

基于 ISSR 分子标记技术的山核桃 幼胚 DNA 甲基化初步研究

李顺福, 胡恒康, 张秋露, 徐艳玲, 张启香

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: 用简单序列重复区间扩增(inter-simple sequence repeat, ISSR) DNA 分子标记技术对山核桃 *Carya cathayensis* 不同发育阶段幼胚(第 9 周至 13 周)的 DNA 进行甲基化状态检测。结果表明: 17 个引物在各个发育时期山核桃幼胚样品中共扩增检测到的 128 个甲基化位点。甲基化比例随着幼胚的发育逐渐升高, 5 个时期幼胚甲基化比例依次为 23.44%, 25.78%, 28.90%, 40.62%和 42.19%。进一步研究表明: 5 个时期均存在全甲基化位点和半甲基化位点, 其中, 全甲基化位点所占比例分别为 7.81%, 8.59%, 16.40%, 24.22%和 25.00%; 半甲基化位点所占分别为 15.62%, 17.19%, 12.50%, 16.41%, 17.19%。因此, 山核桃幼胚 5 个发育时期在基因组 DNA 甲基化水平上存在着较大差异($P<0.01$)。图 3 表 5 参 21

关键词: 经济林学; 山核桃; 幼胚; ISSR; DNA 甲基化

中图分类号: S664.1 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2014)04-0521-07

ISSR analysis of DNA methylation variety on immature embryos of *Carya cathayensis*

LI Shunfu, HU Hengkang, ZHANG Qiulu, XU Yanling, ZHANG Qixiang

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To evaluation the methylation status of different immature embryo stages of *Carya cathayensis*, DNA methylation variety was detected on immature embryos of *Carya cathayensis*, and an inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis was performed to reveal the DNA methylation in five developmental stages of immature embryos (9 – 13 weeks post pollination). Results revealed 128 bands obtained from 17 primers. With development of the immature embryos, the methylation percentage from 9 to 13 weeks post pollination increased gradually from 23.4% to 25.8%, 28.9%, 40.6%, and then 42.2%. Also, total DNA methylation (7.8%, 8.6%, 16.4%, 24.2%, and 25.0%) and half DNA methylation (15.6%, 17.2%, 12.5%, 16.4%, and 17.2%) existed. Thus, there was DNA methylation variety with the development of the immature embryos of *Carya cathayensis* ($P<0.01$). [Ch, 3 fig. 5 tab. 21 ref.]

Key words: cash forestry; *Carya cathayensis*; immature embryos; ISSR; DNA methylation

山核桃 *Carya cathayensis* 是果木兼用的优良经济树种, 主要分布在浙皖交界的天目山区^[1]。目前, 山核桃主要采用实生苗繁殖与嫁接繁殖。实生苗繁殖难以保持品种的优良特性^[2]。山核桃体细胞胚具有

收稿日期: 2013-11-27; 修回日期: 2013-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31100461); 浙江省自然科学基金资助项目(Y3090091)

作者简介: 李顺福, 从事分子生物学研究。E-mail: nuannuanxx@163.com。通信作者: 张启香, 副教授, 博士, 从事植物发育生物学等研究。E-mail: qixiangzh@163.com

完整的两极结构,能一次再生形成完整植株^[3]。因为生产对良种苗木的需要,山核桃的离体繁殖技术已得到了较深入的研究^[4]。表观遗传是指在 DNA 序列不改变的情况下发生的可遗传的基因表达改变,DNA 甲基化是表观遗传修饰的一种方式^[5],是指在 DNA 甲基转移酶催化下以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,将甲基转移到胞嘧啶上形成 5-甲基胞嘧啶,不改变 DNA 一级结构对基因序列进行修饰而影响基因的表达,影响其功能,这种甲基修饰主要发生在 CpG 双核苷酸序列的胞嘧啶上^[6]。已有众多证据表明:DNA 甲基化参与了植物不同发育阶段的生长调控^[7]。研究发现,以山核桃幼胚为外植体进行体胚诱导,不同发育时期幼胚胚性感受态差异较大,其中自然授粉后 8~10 周可诱导产生愈合组织,11~12 周可从幼胚子叶表面直接诱导产生体细胞胚^[8]。山核桃不同程度胚性感受态是否由于不同发育时期幼胚基因组表观遗传的变化引起,尚未见相关研究报道。本研究应用简单序列重复区间扩增(inter-simple sequence repeat, ISSR) DNA 分子标记技术对山核桃幼胚生长过程中 DNA 甲基化变化动态进行研究,揭示山核桃幼胚发育过程中甲基化变化规律,以期对建立高效的山核桃体细胞胚发生体系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

