

植物离体培养过程中 DNA 甲基化变异研究进展

陈兆贵^{1,2}, 黄学林²

(¹惠州学院生命科学系, 惠州 516007; ²中山大学生命科学院/教育部基因工程重点实验室, 广州 510275)

摘要:表观遗传变异对于植物的生长发育起着重要作用, 主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色体重塑和 RNA 干涉等。DNA 甲基化是一种最重要的表观遗传机制, 在植物离体培养过程中广泛存在, 本文对植物离体培养过程的 DNA 甲基化变异现象、影响因素及机理等情况进行综述。

关键词:植物离体培养; 表观遗传变异; DNA 甲基化

Advances on DNA Methylation Research During *in vitro* Culture of Plant

CHEN Zhao-gui^{1,2}, HUANG Xue-lin²

(¹Department of Life Sciences, Huizhou University, Huizhou 516007, ²Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education/School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275)

Abstract: Epigenetic variation plays an important role in plant growth and development, including DNA methylation, histone modification, chromosome remodeling, RNA interference and so on. DNA methylation is one of the most important epigenetic mechanism and widely used in the process of plants' cultivation *in vitro*. This paper reviews DNA methylation variation phenomenon, influencing factors and mechanisms etc in the process of plants' cultivation *in vitro*.

Key words: Plant *in vitro* culture; Epigenetic variation; DNA methylation

表观遗传变异是指基因表达改变但不涉及 DNA 序列的变化, 主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色体重塑和 RNA 干涉等^[1]。DNA 甲基化作为一种最为重要的表观遗传机制, 在植物中对于调控基因表达和维持基因组稳定性(基因组防御)等方面起到重要作用^[2]。DNA 甲基化变化在植物生长发育过程中起着极其重要的作用, 参与植物生长、器官分化、春化、开花等生命过程^[3-5]。体细胞无性系变异是植物离体培养中普遍现象^[6]。在育种工作中, 体细胞无性系可以作为育种中间材料加以利用, 但在快繁和转基因研究中, 应避免无性系变异的发生^[7], 因此有必要弄清楚体细胞无性系变异的来源, 掌握体细胞无性系变异的发生规律, 以便控制体细胞无性系变异的产生。研究表明, DNA 甲基化在植物离体培养过程中和体细胞无性变异产生中起着重要作用。探讨 DNA 甲基化在植物离体培养中的变化规律, 将有助于了解植物离体发育和体细胞无

性系产生的机理。

1 植物 DNA 甲基化概述

在植物中, DNA 甲基化主要以 5-甲基胞嘧啶形式存在^[8], 植物核基因组中的 DNA 胞嘧啶大约有 20% ~ 30% 处于甲基化状态^[9], 其中对称的 C_pG 和 C_pA(T) 甲基化频率最高^[10]。不同种属植物的胞嘧啶甲基化程度存在较大的差异^[11], 拟南芥中只占 5%^[12], 而烟草中胞嘧啶约有 30% 是甲基化的^[13]。研究表明, 多数 DNA 甲基化发生在富含转座子的异染色体区, 但在基因组其他区域同样存在甲基化现象^[14]。DNA 甲基化需要 DNA 甲基转移酶等多种调控因子参与。根据其结构特征, 植物的胞嘧啶甲基转移酶主要分为 4 种类型: 域重排甲基转移酶 DRM(s) (domains rearranged methyltransferase)、甲基转移酶 METs (methyltransferase)、染色体甲基转移酶

收稿日期: 2010-06-29 修回日期: 2010-12-13

基金项目: 广东省科技计划项目(2008E023700006); 惠州市科技计划项目(2009B010001025)

作者简介: 陈兆贵, 副教授, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: chenzg1973@126.com

CMTs (chromomethylase) 和 Dnmt 2 类 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase homologue 2)^[15]。植物域重排甲基转移酶家族与哺乳动物的从头甲基转移酶 (de novo methyltransferase) 家族 (DNMT3, DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3) 同源, 只在催化域的排列顺序上存在差异, 这一类酶是从头甲基化的关键酶, 在拟南芥、大豆、烟草和玉米中分离出的 DRM 蛋白^[15]。甲基转移酶是一类维持型的 DNA 甲基转移酶, 如玉米的甲基转移酶 ZmMET1 体外表达具有 DNA 甲基化的活性, ZmMET1 在转基因植株的中胚轴和根冠细胞中聚集, 表明 ZmMET1 的表达与 DNA 的复制相关。低温处理后, DNA 甲基化水平在部分组织中有选择性的降低, 而 ZmMET1 对这种去甲基化具有抑制作用^[16]。染色体甲基转移酶 CMTs 类型最初是从拟南芥的基因组序列中鉴定得来, 主要负责保持 CNG 位点的甲基化^[17]。Dnmt 2 在植物 DNA 甲基化过程中功能尚不清楚^[18]。

