中国水稻科学(*Chin J Rice Sci*)，2011，25(3)：249～255
http://www.ricesci.cn
DOI：10.3969/j.issn.1001-7216.2011.03.004

双胚苗水稻单倍体及其杂交后代基因组 DNA 甲基化特异位点的分析及功能探讨

吴绍华　薛晶晶　张红宇　徐培洲　吴先军*
(四川农业大学 水稻研究所/西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室，四川 成都 611130；*通讯联系人，E-mail：wuxjsau@126.com)

Analysis of Special DNA Methylated Sites Between Haploid of Twin-Seedling and Its Hybrids in Rice

WU Shao-hua，XUE Jing-jing，ZHANG Hong-yu，XU Pei-zhou，WU Xian-jun*
(*Rice Research Institute/Key Laboratory of Southwest Crop Genetic Resources and Improvement，Ministry of Education，Sichuan Agricultural University，Chengdu 611130，China；* Corresponding author，E-mail：wuxjsau@126.com*)

WU Shaohua，XUE Jingjing，ZHANG Hongyu，et al. Analysis of special DNA methylated sites between haploid of twin-seedling and its hybrids in rice. Chin J Rice Sci，2011，25(3)：249-255
Abstract：The DNA cytosine methylation mutation at the 5′-CpCpGpG sites of the haploid of SARII-628，and its hybrids with Shuhui 527，Shuhui 363 were analyzed by employing the MSAP (methylation sensitive amplification polyphisim) method. A total of 765 DNA methylated sites were detected and the methylation level of hybrids was lower than that of the parents. Meanwhile，different bands between hybrids and parents were analyzed and two types of methylated sites were detected，of which one inherited from the haploid，and the other didn′t. The biological functions of genes related to methylated sites involved in cell structure，metabolize and stress reaction. Therefore，DNA methylated modifications may be involved in the regulation of related genes，playing an important role in plant growth，development and envolution.
Key words：twin-seedling rice；haploid；methylation sensitive amplification polymorphism；DNA methylation

吴绍华，薛晶晶，张红宇，等. 水稻单倍体及其杂交后代基因组 DNA 甲基化特异位点的分析及功能探讨. 中国水稻科学，2011，25(3)：249-255.
摘　要：采用甲基化敏感性扩增多态性技术对水稻单倍体 SARⅡ-628 及它与蜀恢 527、蜀恢 363 的杂交后代基因组 DNA 甲基化位点进行了分析。用 16 对选择性扩增引物在双亲及杂交后代中共检测到 765 个 DNA 甲基化位点，与双亲相比，杂交后代 DNA 甲基化水平均有不同程度的降低。通过分析两个杂交组合与双亲的甲基化带型差异，发现非单倍体遗传及单倍体独立遗传两种甲基化差异位点。对部分甲基化位点的序列进行功能分析，发现这些位点主要涉及细胞构造、代谢途径、应激反应等生物学功能。推测这类功能基因的甲基化修饰调控着相关基因的开启与关闭，为植物的生存、生长、发育及进化提供动力。
关键词：双胚苗水稻；单倍体；甲基化敏感性扩增多态性；DNA 甲基化
中图分类号：Q943；S511.01　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1001-7216(2011)03-0249-07

DNA 甲基化是一种表观遗传现象。在大多数真核生物的细胞中，90％以上的甲基化作用都发生在 CpG、CpXpG、CCA/TGG 和 GATC 中[1-2]，而高等植物中约有 30％左右的胞嘧啶残基发生甲基化[3]。DNA 甲基化与一系列的生物学过程相关，如 X 染色体失活、基因的转录调节和转座子元件的活性、基因沉默、基因组印迹等[4-8]，它在高等生物的生命活动中具有维持基因组稳定及调节生长发育等功能[9]。近年来，对 DNA 甲基化修饰的研究已成为分子生物学的一个热点。

全基因组重复或多倍化过程被认为在植物界物种形成和进化过程中起着非常重要的作用，仅在被子植物中就有大约 70％～80％的物种在不同的进化阶段经历过基因重复或多倍化过程[10-11]。研究发现，水稻基因组内曾发生过两次大的重复事件。基因组加倍后，再经历所谓的二倍化过程，进化成当代的二倍体物种。在物种多倍化进化过程中，必然伴随着表观遗传现象的传递。本实验室利用同一株系来源的双胚苗创建了水稻单倍体和多倍体材料。SSR 分析表明这些倍性水稻间遗传背景一致，是研究水稻多倍化表观遗传的理想材料。来源于同一双胚苗的不同倍性水稻的表型差异除了由基因剂量效应引起外，DNA 甲基化对它也有重要的影响[12-13]，但有关倍性水稻甲基化遗传特性的研究尚未见报道。本研究采用单倍体与二倍体的杂交后代分析单

收稿日期：2010-11-16；**修改稿收到日期**：2011-01-21。
基金项目：国家自然科学基金资助项目(30771157，30971618)；四川省科技厅项目(2008JY0094)。