7 月上旬于浙江省临安市板桥乡罗塘村采集自然授粉后 9,10,11,12,13 周的山核桃幼果(分别以样本第 9 周,第 10 周,第 11 周,第 12 周,第 13 周代替)。将幼果带回实验室中剪去花柱及柱头,洗涤剂洗净表面后,用体积分数为 75%乙醇涮洗 30 s,自来水冲洗干净,于超净工作台上去除果皮和种皮后取出完整的幼胚,提取基因组 DNA。

1.2 实验方法

1.2.1 山核桃幼胚 DNA 的提取 用改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取实验材料的基因组 DNA^[9]。

1.2.2 哥伦比亚大学(UBC)公布的引物的筛选 用提取的不同时期培养的山核桃幼胚的一组 DNA 为模版,所用引物参照加拿大哥伦比亚大学网站公布的第 9 套 ISSR 引物序列,对 100 个引物进行筛选,选取扩增条带多而清晰、分离度高的引物。本实验共筛选出共 17 个引物,分别是:UBC808,809,815,816,817,822,825,827,830,834,840,855,858,862,867,888,889。17 个引物序列如表 1。

1.2.3 DNA 酶切 取 5 个不同时期培养得幼胚 DNA 样品,分别用 *Hap* II 和 *MSP* I 等 2 种酶切,反应体系为 30 μ L,所用 DNA 质量浓度为 50 mg·L⁻¹,为了使酶切完全,加入 3 倍完全酶切的用量,酶切过夜后在 65 $^{\circ}$ C 水浴锅 10 min 使酶失活。

1.2.4 ISSR-PCR 建立 分别以各个材料未酶切, *Hap* II 和 *MSP* I 等 2 种酶切的基因组 DNA 为模版,以筛选的 17 个 UBC 引物进行聚合酶链式反应(PCR)。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 适温退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物用质量分数为 20.0 g·kg⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测^[10]。

1.2.5 山核桃幼胚基因组 DNA 甲基化水平分析 *Msp* I 和 *Hap* II 对相同酶切位点甲基化的敏感程度不同以及 ISSR 是显性标记是分析甲基化变异的理论基础^[11]。同裂酶 *Msp* I 和 *Hpa* II 的酶切位点均为“CCGG/GGCC”,由于两者对该位点胞嘧啶甲基化的敏感程度不同,经 PCR 反应扩增多态性片段就反映出该位点的甲基化状态及程度。*Msp* I 能切割无甲基化和内甲基化位点而不能切割外甲基化位点, *Hpa*

表 1 筛选的引物序列

Table 1 Primers for ISSR

引物	序列	引物	序列
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT
815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	858	TGT GTG TGT GTG TGT GRT
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	867	GGC GGC GGC GGC GGC GGC
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	888	BDB CAC ACA CAC ACA CA
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	889	DBD ACA CAC ACA CAC A
830	TGT GTG TGT GTG TGT GG		

说明: N = (A, G, C, T), R = (A, G), Y = (C, T), B = (C, G, T) (I. e. not A), D = (A, G, T) (I. e. not C), H = (A, C, T) (I. e. not G), V = (A, C, G) (I. e. not T)。

