

研究简报

Research Notes

稻曲病菌休眠与非休眠厚垣孢子的 MSAP 分析

李小娟^{1,2}, 李杰^{1,3}, 周瑚^{1,3,4}, 任佐华^{1*}, 刘二明^{1,3,4*}

(1. 湖南农业大学植物保护学院, 长沙 410128; 2. 湖南省植物保护研究所, 长沙 410125;

3. 植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 长沙 410128; 4. 南方粮油作物协同创新中心, 长沙 410128)

摘要 本研究以稻曲病菌 *Ustilaginoidea virens* 黄色(非休眠)厚垣孢子、黑色(休眠)厚垣孢子、厚垣孢子萌发后产生的分生孢子(非休眠)3种孢子为材料,采用DNA甲基化敏感扩增多态性技术对供试材料基因组DNA进行甲基化分析,探究稻曲病菌休眠与非休眠厚垣孢子DNA甲基化的水平和模式。结果显示,3种形态孢子的基因组DNA甲基化水平差异明显,分生孢子基因组DNA中CCGG序列的总甲基化率为20.56%,黑色休眠厚垣孢子为25.63%,黄色非休眠厚垣孢子为33.52%。黄色和黑色的厚垣孢子主要是全甲基化模式,其全甲基化率高于半甲基化率,其中黄色厚垣孢子全甲基化率高达17.68%;分生孢子则是以半甲基化模式为主。结果对揭示稻曲病菌厚垣孢子休眠的分子机制,探究真核生物孢子的分子休眠机制有普遍意义。

关键词 稻曲病菌; 厚垣孢子; 分生孢子; DNA甲基化; 甲基化敏感扩增多态性

中图分类号: S 435.111 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017475

DNA methylation sensitive amplification polymorphism analysis of dormant and non-dormant chlamydospores in *Ustilaginoidea virens*LI Xiaojuan^{1,2}, LI Jie^{1,3}, ZHOU Hu^{1,3,4}, REN Zuohua¹, LIU Erming^{1,3,4}

(1. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Institute of Plant Protection, Changsha 410125, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Changsha 410128, China; 4. Southern Regional Collaborative Innovation Center for Grain and Oil Crops in China, Changsha 410128, China)

Abstract Methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis was performed to profile the DNA methylation levels and pattern of three forms of dormant and non-dormant chlamydospores and conidia in *Ustilaginoidea virens*. The results showed that the difference of DNA methylation was obvious among them. The total methylation rate of CCGG sequence in genomic DNA of conidia was 20.56%; the black chlamydospores (dormant) was 25.63%, and the yellow chlamydospores (non-dormant) was 33.52%. The fully-methylated ratio of yellow chlamydospores was up to 17.68%, the highest among the two kinds of chlamydospores and conidia. The main pattern was full-methylation in dormant and non-dormant chlamydospores of *U. virens*, while conidia DNA was dominated by hemi-methylation pattern. Therefore, this study would be helpful for the understanding the molecular mechanism of dormancy in chlamydospores of *U. virens*. It has a universal and theoretical value for the study of the molecular mechanism of dormancy in eucaryotes.

Key words *Ustilaginoidea virens*; chlamydospore; conidium; DNA methylation; methylation sensitive amplification polymorphism

稻曲病是由稻绿核菌 *Ustilaginoidea virens* (Cooke) Takahashi[有性态为 *Villosiclava virens*

(Nakata) E. Tanaka & C. Tanaka, 异名 *Claviceps oryzae-sativae* Hashioka] 侵染引起的水稻穗部病

收稿日期: 2017-12-19

修订日期: 2018-02-07

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20114320110008);湖南省教育厅科学研究项目(11A052);国家重点研发计划(2016YFD0300700);转基因重大专项(2014ZX0800102B-003)

