

# 双胚苗水稻中单倍体和二倍体不同器官的 cDNA-AFLP 分析

张红宇<sup>1, 3</sup>, 彭海<sup>2</sup>, 吴绍华<sup>1</sup>, 黄静<sup>1</sup>, 徐培洲<sup>1</sup>, 汪旭东<sup>1</sup>, 吴先军<sup>1, 3</sup>

1. 四川农业大学水稻研究所, 温江 611130;

2. 江汉大学生命科学学院, 武汉 430056;

3. 四川农业大学 西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 雅安 625014;

**摘要:** SARII-628 是四川农业大学水稻所的一个双胚苗自然群体, 每年都能定期分离出单倍体与二倍体 ( $n: 2n$ )。文章对单倍体和对应的二倍体进行了 cDNA-AFLP 分析。合成了 3 个单倍体和 1 个二倍体的根、茎、穗和叶的 cDNA, 用 *EcoR* I / *Msp* I 酶切组合, 通过 cDNA-AFLP 技术统计这 16 个样本的表达差异。共选用 30 对引物, 在 633 条扩增位点上筛选出 49 个有差异表达的序列。结果: (1) 单倍化后 cDNA-AFLP 总体水平虽然在各单株间略有差异但变化不大, 表达变化的位点所占比例平均为 5.14%, 高于二倍体的 3.93%; (2) 根据样本在根、茎、穗和叶中表达出带的有无, 在扩增出的 14 种带型中, 有 4 种只出现在单倍体中, 其对应位点的表达具有单倍体的特异性; (3) 对这 3 个单倍体在不同器官的激活和沉默位点进行汇总, 发现在根和穗中, 发生沉默的位点多于激活的位点数, 而在茎和叶中的结果正好与之相反, 但是在单倍体的所有器官中发生激活变化的位点多于沉默变化的位点; (4) 对不同器官中的发生表达变化 (激活+沉默) 位点分析, 发现根中的变化位点最多, 在穗中的变化最少, 说明位点的表达变化具有器官特异性。

**关键词:** 水稻; 激活; 沉默; cDNA-AFLP

## cDNA-AFLP analysis among different organs of haploid and diploid plants in twin-seedling rice

ZHANG Hong-Yu<sup>1,3</sup>, PENG Hai<sup>2</sup>, WU Shao-hua<sup>1</sup>, HUANG Jing<sup>1</sup>, XU Pei-Zhou<sup>1</sup>,  
WANG Xu-Dong<sup>1</sup>, WU Xian-Jun<sup>1,3</sup>

1 Rice Research Institute of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2 Laboratory of Germplasm and Genetics, College of Life Science, Jiangnan University, Wuhan 430056, China;

3 Key Laboratory of Southwest Crop Genetic Resources and Improvement, Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Ya'an 620514, China;

**Abstract:** SARII-628 is one of the natural twin-seedling populations, which are maintained in Rice Institution of Sichuan Agricultural University. Haploid-diploid ( $n: 2n$ ) twin-seedlings can annually emerge from SARII-628. In this study, cDNA-AFLP technique was applied for these haploid and diploid plants. The double stranded cDNA were synthesized from the total RNAs of the roots, stems, panicles, and leaves of three haploid and one diploid

收稿日期: 2008-10-27; 修回日期: 2008-11-13

基金项目: 四川省科技厅项目 (编号: 2008JY0094) 和教育部长江学者和创新团队发展计划项目 (编号: IRT0453) 资助

作者简介: 张红宇 (1976-), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 作物遗传育种。E-mail: zhanghysd@163.com;

彭海 (1975-), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: penghai138@163.com

