

# 银杏基因组DNA甲基化修饰位点的MSAP分析

李际红, 邢世岩\*, 王聪聪, 张 倩, 付茵茵

(山东农业大学林学院, 农业生态与环境重点实验室, 山东泰安 271018)

**摘 要:** 利用 *EcoR* I 和 *Hpa* II/*Msp* I 双酶切建立适合于银杏基因组的甲基化敏感扩增多态性 (methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP) 分析体系, 在全基因组水平检测银杏 DNA 甲基化修饰水平、模式及位点等表观遗传信息。结果显示, 从 54 对 MSAP 选扩引物中, 选出 16 对 MSAP 引物组合, 共扩增产生 454 条清晰可辨且可重复的 DNA 条带, 平均每对引物扩增获得 28.38 条带。在全部扩增位点中, 检测到甲基化位点 200 个, CCGG/GGCC 位点甲基化修饰比例为 44%。部分银杏基因组甲基化修饰位点进行回收, 最终分离了 18 条存在甲基化修饰的基因组 DNA 序列。BLASTn 比对分析表明, 银杏基因组中包括转录调控因子、反转录转座子、通道蛋白、启动子结合蛋白、蛋白激酶等在内的多种类型的 DNA 序列中均存在 DNA 甲基化修饰现象。

**关键词:** 银杏; 表观遗传学; DNA 甲基化; MSAP

**中图分类号:** S 664.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) 08-1429-08

## Analysis on Genomic DNA Methylation Modification of *Ginkgo biloba* by Methylation-sensitive Amplification Polymorphism

LI Ji-hong, XING Shi-yan\*, WANG Cong-cong, ZHANG Qian, and FU Yin-yin

(Key Laboratory of Agricultural Ecology and Environment, College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

**Abstract:** To investigate the DNA methylated modification levels, patterns and sites of the *Ginkgo biloba* at the genome-wide level, the double digestion of *EcoR* I and *Hpa* II/*Msp* I was used to construct the *Ginkgo biloba* genomic MSAP (methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP) analysis system. By using 16 pairs of selective primers from the 54 pairs of MSAP selective primers, a total of 454 legible and repeatable amplified DNA bands were detected, on average 28.38 bands were observed after amplification with each primer pair. Two-hundred DNA methylated sites were detected among all the amplified sites, which represented 44% ratio of methylated modification at CCGG/GGCC sites in *Ginkgo biloba* genome. Eighteen methylated DNA sequences were isolated and sequenced by extracting part of the amplified sites. BLASTn comparison indicated that the DNA methylated modification phenomenon was existed in multiple types of DNA sequences, including repeated sequences, transcription regulators, retrotransposons, channel protein, promoter-binding protein, protein kinase, etc.

收稿日期: 2011-04-25; 修回日期: 2011-06-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30872040)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xingsy@sdaa.edu.cn)

**Key words:** *Ginkgo biloba*; epigenetic; DNA methylation; methylation-sensitive amplification polymorphism

DNA 甲基化 (DNA methylation) 是基因组 DNA 的一种主要表观遗传 (epigenetics) 修饰形式, 是调节基因组功能的重要手段 (邢世岩 等, 2009)。高等植物基因组中约有 20%~50% 的胞嘧啶残基发生甲基化, 其中约有 90% 的甲基化位于 “CpG” 二核苷酸或 “CpNpG” 三核苷酸对中 (Zhang et al., 2006)。DNA 甲基化修饰与基因表达调控、胚胎发育、细胞分化、基因组印迹、性染色体失活以及细胞记忆等诸多生物学过程密切相关 (Monk & Maurizio, 1995)。是目前生物科学研究领域的热点。越来越多的研究表明, 在树木生长发育过程中伴随着广泛的表观遗传变异 (Monteuuis, 1989; Fraga et al., 2002a, 2002b), 因此对树木生长发育过程中 DNA 甲基化水平和模式变化的研究十分必要。