* 通信作者 E-mail: 819482969@qq.com; ermingliu@163.com

害^[1]。该病在亚洲、美洲和非洲的 30 多个国家及我国各稻区都有不同程度发生。一般穗发病率为 4%~6%，严重达 50% 以上。它不仅使秕谷率、青米率、碎米率增加；而且当稻谷中含有 0.5% 病粒时能引起人畜中毒症状^[1-7]。该病在我国无论是从发生面积，还是从引起的产量损失上看，都已成为水稻尤其是杂交稻最重要的病害之一^[2, 4]。

在稻曲病发展过程中，稻曲球中的厚垣孢子在发育过程中存在颜色转变，即从最初乳白色至黄色再到墨绿色（亦称之黑色），黄色厚垣孢子的萌发率可高达 80% 以上。随着厚垣孢子颜色变深，萌发率下降，当变成黑色厚垣孢子就很难萌发或不能萌发^[8-9]。这种由非休眠（黄色）至休眠（黑色）状态的转变对厚垣孢子度过不良环境和宿主缺乏期（在植物病理学上的越冬或越夏）有重要的生物学意义。厚垣孢子在稻曲病的侵染循环中起重要作用，是稻曲病的主要初侵染源^[8-12]。

DNA 甲基化是一种常见的表观遗传修饰。它是指由 DNA 甲基转移酶 (DNMTase) 介导，在胞嘧啶的第 5 位碳原子上加上 1 个甲基基团，使之变成 5-甲基胞嘧啶 (5-mC) 的化学修饰过程。在各种疾病的致病机制中，甲基化模式异常这一因素所起的作用各不相同。在真核生物中通常 DNA 的甲基化会抑制基因表达。DNA 的甲基化状态对染色体的结构维持、X 染色体失活、基因印记及胚胎发育、正常细胞功能的维持，组织特异性基因的表达和转座子沉默，乃至疾病的发生十分重要^[13-14]。

关于真菌 DNA 甲基化研究，早在 1983 年 Tamame 等^[15]利用 5-氮杂胞苷 (5-azacytidine) 对 *Aspergillus niger* 和 *A. nidulans* 的菌丝进行诱变，研究其野生型和诱变型菌丝 DNA 甲基化，结果显示，它们在 DNA 甲基化方面没有差异。随后，1984 年 Antequera 等^[16]对涵盖 5 个科的 20 个种（包含壶菌、卵菌、接合菌、子囊菌、担子菌和半知菌）进行了 DNA 甲基化检测，其中 18 个种 DNA 甲基化率 $\leq 0.1\%$ ，而 *Sporotrichum dimorphosporum* 和 *Phycomyces blakesleeanus* 的 DNA 甲基化率则分别约为 0.2% 和 0.5%。研究表明，真菌中存在 DNMTase 和甲基化区域^[17-19]。对模型真菌子囊菌粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 的研究显示，真菌 DNA 甲基

化是一种特定的基因组防御，因经过重复诱导点突变没有发现结构基因、沉默转座因子和重复的 DNA 序列^[20-21]。在稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 中存在 DNA 甲基化，反转录转座子 MAGGY 对反转录的限制作用与 DNA 甲基化没有相关性^[22]。不同的 *M. oryzae* 单孢其甲基化也有差异，缺失 MoDMT1 的突变体菌株与正常菌株的生长无差异^[23]，但 DNA 甲基化在全基因组分布和对真菌的生活周期的意义是未知的。Jeon 等^[24]分析了 *M. oryzae* 的 DNA 甲基化，表明 DNA 甲基化有助于真菌的生长发育和基因组防御。

本研究以稻曲病的黄色、黑色厚垣孢子和厚垣孢子萌发后产生的分生孢子为材料，采用甲基化敏感扩增多态 (methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP) 技术对供试材料的基因组 DNA 进行甲基化分析，旨在探究稻曲病菌休眠与非休眠厚垣孢子 DNA 甲基化的水平和模式，这有利于揭示稻曲病菌厚垣孢子休眠分子机制，对探究真核生物分子休眠机制具有一定的理论价值。

