

叶籽银杏 DNA 甲基化水平与模式变异的研究

李际红, 邢世岩*, 张倩, 姚培娟, 王聪聪

(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: 以萌动期与展叶期的叶籽银杏和银杏为试材, 采用基于 DNA 甲基化敏感扩增多态性分析 (Methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP) 方法, 在全基因组水平上探究叶籽银杏、银杏不同发育期 DNA 序列中 CCGG 位点的甲基化水平及模式变化特征。萌动期选用 22 对引物, 在叶籽银杏和银杏中检测到扩增位点为 498 和 384 个, 甲基化位点为 237 和 165 个, 其总甲基化率分别为 47.6% 和 42.4%; 展叶期选用 40 对引物, 在叶籽银杏有叶生胚珠 (YZ2)、无叶生胚珠 (YC) 及银杏 (CK) 叶片中检测到扩增位点 767、600 及 367 个, 甲基化位点分别为 370、244 及 152 个, 其总甲基化率分别为 48.3%、40.5% 及 41.5%。进一步对不同发育期叶籽银杏、银杏 DNA 甲基化模式的变化特征进行分析, 结果显示: 萌动期、展叶期叶籽银杏与银杏相比均有超过半数的位点 (52.1%、54.6% 及 64.2%) DNA 甲基化模式发生多态性变化, 萌动期叶籽银杏相对于银杏其变化趋势以超甲基化为主; 展叶期叶籽银杏有叶生胚珠相对于于叶籽银杏无叶生胚珠及银杏甲基化的变化趋势以超甲基化为主, 叶籽银杏有叶生胚珠相对于银杏 DNA 甲基化模式变异幅度更大, 超甲基化水平更高, 显示出叶籽银杏基因组独特的 DNA 甲基化特征。

关键词: 叶籽银杏; DNA 甲基化; 甲基化敏感扩增多态性分析; 甲基化模式

中图分类号: S 664.3

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 08-1535-10

The Changes in DNA Methylation Levels and Patterns of *Ginkgo biloba* var. *epiphylla*

LI Ji-hong, XING Shi-yan*, ZHANG Qian, YAO Pei-juan, and WANG Cong-cong

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

Abstract: Methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis was performed in *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* Mak. (*epiphylla* ginkgo) and *Ginkgo biloba* (ginkgo), at both the bud-burst stage and the leaf-expansion stage, to characterize the DNA methylation levels and patterns of CCGG sites. The results showed that 22 selected primer sets totally amplified 498 and 384 loci, respectively in bursting buds of *epiphylla* ginkgo and ginkgo. And among them, 237 (47.6%) and 165 (42.4%) loci were found methylated. While at the leaf-expansion stage, 40 selected primer sets totally produced 767, 600 and 367 loci, respectively in epiphyllous-ovule leaf of *epiphylla* ginkgo (YZ2), normal leaf of *epiphylla* ginkgo (YC) and ginkgo (CK). And among them, 370 (48.3%), 244 (40.5%) and 152 (41.5%) loci were methylated. Further analysis revealed that more than half of the loci (52.1%, 54.6%, 64.2%) displayed

收稿日期: 2014-03-17; 修回日期: 2014-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070589)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xingsy@sdau.edu.cn)

changes in DNA methylation patterns in epiphylla ginkgo compared with ginkgo both at budding stages and leaf-expansion stages. Hypermethylation was found more frequent in both YZ1 and YZ2 than in CK, YC or CK. The greater variation of DNA methylation and more frequent hypermethylation occurred in epiphylla ginkgo suggested the unique DNA methylation profile of epiphylla ginkgo. These findings undoubtedly laid foundation for further discussing the origin and phylogeny of epiphylla ginkgo from the perspective of epigenetics.

Key words: *Ginkgo biloba* var. *epiphylla*; DNA methylation; methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP); methylation patterns

叶籽银杏 (*Ginkgo biloba* var. *epiphylla*) 最大特点在于叶生胚珠的发生, 它们对研究银杏的系统发育、起源、演化等具有重要意义 (Douglas et al., 2007)。

李士美等 (2007) 通过对于叶籽银杏的形态发生和比较形态学研究认为, 叶籽银杏的形态学特征明显地再现了古银杏的特征, 可能属返祖现象。造成这种返祖现象的原因可能是由于叶籽银杏对胚珠器官发育的控制松弛或调节作用失效所致 (周志炎, 1994)。

“获得性”性状和“返祖”现象的发生可能是因为一组基因的活性被表观修饰所抑制, 后来由于一些因素的作用造成表观修饰的变化恢复了活性 (董玉玮 等, 2005)。表观遗传调控一旦出现差错就必然会导致生物体生理生化过程的改变, 最终出现形态解剖上的异常或抗性的改变 (Reik, 2007; 郭长花和康向阳, 2008)。

董雷雷等 (2008) 在对叶籽银杏与银杏的 *trnS-trnG* 基因序列分析发现, 两者的差异极小。王京梅等 (2009) 研究发现, 叶籽银杏 *LEAFY* 基因的两个同源异型基因没有发生突变。李保进 (2008) 对叶籽银杏和银杏 cpDNA *matK* 全长基因序列 (1 539 bp) 的分析发现, 仅有 96 bp (6.24%) 发生变异, 在含有的 57 个变异位点中, 仅有两个信息位点, 这样少的信息位点致使它不能提供足够的信息进行系统发育树的构建。由此推测: 叶籽银杏叶生胚珠的发生过程中可以产生许多不能用经典遗传规律解释的可遗传变异, 也许这种变异与表观遗传变异 (epigenetic variation) 有关 (施季森, 2008)。

