

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00794

不同生理年龄毛竹 DNA 甲基化的 MSAP 分析

郭广平, 顾小平, 袁金玲, 吴晓丽

中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江富阳 311400

摘要: 为分析竹子年龄变化与基因组 DNA 甲基化之间的相关性, 以 5 年、31 年和 >60 年起源(从种子萌发年龄算起)的毛竹当年生叶片为材料, 采用 35 对引物对其进行 MSAP 检测。结果表明: 3 个年龄段的总甲基化率和全甲基化率分别为 24.44%、28.21%、32.12% 和 16.57%、19.41%、21.23%; 发生 DNA 甲基化的变异位点为 52.3%, 去甲基化变异位点为 10.3%。可以看出, 随着年龄的增加, 毛竹基因组 DNA 甲基化敏感多态性呈上升趋势。总甲基化率单因素方差分析的结果表明相同年龄的毛竹个体间没有差异($P=0.307 > 0.05$), 而不同年龄间的差异达极显著水平($P < 0.001$)。同时, 对所用引物组合进行分析后发现 6 对引物(E3/HM2、E3/HM6、E3/HM7、E4/HM5、E4/HM6 和 E5/HM5)扩增出的位点与总趋势显著相关, 为进一步开展深入研究奠定基础。

关键词: 毛竹; 生理年龄; DNA 甲基化; MSAP

Research on the features of DNA methylation in leaves of different chronological ages of *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens* based on the method of MSAP

GUO Guang-Ping, GU Xiao-Ping, YUAN Jin-Ling, WU Xiao-Li

Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, China

Abstract: In order to probe the features of DNA methylation for bamboo stand with different chronological ages, the technique of methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) was employed to detect DNA methylation in the paper. Experiment material is Moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens*) leaves with 3 various chronological ages (5, 31, and >60 years after seed germination). During the procedure of genome DNA extration and MSAP analysis, total 35 pairs of MSAP primers were amplyfied. The results showed that MSAP value for bamboo with those three chronological ages were respectively 24.44%, 28.21% and 32.12%, and full-methylation ratios were 16.57%, 19.41% and 21.23%. Meanwhile, the value of variable sites for methylation reached 52.3% and for demethylation was 10.3%. Therefore, it could be concluded that with ages increasing MSAP value rising for Moso bamboo. Moreover the result of variance analysis for methylation ratio indicated that no significant ($P=0.307 > 0.05$) difference among individuals with the same ages, while significant ($P < 0.001$) difference exsited among different chronological ages. Throuygh ANOVA it showed that 6 pairs (E3/HM2, E3/HM6, E3/HM7, E4/HM5, E4/HM6and E5/HM5) of primers had obvious influence on DNA methylation for ones with different chronological ages and could be used for further research.

Keywords: *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens*; chronological age; DNA methylation; MSAP

收稿日期: 2010-11-25; 修回日期: 2011-03-25

基金项目: 国家林业局 948 项目(编号: 2011-4-49)和浙江省重点重大项目(编号: 2009C12097)资助

作者简介: 郭广平, 硕士研究生, 专业方向: 竹类植物分子生物学。E-mail: guoguoguo110@126.com

通讯作者: 顾小平, 博士, 研究员, 研究方向: 竹林培育及种质资源创制。E-mail: guxpzj@163.com

网络出版时间: 2011-5-30 11:34:39

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110530.1134.005.html>

竹子和树木一样属多年生植物, 和一年生植物不同的是: 我们在对多年生植物进行研究时常常需要判断对象的生理年龄。譬如: 幼年期植株更易进行无性繁殖及离体再生, 植物只有到达一定年龄后才能在外界环境的影响下诱导开花^[1]等等。但竹类植物因采用无性繁殖的方式更新生长, 新竹长成后就没有进一步的增粗生长, 故无法象树木那样通过年轮等判断其生理年龄。因此, 在研究竹子的衰老过程、竹子开花周期等与年龄有关的问题时, 如何测定竹子的生理年龄就成了急需解决的难题。

