

二氧化硫胁迫诱导拟南芥 *NIT2* 基因 DNA 甲基化修饰

李利红^{1,2}, 仪慧兰^{1*}, 王艺雯¹, 杨波¹

(1.山西大学生命科学学院, 环境科学与工程研究中心, 太原 030006; 2.山西省水产科学研究所, 太原 030006)

摘要: DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰形式。利用亚硫酸氢盐修饰后测序法和甲基化敏感性限制性内切酶-PCR(MSRE-PCR)法, 研究 SO₂ 胁迫对拟南芥腈水解酶(*NIT2*)基因序列中胞嘧啶甲基化状态的影响, 分析甲基化特征改变在植物胁迫应答过程中的作用。研究发现, 30 mg·m⁻³ 的 SO₂ 连续熏气 3 d 后, 拟南芥植株地上组织细胞中 *NIT2* 基因启动子区域 CG 和 CHH(H 为 C, A 或 T)位点甲基化水平下降, 总甲基化水平降低, 但未检出编码区 5' 端目的片段中 CCGG 位点甲基化状态的改变。RT-PCR 分析表明, SO₂ 胁迫组拟南芥植株地上组织细胞中 *NIT2* 基因的转录水平高于对照组。研究结果表明, SO₂ 胁迫导致拟南芥 *NIT2* 基因启动子区甲基化水平降低, *NIT2* 基因转录上调, 说明 SO₂ 胁迫能诱发拟南芥基因胞嘧啶甲基化水平改变, 启动子区甲基化水平的降低可能与防御基因的诱导表达有关, 胞嘧啶甲基化修饰参与了植物的抗逆生理过程。

关键词: SO₂; 拟南芥; *NIT2*; DNA 甲基化; 基因表达

中图分类号: X503.233 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2012)04-0685-06

Sulfur Dioxide Induces DNA Methylation Alteration of A Gene Encoding Nitrilase 2 Protein in *Arabidopsis* Plants

LI Li-hong^{1,2}, YI Hui-lan^{1*}, WANG Yi-wen¹, YANG Bo¹

(1.School of Life Science, Research Center of Environmental Science and Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2.Fishery Sciences Research Institute of Shanxi Province, Taiyuan 030006, China)

Abstract: DNA methylation is involved in the regulation of many cellular processes. Environmental stimuli induce DNA methylation alterations which may have important consequences for plant adaptations. In this study, SO₂-induced DNA methylation alteration of a gene encoding nitrilase 2 protein (*NIT2*) in *Arabidopsis* was investigated by using bisulfite sequencing and methylation sensitive restriction enzyme PCR. Quantitative analysis of DNA methylation in *NIT2* promoter region showed that cytosine residues were hypomethylated in both CG and CHH (where H is C, A or T) contexts after plant exposed to 30 mg·m⁻³ SO₂ for 3 d, and the methylation levels of the promoter decreased from 37% to 32%. However, cytosine methylation change in the sequence CCGG in the upstream part of *NIT2* coding region could not be detected in SO₂-exposed plants. RT-PCR analysis indicated that *NIT2* transcript level increased markedly in plants exposed to 30 mg·m⁻³ SO₂ for 3 d. The present results showed that DNA hypomethylation of *NIT2* promoter region was associated with high *NIT2* transcript level in SO₂-exposed plants. Our results were consistent with the previous report that *NIT2* was overexpressed in an *Arabidopsis* mutant deficient in DNA methyltransferase, indicating that *NIT2* expression was directly regulated by promoter DNA methylation. These data suggest that SO₂-induced epigenetic change may be closely related to the gene activation in plant response to SO₂ stress. Our report may help to reveal a possible role of this epigenetic mechanism in plants adaptation to environmental stress.