DNA 甲基化 (DNA methylation) 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 (Tariq & Paszkowski, 2004)。近几年 DNA 甲基化及与之相关的不同组织、不同发育时期、不同生理年龄甲基化的时空特异性已成为植物表观遗传学研究的热点 (陆光远 等, 2005; Zhao et al., 2007; Monteuuis et al., 2008; Chen et al., 2009; 潘雅姣 等, 2009; 郭广平 等, 2011; Yang et al., 2011)。韩晨静等 (2011) 认为叶籽银杏展叶期形成了能够观察到叶籽银杏叶生胚珠的发端期, 发端期是叶籽银杏叶生胚珠形成的关键时期。研究萌动期与展叶期叶籽银杏甲基化水平、模式的变异, 对进一步揭示叶籽银杏叶生胚珠发生的表观遗传修饰具有重要的意义, 对其表观遗传变异的深入研究, 将有助于理解这类变异的进化意义及其在林木改良中的有效利用。有关叶籽银杏不同发育时期甲基化的变异尚未见报道。

本研究中从表观遗传学的角度出发, 以不同发育时期的叶籽银杏与银杏为试材, 采用基于 DNA 甲基化敏感扩增多态性分析 (Methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP) 方法, 探究叶籽银杏叶生胚珠发育过程中的 DNA 甲基化水平与模式变化。通过阐释不同发育时期叶籽银杏与银杏甲基化水平、模式的变异, 为进一步从表观遗传学的角度探讨叶籽银杏起源及系统发育机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及其 DNA 提取

叶籽银杏为山东省沂源县油坊的一株叶籽银杏雌株, 树龄约 1 300 年。2009 年 4 月 6 日采集萌动期叶籽银杏的芽, 剥去鳞片取出还没有展开的幼嫩叶片 (YZ1), 立即置于放有硅胶的保鲜袋中, 带回实验室, 放入 4 °C 冰箱保存备用。2009 年 4 月 18 日, 采集展叶期是着生叶生胚珠的叶片 (YZ2) 和是没有着生叶生胚珠的正常叶片 (YC), 迅速投入液氮中速冻, 带回实验室, 在 -70 °C 冰箱中保存备用。普通银杏 (CK) 雌株选自山东省泰安市老君堂, 树龄约 1 300 年。2009 年 4 月 1 日采集新鲜嫩叶放入保鲜袋中 (内装硅胶) 带回实验室, 置于冰箱 4 °C 中保存备用。

采用改良的 CTAB 法提取银杏叶片基因组 DNA; 叶籽银杏基因组 DNA 的提取按照天根试剂盒上的说明书进行操作; 所提 DNA 均经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用分光光度法定量分析, -20 °C 保存备用。

1.2 酶切、连接、PCR 扩增及电泳

按照 Xiong 等 (1999) 的方法进行酶切、连接及 PCR 扩增。

54 对选择扩增引物设计参照李际红等 (2011) 的文献, 而 EA00 + (TC、GA、CG、TG)、E00 + (TC、GA、CG、TG)、E00 + (GC、CC、CA、CT、GG、GA) 为添加两个碱基及 EA00 + (A、T、C、G) 为添加 1 个碱基分别与 TAG、TCG、TTC 完成组合的选扩增引物序列 (表 1)。

选择扩增后的混合液经变性后, 取 10 μL 上样于 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳, 电泳 3.5 h 左右后银染观察。

所有接头与引物序列均委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 MSAP 分析的接头和引物序列
Table 1 Sequence of adapters and primers used for MSAP analysis

名称 Name	<i>EcoR</i> I 序列 Sequence	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I 序列 Sequence
接头 1 Adaptors 1	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	5'-GACGATGAGTCTAGAA-3'
接头 2 Adaptors 2	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'	5'-CGTTCTAGACTCATC-3'
预扩增引物 Preselective primers	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCA-3' (EA00) 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' (E00)	5'-GATGAGTCTAGAACGGT-3'
选扩增引物 Selective primers combinations	EA00 + (TC、GA、CG、TG) E00 + (TC、GA、CG、TG) E00 + (GC、CC、CA、CT、GG、GA) EA00 + (A、T、C、G)	TAG、TCG、TTC TAG、TCG、TTC TAG、TCG、TTC TAG、TCG、TTC

1.3 甲基化变异类型的划分及数据统计

甲基化变异类型的划分参照 Chen 等 (2009) 的方法, MSAP 分析体系中 *Hpa* II 与 *Msp* I 同裂酶的酶切位点相同, 但 *EcoR* I 与二者酶切后两者对酶切位点甲基化修饰敏感性不同, 将其甲基化模式分为 3 种类型。I 型: *Hpa* II 与 *Msp* I 两者均有带, 代表非甲基化位点; II 型: *Hpa* II 有带、*Msp* I 无带, 代表半甲基化位点; III 型: *Hpa* II 无带、*Msp* I 有带, 代表全甲基化位点。有带记为 “1”, 无带记为 “0”。

