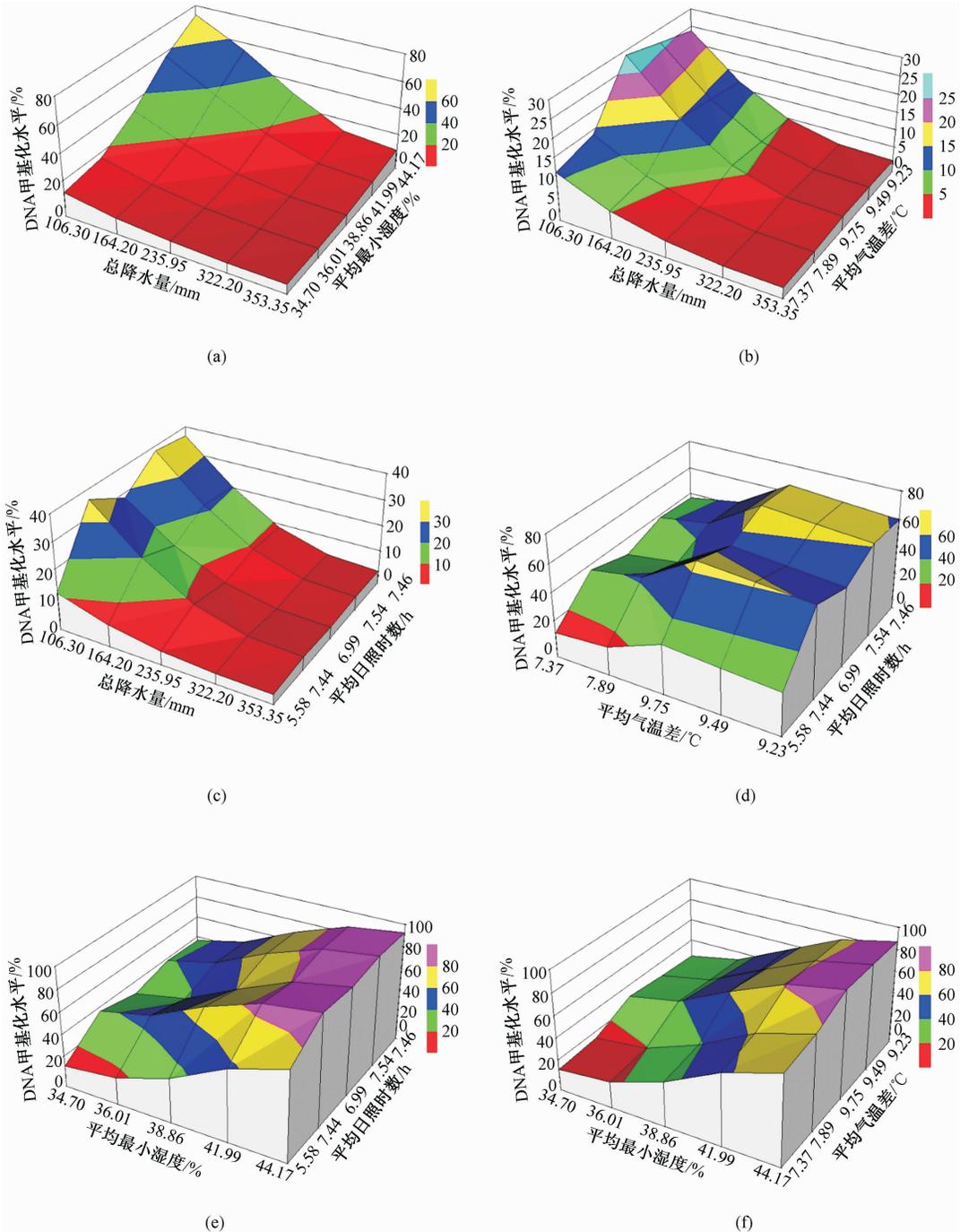


图 2 两气象因子对 DNA 甲基化影响的交互效应分析图

小的协同作用,随着平均最小湿度的上升,DNA 甲基化水平大幅上升,而平均日照时数变化对烟叶 DNA 甲基化的影响不大(图 2e)。平均最小湿度和平均气温差之间有一定的协同作用,平均气温差的上升会促进 DNA 甲基化上升,但平均最小湿度对 DNA 甲基化的影响较大(图 2f)。总之,两因素交互效应分析表明,平均最小湿度、平均气温差、平均日照时数之间对 DNA 甲基化的影响具有协同效应;而总降水量与平均最小湿度和平均气温差之间对 DNA 甲基化的影响有拮抗作用。

3 结 论

单因子对 DNA 甲基化影响的效应分析表明,平均最小湿度的升高对 DNA 甲基化水平的升高影响最大;平均日照时数的增加也会提高烟叶 DNA 甲基化水平;平均气温差对 DNA 甲基化的影响不大;总降水量的增加能够降低总 DNA 甲基化水平,尽管其系数绝对值较小,但总降水量的数值较大时,对 DNA 去甲基化水平的影响仍然较大。两因素交互效应分析表明,平均最小湿度、平均气温差和平均日照时数 3 个气象因子的任意两个之间的增加都能使 DNA 甲基化水平升高;总降水量与平均最小湿度和平均气温差之间的增加有助于烟叶 DNA 的去甲基化。