用于 DNA 甲基化检测方法很多, 根据 DNA 甲基化检测的目的, 分为 DNA 甲基化特异性分析和非特异性分析^[19]。DNA 甲基化非特异性分析主要是根据其重要特征从总体上分析基因组水平的^{5mC} 比例, 主要包括高效液相色谱、高效毛细管电泳、薄层层析、MSss I 甲基转移酶分析、去水乙缩醛反应等^[20]。对 DNA 甲基化进行特异性分析, 主要是对甲基化变化位点进行分析, 包括不依赖重亚硫酸盐处理的 DNA 甲基化分析技术, 包括脍反应、高锰酸反应和限制性内切酶技术^[21]; 而基于重亚硫酸盐处理的 DNA 甲基化分析技术是一种常用的特异性分析, 其基本原理是用重亚硫酸钠修饰后胞嘧啶被转变成尿嘧啶, 而^{5mC} 则在修饰前保持不变, 然后利用 DNA 测序技术或 PCR 技术等可达到对^{5mC} 的特异性分析, 主要包括重亚硫酸测序、甲基化特异性 PCR、甲基化特异性单核苷引物延、重亚硫酸盐制酶组合分析甲基化敏感差异展示分析等^[22]。在 PCR 检测方面, MSAP (methylation-sensitive amplified polymorphism, 甲基化敏感扩增多态性) 是一种最常用的分析技术, 该方法是在 AFLP 技术基础上建立起来的检测 DNA 甲基化的方法, 是以对甲基化敏感的酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 代替高频内切酶 *Mse* I, 以 *EcoR* I 作为外切酶进行反应, 能够检测 DNA 没有发生改变情况基因组 DNA 甲基化修饰情况。MSAP 技术已广泛用于水稻、拟南芥、玫瑰等植物的 DNA 甲基化检测^[23-25]。

2 植物离体培养过程中的 DNA 甲基化现象

2.1 DNA 甲基化与愈伤组织的形成

外植体中的活细胞经诱导, 恢复其潜在的全能性, 转变为分生细胞, 继而其衍生的细胞分化为薄壁组织而形成愈伤组织。愈伤组织的形成大致经过起始期、分裂期和形成期 3 个时期。愈伤组织形成是一个脱分化过程, 它受到多种因素影响, 除了外植体、激素和培养条件以外, 涉及到一系列基因的表达, 还与 DNA 甲基化变异密切相关^[26]。水稻^[27]、玉米^[28]、拟南芥^[24]、玫瑰^[25] 等植物在离体培养的愈伤组织形成过程中均发现 DNA 甲基化水平及其模式变异。李丽琴等^[29] 用 32 个 MSAP 引物组合从红豆杉植株及其愈伤组织分别扩增出 1197 个片段, 总扩增位点的甲基化水平由脱分化前的 12.4% 上升为 16.2%, 表明红豆杉在脱分化过程中的某些位点发生了甲基化, 脱分化前后的 DNA 甲基化模式也存在较大差异, 说明 DNA 甲基化对红豆杉愈伤组织形成有调控作用。Trejgell 等^[30] 在刺苞菊组织培养中发现, 经过愈伤组织阶段再生获得的植株存在表观遗传变异现象, 对再生植株和对照植株进行 DNA 甲基化变化情况检测, 结果发现这 2 种植株在 18S rRNA 和 25S rRNA 基因上甲基化模式存在差异, 此结果表明在愈伤形成或分化过程中, DNA 甲基化可导致表观遗传变异。丁明丽^[31] 对小麦成熟胚脱分化过程中的 DNA 甲基化水平变化情况进行研究, 在整个脱分化过程中, 5-基胞嘧啶百分含量的变化趋势可简要概括为信号传导期 (0~2 h) 骤然降低, 信号响应期 (2~12h) 逐渐增加, 细胞重塑期 (12~24 h) 为下降, 愈伤组织形成期 (24~72 h) 为更加缓慢下降。

愈伤组织的生理状态对于愈伤组织的维持和分化具有重要的影响, 研究发现, 处于不同阶段和生理状态的愈伤组织之间 DNA 甲基化水平存在差异^[25]。Xu 等^[25] 利用 AFLP 法对玫瑰的植株、继代苗、各种类型的愈伤组织及再生植株进行 DNA 甲基化检测, 根据相似性进行聚类分析, 将胚性愈伤组织及其再生植株归为一类, 未分化愈伤组织和器官性愈伤组织归为一类, 其他材料归为一类。以上的研究结果表明, 玫瑰在离体培养过程中 DNA 甲基化水平发生变异, 其中未分化愈伤组织向胚性愈伤组织转变过程中, DNA 甲基化变异水平升高, 表明胚性愈伤组织的形成受到 DNA 甲基化调控。