将萌动期叶籽银杏 (YZ1) 与银杏 (CK) 之间, 展叶期叶籽银杏叶生胚珠 (YZ2)、叶籽银杏无叶生胚珠 (YC) 和银杏 (CK) 之间的胞嘧啶甲基化变化模式分为两大类: I 类表示单态型条带, 表明在叶籽银杏与银杏中察觉到相同的 CCGG 位点; II 类表示多态型条带, 依据胞嘧啶甲基化在叶籽银杏与银杏之间的变化, 又进一步分为 II-A、II-B、II-C、II-D、II-E 五亚类。II-A 表示叶籽银杏相对于银杏的甲基化减弱即发生去甲基化的位点; II-B 类表示叶籽银杏相应银杏的甲基化增强即发生超甲基化的位点; II-C、II-D、II-E 表示叶籽银杏相应于银杏, 部分表现为甲基化减弱、部分表现为甲基化增强, 但不易辨别, 亦表现为多态性条带, 而这种多态性条带可以用 Mendelian 遗传进行位点解释 (洪舟, 2009)。

2 结果与分析

2.1 萌动期叶籽银杏 DNA 胞嘧啶甲基化水平及模式变异分析

2.1.1 萌动期叶籽银杏和银杏 DNA 胞嘧啶甲基化水平

从 54 对 MSAP 引物中选出 22 对引物组合, 扩增产生叶籽银杏 498 条清晰可辨的 DNA 条带, 在全部扩增位点中检测到总甲基化位点 237 个, 总甲基化率为 47.6%。其中, 全甲基化位点为 139 个, 全甲基化率为 27.9%; 半甲基化位点为 98 个, 半甲基化率为 19.7% (表 2)。

22 对引物组合, 扩增产生银杏 384 条清晰可辨的 DNA 条带, 在全部扩增位点中, 检测到总甲基化位点 163 个, 总甲基化率为 42.4%。其中, 全甲基化位点为 98 个, 全甲基化率为 25.5%; 半甲基化位点为 65 个, 半甲基化率为 16.9% (表 2)。

萌动期叶籽银杏和银杏均表现为全甲基化的水平高于半甲基化水平。

表 2 叶籽银杏和银杏萌动期的全基因组的甲基化水平

Table 2 Methylation levels of budding stage in *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* Mak. and *G. biloba* L.

材料 Material	扩增条带总数 Total amplified bands	MSAP 扩增带谱类型 MSAP band type					
		I 非甲基化 Non-methylated		II 半甲基化 Hemi-methylated		III 全甲基化 Full methylated	
		条带数 Bands	%	条带数 Bands	%	条带数 Bands	%
叶籽银杏 YZ1	498	261	52.4	98	19.7	139	27.9
银杏 CK	384	221	57.6	65	16.9	98	25.5

2.1.2 萌动期叶籽银杏和银杏 DNA 胞嘧啶甲基化模式的变异

由图 1 和表 3 可知, 叶籽银杏相对于银杏甲基化的变异类型表现为单态型位点有 414 个, 占总扩增位点的 47.9%, 多态型位点有 450 个, 占总扩增位点的 52.1%; 在多态性变异类型中, 叶籽银杏相对于银杏发生去甲基化 (表 3, II-A1、II-A2、II-A3) 的位点为 114 个, 占总扩增位点的 13.2%; 发生超甲基化 (表 3, II-B1、II-B2、II-B3) 的位点数 126 个, 占总扩增位点的 14.6%; 相对于这三类 (表 3, II-C、II-D、II-E 位点) 多态型位点的总数 210 个, 占总扩增位点的 24.3%, 尽管在这三者间观察到甲基化多态性, 但是每一种多态性都可以用简单的孟德尔遗传解释。

研究发现叶籽银杏相对于银杏在甲基化变异类型上以多态性变异为主, 叶籽银杏的超甲基化变异高于其去甲基化变异。

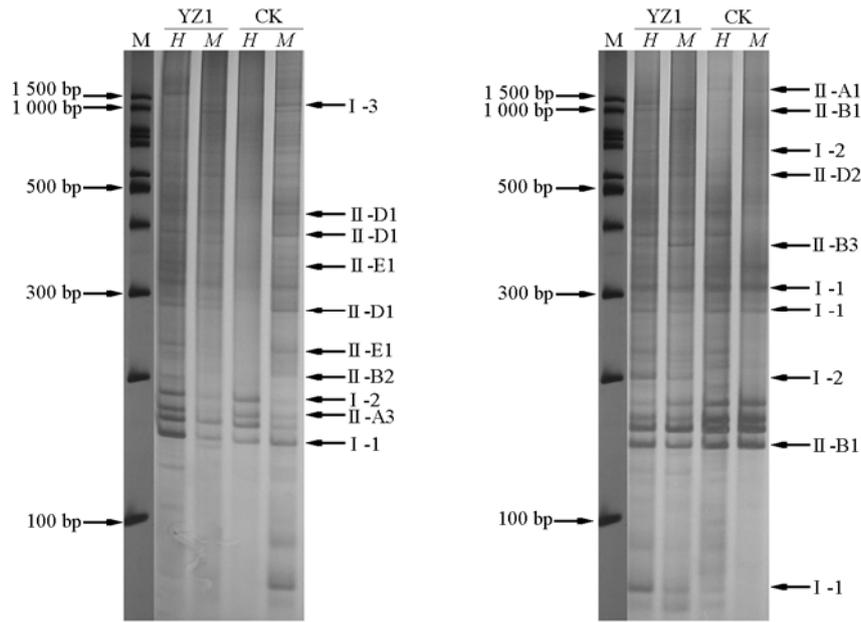


图 1 萌动期叶籽银杏与银杏甲基化模式的变化图

H: *EcoR* I + *Hpa* II 双酶切; M: *EcoR* I + *Msp* I 双酶切; M: 2 000 bp DNA 分子量标准; YZ1: 叶籽银杏; CK: 银杏。

Fig. 1 The type of methylation amplified polymorphism sites of the *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* and *G. biloba* L. at budding stage

H and M are the combinations of enzymes of *EcoR* I / *Hpa* II and *EcoR* I / *Msp* I, respectively.