银杏是现存裸子植物中与恐龙同时代的最古老的孑遗植物, 近十几年来人们对银杏的分子生物学方面开展了深入研究。桂仁意 (2004) 采用 RAPD 技术, 葛永奇等 (2003) 利用 ISSR 技术, 王利等 (2006) 采用 AFLP 研究了银杏的遗传多样性和亲缘关系; 桂仁意 (2004) 构建了银杏的 RAPD 遗传图谱; 王晓梅等 (2001) 用 RAPD 标记获得 1 个与银杏雄性相关的标记, 同时用 AFLP 标记获得两个银杏雌性基因组所特有标记; 沈永宝等 (2005) 用 ISSR 标记进行了银杏品种鉴定的研究。但到目前为止, 有关银杏全基因组中蕴藏的表观遗传学信息却没有引起研究者足够的重视, 对其基因组 DNA 甲基化修饰水平、模式、位点及基因表达表观调控等表观遗传学信息未见研究报道。

MSAP (甲基化敏感扩增多态性, methylation-sensitive amplification polymorphism) 是一种基于选择性 PCR 的新技术, 结合了 AFLP (扩增片段长度多态性, amplified fragment length polymorphism) 的优点, 能够有效检测出样品 DNA 中大量的甲基化位点, 多态性高, 无需预先知道所分析 DNA 的序列, 即可对全基因组范围内胞嘧啶甲基化程度进行分析, 又能检测 DNA 片段特异性位点甲基化状态。现已成为检测植物基因组 DNA 甲基化水平和模式的重要方法 (Zhang et al., 2007; Monteuuis et al., 2008)。

本研究中选用山东省泰安市一株银杏雌株作为研究对象, 采用 *EcoR* I 和 *Hpa* II/*Msp* I 双酶切建立适合于银杏基因组的 MSAP 技术体系, 在全基因组水平检测 DNA 甲基化的修饰水平、模式及位点等表观遗传信息, 旨在解析 DNA 甲基化对相关基因差异表达的潜在调控机制, 为银杏表观遗传学研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及其DNA提取

银杏雌株选自山东省泰安市老君堂, 树龄约 1 300 年。该古树所处的地理位置为北纬 36°11', 东经 117°08', 海拔 150 m。2009 年 4 月 1 日采集新鲜嫩叶放入保鲜袋中 (内装硅胶) 带回实验室, 用去离子水冲洗干净, 再用干净的吸水纸将水吸干, 放入硅胶, 置于冰箱 4 °C 中保存备用。参照沈永宝和施季森 (2001) 的方法, 采用改良的 CTAB 法提取叶片基因组 DNA。所提 DNA 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用分光光度法定量后, -20 °C 保存备用。

### 1.2 MSAP分析

MSAP 分析流程参照 Vos 等 (1995) 的 AFLP 方法并经修改进行, 其中分别用 *EcoR* I + *Hpa* II,

*EcoR* I + *Msp* I（Fermentas Lithuanian）内切酶组合对基因组 DNA 进行酶切、连接、预扩增、选择性扩增、6%聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染检测、读带和数据整理。*EcoR* I 接头及引物序列参照 Vos 等（1995）的序列，*Hpa* II（*Msp* I）接头及引物序列以 Xiong 等（1999）的序列为参照（表 1）。所有接头与引物序列均委托上海生工（Sangon, China）合成。

表 1 MSAP 分析的接头和引物序列  
Table 1 Sequence of adapters and primers used for MSAP analysis

接头和引物 Adaptor and primer (5'→3')	序列 Sequence
接头 Adaptors (5'→3')	
<i>EcoR</i> I adaptors (正向 Forward)	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
<i>EcoR</i> I adaptors (反向 Reverse)	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
<i>Hpa</i> II- <i>Msp</i> I adaptors (正向 Forward)	5'-GACGATGAGTCTAGAA-3'
<i>Hpa</i> II- <i>Msp</i> I adaptors (反向 Reverse)	5'-CGTTCTAGACTCATC-3'
预扩增引物 Preselective primers (5'→3')	
EA00 + A	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCA-3'
E00 + A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
<i>Hpa</i> II- <i>Msp</i> I + T	5'-GATGAGTCTAGAACGGT-3'
选扩增引物组合 Selective primers combinations (5'→3')	
EA00 + ACG	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCACG-3'
E00 + ACG	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'
EA00 + ATG	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCATG-3'
E00 + ATG	5'-GACTGCGTACCAATTCAG-3'
E00 + ACT	5'-GACTGCGTACCAATTCATC-3'
E00 + ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'
E00 + AA	5'-GACTGCGTACCAATTCAA-3'
E00 + AT	5'-GACTGCGTACCAATTCAT-3'
HM + TTC	5'-GATGAGTCTAGAACGGTTC-3'
HM + TCG	5'-GATGAGTCTAGAACGGTCG-3'
HM + TAG	5'-GATGAGTCTAGAACGGTAG-3'