2.2 DNA 甲基化与器官发生途径

植物的离体器官发生是指离体的组织或细胞在组织培养的条件下形成不定芽、根和花芽等器官的过程。器官发生途径分为直接器官发生(不经过愈伤组织阶段)途径和间接器官发生(经过愈伤组织阶段)途径。直接器官发生途径外植体分化不需要经过愈伤组织阶段,在一定条件下直接分化成芽(根),然后再诱导产生根(芽),进而形成完成的再生植株。在直接器官发生过程,虽然没有经过愈伤组织阶段,但在离体培养过程中其他胁迫条件没有改变,同样存在 DNA 甲基化变化^[32]。Peredo 等^[33]利用啤酒花茎尖分生组织直接诱导产生不定芽,并对不芽进行继代培养,连续继代培养 12 代,用 RAPD 等分子标记没有检测到田间对照植株与试管苗之间存在带型差异,用 MSAP 技术对其中一个品种“Columbus”的野生对照植株与第 1、3、9、12 代继代材料进行检测,结果发现在野生型植株和组培苗之间 DNA 甲基化变化程度有差异,在所检测到的 335 个片段中,有 102 个片段存在多态性,多态性比例为 28.73%,其中 DNA 去甲基化比例为 18%,DNA 重新甲基化为 4.23%,其他类型为 6.48%,不同的继代苗之间也检测到 DNA 甲基化水平存在差异,变异约为 9%。另外 Li 等^[34]直接用苹果叶器官进行离体培养,与田间对照叶片相比,同样存在 DNA 甲基化变异现象,这说明在离体培养过程中,由于植物器官处于环境条件胁迫中,导致基因的表达发生改变。

在不定芽继代培养过程中,无性系性状的稳定性对于试管苗的利用和种质保存具有重要意义。不同外植体在继代培养过程中性状的稳定性存在一定差异,变异类型包括遗传变异和表观遗传变异,表观遗传变异主要是 DNA 发生甲基化变异。Smykal 等^[35]对经过 20 年长期组织培养的豌豆材料进行遗传学和表观遗传学变异研究,用 AFLP 和 MSAP 检测经长期组织培养的材料 DNA 带型变异,与对照相比,分别发生 11% 和 18% 的变异,说明在长期的组织培养过程中,豌豆发生了遗传和表观遗传变异。

2.3 DNA 甲基化与体细胞胚途径

在离体植物细胞、组织或器官培养过程中,由一个或一些体细胞,经过胚胎发生和发育过程,形成的与合子胚相类似的结构称为体细胞胚。部分植物经脱分化形成愈伤组织后,在一定的条件下,可以通过体细胞胚途径形成再生植株,从愈伤组织分化出胚状体是一个极为复杂的过程,涉及到一系列的基因

表达。von Aderkas 等^[36]认为植物体细胞胚发生受到 DNA 甲基化调控,而 DNA 甲基化又受激素调控,生长素调控 DNA 甲基化以 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)和 S-腺苷半胱氨酸(SAH)为媒介,调控可能的方式如下:当培养基中除去 2,4-D 时,导致乙烯合成减少,结果导致 SAM 和 SAM/SAH 比率增加,从而促进 DNA 甲基化增加。因此在球形胚期去除 2,4-D, DNA 甲基化减少,但在鱼雷形胚和植株生长期急剧上升,说明体细胞胚发生过程伴随着 DNA 甲基化变化。在胚状体形成过程中,体细胞实现向胚性细胞的转变是关键,在这过程中,受到包括 DNA 甲基化变异等细胞内外一系列调控因子的调控^[37]。郝玉金等^[38]研究发现柑橘具有体胚发生能力的愈伤组织比非体胚发生能力的愈伤组织的 DNA 甲基化变化程度低,说明胚性愈伤组织通过 DNA 去甲基化致使部分基因选择性表达。Chakrabarty 等^[39]发现刺五加胚性愈伤组织有很低的甲基化水平,非胚性愈伤组织有很高的甲基化水平但是没有再生苗的能力,说明愈伤组织中处于较低程度的甲基化水平有利于胚胎的发生。

3 离体培养条件下影响 DNA 甲基化变异的因素

3.1 外植体的基因型和状态

在植物离体培养过程中,无论是愈伤组织的诱导、增殖或分化,都受到基因型的影响^[40]。在离体培养过程中,DNA 甲基化变异同样与外植体的基因型有关。有些植物在离体培养过程中 DNA 甲基化水平提高,如番茄^[41]、香桃木^[42]、玫瑰^[25]等;有些植物在离体培养过程中 DNA 甲基化水平下降,如玉米^[43]、大豆^[44]、油椰子等^[45]。当然,也有些一植物在离体培养过程中 DNA 甲基化水平没有发生变化,如 Gillis 等^[46]用 MSAP 检测竹子外植体、离体培养获得愈伤组织和再生植株,并没有发现存在 DNA 甲基化变异。此外,研究发现同一基因型的植物,不同取材部位离体培养再生植株 DNA 甲基化水平也存在差异,利用 MSAP 技术研究经离体培养获得的再生香蕉植株的 DNA 甲基化变异情况,发现从雄性花序离体培养获得的再生株甲基化变异百分率为 3%,而从吸芽离体培养得到的再生株的甲基化变异百分率为 1.7%,采用传统分株繁殖获得的后代植株没有发现存在 DNA 甲基化变化,这一方面说明组织培养过程中存在 DNA 甲基化变化,另一方面也说明不同部位的取材培养对后代的稳定有一