张红宇和彭海同为第一作者。

通讯作者: 吴先军 (1964-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 作物遗传育种专业。E-mail: wuxjsau@126.com

plants. Then, *EcoRI/Msp I* combination was chosen for expression difference analysis with cDNA-AFLP technique among the 16 samples. Thirty pairs of primers selected amplified 633 loci. Among them, 49 were differently expressed. As shown by cDNA-AFLP, the expression levels of haploids were different among individuals but not significant. The average ratio of sensitive loci (activated loci + silenced loci) in haploids was 5.14%, which was higher than that of diploid (3.93%). According to the presence or absence of the bands in root, stem, panicle, and leaf, out of the 14 types of amplified patterns, only 4 exclusively occurred in haploid and the corresponding loci were thus haploid-specific in expression. The collecting analysis for the silenced and activated loci among different organs of the three haploids revealed that the silenced loci were more than the activated ones in roots and panicles. An opposite trend was observed in panicles and leaves. However, the total number of activated loci in all the four types of haploid organs was more than that of the silenced loci. Root had the most sensitive loci in number and the panicle had the least, suggesting that they were organ-specific in expression.

**Keywords:** rice; silence; activate; cDNA-AFLP

自然界中,植物倍性变化是很普遍的现象,但主要为多倍体。几乎所有真核生物<sup>[1]</sup>和绝大部分被子植物<sup>[2,3]</sup>以及所有农作物<sup>[4]</sup>如水稻<sup>[5-7]</sup>在进化过程中都经历了多倍化事件。单倍体植物虽然很少存在于自然界中,但是因为仅有一套染色体,所有显隐性基因都可获得表达,是遗传研究的重要工具。尽管如此,至今对单倍体RNA表达还了解甚少,仅在酵母<sup>[8,9]</sup>、玉米<sup>[10]</sup>和马铃薯<sup>[11]</sup>中有所涉及。Albertin等<sup>[12]</sup>利用双向电泳技术探讨了白菜多(单)倍体蛋白质组表达,未发现明显差异。植物上也只有在拟南芥上利用cDNA-AFLP和RT-PCR技术分析多倍化后,与叶片起源相关基因及开花相关基因表达的改变,并发现多倍体与单倍体中DNA修复基因表达都上升了<sup>[13]</sup>。我们利用改良AFLP(MSAP)技术,发现了双胚苗水稻SARII-628中同源三倍体<sup>[14]</sup>和单倍体<sup>[15]</sup>DNA甲基化修饰的改变,暗示了单倍化后转录组的变异。

不同于前人研究中普遍采用的人工单倍体,起源于双胚苗的单倍体具显著特点与优势:彭海等<sup>[16]</sup>认为双胚苗中的单倍体可保持DNA序列无变异,是分析倍性效应的理想材料。事实上,我们利用SSR分析也证实了双胚苗中单倍体与二倍体遗传背景的一致性<sup>[15]</sup>,说明双胚苗起源的单倍体确实是调查单倍化对转录组影响的理想材料。甲基化和芯片分析表明在SAR II -628 自然单倍化后有相当比例的沉默与激活表达变化<sup>[12]</sup>。然而基因芯片分析成本过高,样本不可能过大。因此本研究采用基因表达高通量分析方法cDNA-AFLP从统计角度研究了SAR II -628 不同单株与器官在自然单倍化后当代基因表达的变化情况,研究单倍化后是否存在基因表达的株系特异性与器官特异性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

选取来源于 SAR II -628 的 1N-2N 双胚苗的 4 个水稻单株,共同的 2N 命名为 A',其他 3 个单倍体单株则命名为 A、B 和 C。提取它们的 4 种器官(根、茎、穗、叶)共 16 个样本的 RNA 进行实验。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 mRNA 的提取、纯化

在叶枕距为 0 时的当天上午 8 时分别取该分蘖对应的根、茎、叶和幼穗 4 个器官,采用 Trizol 方法提取 mRNA,并用紫外分光光度计检测 mRNA 的产量,变性胶电泳质检。