Ⅱ能切割无甲基化和单链甲基化(双链中只有链甲基化)而不能切割双链甲基化^[12]。因而 DNA 分别用 *Msp* I 和 *Hpa*Ⅱ酶切后选扩，根据带型的有无可能出现 4 种甲基化类型，Ⅰ型：都有带，代表该位点存在外侧胞嘧啶全(双链)甲基化或无 CCGG 位点；Ⅱ型：都无带，代表该 CCGG 位点无甲基化或为内侧胞嘧啶半(单链)甲基化；Ⅲ型：*Hpa*Ⅱ有带而 *Msp* I 无带，代表该位点为内侧胞嘧啶半(双链)甲基化；Ⅳ型：*Hpa*Ⅱ无带而 *Msp* I 有带，代表该位点为外侧胞嘧啶半(单链)甲基化。由表 2 可知：Ⅲ型为全甲基化，

表 2 ISSR 未酶切和甲基化敏感酶 *Hpa*Ⅱ和 *Msp* I 酶切产生的条带类型

类 型	甲 基 化 程 度	内切酶活性		限制性条带		
		<i>Hpa</i> Ⅱ	<i>Msp</i> I	未酶切	H 酶切	M 酶切
Ⅰ	无 CCGG 位点 或 ^{5m} CCGG GGCC ^{5m}	无活性	无活性	+	+	+
Ⅱ	CCGG 或 C ^{5m} CCGG GGCC GGCC	有活性	有活性	+	-	-
Ⅲ	C ^{5m} CCG GGC ^{5m} C	无活性	有活性	+	+	-
Ⅳ	^{5m} CCGG CCGG	有活性	无活性	+	-	+

Ⅳ型为半甲基化，但Ⅰ型和Ⅱ型的全/半甲基化状态仅根据条带位点还不确定，需进一步根据不同时期同一引物的同一位点条带差异来判断胞嘧啶全/半甲基化变异(表 3)。

2 结果与分析

2.1 山核桃幼胚不同发育时期对 DNA 甲基化类型的影响

17 个引物在各个发育时期山核桃幼胚样品中共扩增检测到的 128 个甲基化位点。5 个时期幼胚甲基化比例依次为 23.44%，25.78%，28.90%，40.62%和 42.19%。甲基化比例随着胚的发育逐渐升高。研究结果同时表明，5 个时期幼胚甲基化类型较丰富，4 种甲基化类型均存在(图 1-1~4)。由表 4 可知：在 17 个引物中，引物 809 扩增位点数最多，为 11 个，其中，第 9 周的Ⅰ~Ⅳ类型的扩增位点数分别为 7，4，0，0；第 10 周的Ⅰ~Ⅳ类型的位点数分别为 7，4，0，0；第 11 周的Ⅰ~Ⅳ型的位点数分别为 7，4，0，0；第 12 周的Ⅰ~Ⅳ型的位点数分别为 6，4，1，0；第 13 周的Ⅰ~Ⅳ型的位点数分别为 6，4，1，0。图 2 表明：

随着幼胚的发育，4 种 DNA 甲基化类型呈现规律性变化。第 1 种类型位点数最多，从第 9 周至 13 周 DNA 甲基化类型Ⅰ呈逐渐上升趋势，而Ⅳ型呈逐渐下降趋势；但在Ⅱ型、Ⅲ型中，各发育阶段变化相对平稳(图2)。