倍体基因组 DNA 甲基化位点特异性及遗传特性，旨在为进一步研究单倍体 DNA 甲基化对基因表达调控的影响及倍性进化过程中的表观遗传控制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料包括来源于水稻双胚苗株系 SARⅡ-628 的单倍体(1N)，二倍体恢复系蜀恢 527(R527)、蜀恢 363(R363)及它们的 F_1(1N/R527)、F_1'(1N/R363)。

1.2 方法

1.2.1 倍性鉴定

参照本实验室 Zhang 等[12]所采用的方法，取 1N、F_1 和 F_1' 的根尖并采用压片法进行倍性鉴定。

1.2.2 甲基化敏感性扩增多态性(MSAP)分析

水稻叶片总 DNA 采用 DNAsecure Plant Kit (TIANGEN)进行提取。MSAP 分析中酶切、连接、预扩和选扩参照 Xiong 等[14]的方法进行，双酶切组合分别为 *Eco*RⅠ/*Msp* Ⅰ 和 *Eco*RⅠ/*Hpa* Ⅱ (NEB)，接头和引物序列如表 1 所示。PAGE 条带的统计采用“0、1”表示，相同的位点有带记为“1”，无带记为“0”。

1.2.3 目的条带的回收、测序及序列分析

从聚丙烯酰胺凝胶中切下目的条带，加入 400 μL 高盐溶液(20%乙醇，1 mol/L LiCl，10 mmol/L Tris)，放置 24 h，65℃下水浴 2 h，13 000 r/min 下离心 15 min，取上清，加 2 倍无水乙醇沉淀；待沉淀晾干后加 20 μL 双蒸水溶解；取 5 μL 作模板进行二次 PCR。然后用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测并回收目的条带，用 pMD19-T Clone Kit(TaKaRa)克隆差异片段。转化后挑取白色菌落接种于 3 mL LB/Amp$^+$ 液体培养基中，37℃、200 r/min 下振荡培养，采用 PCR 进行鉴定，阳性克隆送上海美季生物技术有限公司进行测序。用 DNAMAN 软件去除载体序列后，采用 MSU Osa1 Release 6.1 (http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml)和 NCBI 的 BLASTN 程序对测序结果进行同源性比对，数据库是日本晴全基因组序列。

表 1 接头和引物序列

Table 1. Adapter and primer sequences.

接头与引物 Adapter and primer	序列 Sequence
*Eco*RⅠ接头	5′-CTCGTAGACTGCGTACC-3′
*Eco*RⅠ adapter	3′-CTGACGCATGGTTAA-5′
*Msp*Ⅰ/*Hpa*Ⅱ接头	5′-GATCATGAGTCCTGCT-3′
*Msp*Ⅰ/*Hpa*Ⅱ adapter	3′-AGTACTCAGGACGAGC-5′
*Eco*RⅠ预扩增引物(E0) PreAmp primer (E0)	5′-GACTGCGTACCAATTC-3′
*Msp*Ⅰ/*Hpa*Ⅱ预扩增引物(HM0) PreAmp primer (HM0)	5′-ATCATGAGTCCTGCTCGG-3′
*Eco*RⅠ选扩增引物 Selective primer of *Eco*RⅠ	
E1	E0-AAC
E2	E0-AAG
E3	E0-ACA
E4	E0-ACC
E5	E0-ACG
E6	E0-ACT
*Msp*Ⅰ/*Hpa*Ⅱ选扩增引物 Selective primer of *Msp*Ⅰ/*Hpa*Ⅱ	
HM1	HM0-TAT
HM2	HM0-TAG
HM3	HM0-TAC
HM4	HM0-TTG
HM5	HM0-TTC
HM6	HM0-TGT
HM7	HM0-TGC
HM8	HM0-TCT
HM9	HM0-TCG
HM10	HM0-TCC

2 结果与分析

2.1 单倍体与恢复系杂交后代植株的获得与倍性鉴定

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，每年都能产生单倍体和二倍体的双苗植株。在开花期，根据株型和颖花大小从双胚苗群体中筛选出可能为单倍体的植株，进一步对根尖细胞进行染色体鉴定，染色体数目为 12 的确定为单倍体。该单倍体自身不能结实，但与二倍体杂交能获得杂交种子。对单倍体子房进行石蜡切片观察，发现存在正常发育的卵细胞和极核；而花药的切片显示花粉粒形状各异，发育不正常(图 1-A～C)。据此，以单倍体水稻作母本，R527、R363 作父本杂交获得后代植株。1N/R527 杂交后代用 F_1 表示，1N/R363 杂交后代用 F_1' 表示。其中 F_1 成活 4 株，编号为 21-1～21-4；F_1' 成活 7 株，编号为 18-1～18-7。单倍体、R527、R363 及其杂交后代的表型如图 1-G～I 所示，倍性鉴定结果如图 1-D～F 所示，杂交后代均为正常的二倍体植株。

