

# 水稻基因组 DNA 胞嘧啶甲基化在单倍体和对应二倍体间的差异

张红宇\* 彭海\* 李云 徐培洲 汪旭东 吴先军†

( 四川农业大学水稻研究所, 温江 611130; 西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 雅安 625014.

\* 同等贡献. † 联系人, E-mail: [wuxjsau@126.com](mailto:wuxjsau@126.com))

**摘要** 对 SARII-628 的双胚苗中的突变体进行倍性鉴定, 得到 18 对二倍体-单倍体的双胚苗水稻, 任意选取 5 对编号为 A~E. SSR 分析显示, 它们在 310 个位点没有差异, 表明其 DNA 一级结构的碱基没有变异. DNA 甲基化在真核生物的生长发育过程中起着重要的调控作用. 用改良 AFLP 方法(MSAP)分析了 5 个单倍体及其对应二倍体总 DNA 5'-CCGG 位点胞嘧啶的甲基化水平和单倍体与对应二倍体的甲基化差异模式. 发现 5 个二倍体在 482 个位点上甲基化状态没有差异, 与二倍体比较, 单倍体虽然在甲基化总体水平上变化不大, 但共有 43 个位点甲基化类型在不同单株上发生了变异. 单倍体的甲基化敏感扩增多态性比率即扩增的总甲基化位点数占总扩增位点数的比率分别为 18.79%, 19.35%, 18.49%, 18.45% 和 18.75%, 均高于对应的二倍体; 全甲基化(双链 CmCGG)率分别为 10.58%, 11.3%, 10.11%, 10.09% 和 10.34%, 多数略高于二倍体, 表明二倍体突变成单倍体后, 某些位点发生了超甲基化. 单倍体与其对应二倍体比较, 有 5 种类型的改变: ( ) 单倍体与二倍体甲基化模式相同; ( ) 去甲基化及二倍体甲基化, 但在单倍体该位点无甲基化; ( ) 超甲基化, 单倍体甲基化程度高于二倍体; ( ) 次甲基化, 单倍体甲基化程度低于二倍体; ( ) 不定类型, 单倍体与二倍体的甲基化程度无法确定. 对 18 个位点测序检索显示, 这些甲基化变异涉及整个水稻基因组的 12 条染色体且具有位点特异性, 不同单株的变异位点各不相同. 单倍体的甲基化水平高于对应的二倍体, 是单倍体相对于二倍体甲基化模式经过重新调整, 在其基因组中甲基化水平发生了总体变化以适应生存的必然结果.

**关键词** 水稻 双胚苗 二倍体 单倍体 DNA 甲基化 MSAP

高等植物中约有 30%左右的胞嘧啶残基发生甲基化<sup>[1]</sup>, 其中约有 90%的甲基化位于 CpG 二核苷酸或 CpNpG 三核苷酸对中<sup>[2]</sup>. 甲基化的 DNA 对细胞生理活性具有外遗传和诱变效应, 如基因差异表达、细胞分化、染色质失活、肿瘤发生等<sup>[3]</sup>. 基因组 DNA 甲基化对基因表达的调控作用已成为当前分子生物学研究的热点之一. 同裂酶 *Hpa* 和 *Msp* 常用于胞嘧啶的甲基化研究. Reyna-Lopez 等人<sup>[4]</sup>把 AFLP<sup>[5]</sup> 技术加以改良, 用 *Hpa* 和 *Msp* 代替 AFLP 分析中识别 4 碱基的内切酶 *Mse*, 分别与识别 6 碱基的 *EcoR* 配对, 对基因组双酶切, 用于真菌基因组不同发育阶段 DNA 甲基化水平分析. Xiong 等人<sup>[6]</sup>用同样的方法区分水稻杂交种与对应亲本的甲基化水平. 水稻是世界性的重要粮食作物. 目前对其基因组的研究及重要基因的定位、克隆都取得了很大进展, 然而对于单倍体水稻基因组 DNA 的甲基化状况、基因表达调控、品种间的甲基化遗传模式却知之甚少.

水稻单倍体与二倍体不同, 它只有一套染色体, 因此为遗传学和细胞学中许多问题的研究提供了便利条件<sup>[7]</sup>, 能很方便地用于鉴定不同染色体的同源性和可配性<sup>[8,9]</sup>, 并且在育种实践中, 通过染色体加倍, 在  $F_0$  代即可获得稳定的纯合二倍体, 从而大大缩短育种年限<sup>[10,11]</sup>, 因而具有重要的理论价值和实践意义.