1 材料与方法

1.1 供试病菌

从高感稻曲病水稻品种‘红莲优 6 号’采集病粒稻曲球，分离稻曲病菌的单孢，用燕麦培养基（燕麦片 30 g，琼脂 20 g，水加至 1 000 mL）培养。并用 PS 培养液（马铃薯 200 g，蔗糖 20 g，水 1 000 mL）在水平摇床上 26℃ 黑暗条件下 130 r/min 恒温振荡培养获得分生孢子。在无菌环境下将分生孢子悬浮液与捣碎的菌丝片段混匀，孢子浓度调至 4×10^5 个/mL 并接种到水稻品种‘红莲优 6 号’上，发病后收集黄色、黑色的稻曲病菌厚垣孢子。将获得的孢子保存于 -80℃ 冰箱备用。

1.2 供试试剂

基因组 DNA 提取试剂盒，OMG 公司。EcoR I、Msp I、Hpa II、10×Buffer T 等，纽英伦生物技术（北京）有限公司。基因组 DNA 接头的连接试剂（T4 DNA Ligase，基因组 DNA 的预扩增和选择性扩增试剂）等，北京全式金生物技术有限公司；电泳及银染试剂为国产；EcoR I 接头、Hpa II—Msp I 接头、扩增引物等，生工生物工程（上海）股份有限公司。引物及接头序列见表 1。

表 1 接头和引物序列
Table 1 Sequences of adaptors and primers

	引物类型 Primer	序列(5'-3') Sequence
接头 Adaptor	<i>EcoR</i> I (forward)	CTCGTAGACTGCGTACC
	<i>EcoR</i> I (reverse)	AATTGGTACGCAGTCTAC
	<i>Hpa</i> II- <i>Msp</i> I (forward)	GACGATGAGTCTAGAA
	<i>Hpa</i> II- <i>Msp</i> I (reverse)	CGTTCTAGACTCATC
预扩增引物 Pre-amplification primer	E00+A HM	GACTGCGTACCAATTCA ATCATGAGTCCTGCTCGG
选择性扩增引物组 Selective amplification primer	E00+ACA,E00+AAG,E00+AAT,E00+ACT,E00+ACC,E00+AAA,E00+ACG,E00+AAC,E00+AGA,E00+AGC,E00+AGT,E00+AGG HM+TAG,HM+TTA,HM+TGT,HM+TGC,HM+TAC,HM+TCG,HM+TGA,HM+TTG,HM+TTC,HM+TCC	

1.3 基因组 DNA 的提取

采用基因组 DNA 提取试剂盒分别提取稻曲病菌的分生孢子、黄色和黑色厚垣孢子基因组 DNA，具体操作步骤参照试剂盒上的说明。并用核酸分析仪测定 260 nm、280 nm 时的吸光度，用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。

1.4 基因组 DNA 的甲基化 MSAP 体系建立

1.4.1 基因组 DNA 的双酶切

分别使用限制性内切酶 *EcoR* I/*Hpa* II 和 *EcoR* I/*Msp* I 对 DNA 进行双酶切。将提取的 DNA (500 ng) 5.0 μL, *EcoR* I (20 U/μL) 0.5 μL, *Msp* I (或 *Hpa* II) (20 U/μL) 0.5 μL, 10×Buffer T 2.5 μL, 加水至 25 μL, 混匀后于低温恒温水浴槽 37℃ 酶切保温 12 h, 65℃ 温育 20 min, 4℃ 保存。

1.4.2 基因组 DNA 接头的准备与连接

将 *EcoR* I 接头引物分别配成 15 μmol/L 的保存液，混合稀释成 5 μmol/L; *Hpa* II-*Msp* I 接头引物分别配成 100 μmol/L 的保存液，混合配成 50 μmol/L。混合均匀后置于 PCR 仪: 65℃ 10 min; 37℃ 10 min; 25℃ 10 min, 然后自然冷却至室温。将酶切产物 8.5 μL, T4 DNA Ligase 1.0 μL, 5×T4 DNA Ligase Buffer 4.0 μL, *EcoR* I-adapter (5 μmol/L) 2.0 μL, *Hpa* II-*Msp* I-adapter (50 μmol/L) 2.0 μL, 补水至 20 μL, 混匀后于低温恒温水浴槽 16℃ 培养过夜, 70℃ 灭活 10 min, -20℃ 保存。