DNA 甲基化作为表观遗传的主要修饰形式, 在植物基因表达、细胞分化以及系统发育中起着重要的调节作用^[2]。近年来有研究发现: DNA 甲基化不仅与植物生长发育阶段的转变以及无性和有性的繁殖过程中的基因表达有着密切联系^[3], 而且在树木年龄效应中也具有重要的调控作用^[4,5]。Bitonti 等^[6]、Fraga 等^[7]及 Baurens 等^[8]在对辐射松、桃、马占相思等木本植物不同发育阶段基因组 DNA 甲基化水平和模式变化的研究中发现, 幼年植株可以通过改变特定基因的甲基化状态, 调控基因表达而逐渐成熟, 并且随着年龄的增加, DNA 甲基化水平呈上升趋势。这些研究都表明, DNA 甲基化水平在不同植物中与其衰老过程存在着密切的联系。因此, 本文试图利用毛竹(*Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens*)作为研究对象, 用改良的 AFLP 技术(即 MSAP, Methylation-sensitive amplified polymorphism)对 5'-CpCpGpG 位点的甲基化进行特异性扩增, 分析不同生理年龄间甲基化水平和模式的差异, 以及随年龄增加可能出现的趋势, 拟为竹类植物的生理衰老、开花预测及防成熟效应等的研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

试验材料采自亚热带林业研究所的实验林场, 共选择 5 年生、31 年生和>60 年生以上等 3 个龄级的毛竹。其中 5 年生毛竹为本研究组成员于 2004 采用种子培育的 5 个不同无性系的实生苗; 31 年生毛竹为资料记载于 1978 年毛竹种子育苗造林的繁殖材料; >60 年生, 为有资料记载以来无开花更新的毛竹林分。每龄级在林内尽可能地远距离随机选取 5 个当年出笋成竹的单株进行采样。

另外, 为了分析具有相同生理年龄(同一年种子繁育起源的毛竹林)但出笋年龄不同的毛竹单株间是否存在差异, 试验又在同一年种子繁育造林的毛竹林内, 随机选取分别在 2003 年、2005 年、2006 年及 2007 年出笋成竹的各 3 个单株作为供试材料。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法^[9]从新鲜毛竹叶片中提取 DNA, 用 Beckman 紫外可见分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度, 琼脂糖凝胶(0.8%)电泳观察其质量。总 DNA 置于-20 待用。

1.2.2 酶切、连接、PCR 扩增及电泳

用 Xiong 等^[10]的方法进行酶切、连接及 PCR 扩增。所采用的 35 对选择扩增的引物部分选自张红宇等^[11]对水稻的研究, 而 E+CA、E+AG 和 E+AA 均为自行设计引物序列(表 1)。选择扩增后的混合液经变性后, 取 5 μ L 上样于 6%变性聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳, 95 W, 电泳 1.5 h 后银染观察。

表 1 MSAP 分析的接头和引物序列

| 名称 | <i>EcoR</i> I | <i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I |
|--------|-------------------------|-----------------------------|
| 接头 1 | 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' | 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' |
| 接头 2 | 5'-AATTGGTACGACAGTC-3' | 5'-CGCTCAGGACTCAT-3' |
| 预扩增引物 | 5'-GACTGCGTACCAATTC-3' | 5'-GATGAGTCCTGAGCGG-3' |
| 选择扩增引物 | AAC(E1) | CAA(HM1) |
| | AAG(E2) | CAC(HM2) |
| | CA (E3) | CAG(HM3) |
| | AG (E4) | CAT(HM4) |
| | AA (E5) | CTA(HM5) |
| | | CTC(HM6) |
| | | CTG(HM7) |

1.2.3 条带类型统计与数据处理

MSAP 技术中同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 分别与 *Eco*R I 组合进行双酶切。因此每个样品同时拥有两条泳道, 其中第一条泳带采用 *Eco*R I /*Hpa* II 进行酶切, 第二条泳带采用 *Eco*R I /*Msp* I 酶切。根据泳道内条带的有无, 可将条带类型分为 4 种: I 型, 都无带, 代表该位点存在双链外甲基化; II 型, 前者无带, 后者有带, 为双链内甲基化; III 型, 前者有带, 后者无带, 单链外甲基化; IV 型, 都有带, 无甲基化或为单链内甲基化。对 MSAP 检测条带进行统计, 实验数据采用 SPSS16.0 统计分析软件进行方差分析及 LSD 多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同生理年龄间毛竹基因组 DNA 甲基化分析