2.2 亲本及杂交后代基因组 DNA 甲基化水平分析

本研究用 MSAP 分析了双胚苗株系 SARⅡ-628 的单倍体、R527、R363、F_1、F_1' 孕穗期叶片基因组 DNA 5′-CCGG 位点胞嘧啶的甲基化水平和甲基化遗传模式。MSAP方法的关键在于5′-CCGG位点胞

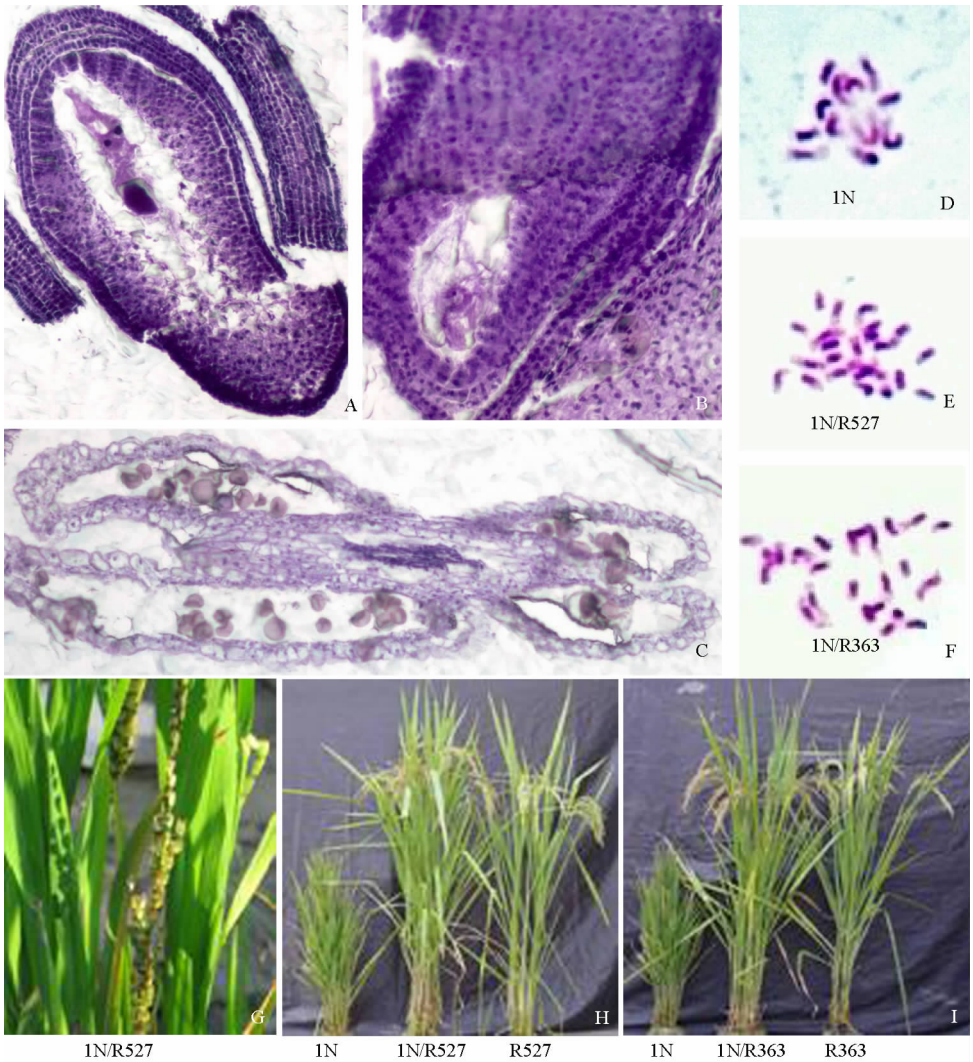


图 1 单倍体子房、花药结构、单倍体及其杂交后代根尖细胞染色体鉴定和植株表型

Fig. 1. Microstructure of ovary and anther of the haploid, root cell chromosome identification and phenotypes of the parents and their hybrids.

A，B —单倍体子房；C —单倍体花药；D～F —根尖细胞染色体；G～I —亲本及其杂交后代的表型。1N —双胚苗株系 SAR Ⅱ-628 的单倍体；R527 —蜀恢 527；R363 —蜀恢 363。下同。

A and B, Ovary; C, Anther; D, E and F, Root cell chromosomes; G, H and I, Phenotypes of the parents and their hybrids. 1N, Haploid of SAR Ⅱ-628; R527, Shuhui 527; R363, Shuhui 363. The same as in figures and tables below.