1.3 甲基化修饰位点回收、克隆及测序

在 PAGE 胶板尚未干燥之前将甲基化修饰位点用刀片挖下，捣碎，加 30 μL 灭菌双蒸水沸水浴 5 min，自然冷却，取 2 μL 上清液为扩增模板，以相应选扩引物组合及扩增条件进行 PCR 扩增。PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶上检测，以 PCR 纯化试剂盒进行回收（TaKaRa, Japan）。回收产物连接入 pMD18-T 载体（TaKaRa, Japan），转化大肠杆菌感受态细胞，挑选阳性单克隆。序列测定委托上海生工（Sangon, China）进行合成。

1.4 序列比对及分析

所得序列用 BLASTn 程序在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上进行同源性检索，序列信息登录 GenBank Database 注册。在 GenBank 数据库检索同源核苷酸序列 (Database: refseq\_rna)。

2 结果与分析

2.1 银杏的MSAP扩增图谱

经MSAP分析，获得了谱带清晰，重复性好，甲基化修饰位点丰富的银杏MSAP扩增图谱（图 1）。*Hpa* II 和 *Msp* I 的酶切位点均为（CCGG/GGCC），但二者对酶切位点甲基化修饰敏感性不同，*Hpa* II 能识别并切割非甲基化和半甲基化位点（<sup>5m</sup>CCGG/GGCC），而不能切割全甲基化位点

( $C^{5m}CGG/GG^{5m}CC$ ); *Msp* I 能识别并切割非甲基化和全甲基化位点而不能切割半甲基化位点。因而以此同裂酶分别与 *Eco*R I 组合进行 MSAP 反应时, 每个扩增位点均代表一个 (CCGG/GGCC) 位点, 而对比 *Hpa* II 与 *Msp* I 不同的扩增模式可反映该位点甲基化状态及程度 (图 1), 将甲基化的类型分为: A 型, 均有带, 代表非甲基化位点 (或单链内甲基化); B 型, *Hpa* II 有带、*Msp* I 无带, 代表半甲基化位点; C 型, *Hpa* II 无带、*Msp* I 有带, 代表全甲基化位点。

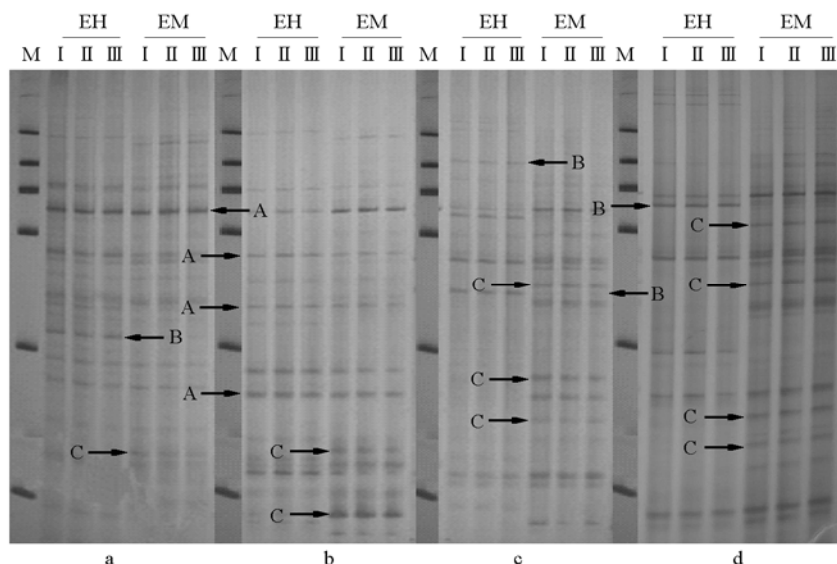


图 1 银杏基因组 DNA 的 MSAP 扩增图谱

A: 非甲基化位点; B: 半甲基化位点; C: 全甲基化位点。EH: *Eco*R I + *Hpa* II 双酶切; EM: *Eco*R I + *Msp* I 双酶切;  
M: 2 000 的 DNA 分子量标准; I ~ III: 重复试验; a ~ d: 不同选扩引物扩增结果。