M: 2 000 bp the DNA molecular-weight marker. YZ1: Epiphylla ginkgo; CK: Ginkgo.

表 3 萌动期叶籽银杏和银杏甲基化模式的变化

Table 3 Different patterns of methylation in *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* and *G. biloba* L., numbers of sites, and frequencies at budding stage

类型 Class	叶籽银杏 YZ1		银杏 CK		位点数 Number of sites	频率/% Frequency
	<i>EcoR</i> I / <i>Hpa</i> II	<i>EcoR</i> I / <i>Msp</i> I	<i>EcoR</i> I / <i>Hpa</i> II	<i>EcoR</i> I / <i>Msp</i> I		
I					414	47.9
I -1	1	1	1	1	372	
I -2	1	0	1	0	12	
I -3	0	1	0	1	30	
II					450	52.1
II -A					114	13.2
II -A1	0	0	1	1	42	
II -A2	0	1	1	1	36	
II -A3	1	0	1	1	36	
II -B					126	14.6
II -B1	1	1	0	0	36	
II -B2	1	0	0	0	42	
II -B3	0	1	0	0	48	
II -C					66	7.6
II -C1	0	0	0	1	24	
II -C2	0	0	1	0	42	
II -D					90	10.4
II -D1	1	1	0	1	30	
II -D2	1	1	1	0	60	
II -E					54	6.3
II -E1	1	0	0	1	18	
II -E2	0	1	0	1	36	

注：“0”：代表没有扩增出带；“1”：代表扩增出带。

Note: “0” stands for the absence of a band, and “1” stands for the present of a band.

2.2 展叶期叶籽银杏 DNA 胞嘧啶甲基化水平及模式的变异分析

2.2.1 展叶期叶籽银杏和银杏 DNA 胞嘧啶甲基化水平

从 54 对 MSAP 引物中选出 40 对引物组合, 扩增产生叶生胚珠 (YZ2) 与无叶生胚珠 (YC) 的叶籽银杏及银杏 (CK) 767、600 及 367 条清晰可辨的 DNA 扩增位点, 在全部扩增位点中检测到总甲基化位点为 370 个、243 个及 152 个, 总甲基化率为 48.3%、40.5%及 41.5%。其中, 全甲基化位点为 176 个、148 个及 107 个, 全甲基化率为 22.9%、24.7%及 29.2%, 半甲基化位点为 194 个、95 个及 45 个, 半甲基化率为 25.4%、15.8%及 12.3% (表 4)。结果显示, 展叶期 YZ2、YC 及 CK 的 DNA 胞嘧啶甲基化水平不同, YZ2 的甲基化水平高于 YC 与 CK, YC 与 CK 甲基化的水平接近。叶籽银杏叶生胚珠的特异性状表达或许与其超甲基化有关。叶籽银杏的高甲基化率, 将或许导致部分基因表达沉默, 银杏出现返祖现象。由此推测叶籽银杏叶生胚珠的形成与其系统发育有关。

表 4 40 对 MSAP 引物组合在展叶期叶籽银杏和银杏全基因组甲基化的扩增结果

Table 4 Number of bands amplified using 40 MSAP selective primer combinations in *Ginkgo biloba* and *G. biloba* var. *epiphylla* at leaf-expansion stages

材料 Material	扩增条带总数 Total amplified bands	MSAP 扩增带谱类型 MSAP band type					
		I 非甲基化 Non-methylated		II 半甲基化 Hemi-methylated		III 全甲基化 Full methylated	
		条带数 Bands	%	条带数 Bands	%	条带数 Bands	%
有叶生胚珠 YZ2	767	397	51.8	194	25.4	176	22.9
无叶生胚珠 YC	600	357	59.5	65	15.8	148	24.7
银杏 CK	367	215	59.6	45	12.3	107	29.2

分别用 *EcoR* I + *Hpa* II, *EcoR* I + *Msp* I (Fermentas Lithuanian) 内切酶不同引物组合对展叶期叶籽银杏、银杏基因组 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, 获得谱带清晰、重复性好、甲基化修饰位点丰富的展叶期叶籽银杏有叶生胚珠、叶籽银杏无叶生胚珠及银杏 MSAP 扩增图谱 (图 2)。