#### 1.2.2 cDNA-AFLP 分析

该方法参照Pieter等<sup>[17]</sup>的酶切、接头和扩增引物序列,采用*EcoR I*和*Msp I*这两种限制性内切酶组合进行双酶切,所不同的是将选择性扩增体系变为50  $\mu$ L。其中PCR反应程序为:94℃ 30 s, 65℃(每循环降温0.7℃) 30 s, 72℃ 60 s, 13个循环;94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 60 s, 23个循环。最终反应产物在3%琼脂糖上电泳检,测凝胶成像系统观察成像并记录实验结果。聚丙烯酰胺凝胶电泳并银染。

## 2 结果与分析

### 2.1 单倍体与对应二倍体的 cDNA -AFLP 水平变化

运用30对引物组合，在这4株水稻植株的根、茎、穗和叶共16个样品的cDNA中进行扩增，按照根、茎、穗和叶的顺序进行统计，有带记为“1”，无带记为“0”，共扩增出633条片段，各单株的总片段数基本相同（表1）。

由表1可以看出，二倍体的根、茎、穗和叶在这30对引物的扩增下，都同时表达的位点有587个，相对于单倍体同时沉默的位点有22个，根、茎、穗和叶具有不同表达变化的有24个位点，占总扩增带数的3.93%。单倍体的A、B和C这3个单株中，根、茎、穗和叶同时表达的位点分别为584、585和584，相对于二倍体同时沉默的位点分别为18、13和20，根、茎、穗和叶具有不同表达变化的分别有31、35和29个位点，分别占总扩增带数的5.04%、5.65%和4.73%。由此可见，单倍化后cDNA -AFLP总体水平虽然在各单株间略有差异，但无论在扩增多态性上还是在总扩增水平上变化都不大。从这些总扩增位点的变化比例来看，多数单倍体都略高于其对应的二倍体。

**表 1 二倍体与对应单倍体的根、茎、穗和叶的 cDNA -AFLP 结果**

表达类型	二倍体		单倍体		单倍体平均值
	A'	A	B	C	
1111	587	584	585	584	584.33
0000	22	18	13	20	17
其他类型	24	31	35	29	31.67
总扩增代数	611	615	620	613	616
变化比例（%）	3.93	5.04	5.65	4.73	5.14

注：0 表示该位点无带，1 表示该位点有带。

### 2.2 单倍体与对应二倍体的不同表达变化类型

在这4个材料的16个样品的扩增带型中，发现共有49个位点同时发生不同的表达变化，共分为14种类型，而且这14种带型也不是都出现在这4个单株中，每个植株只出现其中的10种带型（表2，图1）。对于带型“1110”、“1100”和“0111”，二倍体都缺失而单倍体都出现，“1011”带型则只出现于二倍体中。表明这4种带型的出现与倍性相关，产生这些带型的位点具有倍性特异性。

