

欧石楠体细胞胚发生过程中的DNA甲基化

姚培娟, 李际红*, 亓晓, 邢世岩

山东农业大学林学院, 农业生态与环境重点实验室, 山东泰安271018

摘要: 利用甲基化敏感扩增多态性(MSAP)方法, 对欧石楠大田苗、胚性愈伤组织和再生苗的DNA甲基化进行了研究。从64对选扩增引物中筛选出19对, 共扩增得到506条带, 统计显示, 大田苗、胚性愈伤组织和再生苗的全基因组DNA甲基化水平分别为31.42%、27.86%和29.05%, 3种试材发生甲基化变异的有175条带, 变异率为34.58%。体细胞胚诱导形成胚性愈伤组织过程中, 甲基化水平降低, 而在再生苗中有所恢复, 与大田苗接近。在外侧胞嘧啶甲基化水平上, 胚性愈伤组织的甲基化水平有所增加, 且在再生苗中可部分维持。另外, 在175条变异带中, 再生苗恢复到大田苗DNA甲基化模式的有62条, 占总变异条带的35.43%, 而与胚性愈伤组织维持相同DNA甲基化模式的有59条, 占33.71%。回收部分甲基化变异条带, 最终得到8条有效的基因组DNA序列。BLASTn比对分析表明, 在欧石楠基因组中, 包括抗性基因、蛋白激酶、质体基因等在内的多种DNA序列均存在DNA甲基化修饰现象。

关键词: 欧石楠; DNA甲基化; 体细胞胚发生; 胚性愈伤组织; 再生苗

DNA Methylation in Somatic Embryogenesis of *Erica carnea* L.

YAO Pei-Juan, LI Ji-Hong*, QI Xiao, XING Shi-Yan

Key Laboratory of Agricultural Ecology and Environment, College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China

Abstract: The extent of DNA methylation polymorphisms were evaluated in *Erica carnea* field seedlings, embryogenic calli and regenerated seedlings using methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) technique. In all, 506 bands were produced by 19 selective primer pairs. The percentages of whole-genomic DNA methylation in field seedlings, embryogenic calli and regenerated seedlings were 31.42%, 27.86% and 29.05%, respectively. There were 175 methylation alteration bands (34.58%) among three kinds of materials. It was found that methylation level of embryogenic calli reduced in the process of somatic embryo induction and recovered in the regenerated seedlings, whose methylation level was close to field seedlings. The lateral cytosine methylation level of embryogenic calli was increased and could partially maintain in regenerated seedlings. In addition, in the total of 175 alteration bands, 62 bands (35.43%) from regenerated seedlings recovered to DNA methylation patterns of field seedlings, while 59 bands (33.71%) from regenerated seedlings maintained the same DNA methylation patterns of embryogenic calli. Eight methylated DNA fragments were isolated and sequenced by extracting part of the amplified sites. BLASTn analysis indicated that DNA methylated modification existed in multiple types of DNA fragments, including resistance gene sequences, protein kinase, plastogene, etc.

Key words: *Erica carnea*; DNA methylation; somatic embryogenesis; embryogenic calli; regenerated seedlings

2006年, 我们课题组从华野园艺引进了适合我国北方广大地区栽培的欧洲最新地被开花植物——欧石楠, 为迅速推广应用, 我们已成功建立了欧石楠体细胞胚繁育技术体系(李际红等2012)。然而体细胞无性系变异在植物组织培养中是一种普遍现象, DNA甲基化作为体细胞无性系变异的分子机制之一, 广泛存在于组织培养过程中(Kaeppler等2000)。目前, 关于DNA甲基化在组织培养过程中的作用机制虽然还没被完全揭示, 但许多研究已显示DNA甲基化以多种变异形式出现于植株再生

过程中, 且在组织培养中高频发生(鲍智娟2009)。近年来, 采用甲基化敏感扩增多态性(methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术, 对啤酒花(*Humulus lupulus* cv. Chinook)、豌豆(*Pisum sativum*)、野生大麦(*Hordeum brevisubulatum*)、香雪

收稿 2013-10-17 修定 2013-11-12

资助 山东省泰安市科技局项目(2011-2013)、山东省东营市科技局项目(2009-2011)、山东省泰安市大学生科技引领创新计划项目(2008D2010及2009D1009)。