本研究从双胚苗水稻资源中筛选出一批单倍体-二倍体类型的双胚苗(分子标记检测表明, 这些对应的双胚苗在 DNA 一级结构上没有差异), 选取其中 5 个水稻单倍体及其对应的二倍体, 用改良 AFLP (即 MSAP)<sup>[6]</sup> 对 5'-CpCpG 位点甲基化进行特异性扩增, 分析单倍体及其对应二倍体中甲基化的差异和遗传模式, 探索单倍体的分子基础, 对于认识一系列的遗传现象, 如基因和环境的相互影响、基因的剂量效应、性状结合群、染色体的联会和基因的表达等具有重要意义.

## 1 材料和方法

( ) 材料. SARII-628 来源于四川农业大学水稻研究所双胚苗品系 9003 的自然群体, 每年都能定期分离出单倍体与二倍体( $n=2n$ )的双苗植株. 本研究将从该双苗群体选出的 5 株单倍体水稻依次编号为 A~E, 对应的二倍体编号依次为 A'~E'.

( ) 倍性鉴定. 将 SARII-628 种子在室内发芽, 选择双苗成对种植于大田. 开花期选择株型矮小, 结实率低的植株作为单倍体的预选植株, 与其对应的二倍体成对发根, 取粗壮的根尖, 经 8-羟基喹啉处理, 卡诺氏固定后, 制片, 在光学显微镜下观察, 选分散良好、染色适度的细胞在 Olympus BH-2 显微镜下观察染色体数目并照相.

( ) 总DNA的提取与SSR分析. 水稻叶片总DNA的提取参照Klein等人<sup>[12]</sup>的方法进行. PCR扩增按照Panaud等人<sup>[13]</sup>的方法进行. 扩增产物用 3%琼脂糖凝胶在 120 V电压下电泳 150 min, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察并照相. 微卫星引物由中国科学院遗传与发育生物学研究所提供.

( ) MSAP DNA甲基化分析. MSAP分析中酶切、连接、预扩和选扩参照Xiong等人<sup>[6]</sup>的方法进行, 所不同的是引物采用荧光标记, 并将选扩体系按比例加大为 50  $\mu$ L以方便多次电泳, 双酶切组合分别为 *EcoR* /*Msp* 和 *EcoR* /*Hpa*, 并在酶切片段的两端加上与 *EcoR* 和 *Hpa* -*Msp* 酶切位点互补的人工接头(表 1).

DNA 酶切与接头连接反应一步完成. 反应体系为 25  $\mu$ L, 第 1 个反应包含 500 ng 样本 DNA, 1 $\times$ T4 连接酶缓冲液(含 1 mmol ATP), *EcoR* 和 *Hpa* 内切

酶各 3 U, T4 连接酶 1.5 U, *EcoR* 和 *Hpa* -*Msp* 接头各 50 pmol, BSA 2.5  $\mu$ g. 37  $^{\circ}$ C 保温 8~10 h. 第 2 个反应的条件同第一个反应, 只是内切酶组合为 *EcoR* 和 *Msp*.

预扩增反应体系为 20  $\mu$ L, 包含 2  $\mu$ L的酶切连接混合液, 1 $\times$ PCR缓冲液, 200  $\mu$ mol/L dNTP, *EcoR* 和 HM引物(E00/HM00)各 40 ng, *Taq* DNA聚合酶 0.5 U, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L. 预扩增产物稀释 20 倍, 供选择扩增用. 选择扩增反应在 50  $\mu$ L体系中进行以方便多次电泳. 包含 7.5  $\mu$ L预扩增液, 1 $\times$ PCR缓冲液, MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L, E+3 和HM+3 引物各 100 ng(引物采用荧光标记), dNTP 200  $\mu$ mol/L, *Taq* DNA聚合酶 2 U. PCR反应程序同Klein等人<sup>[12]</sup>的方法. 选择扩增产物在 4.5%聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 在ABI 377 测序仪进行 AFLP多态性分析荧光显带. 甲基化变异位点的条带经 4.5%聚丙烯酰胺凝胶重新电泳, 用聚丙烯酰胺凝胶回收试剂盒(上海杰美)进行回收并送上海申能博彩公司测序, 所得序列用 BLASTN 程序在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上检索同源性.