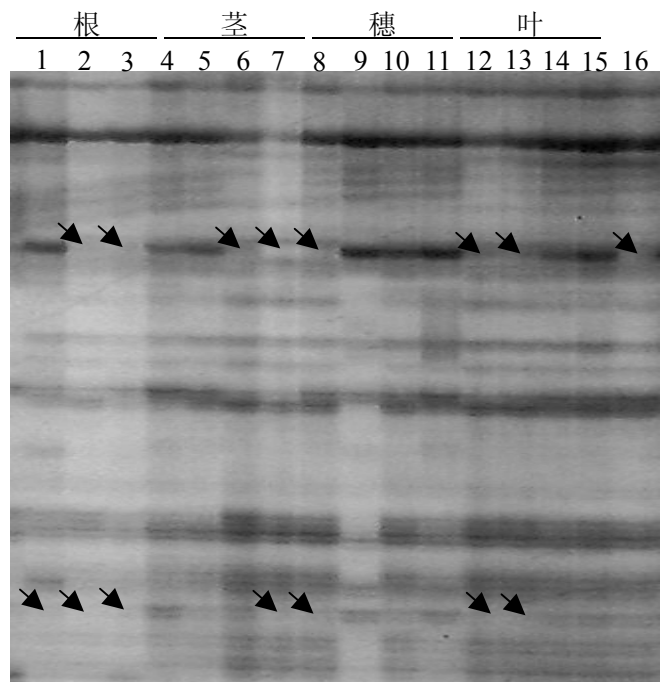


图 1 单倍体与二倍体的 4 个器官的 cDNA-AFLP 电泳结果

1、5、9、13 代表二倍体 A’；2、6、10、14 代表 A；3、7、11、15 代表 B；4、8、12、16 代表 C。箭头表示同一位点没有出带的情况。

表 2 单倍体与对应二倍体的变化带型及位点数

材	表中的四位数的表达顺序依次为：根、茎、穗、叶													
料	1110	0010	0100	0000	1000	0001	1101	1100	0111	0011	1111	0110	1010	1011
A’	0	2	6	22	5	3	1	0	0	0	3	3	3	1
A	4	2	7	18	5	6	1	3	2	1	0	0	0	0
B	4	4	9	13	6	6	0	3	1	0	1	2	0	0
C	1	2	7	20	4	6	0	4	2	0	0	2	1	0

注：0 表示该位点无带，1 表示该位点有带。

在有差异的 49 个位点中，不同的位点在 16 个样品中扩增的带型也具有多态性。根据带型的差异，可分为以下几类：a 型，4 个单株的 4 个器官中的扩增带型完全一致；b 型，单倍体的扩增带型一致，并与二倍体的带型不同；c 型，有一个单倍体的扩增带型与其他 3 个单株不同；d 型，4 个单株中，只有两种扩增带型；e 型，4 个单株中有 3 种扩增带型；f 型，4 个单株有 4 种扩增带型。其中具有 b 型和 c 型的位点所占的比例较大，分别占变化位点数的 30.61% 和 32.65%；具有 f 型的位点比例最小，为 2.04%。说明有些位点在不同倍性的材料中，其表达变化具有器官特异性，还有一些位点的表达变化与植株的倍性没有必然的联系，在不同器官的表达中具有单株特异性。

### 2.3 单倍体与二倍体在不同器官上的差异

对同一位点上单倍体与二倍体对应的不同器官的表达情况统计，发现有些位点的表达变化具有器官特异性。对于有差异变化的 49 个位点进一步分析，根据同一位点中的不同的变化类型，可分为 4 类：所有的单倍体有带而二倍体无带定义为“激活”，反之则定义为“沉默”，单倍体与二倍体没有差异变化的为“不变”，其他的为“不规则”变化的类型（图 2）。在不同的器官中，59.18% 以上的位点不会因倍性变化而发生表达变化，尤其以穗中的保守位点最多，达到 83.67%。而且有些位点的变化与倍性变化不存在必然联系，在 4 个器官中的比例在 10.2%~24.45% 之间。植株发生单倍化导致一些位点发生激活变化，它们在根、

茎、穗和叶中扩增出有差异的 49 个位点中所占的比例分别为 10.2%、8.16%、0 和 4.08%；同样，因单倍化导致位点发生沉默变化，它们在根、茎、穗和叶中的比例分别达到 12.24%、6.12%、6.12%和 4.08%。以上分析表明，运用 cDNA-AFLP 技术，发现植物单倍化后，很多位点会发生沉默和激活变化，并且在不同的器官中它们所占的比例不同，总体上在根中发生的激活和沉默变化的位点最多，在穗中的变化最少，并且发现在穗中没有位点发生激活，这种现象与单倍体的不育存在一定的相关性。