定影响^[47]。

3.2 外源激素的种类和浓度

在植物离体培养过程中,无论是在外植体脱分化形成愈伤组织,还是愈伤组织经过器官发生途径或胚状体途径形成再生植株,都是激素协同起作用的结果^[48]。2,4-D作为一种生长素,在植物愈伤组织的形成中和胚状体的形成中起着重要的作用,特别是对禾谷类植物的体细胞胚发生具有决定性作用^[49]。一方面2,4-D可以诱导产生胚性愈伤组织,而降低2,4-D可以使DNA去甲基化,导致分化产生。Loschiavo等^[48]研究胡萝卜体细胞胚发生过程中发现,2,4-D与细胞DNA的甲基化有关,当胡萝卜悬浮培细胞在含高浓度的2,4-D培养条件下,DNA甲基化从16%增加到45%,DNA甲基化增加,表明对基因表达的抑制作用增大,当除去2,4-D并降低细胞密度时,DNA便处于低甲基化状态,可以激活相应的基因表达。由此可见,细胞DNA甲基化的能力可能是由基因型、分化组织和诱导体胚发生所需的2,4-D的量不同而控制的,DNA的瞬时甲基化可能在分子水平上抑制了与体胚发育有关的基因表达。因此,在高浓度2,4-D存在的条件下,胡萝卜胚性细胞的进一步发育也受到抑制。6-BA和GA₃等激素在植物离体培养中也广泛使用,同样会引起DNA甲基化变化^[50]。

3.3 培养时间及继代次数

在植物离体培养过程中,部分愈伤组织或悬浮培养物起初具有器官或胚胎发生潜力,随着继代次数的增加或培养时间的延长,这种形态发生能力常常会逐渐下降,有时甚至完全丧失^[51]。Salajova等^[52]研究发现,在松胚培养过程中,经过几个月继代培养之后,原本具有体细胞胚发生能力的愈伤组织失去了胚胎发生能力。遗传和表现遗传变异可能是引起长时间培养材料丧失分化能力的一个重要原因^[5]。黄璐等^[53]研究发现玉米愈伤组织经过6个月继代培养丧失分化能力,经RAPD方法检测发现,丧失分化能力的愈伤组织与胚性愈伤组织相比,前者中存在缺失的DNA带,表明在产生非胚性愈伤组织的组织培养继代过程中,玉米细胞的DNA发生了变异。郝玉金等^[38]在研究柑橘继代后失去分化能力的非胚性愈伤组织,发现DNA甲基化水平增加。Peredo等^[33]认为DNA甲基化变化水平随着继代代数和时间的增加而增加。Fraga等^[54]研究发现辐射松胚培养过程中,经过几次继代培养之后,DNA甲基化水平明显增加,并认为DNA甲基化水平增加

导致胚发生能力的丧失。

3.4 渗透压和其他培养条件

在植物离体培养过程,植物细胞处于人工配置的培养基中,客观上给细胞造成了一个胁迫环境,包括渗透压的影响。在植物离体培养过程中,渗透压也会影响到DNA的甲基化水平变化,分别用不同浓度的NaCl和甘露醇对悬浮培养的番茄TBY-2细胞进行处理,培养1周后检测其DNA甲基化变异情况,结果表明,与对照相比,用5g/L和10g/L NaCl处理过的细胞的DNA发生甲基化变异,表现为DNA甲基化程度增加。同样,用171mmol/L甘露醇处理后同样表现出DNA甲基化变化。除去NaCl和甘露醇时,经过一段时间培养,DNA甲基化程度恢复到原来水平,表明番茄细胞在盐胁迫条件下DNA可以通过重新甲基化来适应环境的变化,而一旦胁迫条件解除,DNA通过去甲基化恢复原来的水平^[55]。此外,在离体培养过程中,其他培养条件如植物创伤、氧胁迫等同样会导致DNA甲基化发生变化^[32]。

4 植物离体培养中DNA甲基化变异的机理

在离体培养条件下,有关DNA甲基化发生的机理目前研究得不多,一般的研究只局限于从整体上检测DNA甲基化变化水平和模式,对于在离体培养过程中DNA甲基化变化过程所涉及的基因和如何调控基因表达的方式知之甚少,只在一些模式植物中有一些报道^[56]。丁明丽^[31]用芯片杂交技术检测到小麦成熟胚脱分化过程受到16个有关DNA甲基化和组蛋白修饰基因的调控。DNA甲基化部位通常发生在启动子附近,当结构基因的启动子或第一个内含子C_pG发生甲基化,导致转录因子或其他蛋白因子无法结合到启动子上,从而阻止RNA聚合酶移动,使转录终止,造成基因的沉默,而DNA去甲基化后转录得以正常进行^[57]。Shitsukawa等^[58]曾报道普通小麦中一个MADS家族基因WLHS1基因中WLHS1-B的DNA高度甲基化,发生甲基化部位并不是位于启动子而是位于第一外显子内,由于胞嘧啶发生甲基化而导致该基因沉默。Berdasco等^[56]用遗传学和药物方法对拟南芥愈伤组织和悬浮细胞进行分析,发现一些基因表达受到抑制主要是由启动子发生甲基化的缘故。在未分化的愈伤组织中,TTG1、GSTF5、SUVH8基因的表达受到抑制,而在悬浮细胞中,fimbrin和CCD7基因的表达受到抑制,他