* 通讯作者(E-mail: jhli4856@163.com; Tel: 1861522637)。

兰(*Freesia hybrida*)、大叶蝴蝶兰(*Phalaenopsis bellina*)、大花君子兰(*Clivia miniata*)和茄子(*Solanum melongena*)等禾本科植物及蔬菜作物组织培养过程中DNA甲基化变异的研究已有报道(Peredo等2006; Smykal等2007; Li等2007; Gao等2010; Khoddamzadeh等2010; Wang等2012; Mallaya和Ravishankar 2013),但对木本观赏植物的研究还鲜有报道。目前,我们已建立了成熟的欧石楠体细胞胚再生体系,为了检测以体细胞胚再生方式形成的再生苗在表观遗传方面是否存在变异,对其胚性愈伤组织和再生苗与大田苗之间DNA甲基化水平和模式的变异进行研究。

本试验采用MSAP技术,对欧石楠大田苗、胚性愈伤组织以及胚性愈伤组织诱导的再生苗之间的胞嘧啶甲基化水平和模式的变异进行分析,明确其变异趋势,以期为揭示欧石楠体细胞胚再生过程中DNA甲基化变异的分布规律及其表观遗传学特性提供一定的理论依据。

材料与方 法

1 材料

实验材料为:(1)采自山东农业大学林学实验站的七年生欧石楠(*Erica carnea* L.)大田苗(CK)当

年生嫩梢;(2)于1/2WPM+1.0 mg·L⁻¹ ZT+0.3 mg·L⁻¹ IBA培养基上培养约50 d的胚性愈伤组织(E),以表面具球形颗粒、结构致密、颜色嫩黄者为宜(李际红等2012);(3)胚性愈伤组织诱导形成的再生苗(S)。

2 方法

2.1 DNA提取

按照新型植物基因组提取试剂盒(TianGen)上的步骤提取上述3个试材的总DNA, DNA的纯度与浓度用1.5%琼脂糖凝胶和BioSpec-mini分光光度仪(Shimadzu, Japan)检测, -20 °C保存备用。

2.2 DNA甲基化分析

MSAP分析流程参照魏华丽等(2011)的方法并略作修改,分别用*EcoRI*+*HpaII*和*EcoRI*+*MspI* (Fermentas Lithuanian)内切酶组合对基因组DNA进行酶切、连接、预扩增、选择性扩增、6%聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染检测、读带和数据整理。*EcoRI*及*HpaII* (*MspI*)的接头与引物均参照Xiong等(1999)的序列(表1)。所有接头与引物均委托上海生工(Sangon)合成。

*HpaII*和*MspI*的酶切位点均为(CCGG/GGCC),但二者对酶切位点甲基化修饰敏感性不同: *HpaII*能识别并切割未甲基化和外侧胞嘧啶甲基化位点

表1 MSAP分析的接头和引物序列

Table 1 Sequences of adapters and primers used for MSAP analysis

	接头和引物	序列
接头	正向 <i>EcoRI</i> 接头	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	反向 <i>EcoRI</i> 接头	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
	正向 <i>HpaII</i> - <i>MspI</i> 接头	5'-GACGATGAGTCTAGAA-3'
	反向 <i>HpaII</i> - <i>MspI</i> 接头	5'-CGTTCTAGACTCATC-3'
预扩增引物	EA00+A	5'-GTAGACTGCGTACCAATTC A-3'
	<i>HpaII</i> - <i>MspI</i> +T	5'-GATGAGTCTAGAACGGT-3'
选扩增引物	EA00+ATG	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCATG-3'
	EA00+ACG	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCACG-3'
	EA00+ACT	5'-GTAGACTGCGTACCAATTC ACT-3'
	EA00+ACA	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCACA-3'
	EA00+AGT	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCAGT-3'
	EA00+AGA	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCAGA-3'
	EA00+AGG	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCAGG-3'
	EA00+ACC	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCACC-3'
	EA00+ATC	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCATC-3'
	HM+TTC	5'-GATGAGTCTAGAACGGTTC-3'
	HM+TCG	5'-GATGAGTCTAGAACGGTTCG-3'
	HM+TAG	5'-GATGAGTCTAGAACGGTAG-3'