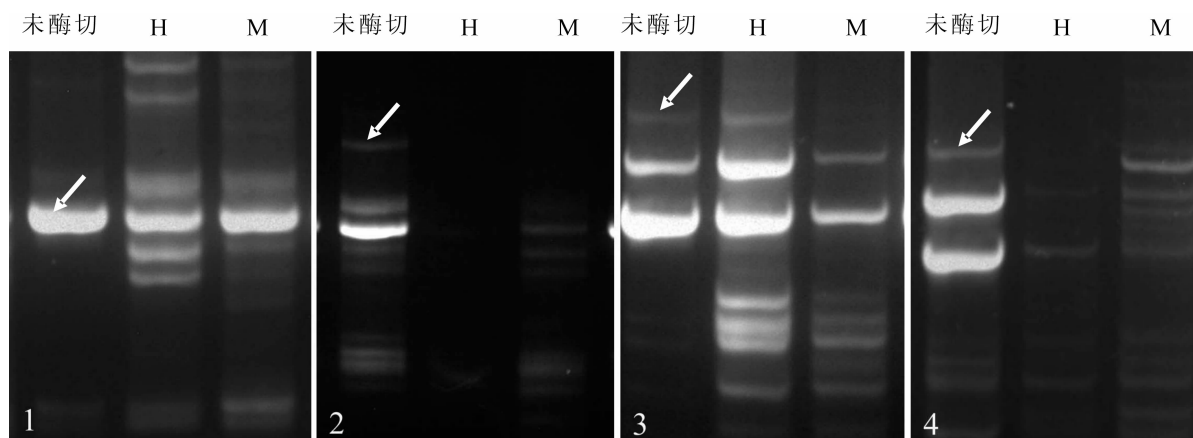
2.2 山核桃幼胚不同发育时期对胞嘧啶全/半甲基化变异的影响

进一步分析表明：5 个时期均存在全甲基化位点和半甲基化位点。5 个时期全甲基化位点数分别为 10，11，21，31，32，所占比例分别为 7.81%，8.59%，16.40%，24.22%和 25.00%；5 个时期半甲基化位点数分别为 20，22，16，21，22，所占比例分别为 15.62%，17.19%，12.50%，16.41%，17.19%。由此可知：山核桃幼胚 5 个发育时期在基因组 DNA 甲基化水平上存在着较大差异，不同时期幼胚之间基因组 DNA 全/半甲基化位点的绝对数量和相对数量都有不同程度的改变。尽管总甲基化

表 3 Ⅰ型和Ⅱ型甲基化状态判断标准

Table 3 DNA methylation of type I and type II		
条带类型变化		甲基化状态变化
Ⅰ →	Ⅱ	甲基化减少，Ⅰ为全甲基化变为Ⅱ为半甲基化
	Ⅲ	甲基化减少，Ⅰ为全甲基化
	Ⅳ	甲基化减少，Ⅰ为全甲基化
Ⅱ →	Ⅰ	甲基化增加，Ⅱ为半甲基化变成Ⅰ全甲基化
	Ⅲ	甲基化增加，Ⅱ为半甲基化
	Ⅳ	甲基化增加，Ⅱ为半甲基化
Ⅲ →	Ⅰ	甲基化增加，Ⅲ为全甲基化
	Ⅱ	甲基化减少，Ⅲ为半甲基化
	Ⅳ	甲基化变化情况不定
Ⅳ →	Ⅰ	甲基化增加，Ⅳ为全甲基化
	Ⅱ	甲基化减少，Ⅳ为半甲基化
	Ⅲ	甲基化变化情况不定

比例及全甲基化位点比例随着胚龄的增加而逐渐升高;半甲基化位点所占比例呈小幅波动并基本持平状态(表 5)。



1. 第 I 类: 都有带, 代表该位点存在外侧胞嘧啶全(双链)甲基化或无CCGG位点(引物888, 第12周幼胚);
2. 第 II 类: 都无带, 代表该CCGG位点无甲基化或为内侧胞嘧啶半(单链)甲基化(引物827, 第12周幼胚);
3. 第 III 类: *Hpa*II 有带而 *Msp* I 无带, 代表该位点为内侧胞嘧啶半(双链)甲基化(引物888, 第11周幼胚);
4. 第 IV 类: *Hpa*II 无带而 *Msp* I 有带, 代表该位点为外侧胞嘧啶半(单链)甲基化(引物825, 第10周幼胚)。