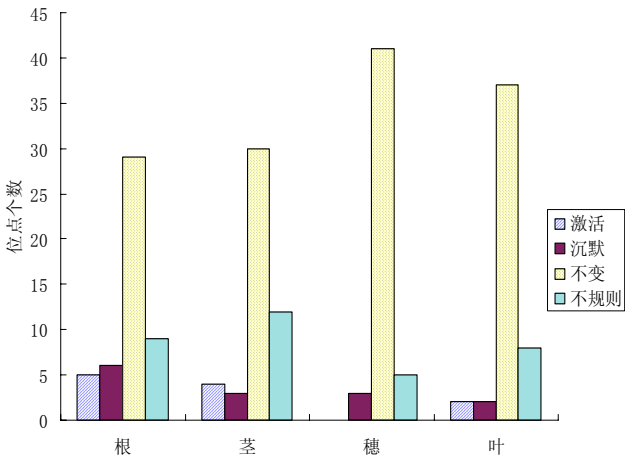


图 2 49 个差异位点在单倍体的不同器官上的表达情况比较

以上分析结果只是在单倍体共同变化（共同激活或沉默）的情况下得出的结论，由于还存在很多不规则的表达变化，并且所占的比例较大，具体表达情况的差异需要根据不同单倍体单株分别与二倍体进行比较，才能得出比较可靠的结论。需要指出的是，在根、茎、穗和叶中的保守位点，只能说明它们在某一种器官中不会因倍性变化发生表达变化，具有器官特异性，并不表示在其他的器官中也不发生表达变化。

2.4 单倍体之间单株的表达差异

2.4.1 单倍体单株的所有器官中激活和沉默位点比较

为了进一步研究激活和沉默的位点在单倍化植株中的具体变化情况，需要从 633 个扩增位点对每一株单倍体的不同器官的表达分别与二倍体进行比较，结果见表 3。

表 3 单倍体单株在根、茎、穗、叶中的表达差异比较

位点的表达	根			茎			穗			叶			单倍体平均值			
变化	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	根	茎	穗	叶
激活	7	8	6	9	10	6	2	3	0	4	4	4	7	8.33	1.67	4
沉默	7	7	9	5	3	3	5	3	4	2	3	4	7.67	3.67	4	3
不变	601	605	598	601	607	604	608	614	609	609	613	605	601	604	610	609
激活比例 (%)	1.14	1.29	0.98	1.46	1.61	0.98	0.33	0.48	0	0.65	0.65	0.65	1.14	1.35	0.27	0.65
沉默比例 (%)	1.14	1.13	1.47	0.81	0.48	0.49	0.81	0.48	0.65	0.33	0.48	0.65	1.25	0.6	0.65	0.49
不变比例 (%)	97.72	97.58	97.55	97.73	97.91	98.53	98.86	99.04	99.35	99.02	98.87	98.7	97.61	98.05	99.08	98.86
位点合计	615	620	613	615	620	613	615	620	613	615	620	613	616	616	616	616

注：A，B，C 分别表示 3 个单倍体的单株。

根据表 3 的结果,可以发现不同的单倍体单株在不同器官中的位点表达变化具有很大差异。A、B 和 C 单株在茎和叶中的位点表达情况显示激活的位点多于沉默的位点;在穗中的表现则相反,沉默的位点多于激活的位点;在根中的表达则是没有任何规律可循。对这 3 个单倍体在不同器官的激活和沉默位点进行汇总,发现在根和穗中,发生沉默的位点多于激活的位点数,而在茎和叶中的结果正好与之相反,但是在单倍体的所有器官中发生激活变化的位点多于沉默变化的位点。

2.4.2 同一位点在不同单倍体单株中的差异表达

对 cDNA-AFLP 扩增出的 633 个位点的分析显示,它们在单倍体单株 A、B 和 C 中共有 7 种不同的表达类型,这 7 种类型在根、茎、穗和叶中出现的频率也不同(表 4)。

表 4 同一位点在不同单倍体单株中的多态性表达

表达类型			根	茎	穗	叶
A	B	C				
0	0	1	1	1	0	2
0	1	0	3	3	2	2
0	1	1	0	3	1	0
1	0	0	2	3	0	3
1	1	0	2	2	2	1
0	0	0	32	25	37	35
1	1	1	593	596	591	590