嘧啶的甲基化状态会影响同裂酶 *Hpa* Ⅱ、*Msp* Ⅰ的酶切反应[15-16]（表 2），经 PCR 扩增出的多态性片段就反映出该位点的甲基化状态及程度。因此，此方法被广泛用于动植物基因组甲基化分析。

本研究用 E1～E6 分别与 HM1～HM10 配对组成的引物对 SAR Ⅱ-628 单倍体及其杂交后代进行 MSAP 分析，经过筛选，获得扩增多态性较好的 16 对引物，包括 E1HM1、E1HM2、E2HM1、E2HM2、E2HM8、E3HM1、E3HM5、E4HM1、E4HM4、E4HM8、E4HM10、E5HM1、E5HM2、E5HM4、E6HM1 和 E6HM2。这 16 对引物在样品中共检测到 765 个 DNA 甲基化位点，亲本及其杂交后代在 CCGG 位点的胞嘧啶甲基化位点数如表 2 所示。结合图 2，发现与双亲相比，杂交后代 F_1 和 F_1'的甲基化水平均有不同程度的降低，这可能是杂种优势的表观遗传表现。推测杂交后代经过基因重组后某些基因发生了甲基化调整，但甲基化整体水平处于下降趋势，也说明了基因激活比基因沉默更活跃，从而导致后代表现优于双亲的生长优势。

2.3 单倍体相关甲基化差异位点分析

本研究用 SAR Ⅱ-628 的单倍体作为两个杂交后代的共同母本，通过比较分析此单倍体与F_1、F_1'、

表 2 单倍体和恢复系及其杂种一代的甲基化水平

Table 2. The methylation levels of the haploid of SAR Ⅱ-628, restorer lines and their hybrids.

类型 Type	甲基化 Methylation	带型 Band H	带型 Band M	R527	1N/R527 21-1	1N/R527 21-2	1N/R527 21-3	1N/R527 21-4	1N	1N/R363 18-1	1N/R363 18-2	1N/R363 18-3	1N/R363 18-4	1N/R363 18-5	1N/R363 18-6	1N/R363 18-7	R363
Ⅰ	$^{5m}C^{5m}CGG$	−	−	55	27	28	2 6	29	46	17	17	17	17	17	17	18	53
	$GG^{5m}C^{5m}C$																
Ⅱ	$C^{5m}CGG$	−	+	138	146	160	159	157	143	151	152	156	162	158	157	159	148
	$GG^{5m}CC$																
Ⅲ	$^{5m}CCGG$	+	−	64	59	45	48	44	52	52	50	51	51	53	52	50	54
	GGCC																
Ⅳ	CCGG	+	+	508	533	532	532	535	524	545	546	541	535	537	539	538	510
	GGCC																
	TMS			257	232	233	233	230	241	220	219	224	230	228	226	227	255
	MSAPR/%			33.6	30.3	30.5	30.5	30.1	31.5	28.8	28.6	29.3	30.1	29.8	29.5	29.7	33.3
	FMB			193	173	188	185	186	189	168	169	173	179	175	174	177	201
	FMR/%			25.2	22.6	24.6	24.2	24.3	24.7	22.0	22.1	22.6	23.4	22.9	22.8	23.1	26.3

H − *Eco*RⅠ+*Hpa*Ⅱ; M − *Eco*RⅠ+*Msp*Ⅰ; “+”表示酶切后扩增有带; “−”表示酶切后扩增无带。TMS−甲基化总位点数(Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ); FMB−全甲基化位点数(Ⅰ+Ⅱ); MSAPR −甲基化敏感性扩增多态性比率; FMR−全甲基化比率。

H, *Eco*RⅠ+*Hpa*Ⅱ; M, *Eco*RⅠ+*Msp*Ⅰ; +, Band present; −, Band absent. TMS, Total methylated sites = Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ; FMB, Full methylated bands = Ⅰ+Ⅱ; FMR, Full methylated ratio; MSAPR, Methylation sensitive amplification polymorphism ratio.

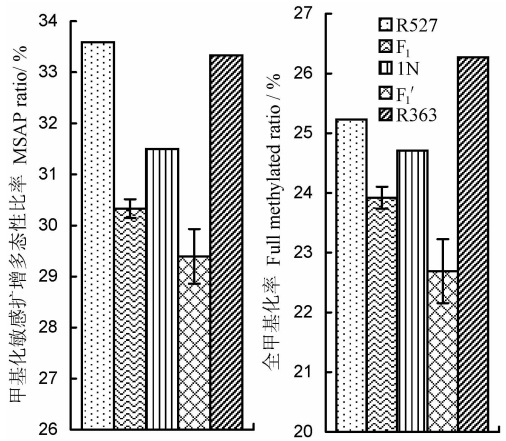


图 2 双亲与杂交后代 DNA 甲基化水平比较

Fig. 2. Comparision of methylation between the parents and their hybrids.

F_1−1N/蜀恢 527; F_1'−1N/蜀恢 363。下同。

F_1, 1N/Shuhui 527; F_1', 1N/Shuhui 363. The same as in tables and figures below.