(^{5m}CCGG/GGCC), 而不能切割内侧胞嘧啶甲基化位点(C^{5m}CGG/GG^{5m}CC); *MspI*能识别并切割未甲基化和外侧胞嘧啶甲基化位点, 而不能切割外侧胞嘧啶甲基化位点。利用这两种同裂酶分别与*EcoRI*组合进行MSAP反应, 被内切酶识别, 图谱上显示有带, 即存在*EcoRI*+*HpaII*双酶切位点(或者*EcoRI*+*MspI*双酶切位点); 未被识别则显示无带。根据条带的有无, 可将MSAP选扩图谱条带分成四大类: *EcoRI*+*HpaII*和*EcoRI*+*MspI*泳道都有条带, 为类型I, 表示未发生甲基化; *EcoRI*+*HpaII*泳道无条带, 而*EcoRI*+*MspI*泳道有条带, 为类型II, 表示发生全甲基化; *EcoRI*+*HpaII*泳道有条带, 而*EcoRI*+*MspI*泳道无条带, 为类型III, 表示发生半甲基化; *EcoRI*+*HpaII*和*EcoRI*+*MspI*泳道都无条带, 为类型IV, 表示没有CCGG位点存在(李际红等2011)。

2.3 DNA甲基化变异模式

将大田苗、胚性愈伤组织以及再生苗3种试材之间的DNA甲基化模式变异分为4种类型: 第一类, 在胚性愈伤组织中DNA甲基化模式已经发生了变异, 而再生苗恢复到之前的甲基化模式; 第二类, 胚性愈伤组织中变异了的DNA甲基化模式在再生苗中可维持; 第三类, 在胚性愈伤组织中已经发生了变异的DNA甲基化模式, 在再生苗中又发生新的甲基化变异; 第四类, 在胚性愈伤组织中没有发生DNA甲基化模式变异, 而再生苗中发生了变异。

2.4 DNA甲基化变异率计算

在两组内切酶消化产物的MSAP扩增图谱中, 有一些是不同材料共有的片段, 即非变异片段, 而有些片段在部分材料中发生了变异, 称之为变异片段。DNA甲基化变异率(%)=变异片段数/(变异片段数+非变异片段数)×100。

2.5 甲基化变异片段的回收、克隆及测序

参照李际红等(2011)的方法, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)胶板尚未干燥之前, 将甲基化变异片段用刀片挖下, 捣碎, 加入30 μL灭菌双蒸水, 于沸水浴中5 min后自然冷却, 取2 μL上清液为模板, 以相应的选扩引物组合和条件进行PCR扩增。PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶上检测, 采用PCR纯化试剂盒(TaKaRa, Japan)回收甲基化变异片段。回收产物连接入pTZ57R-T (Thermo Scientific, USA)

载体, 转化大肠杆菌感受态细胞, 挑选阳性单克隆。序列测定委托上海生工(Sangon)完成。将所得甲基化差异序列用BLASTn程序在NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行同源性检索, 在GenBank数据库检索同源核苷酸序列(Database: refseq_rna)。

实验结果

1 欧石楠的MSAP扩增图谱

采用优化的MSAP技术体系, 对欧石楠大田苗、胚性愈伤组织以及再生苗进行分析, 获得了谱带清晰、重复性好、甲基化扩增条带丰富的MSAP扩增图谱(图1)。依据方法2.2小节中对胞嘧啶甲基化带型的分类, 从64对选扩引物中筛选出的19对引物, 共扩增产生506条清晰可辨且可重复的DNA条带, 平均每对引物扩增获得26.63条带(表2)。

2 欧石楠3种试材的DNA甲基化修饰水平

由图1统计可知, 大田苗、胚性愈伤组织及再生苗的全基因组甲基化水平分别为31.42%、27.86%、29.05% (表2), 大田苗甲基化水平最高, 再生苗次之, 胚性愈伤组织最低。由此可见, 胚性愈伤组织的形成过程是以去甲基化为主, 再生苗的诱导过程是以重新甲基化为主, 表现为再生苗与大田苗的甲基化水平接近(图2)。然而从外侧胞嘧啶甲基化水平看, 胚性愈伤组织的半甲基化水平高于大田苗, 说明在胚性愈伤组织发生过程中, 既存在去甲基化, 也存在外侧胞嘧啶重新甲基化现象。另外, 3种试材的内侧胞嘧啶甲基化水平均高于外侧胞嘧啶甲基化水平(图2), 由此推测DNA胞嘧啶甲基化的发生以双链内侧胞嘧啶甲基化为主。