Keywords: sulfur dioxide; *Arabidopsis*; *NIT2*; DNA methylation; gene expression

DNA 甲基化(DNA methylation)是一种重要的表观遗传修饰形式, 广泛存在于多种有机体中, 通常发

生在胞嘧啶的第 5 位碳原子上, 形成 5-甲基胞嘧啶(5mC)。植物 DNA 甲基化是一种普遍现象, 大约 20%~30% 的基因组 DNA 胞嘧啶处于甲基化状态, 在对称的 CG 位点、CHG 位点和非对称的 CHH(H 代表 A、C 或 T)位点均有甲基化的发生^[1-2]。DNA 甲基化是调节基因功能的重要手段, 参与植物体内一系列的生物学过程, 在基因表达、细胞分化及系统发育中起着重要

收稿日期: 2011-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870454, 30470318); 高等学校博士学科点专项科研基金(20070108007)

作者简介: 李利红(1982—), 女, 山西人, 博士研究生, 主要从事环境毒理学研究。E-mail: lihongli1982@yahoo.cn

* 通讯作者: 仪慧兰 E-mail: yihuilan@yahoo.com.cn

的调控作用,它与基因的转录失活(尤其是转基因的沉默)、转座子的转移失活、基因组印记等多种表观遗传存在密切的关系^[3]。目前,国内外几个实验室先后采用多种方法分析了拟南芥全基因组的甲基化特征,发现大部分基因都存在 DNA 甲基化,且甲基化程度与序列的转录活性密切相关^[4-6]。

近期研究表明,逆境(如盐、热、干旱和重金属等)胁迫能影响植物 DNA 甲基化状态,DNA 甲基化修饰参与了环境胁迫下基因表达调控过程^[7-9]。二氧化硫(SO_2)是一种常见的全球性大气污染物,我们前期完成的甲基化敏感扩增多态性(MSAP)结果显示, SO_2 胁迫诱导拟南芥基因组发生了 DNA 甲基化水平和模式的变异(结果待发)。同时,基因表达谱分析结果表明, SO_2 胁迫导致拟南芥细胞中多个与逆境生理相关的基因转录水平改变^[10],如在植物生长素合成最后一步中起着关键作用的胍水解酶 2(Nitrilase 2, *NIT2*)基因表达水平提高。生长素参与植物体内的多种生理过程,一些生物和非生物胁迫可诱导 *NIT2* 基因的差异表达,通过调节生长素的生物合成来调控植物对逆境胁迫的应答反应^[11-12]。Zhang 等^[2]研究发现,拟南芥 *NIT2* 基因在甲基转移酶突变体中表达增强,提示胁迫条件下基因表达水平的变化可能与 DNA 甲基化状态相关,但有关这方面的研究还未见报道。

本研究采用亚硫酸氢盐修饰后测序法和甲基化敏感性限制性内切酶-PCR(MSRE-PCR)法,分别检测 SO_2 胁迫对拟南芥 *NIT2* 基因启动子区胞嘧啶和编码区 CCGG 位点甲基化水平的影响,并利用 RT-PCR 分析 SO_2 胁迫后该基因的转录水平,探讨 SO_2 胁迫后拟南芥 DNA 甲基化状态的变化及其在植物胁迫应答过程中的作用,为揭示植物对逆境胁迫的适应机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植株培养

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)Columbia 生态型(Col-0),播种于营养土中。4℃春化 2 d 后置于培养间,光照度 $\geq 3\ 000\ \text{lx}$,光/暗周期为 16 h/8 h,培养温度 22℃,相对湿度约 70%。

1.2 SO_2 熏气处理

取 4 周龄的拟南芥植株,采用体积 $0.512\ \text{m}^3$ 的密闭箱静态熏气,温度和光照条件同 1.1。根据 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5 + 2\text{HCl} \rightarrow 2\text{KCl} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{SO}_2$ 的原理,定量产生 SO_2 气体,并采用甲醛吸收-副玫瑰苯胺分光光度法测定 SO_2 浓