R527、R363 甲基化带型的差异,排除因父本、环境、个体等因素造成的带型偏差,确定与母本单倍体有关的 DNA 甲基化差异位点。这些 DNA 甲基化差异位点主要有以下 2 种类型(表 3,图 3)。A 型:单倍体在该位点的甲基化状态不同于父本和后代,后代的 DNA 甲基化模式主要是由父本 R527、R363 遗传。765 个 DNA 甲基化位点中共检测到 21 个 A 型位点,占 2.75%,A 型主要包括 7 类情况(表 3,A1～A7)。B 型:单倍体遗传的甲基化差异位点。该位点的甲基化模式由单倍体遗传给后代而不受父本影响,在 765 个位点中共检测到 36 个 B 型位点,占 4.71%,B 型主要包括 10 类情况(表 3,B1～B10)。另外,还发现不同于双亲的 DNA 甲基化位点,即杂交后产生了新的甲基化模式,可能是双亲互作的结果(表 3,C 型)。

通过对表 3 位点数的统计分析,当双亲同一位点甲基化水平不同时,杂交后代一般优先选择遗传甲基化水平较低的位点,使得有利于后代生长的基因得到表达。如在 A、B 型,分别有 15 个(A1～A3)和 32 个(B1,B5～B10)这样的位点。

2.4 DNA 甲基化差异片段序列分析

对 31 个与单倍体有关的 DNA 甲基化目的片段进行测序,共获得 29 个序列,片段长度范围为 60～448 bp。获得的序列经 MSU Osa1 Release 6.1 的 BLASTN 比对发现,在 29 个序列中,18 个序列与数据库中的基因不能完全匹配,只有 11 个序列能与数据库中的基因匹配。这 11 个序列的功能涉及到类纤维素合酶 C 家族基因 *CSLC7*,PPR 蛋白、AMP 合酶、DNAJ 伴侣蛋白、寡肽转运蛋白、磷酸酶 2C 蛋白家族、富含亮氨酸重复蛋白、OsFBX427-F-box 蛋白以及未知表达蛋白等。其中,CSLC7 蛋白具有糖基转移酶活性,主要参与细胞壁的合成。PPR 蛋白在线粒体、叶绿体 RNA 编辑中作为一种位点识别因子起作用[17-18]。AMP 合酶是内质网、过氧化物酶体、线粒体等细胞组成元件,而磷酸酶 2C 蛋白家族是细胞核、细胞质的组成部分,这两个酶蛋白参与了诸如生物防御等多个生物反应过程。DNAJ 伴侣蛋白是内质网、质体、线粒体、类囊体的组成元件,并参与蛋白代谢过程。寡肽转运蛋白的分子功能主要是起到运送蛋白的作用。简言之,这些蛋白在细胞组成及各类代谢过程中起着重要的作

表 3 杂交后代与双亲 CCGG 位点甲基化比较

Table 3. Comparision of methylation between parents and their hybrids.

类型 Type	甲基化状态 Methylation					位点数 Site
	R527	F_1	1N	F_1'	R363	
A1	C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	^{5m}C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	6
	GG^{5m}CC	GG^{5m}CC	GG^{5m}C^{5m}C	GG^{5m}CC	GG^{5m}CC	
A2	CCGG	CCGG	^{5m}C^{5m}CGG	CCGG	CCGG	5
	GGCC	GGCC	GG^{5m}C^{5m}C	GGCC	GGCC	
A3	CCGG	CCGG	C^{5m}CGG	CCGG	CCGG	4
	GGCC	GGCC	GG^{5m}CC	GGCC	GGCC	
A4	^{5m}C^{5m}CGG	^{5m}C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	^{5m}CCGG	^{5m}CCGG	1
	GG^{5m}C^{5m}C	GG^{5m}C^{5m}C	GG^{5m}CC	GGCC	GGCC	
A5	^{5m}C^{5m}CGG	^{5m}C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	CCGG	CCGG	1
	GG^{5m}C^{5m}C	GG^{5m}C^{5m}C	GG^{5m}CC	GGCC	GGCC	
A6	C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	CCGG	C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	1
	GG^{5m}CC	GG^{5m}CC	GGCC	GG^{5m}CC	GG^{5m}CC	
A7	^{5m}CCGG	^{5m}CCGG	CCGG	^{5m}CCGG	^{5m}CCGG	3
	GGCC	GGCC	GGCC	GGCC	GGCC	
B1	^{5m}C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	^{5m}C^{5m}CGG	8
	GG^{5m}C^{5m}C	GG^{5m}CC	GG^{5m}CC	GG^{5m}CC	GG^{5m}C^{5m}C	
B2	^{5m}C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	CCGG	2
	GG^{5m}C^{5m}C	GG^{5m}CC	GG^{5m}CC	GG^{5m}CC	GGCC	
B3	^{5m}CCGG	C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	^{5m}C^{5m}CGG	1
	GGCC	GG^{5m}CC	GG^{5m}CC	GG^{5m}CC	GG^{5m}C^{5m}C	
B4	CCGG	C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	CCGG	1
	GGCC	GG^{5m}CC	GG^{5m}CC	GG^{5m}CC	GGCC	
B5	^{5m}C^{5m}CGG	^{5m}CCGG	^{5m}CCGG	^{5m}CCGG	^{5m}C^{5m}CGG	1
	GG^{5m}C^{5m}C	GGCC	GGCC	GGCC	GG^{5m}C^{5m}C	
B6	^{5m}C^{5m}CGG	CCGG	CCGG	CCGG	^{5m}C^{5m}CGG	13
	GG^{5m}C^{5m}C	GGCC	GGCC	GGCC	GG^{5m}C^{5m}C	
B7	C^{5m}CGG	CCGG	CCGG	CCGG	C^{5m}CGG	5
	GG^{5m}CC	GGCC	GGCC	GGCC	GG^{5m}CC	
B8	C^{5m}CGG	CCGG	CCGG	CCGG	^{5m}C^{5m}CGG	1
	GG^{5m}CC	GGCC	GGCC	GGCC	GG^{5m}C^{5m}C	
B9	^{5m}CCGG	CCGG	CCGG	CCGG	^{5m}C^{5m}CGG	2
	GGCC	GGCC	GGCC	GGCC	GG^{5m}C^{5m}C	
B10	^{5m}CCGG	CCGG	CCGG	CCGG	^{5m}CCGG	2
	GGCC	GGCC	GGCC	GGCC	GGCC	
C1	^{5m}C^{5m}CGG	C^{5m}CGG	CCGG	C^{5m}CGG	^{5m}C^{5m}CGG	1
	GG^{5m}C^{5m}C	GG^{5m}CC	GGCC	GG^{5m}CC	GG^{5m}C^{5m}C	