## 2 结果与分析

### 2.1 双胚苗中多倍体的筛选频率与倍性鉴定

从 4500 对双胚苗群体中, 在开花期根据株型和结实率筛选出 20 株可能为单倍体的植株, 筛选频率为 0.44%. 进一步对根尖细胞染色体数目进行鉴定, 染色体数目为 12 的确定为单倍体, 染色体数目为 24 的确定为二倍体. 同时每株取 3 个以上幼穗, 每穗观察 5 个小花, 每个小花观察 5 个以上细胞, 以确定其倍性. 共获得 18 对单倍体-二倍体双胚苗(图 1 和 2). 取其中 5 对进行后续分析, 编号为 A~E.

表 1 接头和引物序列

	<i>EcoR</i>	<i>Msp</i> / <i>Hpa</i>
接头 1	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
接头 2	5'-AATTGGTACGCAGTC-3'	5'-CGCTCAGGACTCAT-3'
预扩增引物	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'(E00)	5'-CGCTCAGGACTCAT-3'(HM00)
选扩增引物	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'	5'-GATGAGTCCTGAGCGG-3'
1	AAC (E1)	CAA (HM1)
2	AAG (E2)	CAC (HM2)
3		CAG (HM3)
4		CAT (HM4)
5		CTA (HM5)
6		CTC (HM6)
7		CTG (HM7)

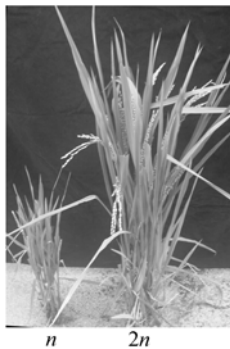


图 1 单倍体(n)与对应二倍体(2n)外观形态比较

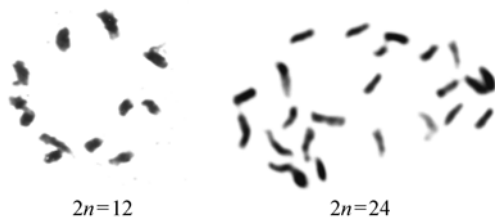


图 2 二倍体-单倍体双胚苗体细胞染色体数

### 2.2 微卫星分析

用 425 对微卫星引物对单倍体-二倍体双胚苗进行多态性验证, 其中 310 对引物扩增出清晰的条带. 在这些位点上, 5 对双胚苗带型都表现一致, 没有差异(图 3), 表明这 5 对单倍体-二倍体双胚苗在 DNA 一级结构上没有碱基的变异.

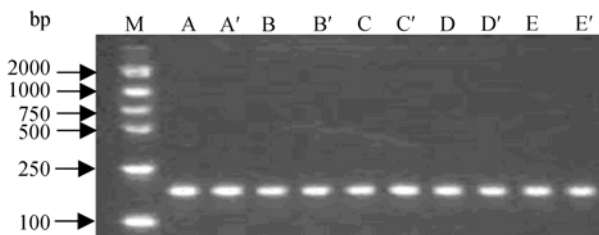


图 3 用引物 RM163 对 5 对双胚苗 DNA 扩增的结果  
M, DL2000 标准分子量. 单倍体水稻依次编号为 A~E, 对应的二倍体编号依次为 A'~E'

### 2.3 MSAP 分析

同裂酶 *Msp* 和 *Hpa* 识别并切割 5'-CCGG 序列, 扩增出来的每条酶切片段, 不论是 *Msp* 还是 *Hpa* 与 *EcoR* 的酶切组合, 都代表一个 5'-CCGG 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. *Msp* 能切割无甲基化和内甲基化位点而不能切割外甲基化位点; *Hpa* 能切

割无甲基化和单链甲基化(双链中只有一条链甲基化)而不能切割双链甲基化. 因而同一 DNA 分别用 *Hpa* 和 *Msp* 酶切后选扩, 根据带型的有无可能出现 4 种甲基化类型: 型, 都无带, 代表该位点存在双链外甲基化; 型, 前者无带而后者有带, 代表该位点为双链内甲基化; 型, 前者有带而后者无带, 代表该位点为单链外甲基化; 型, 都有带, 代表该位点无甲基化或为单链内甲基化.