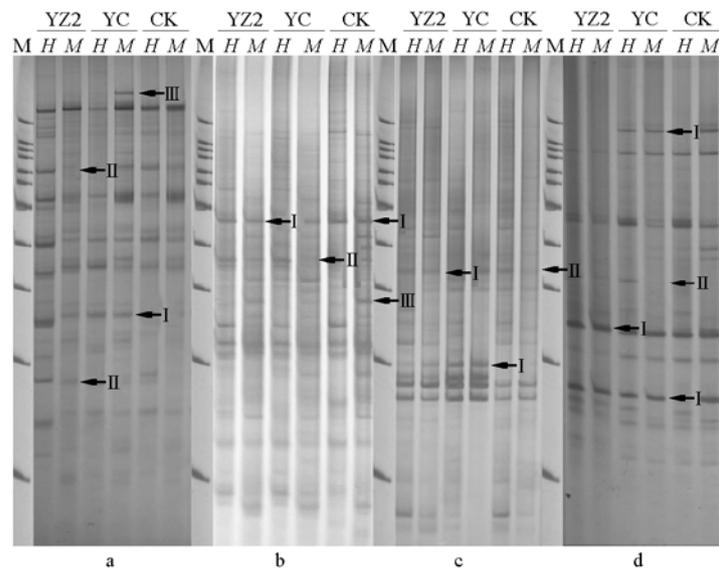


图 2 展叶期叶籽银杏和银杏基因组 DNA 甲基化差异位点的 MSAP 扩增图谱

I: 非甲基化位点; II: 半甲基化位点; III: 全甲基化位点。H: *EcoR* I + *Hpa* II 双酶切; M: *EcoR* I + *Msp* I 双酶切; M: Marker; a~d: 不同选扩引物扩增结果。YZ2: 叶籽银杏有叶生胚珠; YC: 叶籽银杏无叶生胚珠; CK: 银杏。

Fig. 2 MSAP fingerprints of *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* and *Ginkgo biloba* genomic DNA at leaf-expansion stages

I: Non-methylated sites; II: Hemi-methylated sites; III: Full-methylated sites. H: *EcoR* I / *Hpa* II double digestion; M: *EcoR* I / *Msp* I double digestion; M: Marker; a - d: Different primer combinations; YZ2: Epiphyllous-ovule leaf of epiphylla ginkgo; YC: Normal leaf of epiphylla ginkgo; CK: Ginkgo leaf.

2.2.2 展叶期叶籽银杏和银杏 DNA 胞嘧啶甲基化模式的变异

由图 3 和表 5 可知，从 40 对扩增引物中检测到 1 734 条扩增条带，展叶期叶生胚珠（YZ2）相

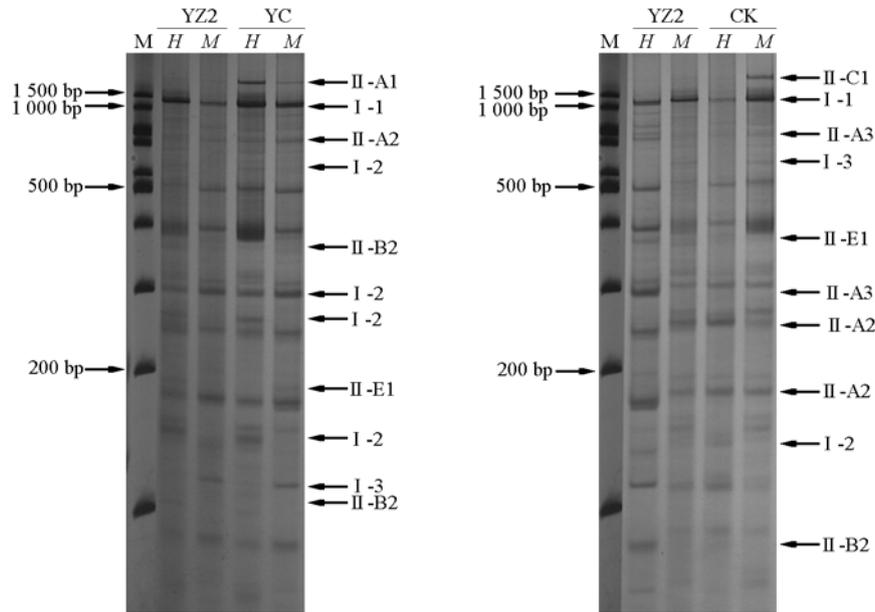


图 3 展叶期叶籽银杏甲基化变化模式图

Fig. 3 The ratios of methylation amplified polymorphism sites of the *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* at leaf-expansion stages

表 5 展叶期叶籽银杏叶生胚珠相对于无叶生胚珠及银杏甲基化模式的变化

Table 5 Different patterns of methylation in *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* and *Ginkgo biloba* L., numbers of sites, and frequencies of at leaf-expansion stages

类型 Class	有叶生胚珠 YZ2		无叶生胚珠 YC		位点数 Site	频率/% Frequency	有叶生胚珠 YZ2		银杏 CK		位点数 Site	频率/% Frequency
	H	M	H	M			H	M	H	M		
I					261	45.4					179	35.8
I-1	1	1	1	1	199		1	1	1	1	116	
I-2	1	0	1	0	11		1	0	1	0	10	
I-3	0	1	0	1	51		0	1	0	1	53	
II					314	54.6					321	64.2
II-A					47	8.2					24	4.8
II-A1	0	0	1	1	11		0	0	1	1	7	
II-A2	0	1	1	1	30		0	1	1	1	14	
II-A3	1	0	1	1	6		1	0	1	1	3	
II-B					92	16.0					140	28.0
II-B1	1	1	0	0	30		1	1	0	0	61	
II-B2	1	0	0	0	35		1	0	0	0	34	
II-B3	0	1	0	0	27		0	1	0	0	45	
II-C					26	4.5					15	3.0
II-C1	0	0	0	1	10		0	0	0	1	9	
II-C2	0	0	1	0	7		0	0	1	0	6	
II-D					84	14.6					81	16.2
II-D1	1	1	0	1	24		1	1	0	1	62	
II-D2	1	1	1	0	14		1	1	1	0	19	
II-E					65	11.3					61	12.2
II-E1	1	0	0	1	6		1	0	0	1	11	
II-E2	0	1	0	1	52		0	1	0	1	50	

注：H: *EcoR* I + *Hpa* II 双酶切；M: *EcoR* I + *Msp* I 双酶切。

Note: H and M are the combinations of enzymes of *EcoR* I / *Hpa* II and *EcoR* I / *Msp* I, respectively.