用。它们对应的 DNA 序列的甲基化模式在本研究中由单倍体遗传，即 B 型位点。从表 3 和表 4 可以看出，回收序列的 CCGG 位点除了在 B4 中单倍体及杂交后代发生了甲基化，其他单倍体遗传位点均发生了去甲基化，这说明了诸如细胞形态建成和功能相关蛋白的表达对于维持单倍化水稻及正常水稻的生长发育都是至关重要的，推测这是一类保守的甲基化遗传修饰，但确凿的证据还有待进一步研究。另外，本研究还发现消化器官扩张因子、富含亮氨酸重复蛋白和 OsFBX427-F-box 蛋白这 3 类蛋白对应 DNA 序列的甲基化模式在这些位点的甲基化主要是由父本 R527、R363 遗传的。消化器官扩张因子和 OsFBX427-F-box 蛋白在 MSU Osa1 Release 6.1 没有相关 GO 注释，是一种未知功能蛋白。而富含亮氨酸重复蛋白在信号转导、激酶活性、蛋白修饰及逆境应答反应等生物过程中起着重要的作用。在这 3 个序列中，单倍体 CCGG 位点的甲基化均高于父本及杂交后代，推测这类基因的沉默对于单倍体的生存是必需的，即单倍体通过牺牲某些功能蛋白的表达以达到生存的目的。

3 讨论

3.1 DNA 甲基化与杂种优势

本研究发现杂交后代 F_1 和 F_1' 的甲基化敏感扩

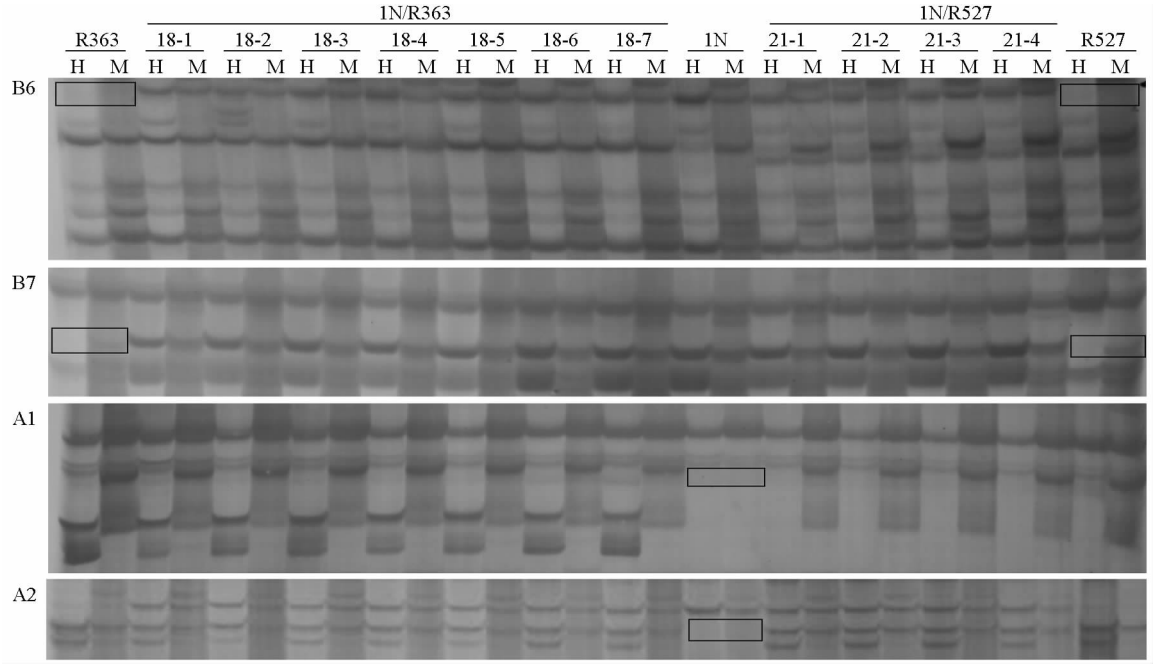


图 3 部分甲基化特异位点

Fig. 3. The type of special methylated sites.