们根据研究结果,认为启动子甲基化是植物细胞建立和保持未分化状态的一种表观遗传机制。

在植物离体培养过程中,DNA 甲基化变异会影响到转座子的活性。植物转座子包括两类,一类是以 DNA 为介导的转座子,如玉米中 Ac-Ds 转座子。另一类是以 RNA 为介导的转座子,又称反转座子,如水稻中 Tos17^[59]。转座子在植物基因组中广泛存在,但通常转座子处于沉默状态,但在一定的条件下可以被激活,导致转座的发生^[60]。植物离体培养会激活一些转座子的活性,如水稻中反转座子 Tos17 就是在组织培养过程中被激活,研究发现在组织培养过程中该转座元件发生去甲基化被激活,并且其临近基因组区域的甲基化模式也发生了可遗传性的改变^[61-62]。转座子激活与 DNA 甲基化水平有关,植物离体培养过程产生 DNA 甲基化变化,DNA 去甲基化可以激活转座子,从而造成转座子的移位,也就是说植物可以通过 DNA 甲基化变化影响转座子的活性,而转座子可以进一步影响到基因功能的改变^[63]。

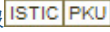
5 结语

在植物离体培养过程中,植物组织中的 DNA 发生甲基化变异是一种普遍现象,一方面 DNA 甲基化变异对于启动外植体分化、维持愈伤组织状态、诱导愈伤组织分化起着重要作用。在离体培养过程,外植体诱导的启动是外植体能否进行脱分化的关键步骤,在这一过程中,DNA 甲基化变异对于诱导一些基因的活化起着重要的作用,不同材料之间,由于对激素的敏感程度不同,其甲基化变异程度也不同,意味着 DNA 甲基化变化本身也受到激素的调控。在愈伤组织维持和分化过程中,DNA 甲基化同样影响着一些基因的表达。另外一方面,在植物离体培养过程中的 DNA 甲基化变异也有可能产生无性系变异的产生。植物离体培养过程中产生的体细胞无性系变异原因十分复杂,既有遗传变异,也有表观遗传变异,以 DNA 甲基化变异为主的表观遗传变异在植物离体培养过程中扮演着重要角色。目前的研究对于离体培养各阶段的培养物和再生植株的 DNA 甲基化变化的水平和模式进行了研究,也获得一些进展,但对于离体培养过程中 DNA 甲基化产生及变化过程的分子机制还缺乏深入的研究;此外,在植物离体培养过程中产生表型变异、遗传变异和表观遗传变异,三者之间的相互关系还待进一步研究。

参考文献

- [1] Bender J. Plant epigenetics[J]. *Current Biol*,2002,12:412-414
- [2] Chan S W, Henderson I R, Jacobsen S E. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nat Rev Genet*, 2005,6:351-360
- [3] 陈建敏,孙德兰. 淀粉质体遗传研究的现状与展望[J]. *植物遗传资源学报*,2008,9(2):258-262
- [4] Vanyushin B F. DNA methylation and epigenetics[J]. *Russian J Genet*,2006,42(9):1186-1199
- [5] Valledor L, Hasbun R, Meijon M, et al. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*,2007,91:75-86
- [6] Larkin P J, Scowcroft W R. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement [J]. *Theor Appl Genet*,1981,60(4):197-214
- [7] Kaeppeler S M, Kaeppeler H F, Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 43: 179-188
- [8] Ng H H, Bird A P. DNA methylation and chromatin modification [J]. *Curr Opin Genet Dev*,1999,9:158-163
- [9] Kakutani T, Munakata K, Richards E J, et al. Inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics*,1999,151:831-838
- [10] Mette M F, Aufsatz A, Winden J V, et al. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double stranded RNA [J]. *EMBO J*,2000,19:5194-5201
- [11] Wagner I, Capesius I. Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography [J]. *Biochim Biophys Acta*,1981,654(1):52-56
- [12] Montero L M, Filipski J, Gil P, et al. The distribution of 5-methylcytosine in the nuclear genome of plants [J]. *Nucleic Acids Res*, 1992,20(12):3207-3210
- [13] Finnegan E J, Peacock W J, Dennis E S. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1996,93:8449-8454
- [14] Zilberman D, Gehring M, Tran R K, et al. Genome wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription [J]. *Nat Genet*, 2007,39:61-69
- [15] Pavlopoulou A, Kossida S. Plant cytosine-5 DNA methyltransferases: Structure, function, and molecular evolution [J]. *Genomics*, 2007,90:530-541
- [16] Steward N, Ito M, Yamaguchi Y, et al. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress [J]. *Biol Chem*,2002,277(40):37741-37746
- [17] Barteel L, Malignac F, Bender J. *Arabidopsis cmt3* chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene [J]. *Genes Dev*,2001,15:1753-1758
- [18] Goll M G, Kirpekar F, Maggert K A, et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt 2 [J]. *Science*,2006,311:395-398
- [19] 沈佳尧,侯鹏,祭美菊,等. DNA 甲基化方法研究现状 [J]. *生命的化学*,2003,23(2):149-151
- [20] Fruhwald M C, Plass C. Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumorigenesis and clinical potential [J]. *Mol Genet Metab*,2002,75(1):1-16
- [21] Rush L, Plass C. Restriction landmark genomic scanning for DNA methylation in cancer: past, present, and future applications [J]. *Anal Biochem*,2002,307(2):191-201
- [22] Taron M, Rosell R, Felip E, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer [J]. *Hum Mol Genet*,2004,13(20):2443-2449
- [23] Xiong L Z, Xu C G, Saghai M M, et al. Patterns of cytosine methylation