度,保持熏气箱内 SO_2 浓度稳定。设对照组和胁迫组,在熏气前 1 d 将植株移入熏气箱中适应箱内环境,胁迫组采用 $(30 \pm 2)\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 的 SO_2 连续熏气 3 d。通过 3 次相同条件独立实验提供后期所需实验材料。

1.3 拟南芥 DNA 及总 RNA 的提取

取对照组和 SO_2 胁迫组拟南芥植株地上部分,采用 CTAB 法提取基因组 DNA;采用 TaKaRa RNAiso Reagent,按说明书步骤提取总 RNA。

1.4 亚硫酸氢盐修饰后测序

参照 Jacobsen 等^[13-14]的方法。取 $2\ \mu\text{g}$ DNA,亚硫酸氢钠处理(55℃,16 h)、过柱纯化(Promega Wizard DNA Clean-up System, A7280)和乙醇沉淀后作为 PCR 扩增模板。*NIT2* 基因引物序列为:5'-ATTTGAA TTATATATTTTTTAAATTAAGTATTATTAATAA AAATAATAAAAAT-3'和 5'-TTAATATACAACCTCTT ATATTTATATATTTAATATACAATTACTATTTTAATA-3'。PCR 扩增条件为:94℃预变性 3 min;94℃10 s,60℃90 s,60℃3 min,2 个循环;94℃10 s,59℃90 s,60℃3 min,2 个循环;94℃10 s,58℃90 s,60℃3 min,2 个循环;94℃10 s,57℃90 s,60℃3 min,32 个循环,最后 60℃延伸 5 min。以无甲基化的基因组区域为亚硫酸氢钠处理完全的对照^[15]。

将 PCR 产物克隆到 pMD-18T 载体(Takara)上,随机挑取 20 个阳性克隆送北京华大基因公司进行序列测定,测序结果通过 <http://www.gmi.oeaw.ac.at/Cy-MATE/>进行甲基化分析^[15]。

1.5 甲基化敏感性限制性内切酶-PCR(MSRE-PCR)

参照 Melnikov 等^[16]的方法。取 $1\ \mu\text{g}$ DNA,加 20 U *Hpa* II 或 *Msp* I (NEB 公司)于 37℃酶切 24 h,将 DNA 纯化后溶于 $10\ \mu\text{L}$ ddH₂O 中,作为 PCR 扩增模板。引物序列为:5'-CAACGATACTCCCGCCACT-3'和 5'-CGAGGATAACCGGATAAAA-3'。扩增条件为:94℃预变性 3 min;94℃30 s,52℃30 s,72℃1 min,30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。琼脂糖电泳检测 PCR 产物。

1.6 RT-PCR 分析

以总 RNA 为模板,使用 M-MLV 反转录酶(Takara)合成 cDNA。*NIT2* 基因引物序列和扩增条件同 1.5。以 *Actin2* 基因为内参,引物序列为:5'-TTCCTCATGCCATCCTCCGTCTT-3'和 5'-CAGC GATACCTGAGAACATAGTGG-3'。扩增程序为:94℃预变性 3 min;94℃30 s,60℃30 s,72℃1 min,30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。琼脂糖电泳检测

PCR 产物。

2 结果与分析

2.1 拟南芥 *NIT2* 基因启动子区 DNA 甲基化状态

经亚硫酸氢盐修饰后, DNA 中甲基化的胞嘧啶保持不变, 仍为胞嘧啶, 而未发生甲基化的胞嘧啶转变成尿嘧啶, 经 PCR 扩增后转化成胸腺嘧啶。利用亚硫酸氢盐修饰后测序法分析对照组拟南芥植株地上组织细胞中 *NIT2* 基因启动子区的甲基化特征, 研究区域为 15993439~15993888(450 bp), 共有 31 个胞嘧啶, 包括 9 个 CG、2 个 CHG 和 20 个 CHH 位点。亚硫酸氢盐修饰后, 经 PCR 扩增得到了与目标序列大小一致的片段; 对 PCR 产物克隆后测序, 将测序结果与 NCBI 数据库中 *NIT2* 基因启动子区序列比对, 目标序列与数据库中的 DNA 序列完全一致, 并发现该区段的 9 个 CG、2 个 CHG 和 17 个 CHH 位点存在甲基化, 还有 3 个 CHH 位点未发生甲基化(图 1)。