对 3 个生理年龄毛竹基因组 DNA 进行扩增, 将得到的 MSAP 条带进行统计, 结果如表 2 所示: 5 年、31 年及 >60 年生毛竹单个植株甲基化总条带数的平均值分别为 413、468、531, 扩增位点的总甲基化率分别为 24.44%、28.21%、32.12%; 其中全甲基化条

带数分别为 280、322、351, 全甲基化率分别为 16.57%、19.41%、21.23%。发现无论是总甲基化率还是全甲基化率都随毛竹年龄的增加呈上升趋势。

对上述统计结果采用反正弦角度转换后进行单因素方差分析(表 3)。结果显示: 差异达极显著水平 ($P < 0.001$)。LSD 多重比较发现每两个年龄间的毛竹基因组 DNA 总甲基化率及全甲基化率均达到了显著的差异水平。表明: 在本次实验所选用的 5 年、31 年以及 >60 年 3 个年龄中, 随着毛竹年龄的增加其甲基化敏感多态性呈现上升趋势, 且不同年龄间差异显著。

2.2 同一林分不同出笋年龄间毛竹基因组 DNA 甲基化分析

对不同出笋时期的毛竹单株基因组 DNA 进行 MSAP 检测, 结果如图 1 所示。可以明显看出: 基于本实验采用的引物组合, 同一林分不同出笋年龄间的毛竹基因组 DNA 经 MSAP 检测得到的扩增条带基本一致, 没有差异。这表明: 同一生理年龄不同出笋年龄的毛竹基因组 DNA 甲基化无显著差异。

通常在生产上提及的竹子采伐年龄指的是个体

表 2 不同生理年龄毛竹基因组 DNA 甲基化水平

| 样品 | 条带类型 | | | | 总扩增条带数 + + | 甲基化总带数 + + | 甲基化敏感扩增 多态性(MSAP)% | 全甲基化条带数 + | 全甲基化率 (%) | |
|-------|------|-----|-----|------|---------------|---------------|-----------------------|--------------|--------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | | | | | | |
| 5 年 | 1 | 81 | 196 | 140 | 1354 | 1690 | 417 | 24.67 | 277 | 16.39 |
| | 2 | 76 | 198 | 139 | 1358 | 1695 | 413 | 24.37 | 274 | 16.17 |
| | 3 | 81 | 203 | 129 | 1358 | 1690 | 413 | 24.44 | 284 | 16.8 |
| | 4 | 76 | 210 | 136 | 1345 | 1691 | 422 | 24.96 | 286 | 16.91 |
| | 5 | 83 | 199 | 121 | 1366 | 1686 | 403 | 23.9 | 282 | 16.73 |
| 均值 | 79 | 201 | 133 | 1356 | 1690 | 413 | 24.44 | 280 | 16.57 | |
| 31 年 | 6 | 109 | 192 | 163 | 1307 | 1662 | 464 | 27.92 | 301 | 18.11 |
| | 7 | 119 | 201 | 149 | 1300 | 1650 | 469 | 28.42 | 320 | 19.39 |
| | 8 | 110 | 216 | 160 | 1283 | 1659 | 486 | 29.29 | 326 | 19.65 |
| | 9 | 105 | 222 | 128 | 1315 | 1665 | 455 | 27.33 | 327 | 19.64 |
| | 10 | 116 | 218 | 133 | 1306 | 1657 | 467 | 28.18 | 334 | 20.16 |
| 均值 | 112 | 210 | 147 | 1302 | 1659 | 468 | 28.21 | 322 | 19.41 | |
| >60 年 | 11 | 115 | 254 | 156 | 1247 | 1657 | 525 | 31.68 | 369 | 22.27 |
| | 12 | 120 | 262 | 160 | 1229 | 1651 | 542 | 32.83 | 382 | 23.14 |
| | 13 | 111 | 238 | 193 | 1228 | 1659 | 542 | 32.67 | 349 | 21.04 |
| | 14 | 123 | 214 | 213 | 1227 | 1654 | 527 | 31.86 | 337 | 26.83 |
| | 15 | 125 | 194 | 202 | 1250 | 1646 | 521 | 31.65 | 319 | 19.38 |
| 均值 | 119 | 232 | 185 | 1236 | 1653 | 531 | 32.12 | 351 | 21.23 | |