- lation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification poly-morphism technique [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 261:439-446
- [24] Bardin M, Labra M, Winfield M, et al. Antibiotic-induced DNA methylation changes in calluses of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2003, 72:157-162
- [25] Xu M L, Li X Q, Korban S S. DNA-methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109:899-910
- [26] Arnholdt-Schmitt B. Physiological aspects of genome variability in tissue culture. II. Growth phase-dependent quantitative variability of repetitive BstNI fragments of primary cultures of *Daucus carota* L [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91:816-823.
- [27] Müller E, Brown P T H, Hartke S, et al. DNA variation in tissue-culture-derived rice plants [J]. *Theor Appl Genet*, 1990, 80:673-679
- [28] Steward N, Kusano T, Sano H. Expression of ZmMET1, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28, 3250-3259
- [29] 李丽琴, 付春华, 赵春芳, 等. 红豆杉脱分化过程中的遗传和表观遗传变异 [J]. *植物生理学通讯*, 2009, 45(6):544-548
- [30] Trejgell A, Dabrowska G, Tretny A. In vitro regeneration of *Carlina acaulis* subsp. *Simplex* from seedling explants [J]. *Acta Physiol Plant*, 2009, 31:445-453
- [31] 丁明丽. 小麦成熟胚脱分化过程的 DNA 甲基化研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2008:34-41
- [32] Cassells A C, Curry R F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2001, 64:145-157
- [33] Peredo E L, Arroyo-García R, Revilla M Á. Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants [J]. *Plant Physiol*, 2009, 166:1101-1111
- [34] Li X Q, Xu M L, Schuyler S K. DNA methylation profiles differ between field- and in vitro-grown leaves of apple [J]. *J Plant Physiol*, 2002, 159:1229-1234
- [35] Smykal P, Valledor L, Rodriguez R, et al. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26:1985-1998
- [36] von Aderkas P, Bonga J. In Silencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment [J]. *Tree Physiol*, 2000, 20:921-928
- [37] Thorpe T A. In vitro embryogenesis in plant [M]. the Netherlands: kluwer Academic publishers, 1995:267-283
- [38] 郝玉金, 邓秀新. 逆境处理和 DNA 甲基化影响柑橘体细胞胚发生 [J]. *植物学报*, 2002, 44(6):673-677
- [39] Chakrabarty D, Yu K W, Paek K Y. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) [J]. *Plant Sci*, 2003, 165:61-68
- [40] Henry Y, Vain P, De Buyser J. Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities [J]. *Euphytica*, 2004, 79:45-58
- [41] Smulders M J M, Rus-Kortekaas W, Vosman B. Tissue culture-induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91:1257-1264
- [42] Parra R, Pastor M T, Pérez-Payá E, et al. Effect of in vitro shoot multiplication and somatic embryogenesis on 5-methylcytosine content in DNA of *Myrtus communis* L. [J]. *Plant Growth Regul*, 2001, 33:131-136
- [43] Kaepler S M, Phillips R L. Tissue culture induced DNA methylation variation in maize [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:8773-8776
- [44] Quemada H, Roth E J, Lark K G. Changes in methylation of tissue cultured soybean cells detected by digestion with the restriction enzymes HpaII and MspI [J]. *Plant cell reports*, 1987, 6:63-66
- [45] Matthes M, Singh R, Cheah S C, et al. Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 104:971-979
- [46] Gillis K, Gielis J, Peeters H, et al. Somatic embryogenesis from mature *Bambusa balcooa* Roxburgh as basis for mass production of elite forestry bamboos [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2007, 91:115-123
- [47] Peraza-Echeverría S, Herrera-Valencia V A, Kay A. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. *Plant Sci*, 2001, 161(2):359-367
- [48] Loschivo F, Pitto L, Giulilano G, et al. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variation as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs [J]. *Theor Appl Genet*, 1989, 77:325-331
- [49] Causevic A, Delaunay A, Ounnar S, et al. DNA methylation and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43:681-691
- [50] Vlasova T I, Demidenko Z N, Kirnos M D, et al. In vitro DNA methylation by wheat nuclear cytosine DNA methyltransferase: effect of phytohormones [J]. *Gene*, 1995, 157:279-281
- [51] 李浚明, 朱登明. 植物组织培养教程 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005:72-73
- [52] Salajova T, Salaj J, Kormutak A. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn [J]. *Plant Sci*, 1999, 145:33-40
- [53] 黄璐, 卫志明. 不同基因型玉米的再生能力和胚性与非胚性愈伤组织 DNA 的差异 [J]. *植物生理学报*, 1999, 25(4):332-338
- [54] Fraga M F, Rodriguez R, Canal M J. Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata* [J]. *Tree Physiol*, 2002, 22:813-816
- [55] Kovarik A, Koukalova B, Bezdek M, et al. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95:301-306
- [56] Berdasco M, Alcázar R, García-Ortiz MV, et al. Promoter DNA Hypermethylation and Gene Repression in Undifferentiated *Arabidopsis* Cells [J]. *PLoS One*, 2008, 3(10):1-10
- [57] Bender J. DNA methylation and epigenetics [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 2004, 55:31-68
- [58] Shitsukawa N, Tahira C, Kassai K, et al. Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat [J]. *Plant Cell*, 2007, 19:1723-1737
- [59] Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, et al. Autonomous Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:7783-7788
- [60] Okamoto H, Hirochika H. Silencing of transposable elements in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6:527-534
- [61] Liu Z L, Tan P, Shan X H, et al. Activation of a rice endogenous retrotransposon Tos17 in tissue culture is accompanied by cytosine demethylation and causes heritable alteration in methylation pattern of flanking genomic regions [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109:200-209
- [62] Cheng C Y, Daigen M, Hirochika H. Epigenetic regulation of the rice retrotransposon Tos17 [J]. *Mol Gen Genom*, 2006, 276:378-390
- [63] Jeddeloh J A, Stokes T L, Richards E J. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein [J]. *Nature Genet*, 1999, 22:94-97