Fig. 1 MSAP fingerprints of *Ginkgo biloba* genomic DNA

A: Non-methylated sites; B: Hemi-methylated sites; C: Full-methylated sites. EH: *Eco*R I + *Hpa* II double digestion; EM: *Eco*R I + *Msp* I double digestion; M: 2 000 the DNA molecular-weight marker; I - III: Repeats; a - d: Different primer combinations.

## 2.2 基因组DNA甲基化修饰水平分析

*Eco*R I 选扩引物分别与 *Hpa* II、*Msp* I 选扩引物配对, 从 54 对 MSAP 选扩引物中按照扩增所得图谱清晰、多态性丰富、重复性好的标准, 选出 16 对引物组合, 共扩增产生 454 条清晰可辨且可重复的 DNA 条带, 平均每对引物扩增获得 28.38 条带 (表 2)。在全部扩增位点中, 检测到甲基化位点 200 个, 比例为 44%。其中, 全甲基化位点为 149 个, 占全部扩增位点的 32.8%; 半甲基化位点为 51 个, 占全部扩增位点的 11.2% (表 2)。

## 2.3 DNA甲基化修饰位点序列分析

对部分银杏基因组甲基化修饰位点进行回收、克隆, 最终成功分离了 18 条甲基化修饰 DNA 序列 (表 3)。BLASTn 比对分析表明, 这 18 条甲基化修饰 DNA 序列均检索到同源系列, 根据匹配的同源序列功能注释进行划分, 发现银杏基因组中包括转录调控因子 (M4)、转座子 (M13)、反转录转座子 (M10、M13)、通道蛋白 (M10、M11)、启动子结合蛋白 (M16)、蛋白激酶 (M9、M17)、假定蛋白 (M6、M7、M8、M11、M14、M15)、泛素蛋白 (M5)、乙醇脱氢酶 (M16、M18) 等的多种类型的 DNA 序列中均存在 DNA 甲基化修饰现象。

表 2 16 对 MSAP 选扩引物组合在银杏全基因组中的检测结果  
Table 2 Number of bands amplified using 16 MSAP selective primers combinations in *Ginkgo biloba*

E 引物 E primer	H/M 引物 H/M primer	扩增位点 Amplification site	半甲基化位点 Hemi-methylated site	全甲基化位点 Full-methylated site
EA00-ACG	H/M-TCG	23	2	7
E00-ACG	H/M-TCG	22	3	6
EA00-ATG	H/M-TCG	26	2	8
E00-ATG	H/M-TCG	30	2	13
EA00-ACG	H/M-TTC	35	5	10
E00-ACG	H/M-TTC	23	1	7
EA00-ATG	H/M-TTC	43	5	16
E00-ATG	H/M-TTC	30	2	12
E00-AA	H/M-TTC	56	8	15
E00-AT	H/M-TTC	43	5	11
E00-AA	H/M-TCG	46	6	13
E00-AT	H/M-TCG	14	2	5
E00-ACA	H/M-TCG	17	1	4
E00-ACT	H/M-TTC	13	2	6
E00-ACA	H/M-TTC	18	2	7
E00-ACT	H/M-TCG	15	3	9
总计 Total		454	51	149
甲基化位点比例/% Rate of methylated			11.2	32.8

表 3 银杏基因组 DNA 甲基化修饰位点的序列及比对结果  
Table 3 Sequence analysis of the methylated sites in *Ginkgo biloba*