1.4.3 基因组 DNA 的预扩增

预扩增总体积 25 μL, 包括连接产物 2.0 μL, 10×Trans Tap HiFi Buffer 2.5 μL, Trans Tap HiFi DNA Polymerase 0.5 μL, GC Enhancer 0.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 10 μmol/L 预扩增上下游引物各 1.0 μL。扩增程序为: 94℃ 30 s, 56℃ 1 min, 72℃

1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。

1.4.4 基因组 DNA 的选择性扩增

预扩增产物 20 倍稀释液 5.0 μL, 10×Trans Tap HiFi Buffer 2.5 μL, Trans Tap HiFi DNA Polymerase 0.5 μL, GC Enhancer 0.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 10 μmol/L 选择性上下游引物各 1.5 μL, 总体积 25 μL。扩增程序为: 94℃ 30 s, 65℃ (每个循环降低 0.7℃) 30 min, 72℃ 1 min, 13 个循环; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 23 个循环; 72℃ 10 min。

1.4.5 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

将选择性扩增产物进行 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。采用美国 BIO-RAD 公司的 PowerPac HV 电泳仪, 恒定电压 1 800 V 进行预电泳 30 min, 使凝胶预热。然后上样, 1 200 V 电泳 2.0~2.5 h, 待二甲苯青移动至整个凝胶的 2/3 处时, 停止电泳, 取出凝胶, 银染显色。

1.5 数据分析

统计显影后的聚丙烯酰胺凝胶电泳条带, 将清晰条带显示记为“1”, 无条带显示处记为“0”, 记录所有适宜选扩增引物组合的 MSAP 图谱, 组成二次元矩阵, 进行甲基化多态性统计^[25]。