参考文献

- [1] 刘璟瑜,王海涛,李长献,等. 气候因素变化对许昌烟区的影响及适应性分析[J]. 气象与环境科学,2009,32(3):43-46.
- [2] 戴冕. 我国主产烟区若干气象因素与烟叶化学成分关系的研究[J]. 中国烟草学报,2000,6(1):27-34.
- [3] 黄中艳,王树会,朱勇,等. 气象条件对云南烤烟 4 项化学成分含量的影响[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2009,35(1):48-52.
- [4] 李洪勋,唐远驹. 毕节烟叶气象因子的灰色关联分析[J]. 现代农业科技,2008(3):136-138.
- [5] 李天福,王彪,杨焕文,等. 气象因子与烟叶化学成分及香口味间的典型相关分析[J]. 中国烟草学报,2006,12(1):23-26.
- [6] 王彪,李天福. 气象因子与烟叶化学成分关联度分析[J]. 云南农业大学学报,2005,20(5):742-745.
- [7] 陈伟,王三根,王玉明,等. 不同生态区烤烟烟碱含量的变异分析[J]. 中国生态农业学报,2009,17(2):285-290.
- [8] 于建军,邵惠芳,刘艳芳,等. 四川凉山烤烟叶片巨豆三烯酮含量与生态因子的关系[J]. 生态学报,2009,29(4):1668-1674.
- [9] 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.
- [10] 凡时财,张学工. DNA 甲基化的生物信息学研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,2009,36(2):143-150.
- [11] 李梅兰,曾广文,朱祝军. 冬性与春性白菜品种花芽分化前后生理代谢的比较[J]. 中国农业科学,2003,36(11):1414-1418.
- [12] 袁文良. 宝丰县汛期长期天气预报趋势[J]. 河南气象,2001(4):16.
- [13] 林敬凡,鲁心正. 河南省烤烟适宜移栽期[J]. 河南气象,1998(2):23-25.
- [14] White-Ziegler C, Hill M, Braaten B, et al. Thermoregulation of *Escherichia coli* pap transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor[J]. Molecular Microbiology,2002,28(6):1121-1137.
- [15] Chinnusamy V, Zhu J K. Epigenetic regulation of stress responses in plants[J]. Current opinion in plant biology,2009,12(2):133-139.
- [16] Granot G, Sikron-Persi N, Gaspan O, et al. Histone modifications associated with drought tolerance in the desert plant *Zygophyllum dumosum* Boiss[J]. Planta,2009,231(1):27-34.
- [17] 王士强,胡银岗,余奎军,等. 小麦抗旱相关农艺性状和生理生化性状的灰色关联度分析[J]. 中国农业科学,2007,40(11):2452-2459.
- [18] 刘录祥,孙其信,王士芸. 灰色系统理论应用于作物新品种综合评估初探[J]. 中国农业科学,1989,22(3):22-27.
- [19] 董中强,张永民,段雪梅,等. 河南烟区与云南优质烟区气候生态系统的灰色关联分析[J]. 河南气象,2000(2):21-22.
- [20] 杨丽丽,王一鸣,康孟珍,等. 基于修正 logistic 模型的番茄单个果实生长规律模拟[J]. 农业机械学报,2008,39(11):81-84.
- [21] 郭兆奎,万秀清,魏继承,等. 适于 PCR 分析的烤后烟叶 DNA 提取方法的研究[J]. 中国烟草科学,1999(4):5-7.
- [22] 贾峰,魏庆华,杜铮,等. 烤烟烟叶胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶分离条件的优化[J]. 山东农业科学,2010(6):94-97.
- [23] 刘思峰,党耀国,方志耕. 灰色系统理论及其应用[M]. 北京,科学出版社,2004.
- [24] Dharmapuri S, Rosati C, Pallara P, et al. Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits[J]. FEBS Lett,2002,519(1):30-34.

Study of Relationship Between DNA Methylation of Flue-cured Tobacco and Meteorological Factors in Baofen

Jia Feng¹, Du Zheng¹, Li Ya'nan², Xie Shicheng³, Sun Bo³, Liu Weiqun³

(1. College of Tobacco Science of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Yexian Weather Station, Yexian 467200, China;

3. College of Life Sciences of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: This study was conducted to build the model for explaining the relationship between the meteorological factors and DNA methylation of flue-cured tobacco. These results provide a method for the formation of the style and characteristic of tobacco. Four meteorological factors were screened with comprehensive evaluation based on grey relational analysis. Then the revised Logistic model was built between DNA methylation and four factors. The results of single-factor analysis showed that the average temperature difference (ATD), average sunshine hour (ASH), and mean relative humidity (MRH) were positively correlated with DNA methylation. The order of the three factors effecting the DNA methylation was as follows: MRH > ASH > ATD. Total precipitation (TP) was negatively correlated with DNA methylation. Two-factor interactions analysis indicated that the synergistic effects between ATD and ASH/MRH or between ASH and MRH were shown in an interaction range, respectively. TP and MRH or ATD have the antagonistic effects with DNA methylation.

Key words: flue-cured tobacco; DNA methylation; meteorological factor; revised Logistic model