( ) 单倍体与相应的二倍体甲基化水平. E1 和 E2 分别与 HM1~7 配对, 组成用于水稻的 14 对引物组合, 在 5 对双胚苗上共扩增出 482 条片段, 各单株的总片段数基本相同(表 2). 在 5 个二倍体中, 所扩增的带型都一致, 而且总片段数都为 464. 其中总甲基化的位点数(包括全甲基化和只有一条链甲基化的半甲基化)都为 85, 它们的甲基化敏感扩增多态性(MASP), 即总扩增位点的甲基化水平为 18.32%, 而其中全甲基化的带数为 47, 全甲基化率为 10.13%. 表明 SARII-628 的二倍体之间除了 SSR 检测没有差异外, 在甲基化上也没有差异.

单倍体 A~E 扩增出的总片段数分别为 463, 460, 465, 466 和 464. 其中总甲基化的位点数分别为 87, 89, 86, 86 和 87, 它们的甲基化敏感扩增多态性(MASP), 即总扩增位点的甲基化水平分别为 18.79%, 19.35%, 18.49%, 18.45%和 18.75%, 而其中全甲基化的带数分别为 49, 52, 47, 47 和 48, 全甲基化率分别为 10.58%, 11.3%, 10.11%, 10.09%和 10.34%. 由此可见, 单倍化后甲基化总体水平虽然在各单株间略有差异, 但无论在甲基化敏感扩增多态性上还是在全甲基化水平上变化都不大(表 2). 从这些水稻的总扩增位点甲基化率(MASP)和全甲基化率来看, 多数单倍体都略高于其对应的二倍体.

( ) 单倍体与相应的二倍体的不同甲基化类型. 5 对单倍体-二倍体双胚苗甲基化敏感性扩增共出现 11 种带型(表 3), 其中 1 为全甲基化类型. 由于双链甲基化(CmCGG), *Hpa* 不能识别, 而 *Msp* 则能识别并切割该位点, 从而产生(1, 0, 1, 0)的带型. 2 为半甲基化类型, 只有一条链而且外甲基化, 即 5'-<sup>m</sup>CCGG, *Msp* 不能识别, 而 *Hpa* 能识别并切割该位点<sup>[14]</sup>, 产生(0, 1, 0, 1)的带型. 上述两种为单态性甲基化位点, 同样的甲基化位点存在于单倍体和其对应的二倍体中; 3 和 7 为去甲基化类型, 即二倍体为全甲基化、半甲基化或 *Msp* 和 *Hpa* 都不能识别

表 2 二倍体与相应的单倍体甲基化水平

类型	二倍体	单倍体					单倍体平均值
		A	B	C	D	E	
	18	19	22	17	16	18	18.4
	29	30	30	30	31	30	30.2
	38	38	37	39	39	39	38.4
	397	395	393	396	396	395	395
总扩增条带	464	463	460	465	466	464	463.6
甲基化总带数 <sup>a)</sup>	85	87	89	86	86	87	104
甲基化敏感扩增多态性(MSAP)(%)	18.32	18.79	19.35	18.49	18.45	18.75	18.77
全甲基化带数 <sup>b)</sup>	47	49	52	47	47	48	48.6
全甲基化率(%)	10.13	10.58	11.3	10.11	10.09	10.34	10.48

a) 甲基化总带数 = + + ; b) 全甲基化带数 = +

表 3 各甲基化类型部分带型及位点数<sup>a)</sup>

类型	带型				位点数				
	单倍体		二倍体		A	B	C	D	E
	M	H	M	H					
1	1	0	1	0	28	27	27	27	27
2	0	1	0	1	38	37	36	36	38
3	1	1	1	0	1	0	1	0	0
4	1	0	1	1	3	4	3	4	3
5	0	0	1	1	1	1	0	1	1
6	0	0	0	1	0	1	0	1	0
7	1	1	0	0	0	0	1	4	2
8	0	1	1	1	0	0	1	0	0
9	0	0	1	0	0	2	1	2	1
10	0	1	0	0	0	0	1	2	0
11	0	1	1	0	0	0	0	0	1