2.2 SO_2 胁迫对 *NIT2* 基因启动子区甲基化状态的影响

用亚硫酸氢盐修饰后测序法分析发现, SO_2 胁迫

组拟南芥植株地上组织细胞中 *NIT2* 基因启动子区胞嘧啶甲基化水平降低(图 2)。在对照组中, CG 位点甲基化比率为 93.3%, CHG 和 CHH 位点甲基化比率分别为 35% 和 12%, 胞嘧啶总的甲基化比率为 37%。 SO_2 暴露组中, CG 位点甲基化比率为 82.8%, 下降了 10.5%; CHH 位点变化比较复杂, 有 6 个位点甲基化水平提高, 8 个位点甲基化水平降低, 甲基化比率为 10.3%; CHG 位点甲基化水平提高, 但其增幅较低, 而且目标序列中仅有 2 个 CHG 位点。因此, SO_2 胁迫组整体上表现为甲基化水平下降, 胞嘧啶总的甲基化比率为 32%。

2.3 SO_2 胁迫对 *NIT2* 基因编码区甲基化状态的影响

选择 *NIT2* 基因编码区 5' 端 15994424~15994606 为目标序列, MSRE-PCR 法检测结果表明, 经 *Msp*I 和 *Hpa* II 酶切后, 对照组和 SO_2 胁迫组都得到预期大小的扩增片段(182 bp)(图 3), 可见 *Msp* I 和 *Hpa* II 均对检测序列 CCGG 位点敏感, 两个内切酶都不能酶切该位点, 说明对照组和胁迫组中该 CCGG 位点为全甲基化, 且 SO_2 胁迫未引起该序列甲基化状态