3 欧石楠3种试材之间的DNA甲基化变异

由欧石楠3种试材的MSAP扩增图谱可见, 大田苗、胚性愈伤组织和再生苗之间存在广泛的DNA胞嘧啶甲基化变异, 在扩增出的506条条带中, 发生DNA甲基化模式变异的条带有175条, 变异率高达34.58%。

通过比较大田苗、胚性愈伤组织及再生苗之间的MSAP扩增图谱, 将其基因组中检测到的DNA甲基化位点模式分为4个大类、12个亚类: A为由未甲基化到发生变化的条带; B为由外侧胞嘧啶半甲基化到发生变化的条带; C为由内侧胞嘧啶完全

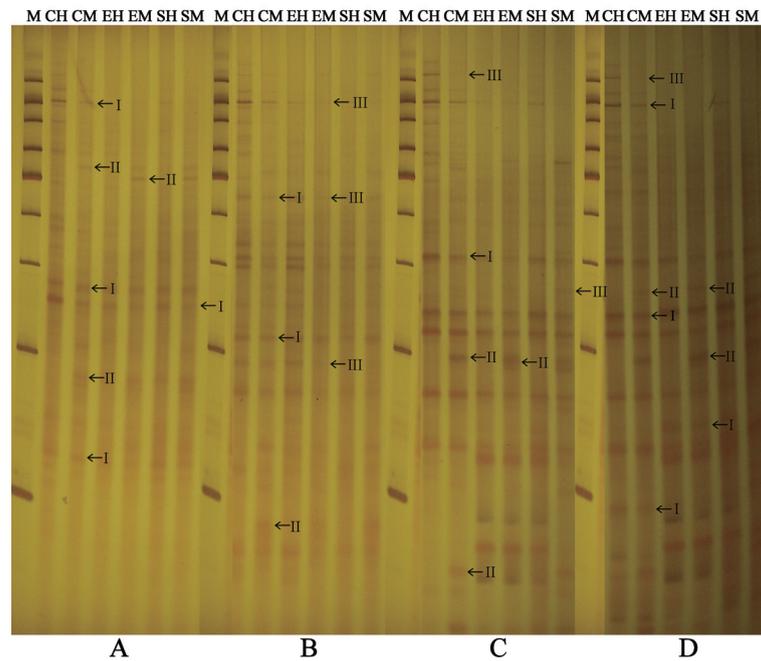


图1 欧石楠基因组DNA的MSAP扩增图谱

Fig.1 MSAP fingerprints of genomic DNA in *E. carnea*

A、B、C、D: 分别表示EA00-ATC+HM-TTC、EA00-ATC+HM-TCG、EA00-ATC+HM-TAG、EA00-ACC+HM-TCG引物组合的扩增结果。CH: 大田苗的*EcoRI*+*HpaII*双酶切; CM: 大田苗的*EcoRI*+*MspI*双酶切; EH: 胚性愈伤组织的*EcoRI*+*HpaII*双酶切; EM: 胚性愈伤组织的*EcoRI*+*MspI*双酶切; SH: 再生苗的*EcoRI*+*HpaII*双酶切; SM: 再生苗的*EcoRI*+*MspI*双酶切; M: 100 bp的DNA分子量标准。I: 非甲基化条带; II: 全甲基化条带; III: 半甲基化条带。

表2 19对MSAP选扩增引物组合在欧石楠全基因组中的检测结果

Table 2 Number of bands amplified using 19 MSAP selective primer combinations in genomic DNA of *E. carnea*