注: A, B, C 分别表示 3 个单倍体的单株; 0 表示该位点无带, 1 表示该位点有带。

这 7 种表达类型中,“000”型和“111”型表示该位点在 3 个单倍体单株中的表达情况一致,即都不表达或都表达,说明这些位点在单倍化植株中只有一种表达模式,具有单态性表达的特点。“111”型在所有器官中的比例是最多的,但是在器官之间的差异较少,平均所占比例为 93.6%。其次就是“000”型,在根、茎、穗和叶中所占的比例为 5.06%、3.95%、5.85%和 5.53%,说明在茎中表达的位点数目多于在穗中的位点数。其余 5 种类型显示该位点在单倍体单株中的不同表达情况,具有多态性表达的特点。这 5 种类型所占的比例极少,并且在不同器官中的出现次数也不同,说明这些位点具有单株特异性。如果这些因单倍化而出现的多态性表达位点在遗传二倍化后能够稳定的遗传下去,就会产生进化上的多样性进而可能形成新的性状或物种。

3 讨论

本次实验中发现植物单倍化后,很多位点会发生沉默和激活变化。在已经完成的基因芯片分析中发现<sup>[18]</sup>,单倍化后植株发生表达变化的序列占总序列的 2.47%,发生激活和沉默的序列所占的比例分别为 0.34%和 0.27%。本实验在运用cDNA-AFLP技术分析 3 个单倍体叶片时,发现激活位点占 0.63%,沉默位点占 0.47%。虽然激活位点数多于沉默位点数的结果与芯片的结果一致,但激活和沉默的比例均高于芯片的结果。cDNA-AFLP结果显示在不同的器官中它们所占的比例不同,说明这些与倍性相关的表达变化不但具有器官特异性,还与植株的不同发育时期相关,这些位点的表达调节主要受它们所具有的特定功能来支配。

不论是基因的“开启”还是“关闭”,都对植株影响是巨大的,可能导致新性状出现或消失,这与我们观察到的单倍体与二倍体巨大的形态学差异是一致的,然而发生激活和沉默变化的基因具体控制哪些功能和性状,单倍体植株又是如何通过控制这些激活和沉默的位点的表达来适应生存的,目前还不清楚,需要在以后的研究中继续探讨。

是什么控制着我们在单倍体观察到的转录组表达变化呢? 由于目前单倍体基因表达资

料还不多,准确说明其表达调控的机制还有一定困难,但我们从广泛研究的多倍体基因表达中可以得到一些有益的启示。如根据基因表达与染色体或染色体臂的相关关系,一些学者提出用基因组剂量效应与剂量补偿来解释倍性效应对基因表达的影响<sup>[10, 19]</sup>。另外,多(单)倍化中,细胞体积变化也被认为是酵母基因表达在倍性间变化的原因<sup>[8]</sup>。单倍体中基因组剂量减少了,细胞体积也变小了,因此,这二者都可能是转录组变化的原因。在新形成的拟南芥多倍体与*A. suecica* 中,利用甲基转移酶抑制剂或RNAi技术沉默甲基转移酶基因后,拟南芥中沉默的基因被重新激活,表明 DNA胞嘧啶超甲基化参与了多倍体中同源基因的沉默<sup>[20, 21]</sup>。K7 基因在人工异源四倍体拟南芥中被沉默了,进一步分析发现其CNG序列内甲基化程度比其亲本低<sup>[22]</sup>,表明CNG甲基化可能影响了异源四倍体中K7 基因的表达。我们利用改良 AFLP (MSAP) 技术,发现了双胚苗水稻SARII-628 中同源三倍体<sup>[14]</sup>和单倍体<sup>[15]</sup>DNA甲基化修饰的改变,暗示了DNA甲基化修饰也可能是单倍体转录组变异的机制。本研究中发现,每个单倍体单株相对于对应二倍体发生变化的位点,以及单倍化后共同变化的位点,它们的RNA水平的表达变化都存在器官特异性,并且还有很多位点在不同器官中的表达具有单株特异性。