图 1 山核桃幼胚不同发育时期的 DNA 甲基化类型

Figure 1 DNA methylation band types of different development stages of immature embryos of *Carya cathayensis*

3 讨论

DNA 甲基化是植物正常生长发育所必需的, 但是甲基化水平不足, 也会导致不正常生长^[13]。在高等植物基因组中, DNA 甲基化在发育过程中处于一个动态的变化之中, 同一物种在不同的发育时期, 甲基化水平会发生变化, 而且不同植物的变化趋势是不一样的^[14]。越来越多的试验结果表明, DNA 甲基化对植物正常发育起重要作用。对某些植物的研究发现: 如果在基因组的重要位点上诱导产生或自然发生 DNA 甲基化的变异, 就会引起广泛的发育异常现象^[15]。油菜 *Brassica campestris* 种子在萌发时伴随着大量的去甲基化事件, 导致甲基化水平的降低^[16]。在同一植株的同一发育时期在不同组织中, DNA 甲基化也有所差异, 研究发现水稻 *Oryza sativa* 在幼苗时期的甲基化水平高于旗叶^[17]。在不同的植物之间, 同源的 DNA 序列的甲基化水平差异也非常明显, 对 11 个不同被子植物的 25S rDNA 的甲基化研究发现, 这些物种的甲基化水平差异较大, 其中拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 低至 4%, 而豌豆 *Pisum sativum* 和洋葱 *Allium cepa* 高达 80% 和 90%^[18]。前人的研究资料表明^[19], 植物在发育过程中, 胞嘧啶的甲基化对基因具有重要的表达调控作用, 在基因的内部或邻近区域发生甲基化可以抑制这些基因的表达, 而去甲基化后又可以激活基因的表达。

本研究用适当的 PCR 扩增反应从 100 个 ISSR 引物中筛选了 17 个引物, 选择引物的标准是它们能产生和再次产生清晰的、多态性丰富的扩增产物(图 3)。在 5 个时期山核桃幼胚中, 17 条 ISSR 标记共产生了 128 个扩增条带。研究结果表明: 5 个发育时期山核桃发生了不同程度的甲基化模式和水平的变化, 如 DNA 甲基化比例随着幼胚的发育逐渐升高, 暗示部分基因正在关闭。同时, 对于这些基因而言, 去甲基化可能是基因进一步表达的必须步骤。这似乎表明: 植物通过 DNA 甲基化和去甲基化的方式实现基因的有序表达^[20]。根据全/半胞嘧啶甲基化均被观察到的结果, 我们推测甲基化变异可能与幼胚成

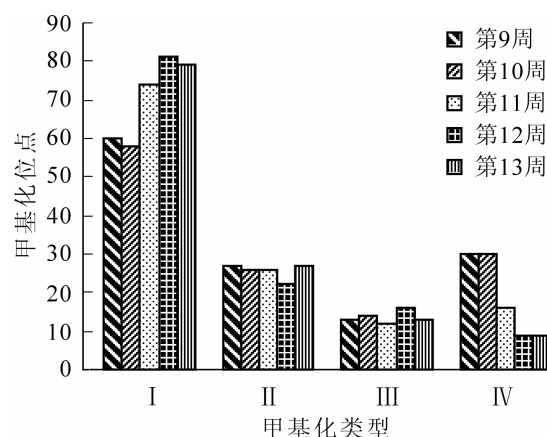


图 2 发育时期对山核桃幼胚甲基化类型的影响

Figure 2 Effect of development stage on DNA methylation types of immature embryos of *Carya cathayensis*

表 4 ISSR 在不同发育阶段幼胚的 DNA 甲基化类型统计

Table 4 DNA methylation types on different development stages of immature embryos of ISSR