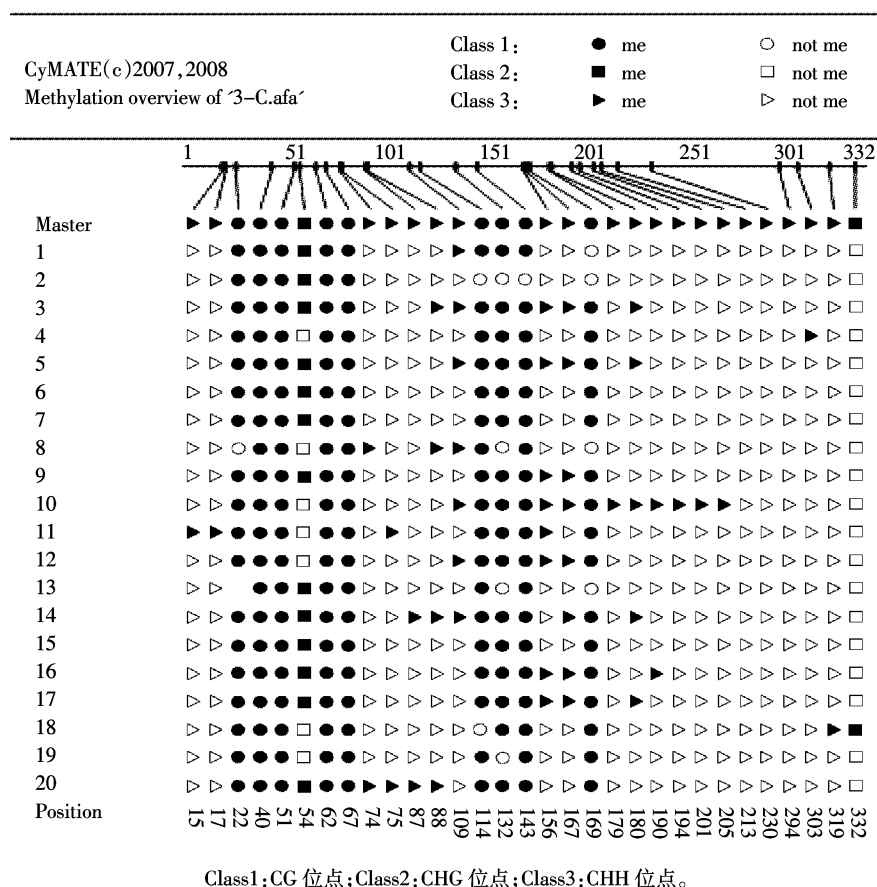
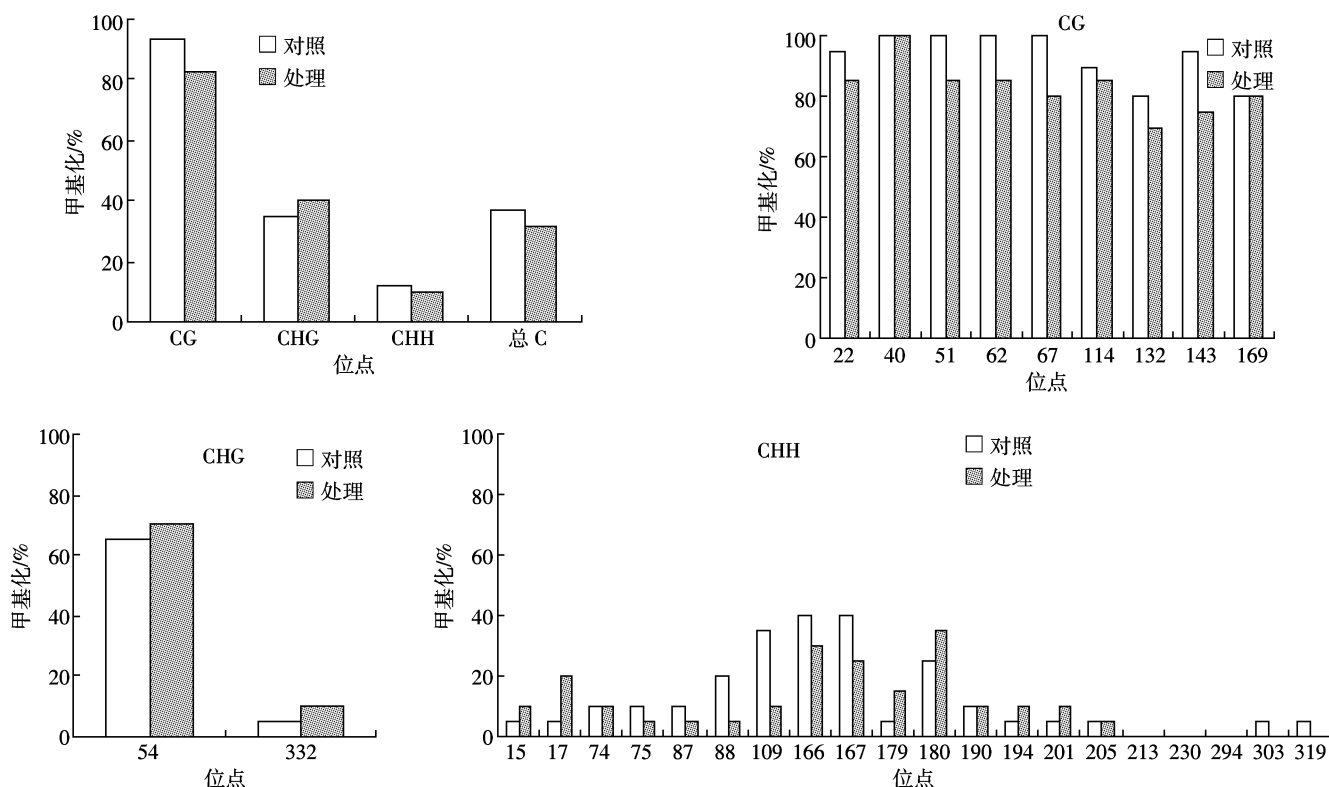
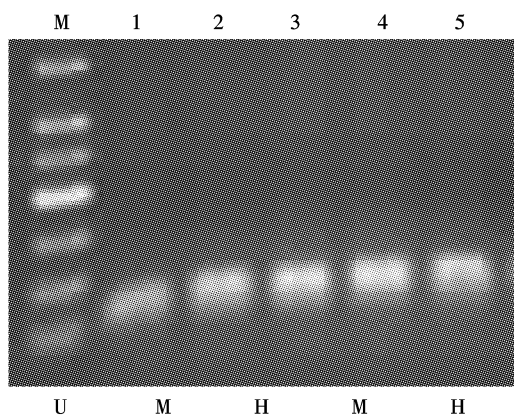