作者: 陈兆贵, 黄学林, CHEN Zhao-gui, HUANG Xue-lin
作者单位: 陈兆贵, CHEN Zhao-gui (惠州学院生命科学系, 惠州516007; 中山大学生命科学院/教育部基因工程重点实验室, 广州510275), 黄学林, HUANG Xue-lin (中山大学生命科学院/教育部基因工程重点实验室, 广州, 510275)
刊名: 植物遗传资源学报 
英文刊名: Journal of Plant Genetic Resources
年, 卷(期): 2011, 12(4)

参考文献(63条)

1. Vlasova T I; Demidenko Z N; Kirnos M D In vitro DNA methylation by wheat nuclear cytosine DNA methyltransferase: effect of phytohormones 1995
2. Causevic A; Delaunay A; Önnar S DNA methylation and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines 2005
3. 黄璐; 卫志明 不同基因型玉米的再生能力和胚性与非胚性愈伤组织DNA的差异 1999(04)
4. Salajova T; Salaj J; Kormutak A Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of Pinus nigra Arn 1999
5. 李浚明; 朱登明 植物组织培养教程 2005
6. Loschiavo F; Pitto L; Giulilano G DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variation as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs 1989
7. Peraza-Echeverria S; Herrera-Valencia V A; Kay A Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) 2001(02)
8. Gillis K; Gielis J; Peeters H Somatic embryogenesis from mature Bambusa balcooa Roxburgh as basis for mass production of elite forestry bamboos 2007
9. Matthes M; Singh R; Cheah S C Variation in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes 2001
10. Quemada H; Roth E J; Lark K G Changes in methylation of tissue cultured soybean cells detected by digestion with the restriction enzymes HpaII and MspI 1987
11. Jeddalo J A; Stokes T L; Richards E J Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein 1999
12. Cheng C Y; Daigen M; Hirochika H Epigenetic regulation of the rice retrotransposon Tos17 2006
13. Liu Z L; Tan P; Shan X H Activation of a rice endogenous retrotransposon Tos17 in tissue culture is accompanied by cytosine demethylation and causes heritable alteration in methylation pattern of flanking genomic regions 2004
14. Okamoto H; Hirochika H Silencing of transposable elements in plants 2001
15. Hirochika H; Sugimoto K; Otsuki Y Autonomous Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture 1996
16. Shitsukawa N; Tahira C; Kassai K Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat 2007
17. Bender J DNA methylation and epigenetics 2004
18. Berdasco M; Alcázar R; García-Ortiz MV Promoter DNA Hypermethylation and Gene Repression in Undifferentiated Arabidopsis Cells 2008(10)
19. Kovarik A; Koukalova B; Bezdek M Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress 1997
20. Fraga M F; Rodriguez R; Canal M J Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of Pinus radiata 2002