引物	扩增位点	第 9 周				第 10 周				第 11 周				第 12 周				第 13 周			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
808	7	6	0	1	0	5	1	1	0	6	1	0	0	6	0	0	1	6	1	0	0
809	11	7	4	0	0	7	4	0	0	7	4	0	0	6	4	1	0	6	4	1	0
815	7	1	4	0	2	2	4	0	1	2	4	0	1	6	1	0	0	5	2	0	0
816	5	3	0	0	2	3	0	0	2	3	0	0	2	3	0	0	2	3	0	0	2
817	8	3	0	0	5	3	0	0	5	3	0	0	5	5	0	0	3	5	0	0	3
822	9	5	3	1	0	5	3	1	0	5	4	0	0	5	4	0	0	5	4	0	0
825	8	3	0	0	5	3	0	0	6	6	0	2	0	6	0	2	0	6	0	2	0
827	9	1	2	0	6	1	2	0	6	6	1	1	1	5	1	0	3	5	3	0	1
830	6	4	2	0	0	4	2	0	0	4	2	2	0	5	1	0	0	5	1	0	0
834	7	3	2	0	2	3	2	0	2	3	2	0	2	3	2	0	2	4	2	0	1
840	9	5	2	2	0	5	2	2	0	5	2	2	0	6	3	0	0	6	3	0	0
855	6	1	1	1	3	2	1	0	3	1	1	1	3	2	1	0	3	3	0	0	3
858	9	4	3	2	0	4	3	2	0	4	3	2	0	5	3	1	0	6	3	0	0
862	6	2	2	1	1	5	0	0	1	5	0	1	0	2	2	1	1	4	1	1	0
867	6	5	1	0	0	5	1	0	0	5	1	0	0	5	0	1	0	5	1	0	0
888	7	3	1	0	3	4	0	0	3	6	1	0	0	6	1	0	0	7	0	0	0
889	8	3	0	0	5	3	0	0	5	7	0	1	0	7	0	1	0	7	0	1	0
总计	128	59	27	14	30	60	25	13	30	74	26	12	16	79	23	17	9	81	25	13	9
甲基化比例/%					23.44				25.78				28.90				40.62				42.19

表 5 ISSR 在不同发育阶段幼胚的胞嘧啶甲基化变异位点统计

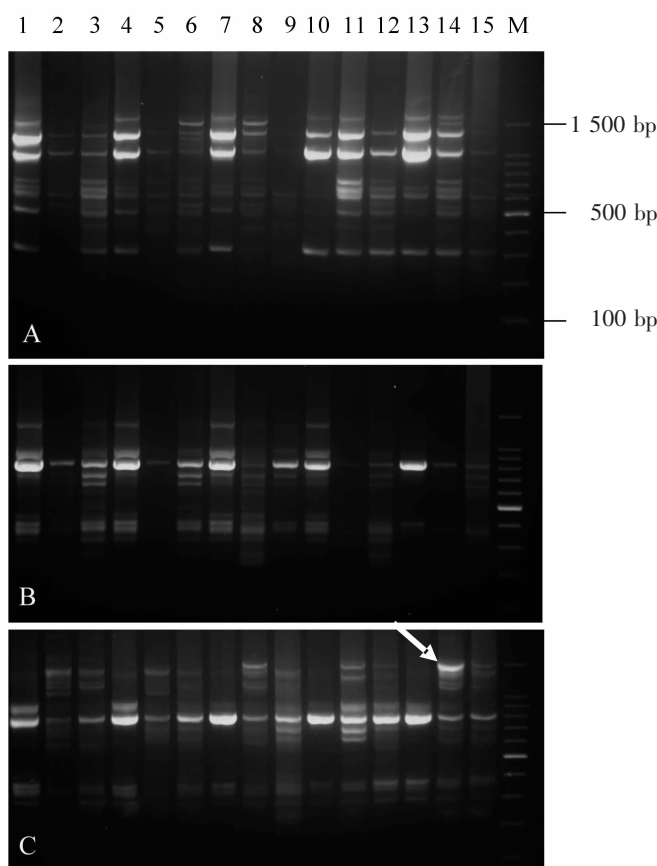
Table 5 Total/half DNA methylation on different development stages of ISSR