2 结果与分析

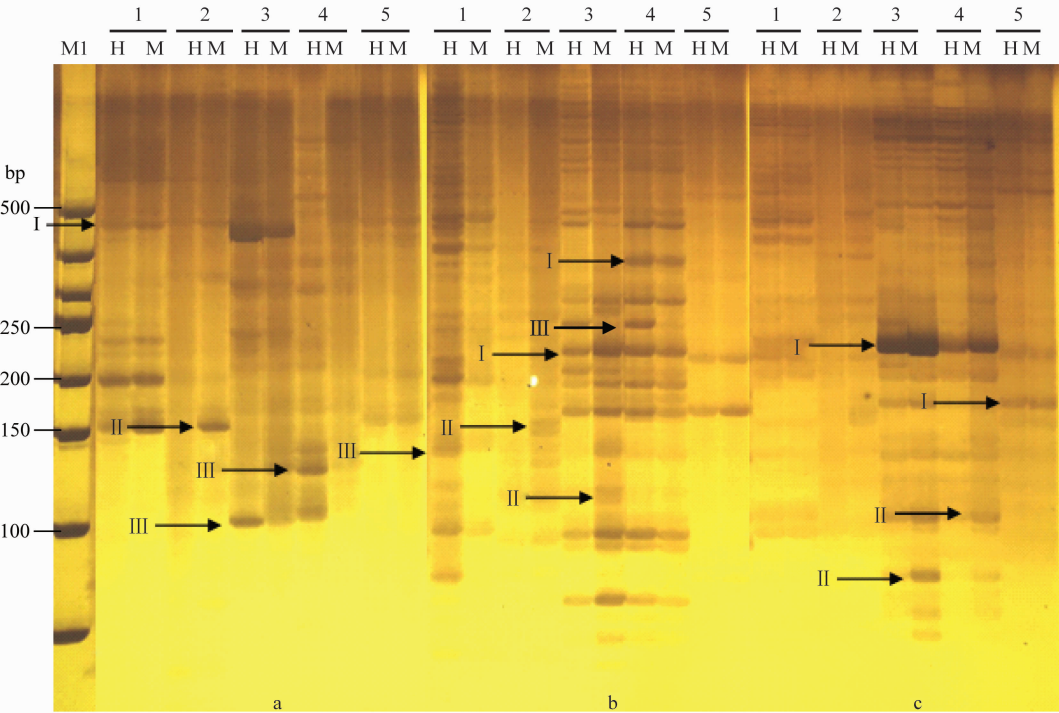
2.1 基因组 DNA 的选择性扩增

甲基化敏感扩增多态性 (MSAP) 中使用的内切酶 *Msp* I 和 *Hpa* II 是一组同裂酶, 都识别并切割 5'-CCGG-3' 序列, 但在 5'-CCGG-3' 存在甲基化时, 两种酶对该序列不同甲基化状态的敏感度不同。*Msp* I 只能切割外部胞嘧啶没有发生甲基化的 5'-CCGG-3' 序列, 一旦外部胞嘧啶发生甲基化, 将不能切割此位点。*Hpa* II 对半甲基化 (单链甲基化) 敏

感,对全甲基化(双链甲基化)不敏感,只切割半甲基化的 5'-CCGG-3'序列。

因此,聚丙烯酰胺凝胶电泳获得的条带可分为 4 种类型:Ⅰ型,两条泳道均有带,表示无甲基化或单链内部发生甲基化;Ⅱ型,*Msp*Ⅰ酶切产物扩增泳道有带,*Hpa*Ⅱ酶切产物扩增泳道无带,表示发生双

链内部甲基化;Ⅲ型,*Hpa*Ⅱ酶切产物扩增泳道有带,*Msp*Ⅰ酶切产物扩增泳道无带,表示发生单链外部甲基化;Ⅳ型,不存在 CCGG 位点,或内侧和外侧胞嘧啶同时甲基化(图 1)。据报道^[26-27],第四种甲基化类型的频率很低,因此我们得到的甲基化水平可能只比实际的低一些。



Ⅰ:非甲基化位点;Ⅱ:全甲基化位点;Ⅲ:半甲基化位点;M: *Eco*RⅠ+*Msp*Ⅰ双酶切;H: *Eco*RⅠ+*Hpa*Ⅱ双酶切;M1: 50 bp的DNA分子量标准;1~2: 黄色厚垣孢子;3~4: 分生孢子;5: 黑色厚垣孢子;a~c: 不同选择性扩增引物扩增结果
Ⅰ: Non-methylated sites; Ⅱ: Full-methylated sites; Ⅲ: Hemi-methylated sites; M: *Eco*RⅠ+*Msp*Ⅰ double digestion; H: *Eco*RⅠ+*Hpa*Ⅱ double digestion; M1: 50 bp DNA marker; 1-2: Yellow chlamydospores; 3-4: Conidiophores; 5: Black chlamydospores; a-c: Different selective primer combinations

图 1 选择性扩增采用 6% PAGE 胶检测的部分结果
Fig. 1 Partial result of selective amplification in 6% PAGE

2.2 基因组 DNA 甲基化水平和模式

*Eco*RⅠ选择性扩增引物分别与 *Msp*Ⅰ、*Hpa*Ⅱ选择性扩增引物配对,从 120 对 MSAP 选择性扩增引物中

筛选出 28 对扩增图谱清晰、甲基化多态性丰富、条带重复性好的选择性扩增引物组合。采用 2.1 的带型统计方法记录 PAGE 胶上的扩增条带,结果如表 2 所示。

表 2 基因组 DNA 甲基化 MSAP 分析

Table 2 MSAP analysis of genomic DNA methylation

孢子类型 Spore type	带型 Pattern			总扩增带数/条 Total amplified bands	甲基化位点数 Methylated sites	总甲基化率/% Total methylated band ratio	全甲基化率/% Full-methylated ratio	半甲基化率/% Hemi-methylated ratio
	Ⅰ (1,1)	Ⅱ (0,1)	Ⅲ (1,0)					
分生孢子 Conidiophore	1 229	135	183	1 547	318	20.56	8.73	11.83
黑色厚垣孢子 Black chlamydospore	618	116	97	831	213	25.63	13.96	11.67
黄色厚垣孢子 Yellow chlamydospore	579	154	138	871	292	33.52	17.68	15.84