21. [Kaeppeler S M;Phillips R L Tissue culture induced DNA methyl- ation variation in maize 1993](#)
22. [Peredo E L;Arroyo-García R;Revilla M\(A\) Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants 2009](#)
23. [Cassells A C;Curry R F Oxidative stress and physiological, epi genetic and genetic variability in plant tissue culture:implications for micropropagators and genetic engineers 2001](#)
24. [丁明丽 小麦成熟胚脱分化过程的DNA甲基化研究 2008](#)
25. [Parra R;Pastor M T;Pérez-PayóE Effect of in vitro shoot multiplication and somatic embryogenesis on 5-methylcytosine content in DNA of Myrtus communis L 2001](#)
26. [Smulders M J M;Rus-KortekaasW;Vosman B Tissue culture-in-duced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants 1995](#)
27. [Henry Y;Vain P;De Buyser J Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities 2004](#)
28. [Chakrabarty D;Yu K W;Paek K Y Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng\(Eleutherococcus senticosus\) 2003](#)
29. [郝玉金;邓秀新 逆境处理和DNA甲基化影响柑橘体细胞胚发生 2002\(06\)](#)
30. [Thorpe T A In vitro embryogenesis in plant 1995](#)
31. [von Aderkas P;Bonga J In Silencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment 2000](#)
32. [Smykal P;Valledor L;Rodriguez R Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea \(Pisum sativum L.\) 2007](#)
33. [Li X Q;Xu M L;Schuyler S K DNA methylation profiles differ between field-and in vitro-grown leaves of apple 2002](#)
34. [Treggell A;Dabrowska G;Tretyn A In vitro regeneration of Calluna acaulis subsp.Simplex from seedling explants 2009](#)
35. [李丽琴;付春华;赵春芳 红豆杉脱分化过程中的遗传和表观遗传变异 2009\(06\)](#)
36. [Steward N;Kusano T;Sano H Expression of ZmMET1, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells 2000](#)
37. [Miiller E;Brown P T H;Hartke S DNA variation in tissue-culture-derived rice plants 1990](#)
38. [Arnholdt-Schmitt B Physiological aspects of genome variability in tissue culture. II. Growth phase-dependent quantitative variability of repetitive BstNI fragments of primary cultures of Daucus carota L 1995](#)
39. [Xu M L;Li X Q;Korban S S DNA-methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose\(Rosa hybrida L.\) 2004](#)
40. [Bardini M;Labra M;Winfield M Antibiotic-induced DNA methylation changes in calluses of Arabidopsis thaliana 2003](#)
41. [Xiong L Z;Xu C G;Saghai M M Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique 1999](#)
42. [Taron M;Rosell R;Felip E BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer 2004\(20\)](#)
43. [Rush L;Plaas C Restriction landmark genomic scanning for DNA methylation in cancer: past, present, and future applications 2002\(02\)](#)
44. [Fruhwald M C;Pliss C Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumorbiology and clinical potential 2002\(01\)](#)
45. [沈佳尧;侯鹏;祭美菊 DNA甲基化方法研究现状 2003\(02\)](#)
46. [Goll M G;Kirpekar F;Maggert K A Methylation of tRNA Asp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt 2 2006](#)
47. [Bartee L;Malagnac F;Bender J Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing](#)

of an endogenous gene 2001

48. Steward N; Ito M; Yamaguchi Y Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress 2002(40)
49. Pavlopoulou A; Kossida S Plant cytosine-5 DNA methyltransferases: Structure, function, and molecular evolution 2007
50. Zilberman D; Gehring M; Tran R K Genome wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription 2007
51. Finnegan E J; Peacock W J; Dennis E S Reduced DNA methylation in Arabidopsis thaliana results in abnormal plant development 1996
52. Montero L M; Filipinski J; Gil P The distribution of 5-methylcytosine in the nuclear genome of plants 1992(12)
53. Wagner I; Capesius I Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography 1981(01)
54. Mette M F; Aufsatz A; Winden J V Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double stranded RNA 2000
55. Kakutani T; Munakata K; Richards E J Inheritance of DNA hypomethylation induced by ddm1 mutation of Arabidopsis thaliana 1999
56. Ng H H; Bird A P DNA methylation and chromatin modification 1999
57. Kaeppeler S M; Kaeppeler H F; Rhee Y Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants 2000
58. Larkin P J; Scowcroft W R Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement 1981(04)
59. Valledor L; Hasbun R; Meijon M Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation 2007
60. Vanyushin B F DNA methylation and epigenetics 2006(09)
61. 陈建敏; 孙德兰 淀粉质体遗传研究的现状与展望 2008(02)
62. Chan S W; Henderson I R; Jacobsen S E Gardening the genome: DNA methylation in Arabidopsis thaliana 2005
63. Bender J Plant epigenetics 2002

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201104015.aspx