表 3 不同年龄毛竹甲基化水平差异分析

| 年龄 | N | 均值 | | 方差检验 | |
|------|---|--------------|--------------|------------|------------|
| | | 总甲基化率 | 全甲基化率 | 总甲基化率 | 全甲基化率 |
| 5 | 5 | 24.44±0.289A | 16.57±0.309a | F=223.653 | F=17.198 |
| 31 | 5 | 28.21±0.513B | 19.41±0.768b | Sig.=0.000 | Sig.=0.000 |
| > 60 | 5 | 32.12±0.358C | 21.23±2.787c | P < 0.01 | P < 0.01 |

注: 均值为平均值±标准差。表中字母 A、B、C 及 a、b、c 均为 LSD 检验差异显著(P < 0.01)。

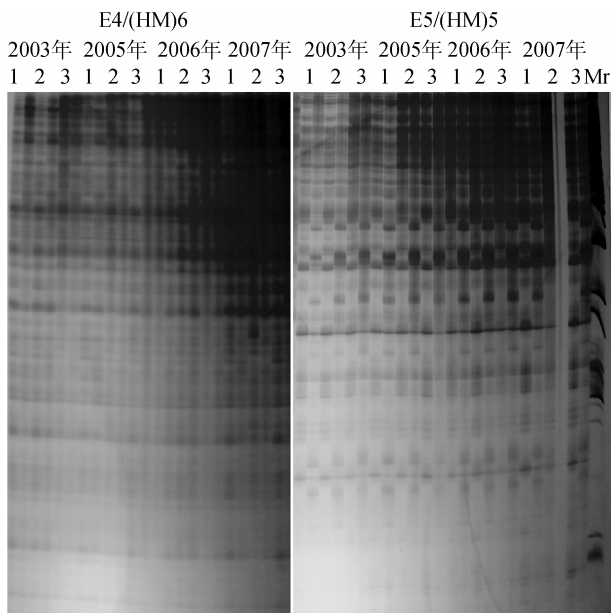


图 1 不同出笋年龄间毛竹叶片的 DNA 甲基化电泳图
扩增所用引物组合标明在其顶部; 标号 1、2、3 代表各个出笋年龄选取的 3 个样品; 每个样品两条泳道即: *EcoR* I / *Hpa* II 的酶切、扩增产物和 *EcoR* I / *Msp* I 的酶切、扩增产物; Mr 代表分子量(50 bp ladder)。

单株的出笋年龄。由于竹子的繁衍生长采用的是无性繁殖方式, 出笋-新竹-老竹的个体生长尽管在时间上有前后的差异, 但都起源于同一批种子, 故生理(或发育的)年龄应该相同。实验也从基因组 DNA 甲基化的角度证实了此结果。

2.3 不同生理年龄间毛竹基因组 DNA 甲基化带型分析

不同生理年龄毛竹基因组 DNA 甲基化部分 MSAP 电泳结果见图 2, 可以看出: 同一年龄不同单株的毛竹基因组 DNA 扩增的条带类型之间无明显差异; 但随着毛竹年龄的增加基因组 DNA 的甲基化位点所呈现的分布模式可以分为两类: 一类是单态型, 即带纹仅出现在 H 泳道中, 或反之亦然; 另一

类为多态型, 即随着毛竹年龄的增加 MSAP 带型发生了变化, 某些片段出现在低龄毛竹 DNA 基因中, 但是随着年龄的增加却消失了, 而另一些片段却只有当年龄增加到一定值时, 才能够被检测到。