根据对稻曲病菌的分生孢子、黑色和黄色厚垣孢子基因组 DNA 进行 MSAP 分析, 可以看出分生孢子基因组 DNA 中 CCGG 序列的甲基化率为 20.56%, 黑色厚垣孢子为 25.63%, 黄色厚垣孢子为 33.52%。其中分生孢子 DNA 的甲基化率最低, 黄色厚垣孢子 DNA 的甲基化率最高。

在分生孢子、黑色和黄色厚垣孢子 DNA 的扩增条带中, 全甲基化条带数分别为 135、116、154 条, 全甲基化率分别为 8.73%、13.96%、17.68%, 分生孢子全甲基化率低于半甲基化率, 黑色和黄色厚垣孢子的全甲基化率均高于半甲基化率。从统计结果看出 DNA 甲基化在稻曲病菌休眠与非休眠厚垣孢子中发生普遍, 在稻曲病菌分生孢子和厚垣孢子之间, 基因组 DNA 甲基化水平差异明显, 黄色和黑色的厚垣孢子主要是全甲基化模式, 分生孢子则是以半甲基化模式为主。

3 讨论

MSAP (甲基化敏感扩增多态性) 技术是检测基因组 DNA 甲基化的重要方法之一, 它是在 AFLP 技术的基础上, 根据 *Msp* I 和 *Hpa* II 对甲基化敏感性的不同来区分基因组 DNA 全甲基化和半甲基化状态, 同时可以测出其总甲基化水平^[28]。

稻曲病菌引起水稻穗粒发病, 在穗粒上形成稻曲球, 稻曲球中的孢子座产生粉状厚垣孢子, 厚垣孢子在发育过程中其颜色会发生变化, 由乳白色逐渐变成黄色, 最终成为墨绿色(黑色), 即厚垣孢子由非休眠状态转化成休眠状态, 这种现象属于表观遗传特征。厚垣孢子在非休眠和休眠的转换中, 其表观遗传上有明显差异, 这种差异与 DNA 甲基化相关。本研究采用 MSAP 技术, 以稻曲病菌的分生孢子及两种颜色的厚垣孢子为材料, 初次对稻曲病菌分生孢子、休眠与非休眠厚垣孢子的基因组 DNA 甲基化水平和模式进行研究, 结果显示, 稻曲病菌分生孢子、黑色和黄色厚垣孢子 DNA 甲基化水平差异明显, 休眠的黑色厚垣孢子的甲基化要低于非休眠的黄色厚垣孢子。这个结论与种子萌发甲基化水平变化是相似的, 黄韞宇等^[29]用 NaCl 处理黄瓜种子, 发现黄瓜种子在萌发过程中甲基化水平是不断变化的, 前期甲基化水平略高, 中后期甲基化水平降低, 发芽末期甲基化水平更低, 与 Mishra 等^[30]报道的比较一致, *Candida albicans* 是人类真菌性病原体, 其 DNA 甲基化调控影响的基因通常与形态转化,

如酵母态与菌丝态形态转换、白色细胞与非透明细胞的转化, 以及铁离子代谢相关的基因有关。C. *albicans* 在无性生长期间, 被压制转录甲基化位点中 C 转换成 T 的频率提高, 一个进化上稳定的抑制突变的模式可能会因为环境或寄主变化而发生遗传改变。稻曲病菌的 3 种不同发育时期的孢子的 DNA 甲基化调控的基因可能影响其萌发, 利用 MSAP 方法获得稻曲病菌 3 种孢子的甲基化差异性位点的 DNA 片段, 通过克隆测序可获得相应的基因的重要信息, 从而可找到甲基化差异基因的表达与休眠的相关性。另外, 通过分析甲基化位点, 发现全甲基化, 即双链甲基化是稻曲病菌休眠与非休眠基因组 DNA 甲基化的主要模式, 分生孢子 DNA 则表现为全甲基化率低于半甲基化率, 以半甲基化为主要模式; 黑色和黄色厚垣孢子的全甲基化率均高于半甲基化率。此结论与种子萌发中, 大量基因上调表达相一致, 且种子萌发过程中同时还发现少量的甲基化事件, 说明部分功能基因处于关闭或正在关闭的调控状态^[31-34]。稻曲病菌由可萌发的黄色厚垣孢子到不可萌发的黑色厚垣孢子, 由厚垣孢子到萌发后的分生孢子之间的胞嘧啶甲基化率降低、甲基化模式改变, 其分子机理有待进一步研究和验证。