序列 Sequence	长度/bp Length	BLASTn (genome sequence) 同源序列 Homologous sequence	一致性/% Identity	E 值 E value
M1	198	<i>Pinus taeda</i> clone PT_7Ba3204L22 (AC241320.1)	78	2.6
M2	198	<i>Vitis vinifera</i> , whole genome shotgun sequence, contig VV78X117801.19, clone ENTAV 115 (AM435357.1)	87	9.1
M3	99	<i>Physcomitrella patens</i> subsp. <i>patens</i> predicted protein(PHYPADRAFT_105273)mRNA, complete cds (XM_001758097.1)	86	3.7
M4	337	<i>Lupinus luteus</i> gene for glutamine synthetase X71399.1	88	4.8
M5	461	<i>Populus trichocarpa</i> predicted protein, mRNA (XM_002307215.1)	100	6.8
M6	273	<i>Humulus lupulus</i> clone ACA1-B21-1 microsatellite sequence (EU094937.1)	87	3.8
M7	198	<i>Candidatus Amoebophilus asiaticus</i> 5a2, complete genome (CP001102.1)	78	2.6
M8	167	<i>Triticum aestivum</i> chromosome 3B-specific BAC library, contig ctg0528b (FN564431.1)	92	7.4
M9	187	<i>Carica papaya</i> BAC clone 46O19, complete sequence (AC238599.1)	89	6.00E-08
M10	245	<i>Tetrahymena thermophila</i> cation channel family protein, (XM_001020203.1)	81	0.96
M11	195	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2, complete genome (AE006641.1)	100	9
M12	130	<i>Petunia integrifolia</i> subsp. <i>inflata</i> S2 self-incompatibility ribonuclease (S2-RNase) and S2-locus F-box protein (SLF2) (AY136628.2)	92	9.00E-04
M13	277	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2, complete genome (CP000557.1)	90	3.9
M14	249	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> hypothetical protein, mRNA (XM_002882620.1)	81	0.98
M15	165	<i>Arachis diogeni</i> clone ADAF44 putative short chain alcohol dehydrogenase GU785017.1	100	0.6
M16	282	<i>Vitis vinifera</i> , whole genome shotgun sequence, contig VV78X109843.5, clone ENTAV 115 (AM446690.1)	85	0.32
M17	167	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> M1, complete genome (CP001900.1)	80	7.4
M18	356	<i>Cycas taitungensis</i> mitochondrial DNA. DADH, complete genome (AP009381.1)	91	4.00E-07

3 讨论

MSAP 技术是在 AFLP 技术的基础上发展起来的一种新的分子标记技术，利用对同一酶切识别位点（CCGG/GGCC）中胞嘧啶甲基化修饰敏感性不同的一对同裂酶（*Hpa* II/*Msp* I）代替 AFLP 技术的 *Mse* I 与 *Eco*R I 对基因组分别进行酶切，并设计相应接头和引物，扩增后产生甲基化敏感扩增多态性谱带的一项技术。Reyna-Lopez 等（1997）的研究认为，MSAP 技术所需 DNA 量少，不需

Southern 杂交, 敏感性强, 一次性检出位点多, 试验结果稳定可靠, 适用于全基因组水平甲基化位点分析, 尤其适用于未知基因组序列的物种。MSAP 技术, 被广泛应用于多种植物表观遗传学研究中 (Ruiz-García et al., 2005; Salmon et al., 2005; Sharma et al., 2007)。

Zhang 等 (2007) 研究报道, MSAP 技术在植物研究中对于基因组 DNA 甲基化检出率在 4.7%~45% 之间, 植物基因组 DNA 甲基化修饰检出率不同, 反映了基因组物种差异性。本研究中, 通过优化实验体系, 筛选引物组合, 获得了清晰、稳定的银杏 MSAP 扩增谱带, 检测到甲基化修饰位点 200 个, 甲基化修饰比例为 44.0%, 与杉木 (20.66%~25.40%) (洪舟 等, 2009)、巨杉 (13.4%~23%), (Monteuuis et al., 2008)、辐射松 (30%~35%) (Fraga et al., 2002)、落叶松 (20%) (Greenwood et al., 1989)、红豆杉 (12.4%~16.2%) (李丽琴等, 2009)、栗树 (13.7~35.0%) (Hasbún et al., 2005)、脐橙 (4.7%~15.0%) (洪柳和邓秀新, 2005)、黑麦 (51.72%)、小麦 (41.56%~44.83%)、水稻 (15.9%~16.3%)、山羊草 (30.2%~33.2%) (张勇 等, 2009) 等上述植物基因组 DNA 甲基化修饰检出率有所不同, 这进一步反映了基因组在 DNA 修饰层面的物种差异性。据陆光远等 (2005) 研究, 由于 MSAP 使用的同裂酶只能识别 “CCGG/GGCC” 位点的胞嘧啶甲基化, 而不能对 “CCGG/GGCC” 位点以外的胞嘧啶甲基化进行修饰, 获得的结果对于基因组中实际的甲基化水平可能估计不准。但因为 “CCGG/GGCC” 位点中, 其中约 90% 的甲基化修饰位于 “CpG” 二核苷酸或 “CpNpG” 三核苷酸重复区内, 因此多数研究者 (Reyna-Lopez et al., 1997; Ruiz-García et al., 2005; Salmon et al., 2005) 认为相对于 “CCGG/GGCC” 位点的甲基化修饰比例, 能够客观反映植物基因组甲基化修饰水平。本研究首次在银杏的全部扩增位点中检测到甲基化位点 200 个, CCGG/GGCC 位点甲基化修饰比例为 44%。为银杏表观遗传学的深入研究提供了一定依据。