对于无叶生胚珠 (YC)、银杏 (CK) 甲基化的变异类型表现为单态型位点有 261 个、179 个, 占总扩增位点的 45.4%、35.8%, 多态型位点有 314 个、321 个, 占总扩增位点的 54.6%、64.2%; 在多态型变异类型中, YZ2 相对于 YC 及 CK 发生去甲基化 (表 5, II-A1、II-A2、II-A3) 的位点为 47 个、24 个, 占总扩增位点的 8.2%、4.8%; 发生超甲基化 (表 5, II-B1、II-B2、II-B3) 的位点 92 个、140 个, 占总扩增位点的 16.0%、28.0%, 相对于这 3 类 (表 5, II-C、II-D、II-E 位点) 多态性位点为 175 个、157 个, 占总扩增位点的 30.4%、31.4%。结果显示, 展叶期叶生胚珠的叶籽银杏相对于无叶生胚珠的叶籽银杏及银杏甲基化变异类型以多态性变异为主, 叶生胚珠相对于无叶生胚珠和银杏在多态性变异中表现为超甲基化 (16.0%、28.0%) 高于去甲基化 (8.2%、4.5%), YZ2 相对于 CK 其超甲基化率更高, 变异幅度也更丰富。

3 讨论

DNA 甲基化在植物的生长发育过程中起着重要的调控作用, 在不同组织或同一组织的不同发育阶段, 基因组 DNA 的甲基化水平和模式存在差异 (Zhao et al., 2007)。陆光远等 (2005) 的研究证明, 白菜 (*Brassica campestris* L.) 种子萌发过程中同时发生甲基化和去甲基化, 以去甲基化占据主导地位, 白菜可能通过甲基化和去甲基化的方式调控基因的表达, 并最终决定植株的生长发育和器官分化。

萌动期叶籽银杏的甲基化水平 (47.6%) 显著高于银杏 (42.4%); 展叶期叶籽银杏叶生胚珠、无叶生胚珠及银杏的甲基化水平分别为 48.3%、40.5% 和 41.5%。不论是萌动期还是展叶期, 叶籽银杏的甲基化水平均高于银杏。研究显示, DNA 的甲基化程度越高, 转录和翻译为功能蛋白质的可能性越小 (魏华丽 等, 2009)。叶籽银杏的高甲基化, 体现其形状的特异性与表观遗传修饰具有一定的关联性。表观遗传调控一旦出现差错就必然会导致生物体生理生化过程的改变, 最终出现形态解剖上的异常 (Reik, 2007)。叶籽银杏的高甲基化与其形态特性的返祖性或许具有一定的相关性。本研究为进一步从表观遗传学的角度探讨叶籽银杏起源及系统发育机制奠定了一定基础。

本研究中就叶籽银杏与银杏之间甲基化模式变异研究发现, 不论是萌动期还是展叶期叶籽银杏与银杏之间甲基化模式均存在广泛的变异, 其多态性变异的的比例明显高于单态性变异, 在多态性变异中存在着多种变异类型, 即有去甲基化类型、又有超甲基化类型及两种类型均有但表达不是很明确的第三类多态性变异类型。这与 Chen 等 (2009) 在对大花蕙兰 (*Cymbidium hybridum*) 拟原球茎形成期与分化期研究的结果一致, 在两个时期中存在着丰富的甲基化变异。在北美巨杉 (*Sequoiadendron giganteum*) 等木本植物中的研究中也发现, 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 (Monteuuis et al., 2008)。

萌动期, 叶籽银杏相对于银杏其单态性比例低于多态性比例, 在多态性比例中超甲基化占主导地位; 展叶期, 叶籽银杏叶生胚珠相对于叶籽银杏无叶生胚珠及银杏的单态性比例明显低于其多态性比例, 在多态性比例中去甲基化比例仅为 8.2% 和 4.5%, 而超甲基化的比例为 16% 和 28.0%, 叶生胚珠相对于无叶生胚珠及银杏以超甲基化变异类型为主, 叶生胚珠相对于银杏其超甲基化水平更高、变异幅度也更丰富。Santamaría 等 (2009) 在对欧洲栗 (*Castanea sativa*) 芽的形成与萌发阶段组蛋白乙酰化和基因组 DNA 甲基化模式的研究中发现存在非常变化, 如在顶芽中, 芽萌动时甲基化水平增加, 展叶期甲基化水平降低; 腋芽在顶芽展叶时 DNA 甲基化的水平恒定, DNA 甲基化在一年里的波动不大。袁金玲等 (2012) 在对开花的孝顺竹研究发现, 开花期的孝顺竹同时发生甲基化和去甲基化, 但发生去甲基化的概率明显大于发生甲基化的概率, 最终导致其甲基化水平极显著降低。本研究结果与其相近, 虽然有所差异, 但均在不同发育期存在丰富的变异。展叶期为叶籽银杏发端