H — *Eco*R Ⅰ + *Hpa* Ⅱ; M — *Eco*R Ⅰ + *Msp* Ⅰ; A1、A2 —非单倍体遗传的甲基化差异位点, F_1 的甲基化带型与 1N 不同; B6、B7 —单倍体遗传的甲基化差异位点, F_1 的甲基化带型与 1N 相同。

H, *Eco*R Ⅰ + *Hpa* Ⅱ; M, *Eco*R Ⅰ + *Msp* Ⅰ; A1 and A2, The methylated sites didn't inherit from the haploid, the bands of hybrids differed from the haploid; B6 and B7, The methylated sites inherited from the haploid.

增多态性比率和全甲基化率均低于双亲,这与 Yi 等[19]有关高粱杂交种的研究相似(3 个杂交组合甲基化水平均低于双亲),与 Xiong 等[14]的结果(杂交种甲基化水平约为 18%,亲本约为 16.3%)不同。而朱新霞等[20]发现不同生育时期杂交棉组合与亲本的甲基化水平表现出不确定性。He 等[21]通过构建日本晴、93-11 及它们正反交杂交后代表观遗传组、mRNA、小分子 RNA 转录组表达谱,发现后代与亲本间不同的表观遗传修饰与转录组水平具有相关性。同时,他们通过对测序数据进行 SNP 分析后发现,后代对等位基因表观遗传修饰的偏爱性与亲本具有很大关联但又有所不同。据此,认为杂交后代甲基化状况及总体甲基化程度与杂种优势可能并没有严格的相关性,但是基因经过重组后,某些基因的甲基化水平的升高或降低都应该是朝着有利于杂种的生长和发育进行的,这可能就是杂种优势的

表 4 DNA 甲基化位点功能注释

Table 4. Annotation of the DNA methylated sites.

序列编号 Sequence No.	长度 Length/bp	同源序列 Homologous sequence	功能 Function	*E* 值 *E*-value	类型 Type
M0719.321	244	LOC_Os05g43530	CSLC7-cellulose synthase-like family C, expressed	9.50e-49	B4
M0719.325	230	LOC_Os05g22920	Digestive organ expansion factor, putative, expressed	2.70e-45	A1
M0719.323	207	LOC_Os03g01550	Expressed protein	1.70e-39	B7
M0719.328	145	LOC_Os11g37330	Pentatricopeptide repeat domain containing protein, putative, expressed	2.20e-25	B1
M0809.340	60	LOC_Os01g46750	AMP-binding enzyme, putative, expressed	6.20e-07	B1
M0809.343	337	LOC_Os05g26926	Chaperone protein DNAJ, putative, expressed	3.00e-69	B1
		LOC_Os05g26902	Chaperone protein DNAJ, putative, expressed	1.40e-68	
		LOC_Os05g26914	Chaperone protein DNAJ, putative, expressed	1.90e-68	
M0809.319	87	LOC_Os12g22060	Expressed protein	1.10e-12	B7
M0809.320	69	LOC_Os06g03700	Oligopeptide transporter, putative, expressed	3.90e-08	B6
M0809.322	148	LOC_Os12g39120	Protein phosphatase 2C, putative, expressed	6.30e-27	B5
M0809.323	252	LOC_Os01g41770	Leucine rich repeat protein, putative, expressed	2.70e-50	A2
M0809.325	155	LOC_Os11g41560	Osfbx427-F-box domain containing protein, expressed	1.30e-28	A1

数据库为 MSU Osa1 Release 6.1 (http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml)。

The database is MSU Osa1 Release 6.1 (http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml).