a) 甲基化类型有扩增条带记为 1, 无扩增条带记为 0; H 和 M 分别为 *EcoR* /*Hpa* 和 *EcoR* /*Msp* 酶切组合

切割的位点, 而在其对应的单倍体中, 该位点去甲基化, 两个酶都能识别和切割, 因而可扩增出相应的片段; 5、6 和 9 为过或超甲基化类型, 即二倍体为全甲基化、半甲基化或无甲基化, 而其对应的单倍体中, 识别位点双链的两个胞嘧啶碱基均已甲基化, *Msp* 和 *Hpa* 都不能识别和切割, 不能扩增出相应的片段; 10 为次甲基化类型, 即单倍体基因组 DNA 中的 5'-CCGG 位点甲基化水平比其对应二倍体要低, 发生了部分去甲基化现象; 8 为不定类型, 即单倍体和二倍体中的甲基化程度的变化不能确定; 4 表示单倍体的甲基化程度上升; 11 表示单倍体的甲基化程度下降。总体上又可将上述甲基化类型分为甲基化变异上升、甲基化变异下降和不定类型。

5 对双胚苗的全甲基化和半甲基化(1+2)型位点数分别为 66, 64, 63, 63 和 65, 分别占总甲基化多态性扩增位点数的 92.96%, 88.89%, 88.73%, 81.82% 和 89.04%。去甲基化(3+7)占甲基化多态性扩增位点的

比例分别为 1.41%, 0, 2.82%, 5.19% 和 2.74%。过或超甲基化类型(5+6+9)分别占 1.41%, 5.56%, 1.41%, 5.19% 和 2.74%。次甲基化类型(10)分别占 0, 0, 1.41%, 2.6% 和 0.5。对双胚苗平均 4 种类型分别为 88.29%, 2.43%, 3.26% 和 0.8%。去甲基化和次甲基化比例反映了在突变成单倍体的过程中, 单倍体甲基化程度的降低, 二者约占 3.23%。而超甲基化和全(半)甲基化类型反映了单倍体比对应二倍体甲基化水平的增加或保持二倍体的甲基化水平, 二者约占 91.55%。

单倍化后变异共有 9 种模式(表 4, 图 4), 但各种模式分布并不均衡, 最多的为第 9 种类型; 同一模式在不同单株中的变异位点数也不相同。以 CCGG 中胞嘧啶被甲基化的个数增加表示甲基化程度上升, 被甲基化的个数减少为甲基化程度下降进行分类, 其中 1~4 类代表了甲基化程度上升; 5~8 类代表了甲基化程度下降; 而第 9 类代表甲基化程度改变不能确定的类型。比例分别为 67.44%, 30.23% 和 2.33%。

表 4 单倍化后甲基化变异类型和位点数

变异类型	二倍体类型	单倍化后类型	单倍体编号					合计
			A	B	C	D	E	
1			0	1	0	1	0	2
2			1	1	0	1	1	4
3			3	4	3	4	3	17
4			0	2	1	2	1	6
上升类型总和			4	8	4	8	5	29
5			0	0	0	0	1	1
6			0	0	1	2	0	3
7			1	0	1	0	0	2
8			0	0	1	4	2	7
下降类型总和			1	0	3	6	3	13
9			0	0	1	0	0	1
不定类型总和			0	0	1	0	0	1