参考文献

- [1] TAKETO A, MAMI T, JOUJI M, et al. A refined inoculation method to evaluate false smut resistance in rice [J]. Journal of General Plant Pathology, 2011, 77: 10-16.
- [2] 王金辉, 陈越华. 湖南省 2004 年中、晚稻稻曲病流行情况调查 [J]. 中国植保导刊, 2005, 25(8): 14-15.
- [3] 姜慎, 唐春生, 谭志琼. 国内外稻曲病研究现状 [J]. 热带农业科学, 2010, 30(3): 62-66.
- [4] 邓根生. 国内稻曲病研究现状 [J]. 植物保护, 1989, 15(6): 39-40.
- [5] 吕世琼, 刘浩, 赵江林, 等. 稻曲菌素研究进展 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(14): 265-268.
- [6] SUN Xianyun, KANG Shu, ZHANG Yongjie, et al. Genetic diversity and population structure of rice pathogen *Ustilaginoidea virens* in China [J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(9): e76879.
- [7] GUO Xiaoyi, LI Yan, FAN Jing, et al. Progress in the study of false smut disease in Rice [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2012: 1211-1217.
- [8] 刘安国, 何念杰, 汪金莲. 稻曲病菌 [*Ustilaginoidea virens* (Cooke) Takahashi] 厚垣孢子发芽力的研究 [J]. 江西农业大学学报, 1989, 11(3): 29-34.
- [9] 王疏, 白元俊, 周永力, 等. 稻曲病菌的病原学 [J]. 植物病理学报, 1998, 28(1): 19-24.
- [10] 王国良. 稻曲病菌厚垣孢子侵染时期和侵染途径的研究 [J]. 植物保护学报, 1992, 19(2): 97-100.