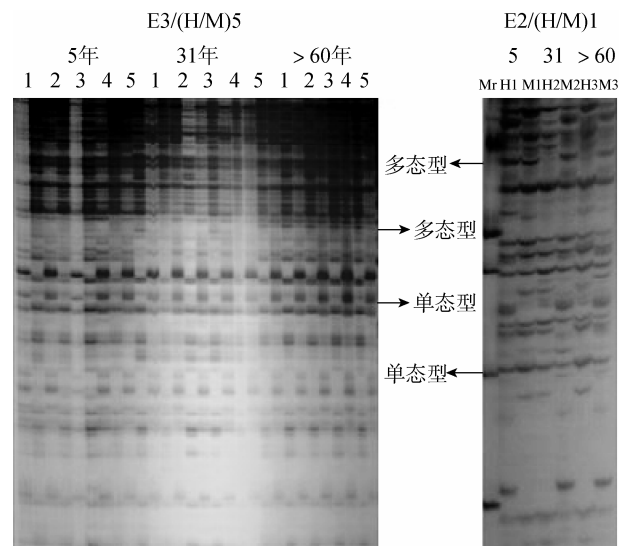


图 2 MSAP 分析毛竹不同生理年龄 DNA 甲基化部分电泳图

H: *EcoR* I / *Hpa* II 的酶切、扩增产物; M: *EcoR* I / *Msp* I 的酶切、扩增产物。扩增所用引物组合标明在其顶部; Mr 代表分子量(50 bp ladder); 1~5 代表同一生理年龄选择的 5 个样品。

对不同生理年龄的 DNA 甲基化状态进行比较, 发现: 随着年龄变化同一位点发生变异的条带数为 174。一些位点会随着年龄的增加由甲基化状态发生去甲基化, 另一些位点会由未甲基化状态产生从头甲基化, 还有部分位点会发生不规则的变动即在去甲基化和从头甲基化之间进行转变。因此, 根据伴随年龄增加所出现的带型变化可将其分为 3 种类型(表 4 所示): A 型, 随着生理年龄的增加, DNA 发生从头甲基化, 即 DNA 基因组甲基化率升高, 位点数为 91, 占总变异类型的 52.3%; B 型, 随着生理年龄的增加, CCGG 位点在超过 60 年的样本中发生了完

全的去甲基化,位点数为 18,占总变异的 10.3%; C 型,随着毛竹生理年龄的增加,条带类型出现不规则变化,位点数 65,占总变异的 37.4%。由此可以看出,在生理年龄增加的过程中 DNA 去甲基化的数目变化不大,而甲基化的数目明显增加,最终导致基因组的甲基化位点数不断增加。

表 4 不同生理年龄间的 DNA 甲基化变化情况

| 类型 | 带型变化 | 位点数目 | 不同类型的比率(%) |
|-----|-------------------|------|------------|
| A 型 | I (0 0) | 27 | 52.3 |
| | IV(1 1) → II(0 1) | 22 | |
| | III(1 0) | 42 | |
| B 型 | I (0 0) | 9 | 10.3 |
| | II(0 1) → IV(1 1) | 5 | |
| | III(1 0) | 4 | |
| C 型 | I (0 0) I (0 0) | 65 | 37.4 |
| | II(0 1) → II(0 1) | | |
| | III(1 0) III(1 0) | | |

2.4 MSAP 检测过程中扩增引物组合的分析

使用不同引物组合对基因组 DNA 进行 MSAP 检测,得到的特异性扩增片段各不相同。随着毛竹年龄的增加,各个引物组合在不同年龄阶段扩增出的甲基化片段并表现了各自不同的 DNA 甲基化水平和变化趋势。

对本次研究选用的 35 对引物组合所得总甲基化率进行统计发现:随着毛竹年龄的增加,40%引物组合呈上升趋势,31%呈不规则变化,23%无差异,6%呈下降趋势。40%引物组合即 14 对引物组随着年龄的增加表现出与供试引物组的总甲基化趋势一致的现象,因此不妨推断这 14 对引物组合可能与年龄具有更为密切的相关性。将这 14 对引物组所得 DNA 甲基化率进行反正弦角度转换,对其进行方差分析及 LSD 多重比较发现可将引物组分为 3 种类型:一,引物组 E1/HM6, E5/HM3 虽然随年龄的增加 DNA 甲基化率逐渐上升,但是相邻年龄间差异不显著;二,引物组 E1/HM1, E1/HM3, E3/HM4, E3/HM5, E5/HM1, E5/HM6 虽然方差分析具有显著差异,但经 LSD 多重比较后发现并不是每两个相邻年龄间均差异显著;三,引物组 E3/HM2、E3/HM6、E3/HM7、E4/HM5、E4/HM6、E5/HM5, 方差分析结果差异显著, LSD 多重比较表明:每相邻两个年龄间差异均达到显著水平(表 5 所示)。