引物	扩增位点	第 9 周		第 10 周		第 11 周		第 12 周		第 13 周	
		全甲基化位点	半甲基化位点	全甲基化位点	半甲基化位点	全甲基化位点	半甲基化位点	全甲基化位点	半甲基化位点	全甲基化位点	半甲基化位点
808	7	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
809	11	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
815	7	0	2	1	1	1	1	3	1	4	1
816	5	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
817	8	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0
822	9	2	0	2	0	2	1	2	1	2	1
825	8	0	3	0	3	3	0	4	0	4	0
827	9	2	0	2	0	2	0	2	1	2	1
830	6	0	0	0	0	0	0	2	1	2	1
834	7	0	3	0	3	1	3	1	3	1	3
840	9	2	0	2	0	2	0	2	1	2	1
855	6	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3
858	9	2	0	2	0	2	1	2	1	2	2
862	6	0	1	0	1	1	0	1	3	2	2
867	6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
888	7	0	3	0	3	0	3	1	3	1	3
889	8	0	5	0	5	5	0	5	0	5	0
总计	128	10	20	11	22	21	16	31	21	32	22
甲基化比例/%		7.81	15.62	8.59	17.19	16.40	12.50	24.22	16.41	25.00	17.19
			23.44		25.78		28.90		40.62		42.19

熟的一些重要属性有关。本研究在用 *Msp* I 和 *Hpa* II 酶切 ISSR 图谱和未酶切图谱比较时, 还观察到了一种特殊的现象, 即酶切后出现了未酶切没有的新条带(图 3, 箭头所示)。理论上酶切 ISSR 图谱的出现的条带必然在未酶切 ISSR 图谱中出现, 这种情况可能由于未酶切基因组存在一定的构象造成 PCR 引物结合困难, 酶切后引物可以结合上去^[21]。因此, 尽管本研究已获得山核桃幼胚发育 DNA 甲基化状态的初步结果, 但由于本研究尚未应用特异条带回收并杂交验证, 关于山核桃幼胚不同发育阶段基因表达与基因组 DNA 甲基化以及胚性感受态之间关系还需要进一步探索。

参考文献:

- [1] 郭传友, 黄坚钦, 方炎明. 山核桃研究综述及展望[J]. 经济林研究, 2004, **22**(1): 61 - 63.
GUO Chuanyou, HUANG Jianqin, FANG Yanming. Review and perspective of research on *Carya cathayensis* [J]. *Nonwood For Res*, 2004, **22**(1): 61 - 63.
- [2] 张婷, 张虹. 山核桃青皮化学成分及生物活性研究进展[J]. 食品科技, 2007(5): 116 - 119.
ZHANG Ting, ZHANG Hong. Research progress on chemical compounds of the green peel of *Carya cathayensis* Sarg. and its biological activity [J]. *Food Sci Technol*, 2007(5): 116 - 119.
- [3] ZHANG Qixiang, HU Hengkang, HUANG Jianqin, *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature hickory (*Carya cathayensis* Sarg.) embryos [J]. *Prop Ornament Plants*, 2011, **11**(3): 137 - 143.
- [4] 张启香, 胡恒康, 王正加, 等. 山核桃间接体细胞胚发生和植株再生[J]. 园艺学报, 2011, **38**(6): 1063 - 1070.
ZHANG Qixiang, HU Hengkang, WANG Zhengjia, *et al.* Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration of *Carya cathayensis* [J]. *Acta Horti Sin*, 2011, **38**(6): 1063 - 1070.
- [5] RUSSO V E A, MARTIENSSEN R A, RIGGS A D. *Epigenetics Mechanisms of Gene Regulation* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.
- [6] ZHANG Meishan, KIMATU J N, XU Kezhang, *et al.* DNA cytosine methylation in plant development [J]. *Genet Genomics*, 2010, **37**: 112.
- [7] GEHRING M, HENIKOFF S. DNA methylation dynamics in plant genomes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1769** (5/6): 276 - 286.
- [8] ZHANG Qixiang, HU Hengkang, HUANG Youjun, *et al.* The relationship between developmental stages of zygotic embryos at explanting and embryogenic frequency on hickory (*Carya cathayensis* Sarg.) [J]. *Sci Horti*, 2012, **139**: 66 - 70.
- [9] POREBSKI S, BAILEY L G, BAUM B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1997, **15**(1): 8 - 15.