期形成的关键期(韩晨静等, 2011), 由此推测, 叶籽银杏发端期甲基化模式的广泛变异为其叶籽银杏叶生胚珠形成提供了表观遗传学基础, 说明叶籽银杏叶生胚珠的形成与其表观遗传修饰有关, 并能稳定遗传。魏丽华等(2009)的研究也认为, 基因中异常的超甲基化导致转录抑制和基因沉默, 且这种异常的甲基化模式(methylation patterns)可遗传数代。

References

- Chen Xiao-qiang, Ma Yi, Chen Fang, Song Wen-qin, Zhang Lei. 2009. Analysis of DNA methylation patterns of PLBs derived from *Cymbidium hybridum* based on MSAP. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 98: 67 - 77.
- Dong Lei-lei, Xing Shi-yan, Li Ji-hong, Wang Jing-mei. 2008. Sequencing and analysis of trnS-trnG on *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* Mak. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 24 (12): 168 - 172. (in Chinese)
- 董雷雷, 邢世岩, 李际红, 王京梅. 2008. 叶籽银杏 trnS-trnG 序列测定与分析. *中国农学通报*, 24 (12): 168 - 172.
- Dong Yu-wei, Hou Jin-hui, Zhu Bi-cai, Li Pei-qing, Pang Yong-hong. 2005. Concepts related to epigenetics and their advances. *Journal of Biology*, 22 (1): 1 - 3. (in Chinese)
- 董玉玮, 侯进慧, 朱必才, 李培青, 庞永红. 2005. 表观遗传学的相关概念和研究进展. *生物学杂志*, 22 (1): 1 - 3.
- Douglas A W, Stevenson D W, Little D P. 2007. Ovule development in *Ginkgo biloba* L., with emphasis on the collar and nucellus. *Int J Plant Sci*, 168 (9): 1207 - 1236.
- Guo Chang-hua, Kang Xiang-yang. 2008. Progress in phase change during tree development. *Letters Biotechnology*, 19 (5): 784 - 786. (in Chinese)
- 郭长花, 康向阳. 2008. 树木发育中的阶段转变研究进展. *生物技术通讯*, 19 (5): 784 - 786.
- Guo Guang-ping, Gu Xiao-ping, Yuan Jin-ling, Wu Xiao-li. 2011. Research on the features of DNA methylation in leaves of different chronological ages of *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens* based on the method of MSAP. *Hereditas*, 33 (7): 794 - 800. (in Chinese)
- 郭广平, 顾小平, 袁金玲, 吴晓丽. 2011. 不同生理年龄毛竹 DNA 甲基化的 MSAP 分析. *遗传*, 33 (7): 794 - 800.
- Han Chen-jing, Xing Shi-yan, Dong Zhang-kai, Zhang Fang, Li Ji-hong. 2011. Studies on histochemistry of the developmental epiphyllous ovule in *Ginkgo biloba* var. *epiphylla*. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (5): 817 - 824. (in Chinese)
- 韩晨静, 邢世岩, 董章凯, 张芳, 李际红. 2011. 叶籽银杏叶生胚珠的发育组织化学研究. *园艺学报*, 38 (5): 817 - 824.
- Hong Zhou. 2009. Study on molecular mechanism of heterosis of Chinese fir [*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook] [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Forestry University. (in Chinese)
- 洪舟. 2009. 杉木杂种优势分子机理初探[博士论文]. 南京: 南京林业大学.
- Li Bao-jin. 2008. Sequence analysis of matK gene and ITS region and phylogeny on *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* Mak [M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 李保进. 2008. 叶籽银杏 matK 和 ITS 序列分析及系统发育研究[硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Li Ji-hong, Xing Shi-yan, Wang Cong-cong, Zhang Qian, Fu Yin-yin. 2011. Analysis on genomic DNA methylation modification of *Ginkgo biloba* by methylation-sensitive amplification polymorphism. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (8): 1429 - 1436. (in Chinese)
- 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.
- Li Shi-mei, Xing Shi-yan, Li Bao-jin, Wang Li. 2007. Review on ontogeny and phylogeny of *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* and its genesis mechanism. *Scientia Silvae Sinicae*, 43 (5): 90 - 98. (in Chinese)
- 李士美, 邢世岩, 李保进, 王利. 2007. 叶籽银杏的发生及其个体与系统发育研究述评. *林业科学*, 43 (5): 90 - 98.
- Lu Guang-yuan, Wu Xiao-ming, Chen Bi-yun, Gao Gui-zhen, Xu Kun, Li Xiang-zhi. 2005. DNA methylation process MSAP canola seed germination. *Chinese Science Bulletin*, 50 (24): 2750 - 2756. (in Chinese)
- 陆光远, 伍晓明, 陈碧云, 高桂珍, 许鲲, 李响枝. 2005. 油菜种子萌发过程中 DNA 甲基化的 MSAP 分析. *科学通报*, 50 (24): 2750 - 2756.
- Monteuuis O, Doubeau S, Verdeil J L. 2008. DNA methylation in different originclonal offspring from a mature *Sequoiadendron giganteum* genotype. *Trees*, 22 (6): 779 - 784.
- Pan Ya-jiao, Fu Bin-ying, Wang Di, Zhu Ling-hua, Li Zhi-kang. 2009. Spatial and temporal profiling of DNA methylation induced by drought stress in rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (9): 3009 - 3018. (in Chinese)