3 讨论

目前,MSAP 技术已经广泛应用于水稻、拟南芥、柑橘等物种的基因组 DNA 甲基化研究中^[12], Xiong 等^[10]在对水稻 DNA 甲基化多态性研究中得到了 Southern 杂交的验证,而且在拟南芥中通过对序

表 5 与总甲基化水平趋势相同的引物组所测得 DNA 甲基化率及统计检验

| 类型 | 引物组合 | N | 均值(MSAP%) | | | 方差分析 | |
|-------|-------|-------------|-------------|--------------|------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | | 5 年生 | 31 年生 | >60 年生 | F _{no} | F _{time} |
| — | E1HM6 | 15 | 44.28±9.60a | 45.42±4.77a | 46.04±0.25a | F _{no} =1.259 | F _{time} =0.012 |
| | E5HM3 | 15 | 31.77±1.07a | 33.11±1.52a | 34.23±1.35a | F _{no} =0.942 | F _{time} =4.226 |
| | E1HM1 | 15 | 11.95±5.16a | 30.14±6.23b | 36.06±0.14b | F _{no} =0.378 | F _{time} =9.331** |
| 二 | E1HM3 | 15 | 11.75±7.93a | 14.74±2.35ab | 23.97±6.57b | F _{no} =1.176 | F _{time} =3.781* |
| | E3HM4 | 15 | 24.34±5.77a | 35.40±4.20ab | 52.35±0.21b | F _{no} =0.847 | F _{time} =5.892* |
| | E3HM5 | 15 | 24.94±5.59A | 28.45±0.12AB | 53.56±0.18AB | F _{no} =2.369 | F _{time} =9.864** |
| 三 | E5HM1 | 15 | 24.07±2.46a | 29.04±2.92b | 35.41±0.57b | F _{no} =0.892 | F _{time} =43.417** |
| | E5HM6 | 15 | 23.63±1.57a | 25.30±1.56a | 35.00±0.93b | F _{no} =0.476 | F _{time} =74.074** |
| | E3HM2 | 15 | 14.07±4.69A | 26.09±7.51B | 43.77±4.74C | F _{no} =1.467 | F _{time} =34.625** |
| | E3HM6 | 15 | 19.70±1.70a | 24.78±4.39b | 42.34±1.00c | F _{no} =0.784 | F _{time} =73.454** |
| | E3HM7 | 15 | 11.42±0.00A | 19.06±0.12B | 21.43±0.00C | F _{no} =1.000 | F _{time} =3.175E4** |
| | E4HM5 | 15 | 30.39±1.14A | 36.74±2.14B | 43.66±0.96C | F _{no} =0.381 | F _{time} =76.341** |
| | E4HM6 | 15 | 33.13±1.66A | 38.38±0.69B | 44.04±2.91C | F _{no} =1.254 | F _{time} =41.857** |
| E5HM5 | 15 | 28.46±1.62A | 32.71±0.34B | 39.31±0.65C | F _{no} =0.891 | F _{time} =127.557** | |

注: * 表示 5% 的差异显著水平; ** 表示 1% 差异极显著水平; no 表示毛竹单株个体; time 表示毛竹生理年龄。

列测定和比较分析证明了 MSAP 检测结果的有效性和可靠性^[13]。在已研究的高等植物中, 基因组 DNA 发生甲基化程度因种类而异, 从 4.6%~30%不等^[14]。本次研究部分引物组合与张红宇等^[11]对水稻单倍体和二倍体甲基化差异时所选用的引物组相同, 但毛竹甲基化水平(32.12%)明显高于水稻(18%~20%)。这可能是由于毛竹的高倍性, 当几个基因组综合到一个核中时, 会发生超量表达的浪费现象有关。