引物组合	扩增条带数	半甲基化条带数			全甲基化条带数		
		CK	E	S	CK	E	S
EA00ATG+HM-TAG	24	3	5	3	7	3	3
EA00ACG+HM-TAG	17	5	6	6	5	2	2
EA00ACA+HM-TAG	17	1	4	0	4	4	6
EA00AGT+HM-TAG	36	0	0	0	2	1	1
EA00AGA+HM-TAG	22	5	14	5	1	0	2
EA00AGG+HM-TAG	43	12	10	7	8	8	8
EA00ACC+HM-TAG	22	3	5	3	5	7	9
EA00ATG+HM-TCG	19	3	1	1	7	4	6
EA00ACG+HM-TCG	31	3	2	4	2	1	2
EA00ACT+HM-TCG	25	1	0	1	3	2	4
EA00AGA+HM-TCG	19	0	0	0	2	3	3
EA00ACC+HM-TCG	29	2	2	4	5	3	2
EA00ACA+HM-TTC	23	2	3	3	2	3	2
EA00AGT+HM-TTC	23	4	6	6	3	1	0
EA00AGA+HM-TTC	22	3	4	6	1	2	1
EA00ACC+HM-TTC	27	3	2	3	8	5	6
EA00ATC+HM-TAG	35	3	1	2	7	4	5
EA00ATC+HM-TCG	32	5	3	9	9	8	10
EA00ATC+HM-TTC	40	2	2	3	18	10	9
总计	506	60	70	66	99	71	81
甲基化位点比例/%		11.86	13.83	13.04	19.56	14.03	16.01

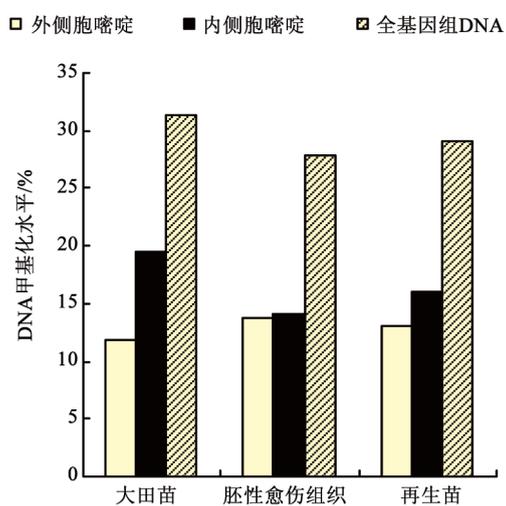


图2 欧石楠大田苗、胚性愈伤组织和再生苗的DNA甲基化水平

Fig.2 DNA methylation levels of field seedlings, embryogenic calli and regenerated seedlings in *E. carnea*

甲基化到发生变化的条带; D为由外侧胞嘧啶或者内侧和外侧胞嘧啶位点到又重新出现条带的条带。175条变异带的变异模式见图3。

由表3可见, 相对于大田苗, 胚性愈伤组织的带型变异主要表现为新条带的出现(A1、A2和A3), 产生了63条新条带, 占152个多态性位点的41.45%; 相对于胚性愈伤组织, 再生苗的带型变异以重新甲基化为主(A3、B3和C3), 产生了33条新条带, 占

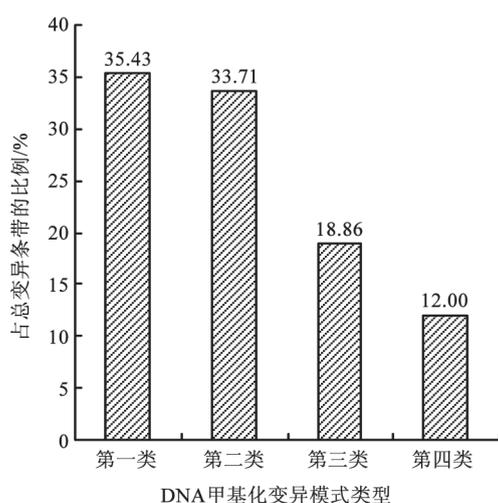


图3 胚性愈伤组织、再生苗与大田苗之间的变异模式

Fig.3 Variation patterns among embryogenic calli, regenerated seedlings and field seedlings

表3 三种欧石楠试材两者之间的变异模式

Table 3 Variation patterns between each two materials in 3 kinds of *E. carnea* materials

模式	类型	变异前带型		变异后带型		变异条带数	
		H	M	H	M	CK→E	E→S
A	A1	有	有	有	无	10	6
	A2	有	有	无	有	7	3
	A3	有	有	无	无	48	18
B	B1	有	无	有	有	1	7
	B2	有	无	无	有	1	6
	B3	有	无	无	无	13	12
C	C1	无	有	有	有	6	4
	C2	无	有	有	无	4	0
	C3	无	有	无	无	28	3
D	D1	无	无	有	有	21	22
	D2	无	无	有	无	10	14
	D3	无	无	无	有	3	9
总计						152	104