A, B, C引物分别为825, 840, 888; M: 标记物(100 bp)
1~3分别为未酶切, *Hpa* II, *Msp* I 酶切的第9周幼胚;
4~6分别为未酶切, *Hpa* II, *Msp* I 酶切的第10周幼胚;
7~9分别为未酶切, *Hpa* II, *Msp* I 酶切的第11周幼胚;
10~12分别为未酶切, *Hpa* II, *Msp* I 酶切的第12周幼胚;
13~15分别为未酶切, *Hpa* II, *Msp* I 酶切的第13周幼胚。
图 3 引物分别在山核桃幼胚发育的 5 个时期材料中的扩增结果

Figure 3 Amplification results of immature embryos in five development stages by different ISSR primers

- [10] 李元春, 沈林, 曾燕如. 山核桃 SRAP 体系的建立基及与 RAPD 和 ISSR 标记的比较[J]. 浙江农林大学学报, 2011, **28**(3): 505 – 512.
- LI Yuanchun, SHEN Lin, ZENG Yanru. Establishment of a SRAP analysis protocol in *Carya cathayensis* and a comparison among SRAP, RAPD, ISSR analysis protocols [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2011, **28**(3): 505 – 512.
- [11] 邱英雄, 胡绍庆, 陈跃磊, 等. ISSR-PCR 技术在桂花品种分类中的应用[J]. 园艺学报, 2004, **31**(4): 529 – 532.
- QIU Yingxiong, HU Shaoqing, CHEN Yuelei, *et al.* Studies on cultivar classification of *Osmanthus fragrans* by ISSR-PCR analysis [J]. *Acta Horti Sin*, 2004, **31**(4): 529 – 532.
- [12] XU Mingliang, LI Xiangqian, SCHUYLER S. AFLPbased detection of DNA methylation plant [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2000, **18**(4): 361 – 368.
- [13] FINNEGAN E J, BRETTELL R I, DENNIS E S. The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression [J]. *EXS*, 1993, **64**: 218 – 261.
- [14] RICHARDS E J. DNA methylation and plant development [J]. *Trends Genet*, 1997, **13**(8): 319 – 323.
- [15] CHEN Taiping, LI En. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2004, **60**: 55–89.
- [16] PAN Yajiao, WANG Wensheng, ZHAO Xiuqin, *et al.* DNA methylation alterations of rice in response to cold stress [J]. *Plant Om J*, 2011, **4**(7): 364 – 369.
- [17] OU Xiufang, LONG Likun, ZHANG Ying, *et al.* Spaceflight induces both transient and heritable alterations in DNA methylation and gene expression in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Mutation Res*, 2009, **662**(1/2): 44 – 53.
- [18] JASENCAKOVA Z, SOPPE W J, MEISTER A, *et al.* Histone modifications in *Arabidopsis* high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin [J]. *Plant J*, 2003, **33**(3): 471 – 480.
- [19] ZHANG Jian, NALLAMILI B R, MUJAHID H, *et al.* OsMADS6 plays an essential role in endosperm nutrient accumulation and is subject to epigenetic regulation in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Plant J*, 2010, **64**(4): 604 – 617.
- [20] CAO Xiaofeng, JACOBSEN S E. Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing [J]. *Curr Biol*, 2002, **12**(13): 1138 – 1144.
- [21] PORTIS E, ACQUADRO A, COMINO C, *et al.* Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Cap-sicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. *Plant Sci*, 2004, **166**(1): 169 – 178.