近年来, 针对不同植物不同发育阶段基因组 DNA 甲基化水平和模式进行的研究较多。Demeulemeester 等^[15]对菊苣的研究中就发现基因组 DNA 的甲基化水平与其年龄密切相关; 之后 Bitonti 等^[6]、Fraga 等^[7]分别对桃和辐射松不同发育阶段分生组织的 DNA 甲基化水平进行了检测, 发现成年期分生组织显著高于童期和类童期分生组织的甲基化水平; 随后 Fraga 等^[16]又对成年植株进行复壮嫁接, 发现总的 DNA 甲基化水平明显下降。在对北美巨杉等木本植物的研究中也发现, DNA 甲基化水平及模式随着树木发育阶段的转换而发生改变^[17]。本次研究我们对处于不同年龄阶段的毛竹进行 MSAP 检测, 发现与其他植物一样毛竹基因组 DNA 的甲基化水平和模式与自身衰老过程有着密切联系。在毛竹的生长发育过程中, 同时发生甲基化和去甲基化作用, 其中发生 DNA 甲基化的变异位点(52.3%)远大于 DNA 去甲基化变异位点(10.3%), 最终导致基因组的甲基化位点数不断增加, 从而使得 DNA 甲基化率随年龄的增加呈现上升的趋势。

Baurens 等^[8]对马占相思幼嫩、成熟外植体离体繁殖微芽的基因组 DNA 甲基化进行检测, 结果显示幼嫩叶形态的微芽 DNA 甲基化程度高于成熟叶状柄的形态型; 并发现各有 3 个与年龄相关的 C^{5m}CGG 位点分别专属于幼年及成年材料中。这表明在植物生长发育过程中存在年龄相关的 DNA 甲基化与变异位点。在本研究中, 同样存在随着年龄增加而产生甲基化状态改变的变异条带, 主要体现在不同年龄之间相同位点的甲基化状态不同, 包括去甲基化、单链 mCCGG 或 mCmCGG 与 mCCGG 之间的转换等。由此可以推断: 在这些变异条带中很可能存在与毛竹年龄紧密相关的甲基化变异位点。这就需要下一步根据变异的位点, 进行回收测序, 并进一步设计引物验证该位点在各个龄级的定

量表达差异, 来验证甲基化分析结果的可靠性。

要想建立毛竹基因组 DNA 甲基化水平与年龄之间的数量关系, 需要采用更多的年龄阶段来进一步验证, 然而在进行大量实验中, 过多的引物组合会使实验费用以及工作量增加。选择合适的能够代表总水平及趋势的引物组合来研究毛竹生理年龄和 DNA 甲基化之间的关系, 将对进一步的研究提供裨益。在我们所选用的 35 对引物组合中, 有 6 对引物组与总甲基化率趋势一致且差异显著。因此, 能否在基于特定引物组合下, 将 DNA 甲基化改变与年龄之间建立较精确的量化关系尚待下一步开展大量的研究。我们希望基于对 3 个不同生理年龄的毛竹基因组 DNA 甲基化水平及模式研究, 有助于更深入地了解竹子的生长发育机制, 为竹类植物生理年龄的判定提供一种方法。

参考文献(References):

- [1] 郭长花, 康向阳. 树木发育中的阶段转变研究进展. 生物技术通讯, 2008, 19(5): 784-786.
- [2] Tariq M, Paszkowski J. DNA and histone methylation in plants. *Trends Genet*, 2004, 20(6): 244-251.
- [3] Jack T. Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell*, 2004, 16(S1): S1-S17.
- [4] Poethig RS. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science*, 1990, 250(4983): 923-930.
- [5] Brunner AM, Nilsson O. Revisiting tree maturation and floral initiation in the poplar functional genomics era. *New Phytologist*, 2004, 164(1): 43-51.
- [6] Bitonti MB, Cozza R, Chiappetta A, Giannino D, Castiglione MR, Dewitte W, Mariotti D, van Onckelen H, Innocenti AM. Distinct nuclear organization, DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile, juvenile-like and adult vegetative apical meristems in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *J Exp Bot*, 2002, 53(371): 1047-1054.
- [7] Fraga MF, Cañal MJ, Rodríguez R. Phase-change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don. *Planta*, 2002, 215(4): 672-678.
- [8] Baurens FC, Nicolleau J, Legavre T, Verdil JL, Monteuis O. Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker. *Tree Physiol*, 2004, 24(4): 401-407.
- [9] 高志民, 范少辉, 高健, 李雪平, 蔡春菊, 彭镇华. 基于 CTAB 法提取毛竹基因组 DNA 的探讨. 林业科学研究,