图 1 拟南芥 *NIT2*(at3g44300)基因启动子区序列甲基化特征

Figure 1 Methylation pattern of *NIT2* promoter region in *Arabidopsis* shoot cells

图 2 SO_2 胁迫后 *NIT2* 基因甲基化水平的变化Figure 2 Changes of DNA methylation level of *NIT2* in SO_2 -treated *Arabidopsis* plants

M: 150 bp DNA Marker, 2 和 3 为对照组, 4 和 5 为 SO_2 胁迫组。

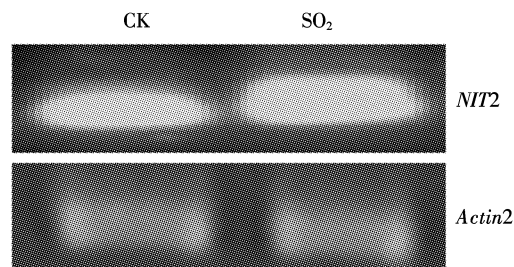
U: 未酶切; M: *Msp* I 酶切; H: *Hpa* II 酶切。

图 3 MSRE-PCR 检测 *NIT2* 基因编码区 CCGG 位点甲基化状态Figure 3 MSRE-PCR detecting the methylation status of one CCGG site in *NIT2* coding region in *Arabidopsis* shoot cells

的改变。

2.4 SO_2 胁迫对 *NIT2* 基因转录水平的影响

RT-PCR 检测结果(图 4)显示, *NIT2* 基因在对照组拟南芥植株地上部分组织细胞中表达, SO_2 胁迫组中 *NIT2* 基因 mRNA 表达量高于对照组, 即 SO_2 胁迫诱导 *NIT2* 基因转录水平提高。

图 4 RT-PCR 检测 *NIT2* 基因的转录水平Figure 4 RT-PCR results of the transcript levels of *NIT2* in *Arabidopsis* shoot cells

3 讨论

植物在生长发育过程中, DNA 甲基化水平的改变在调控重要功能基因表达、基因组防御(保护某些位点不受降解、DNA 损伤修复)以及细胞发育与分化等方面具有重要作用^[17-18]。一般认为, 植物基因中启动子区的过度甲基化能阻碍转录因子复合体与 DNA 的结合, 抑制基因的转录, 引起基因沉默; 而去甲基化则有利于基因表达^[19]。因此, 掌握基因 DNA 甲基化水平的变化将有助于研究功能基因的表达调控以及植物适应逆境胁迫的分子机理。

腈水解酶(Nitrilase, EC 3.5.5.1)是一类水解腈化合物中腈基功能团(R-CN)的酶,能催化吡啶乙腈转变为吡啶乙酸(IAA),在植物生长素合成过程中起关键作用^[20]。植物受病原菌或盐等胁迫时 *NIT2* 基因诱导表达,生长素合成增加,从而影响受生长素调控的多种生理过程^[21]。30 mg·m⁻³ 的 SO₂ 熏气 3 d 后,拟南芥植株叶面出现少量透明斑,但植株继续生长发育,显示了较强的适应性^[10]。本文 RT-PCR 结果表明,30 mg·m⁻³ 的 SO₂ 熏气 3 d 后拟南芥植株地上组织细胞中 *NIT2* 基因转录上调,与前期我们对基因表达谱的分析结果一致,证实了拟南芥植株对 SO₂ 响应过程中 *NIT2* 基因的诱导表达,也说明 *NIT2* 基因及其产物在植株对 SO₂ 胁迫的适应过程中发挥了积极的调节作用。