- [11] 陆凡, 陈志谊, 陈毓苓, 等. 稻曲病菌的生物学特性及其侵染循环中某些未确定要点的研究[J]. 江苏农业学报, 1996, 12(4): 35-40.
- [12] 左广胜, 冉西京, 杜生茂, 等. 稻曲病菌初侵染源研究[J]. 中国农学通报, 1996, 12(5): 17-18.
- [13] SCHAEFER C B, OOI S K T, BESTOR T H, et al. Epigenetic decisions in mammalian germ cells [J]. Science, 2007, 316: 398-399.
- [14] REIK W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development [J]. Nature, 2007, 447: 425-432.
- [15] TAMAME M, ANTEQUERA F, VILLANUEVA J R, et al. High-frequency conversion to a “fluffy” developmental phenotype in *Aspergillus* spp. by 5-azacytidine treatment: evidence for involvement of a single nuclear gene [J]. Molecular and Cellular Biology, 1983, 3(12): 2287-2297.
- [16] ANTEQUERA F, TAMAME M, VILLANUEVA J R, et al. DNA methylation in the fungi [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1984, 259(13): 8033-8036.
- [17] DHILLON B, CVALETTI J R, WOOD K V, et al. Accidental amplification and inactivation of a methyltransferase gene eliminates cytosine methylation in *Mycosphaerella graminicola* [J]. Genetics, 2010, 186: 67-77.
- [18] LIU Siyang, LIN Jianqing, WU Honglong, et al. Bisulfite sequencing reveals that *Aspergillus flavus* holds a hollow in DNA methylation [J/OL]. PLoS ONE, 2012, 7(1): e30349.
- [19] ZEMACH A, MCDANIEL I E, SILVA P, et al. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation [J]. Science, 2010, 328: 916-919.
- [20] HONDA S, LEWIS Z A, HUARTE M, et al. The DMM complex prevents spreading of DNA methylation from transposons to nearby genes in *Neurospora crassa* [J]. Genes & Development, 2010, 24(5): 443-454.
- [21] LEWIS Z A, ADHVARYU K K, HONDA S, et al. DNA methylation and normal chromosome behavior in *Neurospora* depend on five components of a histone methyltransferase complex, DCDC [J/OL]. PLoS Genetics, 2010, 6(11): e1001196.
- [22] 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 [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1997, 253: 703-710.
- [23] IKEDA K, VAN VU B, KADOTANI N, et al. Is the fungus *Magnaporthe* losing DNA methylation? [J]. Genetics, 2013, 195: 845-855.
- [24] JEON J, CHOI J, LEE G W, et al. Genome-wide profiling of DNA methylation provides insights into epigenetic regulation of fungal development in a plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae* [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 8567.
- [25] JAROSLAV F, ALES K. How to interpret methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) profiles? [J]. BMC Genetics, 2014, 15: 2. DOI: 10.1186/1471-2156-15-2.
- [26] NAKAYASHIKI H, IKEDA K, HASHIMOTO Y, et al. Methylation is not the main force repressing the retrotransposon MAGGY in *Magnaporthe grisea* [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(6): 1278-1284.
- [27] SALMON A, AINOUCHE M L, WENDEL J F, et al. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae) [J]. Molecular Ecology, 2005, 14: 1163-1175.
- [28] 李卫国, 常天俊, 龚红梅. MSAP 技术及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 生物技术, 2008, 18(1): 83-87.
- [29] 黄韞宇, 张海军, 邢燕霞, 等. NaCl 胁迫对黄瓜种子萌发的影响及 DNA 甲基化的 MSAP 分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(8): 1646-1656.
- [30] MISHRA P K, BAUM M, CARBON J. DNA methylation regulates phenotype-dependent transcriptional activity in *Candida albicans* [J]. PNAS, 2011, 108(29): 11965-11970.
- [31] 褚会娟, 张今今, 王喆, 等. 丹参 MSAP 分子标记技术体系的优化及其应用[J]. 西北植物学报, 2011(5): 920-928.
- [32] SANTOS D, FEVERIRO P. Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 70(2): 155-161.
- [33] XIA Ran, WANG Junguo, LIU Chunyan, et al. ROR1/RPA2A, a putative replication protein A2, functions in epigenetic gene silencing and in regulation of meristem development in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2006, 18(1): 85-103.
- [34] 丛建民, 陈凤清, 沈海龙, 等. 水曲柳胚后熟时期 MSAP 分析[J]. 南京林业大学学报, 2015, 39(3): 39-44.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 115 页)

- [25] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(5): 294-299.
- [26] SZALANSKI A L, POWERS T O. Molecular diagnostics of three *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae) pest species [J]. Journal of the Kansas Entomological Society, 1996, 69(3): 260-266.
- [27] CLARK T L, MEINKE L J, FOSTER J E. PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase (subunit I) gene provides diagnostic markers for selected *Diabrotica* species (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. Bulletin of Entomological Research, 2001, 91(6): 419-427.
- [28] 席欧彦, 李晓, 郑飞, 等. 杨树蚱叶甲 DNA 条形码研究[J]. 新疆农业科学, 2016, 53(2): 309-316.
- [29] CLARK T L, MEINKE L J, FOSTER J E. Molecular phylogeny of *Diabrotica* beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences [J]. Insect Molecular Biology, 2001, 10(4): 303-314.
- [30] 雍容婧, 李志红, 陈宏, 等. 3 种根蚱叶甲实时荧光 PCR 检测技术研究[J]. 植物检疫, 2017, 31(5): 38-43.
- [31] 张桂芬, 刘万学, 郭建英, 等. 美洲斑潜蝇 SS-PCR 检测技术研究[J]. 生物安全学报, 2012, 21(1): 74-78.

(责任编辑: 田 喆)