- 2006, 19(6): 725–728.
- [10] Xiong LZ, Xu CG, Saghai Maroof MA, Zhang QF. Patterns of cytosine methylation pattern in an elite rice hybrid and its parental lines detected by a methylation polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(3): 139–446.
- [11] 张红宇, 彭海, 李云, 徐培洲, 汪旭东, 吴先军. 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. *科学通报*, 2006, 51(13): 1529–1535.
- [12] Portis E, Acquadro A, Comino C, Lanteri S. Analysis of DNA methylation during germination pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci*, 2004, 166(1): 169–178.
- [13] Cervara MT, Ruin-García L, Martínez-Zapater JM. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Mol Genet Genomics*, 2002, 268(4): 543–552.
- [14] 薛梅, 陈成彬, 陈力, 马小军. 半夏多倍体复合体基因组 DNA 甲基化状态的 MSAP 分析. *中草药*, 2008, 39(11): 1713–1716.
- [15] Demeulemeester MAC, van Stallen N, De Proft MP. Degree of DNA methylation in chicory (*Cichorium intybus* L.): influence of plant age and vernalization. *Plant Sci*, 1999, 142(1): 101–108.
- [16] Fraga MF, Cañal MJ, Rodríguez R. *In vitro* morphogenic potential of differently aged *Pinus radiata* trees correlates with polyamines and DNA methylation levels. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 2002, 70(2): 139–145.
- [17] Monteuis O, Doubeau S, Verdeil JL. DNA methylation in different originclonal offspring from a mature *Sequoiadendron giganteum* genotype. *Trees*, 2008, 22(6): 779–784.

• 综合信息 •

2011 全国植物生物学研讨会即将南宁召开

为促进我国从事植物遗传学、分子生物学、细胞生物学、功能基因组学、分子育种等领域的科研人员之间的交流, 研讨相关领域的最新成果和进展, 中国遗传学会植物遗传和基因组学专业委员会、中国植物生理学会细胞与发育生物学专业委员会和分子生物化学专业委员会、中国植物学会植物生理及分子生物化学专业委员会与中国细胞生物学学会植物细胞生物学专业委员会将于 2011 年 9 月 16-19 日在南宁联合举办“2011 全国植物生物学研讨会”。

研讨会主席:

许智宏院士、李家洋院士、陈章良教授

研讨会学术委员会:

方荣祥、孙大业、许智宏、张启发、李家洋、李振声、陈宜瑜、陈晓亚、林鸿宣、武维华、赵进东、薛勇彪

研讨会组委会主席:

薛勇彪、唐纪良;

副主席: 左建儒、李有志

研讨会专题:

植物遗传学与发育生物学; 植物细胞生物学; 植物基因组学和表观遗传学; 植物激素作用的分子机理; 植物生物胁迫与非生物胁迫; 植物营养与代谢; 作物生物技术与分子育种。

注册:

请通过大会网页(<http://nn2011.geneticsociety.cn/>)在线注册。

注册费:

7 月 30 日前注册: 1500 元/人; 研究生、博士后: 1200 元/人

7 月 30 日后注册: 1800 元/人; 研究生、博士后: 1500 元/人

现场注册: 2100 元/人; 研究生、博士后: 1800 元/人

缴费方式:

开户行: 中国银行广西南宁市西大支行

账户名: 广西大学

账 号: 802700009808091001

大会联系人: 蒙冰, 电话: 0771-3237092; 邮箱: meng.b@163.com; 传真: 0771-3237873

联系地址: 广西南宁市大学路 100 号 邮编: 530004