逆境胁迫可导致 DNA 甲基化水平发生改变,是植物对逆境响应的机制之一^[8,22]。本研究,SO₂ 胁迫组拟南芥植株地上组织细胞中 *NIT2* 基因编码区甲基化状态不变,启动子区的多个 CG 和 CHH 位点去甲基化,胞嘧啶总的甲基化水平降低,同期 *NIT2* 基因转录上调。Choi 等^[23]在受铝胁迫的烟草叶片中发现编码类甘油磷酸酯酶蛋白的 *NtGPD* 基因去甲基化, *NtGPD* 基因转录本增加。李雪林等^[24]研究发现高盐胁迫诱导棉花根中抗逆相关基因 DNA 序列去甲基化,基因表达水平提高。因此,本结果与多数研究报道中逆境胁迫诱导植物 DNA 序列去甲基化,基因转录水平提高的结果一致^[20]。利用 PLANTCARE 在线预测工具分析表明, *NIT2* 基因该启动子区域含有多个胁迫诱导元件,如 ACE、Box4、CAAT-box、TATA-box 和 chs-CMA1a (TTACTTAA) 等。SO₂ 胁迫诱导拟南芥 *NIT2* 基因启动子区域去甲基化,从而有利于转录起始复合物与该启动子区调控元件的结合,及转录复合物沿 DNA 模板链的快速移动,以提高 *NIT2* 基因表达水平,调节植物抗逆生理,增强植株抗性。本研究证实了逆境生理中胁迫响应基因的转录应答与启动子序列的甲基化特征有关,表明 DNA 甲基化修饰在植物胁迫应答过程中发挥了重要作用。

研究表明,活性氧攻击 DNA 形成的 8-羟基鸟苷能影响相邻胞嘧啶的甲基化,诱导异常的表现遗传效应,导致癌症发生,由此推测氧化损伤可能是 DNA 甲基化特征改变的原因^[25]。植物细胞中也可能发生类似事件,逆境胁迫时产生的大量活性氧与胁迫诱发的甲基化特征改变有关^[8,23,26]。SO₂ 胁迫后拟南芥组织中活性氧水平明显增高^[10],活性氧分子可能参与 DNA 甲基化修饰过程,是甲基化特征改变的一个诱因。

4 结论

SO₂ 胁迫后,拟南芥植株地上组织细胞中 *NIT2* 基因启动子区多个 CG 和 CHH 位点去甲基化, DNA 甲基化水平降低,从而有利于逆境生理中 *NIT2* 的转录应答, *NIT2* 基因表达水平提高,在 SO₂ 胁迫应答反应中发挥重要作用,说明植物细胞能通过甲基化修饰调控相关基因的表达,从而提高植物对逆境的适应性。

参考文献:

- [1] Richards E J. DNA methylation and plant development[J]. *Trends in Genetics*, 1997, 13(8):319-323.
- [2] Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2006, 126:1189-1201.
- [3] Razin A, Cedar H. DNA methylation and gene expression[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1991, 55:451-458.
- [4] Cokus S J, Feng S, Zhang X, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning[J]. *Nature*, 2008, 452:215-219.
- [5] 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]. *Nature Genetics*, 2007, 39:61-69.
- [6] Lister R, O'Malley R C, Tonti-Filippini J, et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2008, 133:523-536.
- [7] 杨金兰, 柳李旺, 龚义勤, 等. 镉胁迫下萝卜基因组 DNA 甲基化敏感扩增多态性分析 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2007, 33(3): 219-226.
YANG J-L, LIU L-W, GONG Y-Q, et al. Analysis of genomic DNA methylation level in radish under cadmium stress by methylation-sensitive amplified polymorphism technique[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2007, 33(3):219-226.
- [8] Chinnusamy V, Zhu J K. Epigenetic regulation of stress responses in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(2):133-139.
- [9] 赵云雷, 叶武威, 王俊娟, 等. DNA 甲基化与植物抗逆性研究进展[J]. 西北植物学报, 2009, 29(7):1479-1489.
ZHAO Yun-lei, YE Wu-wei, WANG Jun-juan, et al. Review of DNA methylation and plant stress-tolerance[J]. *Acta Botanica Boreali-Occident Sinica*, 2009, 29(7):1479-1489.
- [10] 仪慧兰, 李利红, 仪民. 二氧化硫胁迫导致拟南芥防护基因表达改变[J]. 生态学报, 2009, 29(4):1682-1687.
YI Hui-lan, LI Li-hong, YI Min. Expression of *Arabidopsis* defense-related genes in response to sulfur dioxide fumigation[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(4):1682-1687.
- [11] Grsic-Rausch S, Kobelt P, M. Siemens J, et al. Expression and localization of nitrilase during symptom development of the clubroot disease

- in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2000, 122:369–378.
- [12] 王爱荣, 刘向国, 赵旭, 等. 水稻腈水解酶家族的生物信息学分析[J]. 中国农学通报, 2009, 25(23):52–57.
- WANG Ai-rong, LIU Xiang-guo, ZHAO Xu, et al. Analysis of rice nitrilase family by bioinformatic methods[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(23):52–57.
- [13] Jacobsen S E, Sakai H, Finnegan E J, et al. Ectopic hypermethylation of flower-specific genes in *Arabidopsis*[J]. *Current Biology*, 2000, 10: 179–186.
- [14] Henderson I R, Chan S R, Cao X, et al. Accurate sodium bisulfite sequencing in plants[J]. *Epigenetics*, 2010, 5:29–31.
- [15] Hetzl J, Foerster A M, Raidl G, et al. CyMATE: A new tool for methylation analysis of plant genomic DNA after bisulfite sequencing[J]. *Plant Journal*, 2007, 51:526–536.
- [16] Melnikov A A, Gartenhaus R B, Levenson A S, et al. MSRE-PCR for analysis of gene-specific DNA methylation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(10):93.
- [17] Finnegan E J, Peacock W J, Dennis E S. DNA methylation, a key regulator of plant development and other process[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2000, 10:217–223.
- [18] Lukens L N, Zhan S H. The plant genome's methylation status and response to stress, implications for plant improvement[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(3):317–322.
- [19] Bird A P. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(1):6–21.
- [20] Park W J, Kriechbaumer V, Muller A, et al. The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid[J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(2):794–802.
- [21] Bao F, Li J Y. Evidence that the auxin signaling pathway interacts with plant stress response[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44:532–536.
- [22] Mirouze M, Paszkowski J. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14:1–8.
- [23] Choi C S, Sano H. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2007, 277(5):589–600.
- [24] 李雪林, 林忠旭, 聂以春, 等. 盐胁迫下棉花基因组 DNA 表观遗传变化的 MSAP 分析[J]. 作物学报, 2009, 35(4):588–596.
- LI Xue-lin, LIN Zhong-xu, NIE Yi-chun, et al. MSAP analysis of epigenetic changes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under salt stress[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35(4):588–596.
- [25] Cerda S, Weitzman S A. Influence of oxygen radical injury on DNA methylation[J]. *Mutation Research*, 1997, 386(2):141–152.
- [26] Peng H, Zhang J. Plant genomic DNA methylation in responses to stresses: Potential applications and challenges in plant breeding[J]. *Progress in Natural Science*, 2009, 19(3):1037–1045.