H: *EcoRI*+*HpaII*酶切; M: *EcoRI*+*MspI*酶切。CK→E: 从大田苗到胚性愈伤组织发生的甲基化变异; E→S: 从胚性愈伤组织到大田苗发生的甲基化变异。

104个多态性位点的31.73%; 在所有发生变异的带型中, 内侧与外侧甲基化位点的转换频率最低(B2和C2)。

按照方法2.3小节对DNA甲基化变异模式的分类, 分析所获得的175条变异条带, 结果显示, 第一类的条带有62条, 占总变异条带的35.43%, 为4种变异类型中所占比例最高的; 第二类有59条, 占33.71%, 其中以外侧胞嘧啶甲基化变异的遗传稳定性最好; 第三类的比例为18.86%; 第四类的比例为12.00% (图3和图4)。可见, 胚性愈伤组织的形成和再生苗的诱导中均存在丰富的DNA甲基化变异模式, 胚性愈伤组织中发生的甲基化变异在再生苗中大部分会有所恢复, 而在再生苗中表现的变异多为外侧胞嘧啶半甲基化。

4 DNA甲基化变异片段的回收检测及序列分析

对部分产生甲基化变异的修饰位点进行回收克隆, 最终成功分离了8条发生甲基化变异的DNA序列(表4)。BLASTn比对分析表明, 这8条甲基化变异序列均检索到同源系列, 包括抗性基因(M5)、蛋白激酶6 (MKK6) (M12)、环斑病(PRSV)外壳蛋白(M19)、茶树连锁图谱中相关基因(M11)、质体(M20、M30)、切割和多聚腺苷酸化特异性因子亚单位(M24)和大豆转基因无性系(M29), 说明多种

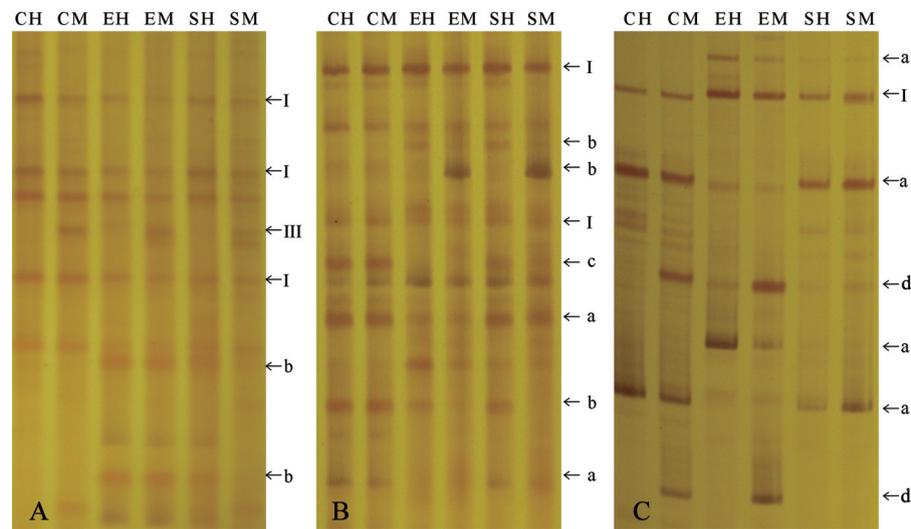


图4 胚性愈伤组织、再生苗与大田苗的DNA甲基化变异模式的MSAP图谱

Fig.4 MSAP fingerprints of DNA methylation variation patterns among embryogenic calli, regenerated seedlings and field seedlings

A、B、C: 分别表示EA00-ATC+HM-TAG、EA00-AGG+HM-TAG、EA00-AGT+HM-TAG的选扩增引物扩增结果。CH: 大田苗的*EcoRI*+*HpaII*双酶切; CM: 大田苗的*EcoRI*+*MspI*双酶切; EH: 胚性愈伤组织的*EcoRI*+*HpaII*双酶切; EM: 胚性愈伤组织的*EcoRI*+*MspI*双酶切; SH: 再生苗的*EcoRI*+*HpaII*双酶切; SM: 再生苗的*EcoRI*+*MspI*双酶切。I: 非甲基化位点; III: 半甲基化位点。a、b、c、d分别为第一类、第二类、第三类、第四类变异带型。

表4 欧石楠基因组DNA甲基化变异片段的比对结果

Table 4 BLASTn result of the methylated DNA fragments of genomic DNA in *E. carnea*