DNA 甲基化在调节基因表达, 控制细胞分化及系统发育等过程中起着重要的生物学功能 (Huang et al., 2010)。高等植物基因组中, 大约 20%~50% 的胞嘧啶处于甲基化状态, 这是植物维持正常的生长发育所必需的 (Monk & Maurizio, 1995; Zhang et al., 2006; Zilberman et al., 2007)。Fraga 等 (2002a) 对辐射松不同发育阶段甲基化程度进行研究发现, 幼年 DNA 甲基化水平 30%~50%, 而成年是 60%。Fraga 等 (2002b) 又重复嫁接成年组织使其复壮, 发现 DNA 总甲基化水平降低, 经过 4 次连续嫁接后, 胞嘧啶甲基化含量下降 35%。上述试验均表明, DNA 甲基化水平可能与幼年的形态建成相关, 随着年龄增加, DNA 甲基化水平呈上升趋势。树龄 1 300 年的银杏树其甲基化比例较其他木本植物高, 本研究结果也反映了这种变化趋势。在植物生长发育过程中, 如果 DNA 甲基化水平非正常变化, 将会导致发育异常、生活力下降等诸多表型变异 (Vaughn et al., 2007)。

Zilberman 等 (2007) 发现, 在拟南芥基因组中, 大部分编码基因及转座子序列存在相当比例的 DNA 甲基化, 甲基化程度的不同与相应序列的转录活性密切相关, 进而影响植株的表型。例如在拟南芥 *ibm1* 突变体中, 细胞周期调控相关基因甲基化水平表现异常, 突变体表现植株矮化、叶片变小、开花延迟、种子变小、结实率降低以及育性下降等变异 (Saze et al., 2008)。Cheng 等 (2006) 研究也认为转座元件和一些重复序列是甲基化变异的主要位点, 这些序列 DNA 甲基化模式的改变可以影响植物花期、育性、形态等表型性状。Yun 等 (2009) 研究结果显示重复序列与转座子与植物的表型相关。

本研究中, 从银杏基因组中分离了 18 条存在 DNA 甲基化修饰的基因组序列, 通过匹配的同源序列功能注释, 发现银杏基因组中包括大量的转座子序列、反转录转座子序列、散在重复序列、叶绿体通道蛋白及乙酸脱氢酶在内的多种类型 DNA 序列中均存在 DNA 甲基化修饰现象, 结合上述多位学者的研究结果, 推测这些转座子序列、反转录转座子序列、散在重复序列以及功能基因序列中保持正常的 DNA 甲基化修饰可能与维持银杏基因组水平的结构稳定及相关基因的正常表达有关。以 “CpG” 二核苷酸中胞嘧啶 5' 甲基化为特征的 DNA 甲基化修饰, 是表观遗传修饰最主要的方式