## 参考文献 (References):

- [1] Wolfe KH. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(5): 333–341.
- [2] Cui L, Wall P, Leebens-Mack J, Lindsay B, Soltis D, Doyle J, Soltis P, Carlson J, Arumuganathan K, Barakat A, Albert V, Ma H, Claude W. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Res*, 2006, 16(6): 738–749.
- [3] Soltis PS. Ancient and recent polyploidy in angiosperms. *New Phytol*, 2005, 166(1): 5–8.
- [4] Leitch IL, Bennett MD. Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci*, 1997, 2: 470–476.
- [5] Paterson AH, Bowers JE, Chapman BA. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(26): 9903–9908.
- [6] Paterson AH, Bowers JE, Peterson DG, Estill J, Chapman B. Structure and evolution of cereal genomes. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13(6): 644–650.
- [7] Yu J, Wang J, Lin W, Li S, Li H. The Genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. *PLoS Biol*, 2005, 3(2): e38.
- [8] Galitski T, Saldanha AJ, Styles CA, Lander ES, Fink GR. Ploidy regulation of gene expression. *Science*, 1999, 285(5425): 251–254.
- [9] Storchova Z, Breneman A, Cande J, Dunn J, Burbank K, O'Toole E, Pellman D. Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature*, 2006, 443(7111): 541–547.
- [10] Guo M, Davis D, Birchler JA. Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics*, 1996, 142(4): 1349–1355.
- [11] Stupar RM, Bhaskar PB, Yandell BS, Rensink WA, Hart AL, Ouyang S, Veilleux RE, Busse JS, Erhardt RJ, Buel CR, Jiang J. Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics*, 2007, 176(4): 2055–2067.
- [12] Albertin W, Brabant P, Catrice O, Eber F, Jenczewski E, Chèvre A-M, Thiellement H. Autopolyploidy in cabbage (*Brassica oleracea* L.) does not alter significantly the proteomes of green tissues. *Proteomics*, 2005, 5(8): 2131–2139.
- [13] Wang J, Tian L, Madlung A, Lee HS, Chen M, Lee JJ, Watson B, Kagochi T, Comai L, Chen ZJ. Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics* 2004, 167(4), 1961–1973.
- [14] Zhang HY, Peng H, Li Y, Xu PZ, Wang XD, Wu XJ. Patterns of DNA cytosine methylation between haploids and corresponding diploids in rice. *Chin Sci Bull*, 2006, 51(14): 1721–1728.

- [15] Albertin W, Balliau T, Brabant P, Chevre AM, Eber F, Malosse C, Thiellement H. Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. *Genetics*, 2006, 173(2): 1101–1113.
- [16] Peng H, Zhang J, Wu XJ. The ploidy effects in plant gene expression: Progress, problems and prospects. *Sci China Ser C-Life Sci*, 2008, 51(4): 295–301.
- [17] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23 (21) :4407-4414.
- [18] Zhang HY, Peng H, Li PC, Deng QM, Xu PZ, Li Y, Wang XD, Wu XJ. The microarray analysis for gene expression in haploids and diploids derived from twin-seedling rice. *Sci China Ser C-Life Sci*, 2008, 51(6): 503–512.
- [19] [cited; Available from: [www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression\\_manual.affx](http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx)], 2006, 4.
- [20] Lee HS, Chen ZJ. Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12): 6753–6758.
- [21] Wang J, Tian L, Madlung A, Lee HS, Chen M. Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics*, 2004, 167(4): 1961–1973.
- [22] Comai L, Tyagi AP, Winter K, Holmes RD, Reynolds SH. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Cell*, 2000, 12(9): 1551–1568.