序列	长度/bp	变异模式	BLASTn同源序列	一致性/%	E值
M5	188	第一类	陆地棉冷应激甲基化敏感多态性基因组序列MSAP-11无性系(JN568572.1)	100	3.4
M11	95	第二类	茶树SSR标记的DNA序列MSE0239 (AB623933.1)	85	8.00E-04
M12	134	第二类	陆地棉丝裂原活化蛋白激酶6 (MKK6)的mRNA序列完整的CDS (GU188977.1)	90	2.2
M19	198	第二类	番木瓜BAC克隆46O19完整序列(AC238599.1)	85	0.086
M20	267	第二类	大果越橘叶绿体完整的基因组(JQ248601.1)	90	2.00E-87
M24	165	第二类	预测的野草莓裂解多聚腺苷酸化特异性因子亚单元(LOC101315389)的mRNA (XM_004308111.1)	90	5.00E-04
M29	172	第三类	大豆82株GM_WBb0152C06无性系完整序列(AC235438.1)	92	1.00E-04
M30	95	第三类	紫金牛属叶绿体完整的基因组(KC465962.1)	97	1.00E-25

类型的基因组DNA序列均存在DNA甲基化变异修饰现象,可见欧石楠体细胞胚诱导发生过程中发生了广泛的甲基化变异。

讨 论

早在1994年,Phillips等就提出,DNA甲基化可能是体细胞无性系变异的一个重要原因。Kaeppler等(2000)研究显示,再生苗及其后代中存在广泛的DNA甲基化变异。Prakash等(2003)利用两组同裂酶(*HpaII*和*MspI*)对矮牵牛叶片再生苗诱导过程中

愈伤组织和再生苗的CCGG位点进行酶切分析,证明胞嘧啶甲基化水平与叶片诱导再生苗的能力存在极强的正相关。本研究利用MSAP技术,研究了欧石楠胚性愈伤组织、再生苗与大田苗之间的DNA甲基化水平和模式的变异,发现胚性愈伤组织全基因组DNA甲基化水平比大田苗的有所降低;再生苗的DNA甲基化水平(29.05%)与胚性愈伤组织的(27.86%)相比,有所回升,接近大田苗的水平(31.42%)。本研究得到的胚性愈伤组织甲基化水平的变异趋势与在玉米(Kaeppler和Phillips

1993)、刺五加(Chakrabarty等2003)、油棕(Kubis等2003)以及大麦(Li等2007)等中的报道一致,与Kubis等(2003)利用HPLC对油棕愈伤组织和再生苗甲基化变异的检测结果一致,但与在香蕉(Peraza-Echeverria等2001)和豌豆(Smykal等2007)中的研究结论不同。

欧石楠胚性愈伤组织的全基因组DNA甲基化水平虽然有所降低,但其外侧胞嘧啶甲基化水平却有所增加,再生苗中也持续此变化(图3);这与苗高健(2009)在水稻中的研究结论一致。而Xu等(2004)在玫瑰愈伤组织中的检测结果表明,其外侧胞嘧啶甲基化水平显著下降,与本实验结论存在分歧;再生苗又恢复到之前的DNA甲基化模式,与欧石楠再生苗诱导形成过程中甲基化水平变异模式一致。关于愈伤组织形成过程中DNA甲基化水平的变异虽然存在多种报道,但再生苗诱导发生过程中大多数变异逐渐恢复的趋势却是一致的。这可能与愈伤组织培养过程中所用的外源生长调节剂有关。

对欧石楠组织培养发生的胚性愈伤组织和诱导形成的再生苗胞嘧啶甲基化变异模式的具体类型进行统计分析,在发生变异的175条带中,有62条(35.43%)在胚性愈伤组织形成过程中发生变异的条带又恢复到之前大田苗的甲基化模式,与聂丽娟等(2008)对菊花的研究结果一致;另一方面,175条变异带中33.71%的变异带型可在再生苗中持续下去,大部分为外侧胞嘧啶甲基化,与番茄中的研究结论(Smulders等1995)一致。Smulders等(1995)利用探针技术对番茄愈伤组织和再生苗叶片甲基化模式进行比较,发现没有发生内侧胞嘧啶甲基化变异,仅存在外侧胞嘧啶甲基化变异,且在再生苗中可以部分持续,遗传给后代。本研究所采用的技术虽与之不同,但获得一致的结论,进一步证明,胚性愈伤组织发生过程中存在此类甲基化变异现象,且可部分遗传,然而其机理有待进一步研究。