- 潘雅姣, 傅彬英, 王 迪, 朱冬华, 黎志康. 2009. 水稻干旱胁迫诱导 DNA 甲基化时空变化特征分析. 中国农业科学, 42 (9): 3009 - 3018.
- Reik W. 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 447 (7143): 425 - 432.
- Santamaría M E, Hasbún R, Valera M J, Meijón M, Villedor L, Rodríguez J L, Toorop P E, Cañal M J, Rodríguez R. 2009. Acetylated H4 histone and genomic DNA methylation patterns during bud set and bud burst in *Castanea sativa*. *Journal of Plant Physiology*, 166: 1360 - 1369.
- Shi Ji-seng. 2008. Apparent genomics - A new vision of quantitative genetics//The sixth national conference on forest genetics and breeding. Hangzhou: 109 - 112. (in Chinese)
- 施季森. 2008. 表观基因组学——数量遗传学的一个新视野//第六届全国林业遗传育种大会. 杭州: 109 - 112.
- Tariq M, Paszkowski J. 2004. DNA and histone methylation in plants. *Trends Genet*, 20 (6): 244 - 251.
- Wang Jing-mei, Li Ji-hong, Xing Shi-yang, Yao Lin-mei, Wang Yi-gang. 2009. Cloning and sequence analysis of *GbMADS5* gene from *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* Mak. *Molecular Plant Breeding*, 7 (5): 1015 - 1020. (in Chinese)
- 王京梅, 李际红, 邢世岩, 姚林梅, 王邑刚. 2009. 叶籽银杏 *GbMADS5* 基因的克隆与序列分析. 分子植物育种, 7 (5): 1015 - 1020.
- Wei Li-hua, Yang Wen-hua, Han Su-ying, Qi Li-wang. 2009. Research strategy of epigenetics and utilization in wooden plants. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 11 (2): 10 - 16. (in Chinese)
- 魏丽华, 杨文华, 韩素英, 齐力旺. 2009. 表观遗传学在木本植物中的研究策略及应用. 中国农业科技导报, 11 (2): 10 - 16.
- Xiong L Z, Xu C G, Saghai Maroof M A, Zhang Q F. 1999. Patterns of cytosine methylation pattern in an elite rice hybrid and its parental lines detected by a methylation polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 261 (3): 139 - 446.
- Yang C, Zhang M J, Niu W P, Yang R J, Zhang Y H, Qiu Z Y, Sun B X, Zhao Z H. 2011. Analysis of DNA methylation in various swine tissues. *PLoS ONE*, 6 (1): e16229. doi: 10.1371/journal.pone.0016229.
- Yuan Jin-ling, Guo Guang-ping, Yue Jin-jun, Wu Xiao-li, Gu Xiao-ping. 2012. Features of DNA methylation during the flowering process of *Bambusa multiplex*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 32 (1): 60 - 66. (in Chinese)
- 袁金玲, 郭广平, 岳晋军, 吴晓丽, 顾小平. 2012. 孝顺竹开花过程中 DNA 甲基化水平动态研究. 西北植物学报, 32 (1): 60 - 66.
- Zhao X, Chai Y, Liu B. 2007. Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intra-specific hybrids. *Plant Sci*, 172: 930 - 938.
- Zhou Zhi-yan. 1994. Heterochronic origin of *Ginkgo biloba*-type ovule organs. *Acta Palaeontologica Sinica*, 33 (2): 131 - 139. (in Chinese)
- 周志炎. 1994. 银杏型胚珠器官的异时发育起源. 古生物学报, 33 (2): 131 - 139.

征 订

欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的学术期刊, 创刊于 1962 年, 刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究报告、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息, 适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊, 中国科技核心期刊; 被英国《CAB 文摘数据库》、美国 CA 化学文摘、日本 CBST 科学技术文献速报、俄罗斯 AJ 文摘杂志、CSCD 中国科学引文数据库等多家数据库收录。《园艺学报》荣获“第三届国家期刊奖”及“新中国 60 年有影响力的期刊”、“中国国际影响力优秀学术期刊”、“百种中国杰出学术期刊”、“中国权威学术期刊”、“中国精品科技期刊”等称号。

《中国学术期刊影响因子年报》2013 年公布的《园艺学报》复合总被引频次为 11 071, 复合影响因子为 1.734; 期刊总被引频次为 5 146, 期刊影响因子为 1.112。

《中国科技期刊引证报告》2013 年公布的《园艺学报》扩展总被引频次为 6 106, 扩展影响因子为 1.333; 核心总被引频次为 4 328, 核心影响因子为 1.047; 在中国科技核心期刊综合评价总分排名中居第 29 位。

《园艺学报》为月刊, 每月 25 日出版。每期定价 40 元, 全年 480 元。国内外公开发售, 全国各地邮局办理订阅, 国内邮发代号 82 - 471, 国外发行由中国国际图书贸易总公司承办, 代号 M448。漏订者可直接寄款至编辑部订购。编辑部地址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部。

邮政编码: 100081; 电话: (010) 82109523. E-mail: yuanyixuebao@126.com。

网址: <http://www.ahs.ac.cn>。