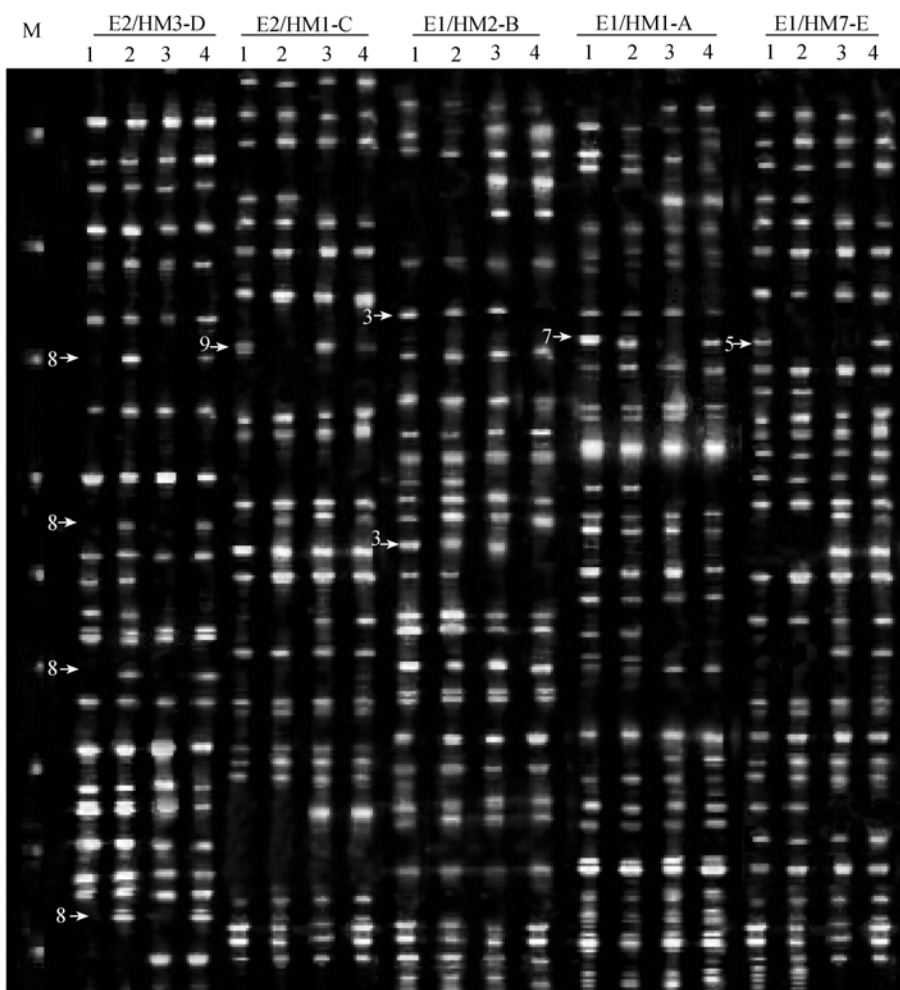


图 4 5 对双胚苗水稻甲基化敏感性扩增结果

M, 分子量标准; Ex/HMy-n, 引物组合为 Ex/HMy(表 1)在第 n 对双胚苗上的 4 种选扩结果. 每组 4 个泳道中, 酶与倍性组合为: 1, *Hpa* /二倍体; 2, *Hpa* /单倍体; 3, *Msp* /二倍体; 4, *Msp* /单倍体. 图中数字(与表 4 对应)与箭头示单倍体与二倍体间的甲基化变异类型

( ) 甲基化变异遍布于整个基因组且具有位点特异性. 43 个变异位点是从 18 对不同的酶切组合扩增中得到的, 从这些变异位点中初步选取 18 条有差异的 DNA 片段运用试剂盒进行回收并测序, 通过检索, 发现这 18 条 DNA 序列无规则分布于整个水稻的 12 条染色体上(表 5), 表明甲基化变异范围涉及了整个水稻基因组.

对于不同的位点, 其变异的能力是不一样的(表 5 和 6). 在 482 个位点中, 439 个位点在 5 个单倍体中都没有发生甲基化变异. 而变异的 43 个位点中, 每个位点变异频率(同一位点发生变异的株数占总株数 5 株的百分率)也各不相同, 其中 3 个位点在 5 株同时发生变异, 频率达 100%; 有 1 个位点在 4 株同时变异, 频率为 80%; 有 3 个位点在 3 株同时发生变异, 频率为 60%; 4 个位点在 2 株中发生变异, 频率为 40%; 其余 7 个位点都仅一株发生变异, 频率各为 20%. 这表明单倍化导致的甲基化变异是具有位点特异性的, 某些位点更倾向于变异.

### 3 讨论

#### 3.1 双胚苗水稻中的倍性变化和甲基化研究的优势

单倍体的获得有多种途径, 双胚苗是其中的途径之一. 至今已在许多植物中发现了双(多)胚苗现象. 在这些双(多)胚苗中自然发生单倍体的频率比正常的单苗要高, 并且双(多)胚苗中的单倍体较普通单倍体稳定, 不易自然加倍. 在研究倍性变化与甲基化变异的关系中, 应尽可能地排除 DNA 一级结构变异、远缘杂交、环境和发育时期对甲基化变异的影响. 本研究中选择来源于双胚苗中的单倍体作为研究单倍化对甲基化影响的材料, 其优势主要体现在以下几个方面: ( ) 由于双胚苗来源于同一谷粒, 所以二倍体与单倍体遗传基础完全一致, 因而能够直接进行比较; 而且, 单倍化过程是在自然状态下进行的,