参考文献

鲍智娟(2009). 植物组织培养中体细胞无性系变异的研究进展. 白城师范学院学报, 23 (6): 21~25
李际红, 邢世岩, 王聪聪, 张倩, 付茵茵(2011). 银杏基因组DNA甲

基化修饰位点的MSAP分析. 园艺学报, 38 (8): 1429~1436
李际红, 邢世岩, 姚培娟, 谭起航, 王海林(2012). 欧石楠体细胞胚发生和植株再生. 植物生理学报, 48 (11): 1043~1049
苗高健(2009). 水稻胚性愈伤组织诱导和植株再生伴随DNA胞嘧啶甲基化的减少和恢复[学位论文]. 长春: 东北师范大学
聂丽娟, 王子成, 何艳霞(2008). 菊花组织培养继代过程中的DNA甲基化变化. 园艺学报, 35 (11): 1689~1694
沙文勇(2002). 欧洲常绿地被植物——欧石楠和彩萼石楠. 中国花卉园艺, (9): 14~15
魏华丽, 吴涛, 杨文华, 李万峰, 张俊红, 齐力旺, 韩素英(2011). 落叶松体细胞胚胎发生过程中DNA甲基化模式变化分析. 东北林业大学学报, 39 (2): 33~37
Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY (2003). Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). Plant Sci, 165: 61~68
Gao X, Yang D, Cao D, Ao M, Sui X, Wang Q, Kimatu JN, Wang L (2010). *In vitro* micropropagation of *Freesia hybrida* and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. J Plant Growth Regul, 29 (3): 257~267
Kaeppeler SM, Kaeppeler HF, Rhee Y (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Mol Biol, 43: 179~188
Kaeppeler SM, Phillips PL (1993). Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 8773~8776
Khoddamzadeh AA, Sinniah UR, Kadir MA, Kadzimin SB, Mahmood M, Sreeramanan S (2010). Detection of somaclonal variation by random amplified polymorphic DNA analysis during micropropagation of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. Afr J Biotechnol, 9 (40): 6632~6639
Kubis SE, Castilho AMMF, Vershinin AV, Heslop-Harrison JS (2003). Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. Plant Mol Biol, 52: 69~79
Li XL, Yu XM, Wang NN, Feng QZ, Liu LX, Shen JL, Liu B (2007). Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link). Plant Cell Tiss Org Cult, 90: 153~168
Mallaya NP, Ravishankar GA (2013). *In vitro* propagation and genetic fidelity study of plant regenerated from inverted hypocotyl explants of eggplant (*Solanum melongena* L.) cv. Arka Shirish. 3 Biotech, 3 (1): 45~52
Peraza-Echeverria S, Herrera-Valencia VA, Tames-Kay A (2001). Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). Plant Sci, 161: 359~367
Peredo EL, Revilla MA, Arroyo-Garcia R (2006). Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential

- subcultures of organic calli. *J Plant Physiol*, 163: 1071~1079
- Prakash AP, Kush A, Lakshmanan P, Kumar PP (2003). Cytosine methylation occurs in a CDC48 homologue and a MADS-box gene during adventitious shoot induction in *Petunia* leaf explants. *J Exp Bot*, 54 (386): 1361~1371
- Smulders MJM, Rus-Kortekaas W, Vosman B (1995). Tissue culture-induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants. *Theor Appl Genet*, 91: 1257~1264
- Smykal P, Valledor L, Rodriguez R, Griga M (2007). Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep*, 26: 1985~1998
- Wang QM, Wang YZ, Sun LL, Gao FZ, Sun W, He J, Gao X, Wang L (2012). Direct and indirect organogenesis of *Clivia miniata* and assessment of DNA methylation changes in various regenerated plantlets. *Plant Cell Rep*, 31 (7): 1283~1296
- Xiong LZ, Xu GG, Saghai Maroof MA, Zhang Q (1999). Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines detected by a methylation sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 261: 439~446
- Xu M, Li X, Schuyler SK (2004). DNA-methylation alterations and exchanges during *in vitro* cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.). *Theor Appl Genet*, 109 (5): 899~910