表观遗传基础。

3.2 DNA 甲基化差异片段功能探讨

双胚苗是自然界普遍存在的一种现象。我们在自然条件下从双胚苗群体中筛选得到了单倍体及同源多倍体水稻材料。Zhang 等[12]应用 MSAP 技术研究了单倍体及对应二倍体的甲基化差异，发现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。筛选得到的单倍体与普通二倍体杂交能得到正常的杂交后代，而经鉴定的三倍体与普通二倍体杂交因其遗传重组较复杂，得到的后代要么不正常，要么能产生早代稳定现象[22-23]，用于研究表观遗传现象时，不利于排除其他因素的干扰。因此，本研究采用单倍体与普通二倍体的杂交后代来研究倍性水稻 DNA 甲基化的遗传特性和位点特异性。通过对条带分析，发现了 21 个非单倍体遗传的甲基化差异位点，36 个单倍体独立遗传的甲基化位点。对部分条带进行回收测序，有 11 个片段序列能与水稻 MSU Osa1 Release 6.1 的基因主体相匹配，它们的蛋白功能涉及细胞构造、代谢途径、应激反应等生物学功能。研究发现，CG 位点甲基化不仅存在于转座子，也存在于组成型转录基因中。Feng 等[24]用基因组亚硫酸氢盐鸟枪测序法(BS-seq)比较了 8 个不同植物和动物 DNA 甲基化，发现开花植物胞嘧啶的甲基化模式是非常相似的，且主体基因甲基化在不同的生物体是保守的，且偏爱在外显子甲基化。同样，Zemach 等[25]量化了 17 种真核生物的 DNA 甲基化，也发现了主体基因的甲基化在植物和动物中是保守的，而且具有真核生物基因组的古老特性。而单倍体由于基因组的单拷贝性，与进化、生长发育等相关保守基因的表观遗传修饰能直观地表现出来，并传递给下一代。因此，通过单倍体及杂交后代对 DNA 甲基化差异片段的分离并进一步在相应的不同倍性水稻进行验证，分析其保守性和特异性，将有助于了解植物多倍化的进化特点。另外的 18 个片段序列经 NCBI 上的 BLASTN 比对后发现，有 9 个序列能与水稻基因组有较好的匹配，但在 MSU Osa1 Release 6.1 上并未得到很好的匹配。因此，认为这 9 个序列可能是基因间序列或重复序列，而基因间序列多是诸如启动子、增强子等调控因子。由此推测这一类序列主要通过甲基化、过甲基化或去甲基化来调节调控因子的表达，从而达到调节其上下游基因表达的目的。总之，基因及基因间序列的甲基化或去甲基化直接或间接地调控基因的表达，为植物的生长、发育及进化提供动力。

参考文献：

[1] 吴乃虎. 基因工程原理. 北京：科学出版社，2001：86-88.
[2] 朱玉贤，李 毅. 现代分子生物学. 北京：高等教育出版社，2002：250-254.
[3] Richards E J. DNA methylation and plant development. *Trends Genet*, 1997, 13: 319-323.
[4] Chan S W, Henderson I R, Jacobsen S E. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(5): 351-360.
[5] Bird A P, Wolffe A P. Methylation-induced repression: Belts, braces, and chromatin. *Cell*, 1999, 99(5): 451-454.
[6] Bestor T H. The DNA methyltransferases of mammals. *Human Mol Genet*, 2000, 9(16): 2395-2402.
[7] Bender J. DNA methylation and epigenetics. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 41-68.
[8] Gehring M, Choi Y, Fischer R L. Imprinting and see development. *Plant Cell*, 2004, 16(Suppl): S203-S213.
[9] Wassenegger M. RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol Biol*, 2002, 43: 203-220.
[10] Masterson J. Stomatal size in fossil plants evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 1994, 264: 421-424.
[11] Bowers J E, Chapman B A, Rong J, et al. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature*, 2003, 422: 433-438.
[12] Zhang H Y, Peng H, LI Y, et al. Patterns of DNA cytosine methylation between haploids and corresponding diploids in rice. *Chin Sci Bull*, 2006, 51(14): 1721-1728.
[13] Peng H, Zhang H Y, Li Y, et al. Natural homologous triploidization and DNA methylation in SARII-628, a twin-seedling rice (*Oryza sativa* L.). *Rice Sci*, 2007, 14(4): 265-271.
[14] Xiong L Z, Xu C G, Saghai Maroof M A, et al. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 1999, 261: 439-446.
[15] Mcclelland M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucl Acids Res*, 1994, 22(17): 3640-3659.
[16] Reyna-Lopez G E, Simpson J, Ruiz-Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphism. *Mol Gen Genet*, 1997, 253(6): 703-710.
[17] Okuda K, Nakamura T, Sugita M, et al. A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing. *JBC*, 2006, 281(49): 37661-37667.
[18] Zehrmann A, Verbitskiy D, van der Merwe J A, et al. A DYW domain-containing pentatricopeptide repeat protein is required for RNA editing at multiple sites in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2009, 21: 558-567.
[19] 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.
[20] 朱新霞，汪保华，郭旺珍，等. 中棉所 12 配制的 2 个杂交棉 DNA 甲基化遗传与传递. 作物学报，2009，35(12)：2150-2158.
[21] He G M, Zhu X P, Elling A A, et al. Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids. *Plant Cell*, 2010, 22: 17-33.
[22] 吴先军，汪旭东，周开达，等. 从农艺性状和分子标记鉴定一个水稻三倍体×二倍体 F_2 群体的遗传稳定性. 植物学报，1999，41(10)：1067-1071.
[23] 李 云，张红宇，汪秀志，等. 水稻同源三倍体(149-B)×二倍体 F_2 代稳定群体的验证及分析. 遗传学报，2004，31(6)：604-608.
[24] Feng S, Cokus S J, Zhang X, et al. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(19): 8689-8694.
[25] Zemach A, McDaniel I E, Silva P, et al. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*, 2010, 328(5980): 916-919.