研究材料更接近自然多倍体且不容易产生突变, 本研究中 310 个 SSR 位点均未发现差异, 也初步证实了这点. ( ) 双胚苗采用成对同时种植, 使环境差异和发育时期差异减到最小, 5 个二倍体之间没有检测到甲基化差异, 说明了本研究中环境与发育时期的差异没有影响到甲基化状态的改变. ( ) 本研究中使用的单倍体直接由二倍体自然突变而来, 没有异源多倍体中基因组异质结合的干扰, 因而可以直接反映单倍化对甲基化的影响. ( ) 利用单倍化后的  $M_0$  代进行研究, 可以准确反应单倍化后甲基化变异的迅速性.

#### 3.2 水稻单倍体基因组的甲基化率

水稻单倍体 5 个材料 A~E 的甲基化敏感扩增位点多态性, 即半甲基化、全甲基化扩增位点占总扩增位点的比例为 18.45%~19.45%, 全甲基化率为 10.09%~11.3%. 在植物 DNA 中,  $mG$  的含量最高可达 30%<sup>[11]</sup>, 近 90% 的甲基化发生在 CG 和 CNG 核苷酸序列中<sup>[12]</sup>. 从本研究对水稻单倍体及对应二倍体的分析来看, 5'-CCGG 位点上甲基化率, 包括  $m$ CCGG 和  $C^m$ CCGG 类型, 平均为 18.77%. 但在植物中, 甲基化也会发生在 CAG, CTG<sup>[13]</sup> 和 CGG<sup>[14,15]</sup> 的基元中. 本研究用 14 对引物通过甲基化敏感多态性扩增位点所揭示的甲基化水平只反映了 CG 或部分 CCG 核苷酸残基中胞嘧啶的甲基化程度, 而整个基因组中胞嘧啶的甲基化率可能高于本试验的结果.

#### 3.3 单倍化与甲基化模式的改变

本研究中单倍化后出现了甲基化改变的 9 种模式, 主要包括了甲基化程度的上升、下降和不定的类型. 各种类型对于基因的表达是不同的, 上升一般来说是抑制基因的表达, 而下降一般是激活基因的表达<sup>[16]</sup>. 从 5 个单倍体水稻看, 单倍体的甲基化敏感扩增多态性(全、半甲基化)比率和全甲基化率几乎均高

表 5 甲基化变异位点在染色体上的分布

编号	变异位点																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
染色体	4	1	10	7	2	1	4	8	1	9	11	6	6	8	5	3	12	11
变异株数	2	5	2	3	1	2	4	3	5	1	3	1	1	1	2	1	1	5

表 6 不同单倍体单株的甲基化变异位点

编号	单倍体单株				
	A	B	C	D	E
变异的位点	2, 3, 6, 8, 10	1~5, 6, 10, 16	2, 4, 6, 8~10, 12, 17	1, 2, 4, 6~15, 18	2, 6~10, 12, 16

于二倍体, 暗示形成单倍体后, 基因组 DNA 的某些位点发生了过(超)甲基化. 单倍体甲基化水平的提高未必就是由单倍化带来的退化的必然结果. 由于单倍化后基因组减少为一套, 所以为了基本生存的需要, 单倍体必然对自身的基因表达作出大的调整. 在突变成单倍体时, 某些位点甲基化程度的降低对其生长发育有利, 而另一些位点甲基化程度的增加会对其生长发育有利, 所以在单倍体中, 一些基因的增强表达对单倍体生长发育有利, 而一些基因的相对抑制也有利于单倍体的生长发育, 因而本研究中的甲基化程度的上升、下降和不定的类型都有出现是可以理解的. 由于本研究酶切位点有限, 出现了甲基化的不定类型, 进一步的研究可以将其归入上升或下降的类型. 本研究只是对倍性影响甲基化改变作了一个统计上的分析, 对于其如何影响单倍体基因的表达还需进一步对具体位点作分析.

### 3.4 关于甲基化变异的位点特异性

单倍体和其对应二倍体中多种基因的差异表达与其对外界环境的适应密切相关, 并且单倍体同二倍体基因型表达的差异主要表现在转录水平上. DNA 甲基化水平的改变作为基因转录调控的一种重要手段无疑在单倍体某些基因的转录中发挥重要作用, 通过调节启动子区域或基因内部的甲基化状态来控制基因转录效率.

Liu 等人<sup>[17]</sup>认为, 在新形成的多倍体中, 特定的染色体区段或序列是敏感的, 与 DNA 甲基化有密切的关系. Wang 等人<sup>[18]</sup>在拟南芥中的研究也表明, 甲基化的变异在某些位点上更容易发生. 本研究中特定位点甲基化变异的频率有高有低, 大部分位点都没有变异, 但也有变异频率高达 80% 的位点, 表明甲基化的变异是具有位点特异性的. 本研究室也对 SAR -628 中的多倍体与二倍体的甲基化状态进行了研究, 初步结果表明, 29 个多倍体甲基化变异位点中有 9 个在多倍体中也发生了甲基化变异, 共同变异位点达 31.03%, 在多倍体与二倍体的杂种中, 变异位点也存在类似的情况(资料待发表), 进一步说明了 SARII-628 的甲基化变异存在位点特异性.

致谢 本工作作为教育部长江学者和创新团队发展计划(批准号: IRTO453)资助项目.

### 参 考 文 献

- 1 Richards E J. DNA methylation and plant development. *Trends Genet*, 1997, 13: 319—323 [DOI]
- 2 Yi Z B, Sun Y, Niu T T, et al. Patterns of DNA cytosine methylation between hybrids and their parents in sorghum genome. *Acta Agron Sin*, 2005, 31(9): 1138—1143
- 3 Gonzalzo M L, Jones P A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutat Res*, 1997, 386: 107—118 [DOI]
- 4 Reyna-Lopez G E, Simpson J, Ruiz-Herres J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Mol Gen Genet*, 1997, 253: 703—710 [DOI]
- 5 Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407—4414
- 6 Xiong L Z, Xu C G, Saghai Maroof M A, et al. Patterns of cytosine methylation pattern in an elite rice hybrid and its parental lines detected by a methylation: Sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 1999, 261: 139—446
- 7 Kimber G, Riley R. Haploid angiosperms. *Bot Rev*, 1963, 29(4): 480—531
- 8 Jauhar P P, Riera-Lizarazu O, Dewey W G, et al. Chromosome pairing in haploids and the A, B, and D genomes of bread wheat. *Theor Appl Genet*, 1991, 82: 441—449 [DOI]
- 9 Jauhar P P, Almouslem A B, Peterson T S, et al. Inter- and intragenomic chromosome pairing in haploids of durum wheat. *J Hered*, 1999, 90: 437—445 [DOI]
- 10 Baenziger P S. Reflections on doubled haploids in plant breeding. In: Jain S M, Sopory S K, Veilleux R E, et al, eds. *In vitro* haploid production in higher plants. Vol 1. Dordrecht Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. 35—48
- 11 Khush G S, Virmani S S. Haploid in plant breeding. *In vitro* haploid production in higher plants. Vol 1. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. 11—13
- 12 Klein R R, Morishige D T, Klein P E, et al. High throughput BAC DNA isolation for physical map construction of sorghum (*Sorghum bicolor*). *Plant Mol Biol Rep*, 1998, 16: 351—364 [DOI]
- 13 Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa*). *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 257—261 [DOI]
- 14 Gruenbaum Y, Naveh-Many T, Cedar H, et al. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature*, 1981, 292: 860—862 [DOI]
- 15 Bezdek M, Koukalova B, Kuhrova V, et al. Differential sensitivity of CG and CCG DNA sequences to ethionine-induced hypomethylation of the *Nicotiana tabacum* genome. *FEBS Lett*, 1992, 300: 268—270 [DOI]
- 16 Magdinier F, Billard L M, Wittmann G, et al. Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells. *FASEB J*, 2000, 14: 1585—1594 [DOI]
- 17 Liu B, Wendel J F. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Mol Phylogenetics Evol*, 2003, 29(3): 365—379 [DOI]
- 18 Wang J, Tian L, Madlung A, et al. Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics*, 2004, 167: 1961—1973 [DOI]

1 Richards E J. DNA methylation and plant development. *Trends*

(2006-02-21 收稿, 2006-05-29 接受)