之一, 具有重要的生物学功能。

## References

- Cheng C, Daigen M, Hirochika H. 2006. Epigenetic regulation of the rice retrotransposon *Tos17*. *Mol Gen Genomics*, 276 (4): 378 – 390.
- Fraga M F, Canal M J, Rodriguez R. 2002a. Phasechange related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don. *Planta*, 215 (4): 672 – 678.
- Fraga M F, Uriol E, Diego L B, Berdasco M, Esteller M, Canal M J, Rodriguez R. 2002b. High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: Application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis*, 23: 1677 – 1681.
- Ge Yong-qi, Qiu Ying-xiong, Ding Bing-yang, Fu Cheng-xin. 2003. An ISSR analysis on population genetic diversity of the relict plant *Ginkgo biloba*. *Biodiversity Science*, 11 (4): 276 – 287. (in Chinese)
- 葛永奇, 邱英雄, 丁炳扬, 傅承新. 2003. 孑遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析. *生物多样性*, 11 (4): 276 – 287.
- Greenwood M S, Hopper C A, Hutchinson K W. 1989. Maturation in larch. I. Effect of age on shoot growth, foliar characteristics, and DNA methylation. *Plant Physiol*, 90: 406 – 412.
- Gui Ren-yi. 2004. The construction of fingerprints and linkage map of main cultivated *Ginkgo biloba* [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Forestry University. (in Chinese)
- 桂仁意. 2004. 银杏主要栽培品种指纹图谱构建及遗传图谱构建研究 [博士论文]. 南京: 南京林业大学.
- Hasbún R, Valledor L, Berdasco M, Santamaria E, Cañal M J, Rodriguez R, Rios D, Sánchez M. 2005. *In vitro* proliferation and genome DNA methylation in adult chestnuts. *Ishs Acta Horti*, 693: 333 – 340.
- Hong Liu, Deng Xiu-xin. 2005. Analysis of DNA methylation in navel oranges based on MSAP marker. *Scientia Agricultura Sinica*, 38 (11): 2301 – 2307. (in Chinese)
- 洪柳, 邓秀新. 2005. 应用 MSAP 技术对脐橙品种进行 DNA 甲基化分析. *中国农业科学*, 38 (11): 2301 – 2307.
- Hong Zhou, Shi Ji-sen, Zheng Ren-hua, Yang Li-wei, Chen Xiao-chou, Weng Yu-zhen, Huang Jin-hua. 2009. Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation in Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) intraspecific hybrids. *Molecular Plant Breeding*, 7 (3): 591 – 598. (in Chinese)
- 洪舟, 施季森, 郑仁华, 杨立伟, 陈孝丑, 翁玉榛, 黄金华. 2009. 杉木亲本自交系及其杂交种 DNA 甲基化和表观遗传变异. *分子植物育种*, 7 (3): 591 – 598.
- Huang J J, Wang H H, Xie X J, Zhang D, Liu Y, Guo Q Q. 2010. Roles of DNA methyltransferases in *Arabidopsis* development. *African Journal of Biotechnology*, 9 (50): 8506 – 8514.
- Li Li-qin, Fu Chun-hua, Zhao Chun-fang, Wu Wen-juan, Yu Long-jiang. 2009. Genetic and epigenetic variations of *Taxus media* L. cv. Hicksii during process of dedifferentiation. *Plant Physiology Communications*, 45 (6): 544 – 548. (in Chinese)
- 李丽琴, 付春华, 赵春芳, 吴文娟, 余龙江. 2009. 红豆杉脱分化过程中的遗传和表观遗传变异. *植物生理学通讯*, 45 (6): 544 – 548.
- Lu Guang-yuan, Wu Xiao-ming, Chen Bi-yun, Gao Gui-zhen, Xu Kun, Li Xiang-zhi. 2005. Analysis on genomic DNA demethylation modification of seed germination *Brassica* by methylation-sensitive amplification polymorphism. *Science Bulletin*, 50: 2750 – 2756. (in Chinese)
- 陆光远, 伍晓明, 陈碧云, 高桂珍, 许鲲, 李响枝. 2005. 油菜种子萌发过程中 DNA 甲基化的 MSAP 分析. *科学通报*, 50: 2750 – 2756.
- Monk M, Maurizio Z. 1995. Methylation of the mouse *Xist* gene in sperm and eggs correlates with imprinted *Xist* expression and paternal X-inactivation. *Nature Genetics*, 9: 316 – 320.
- Monteuuis O. 1989. Maturation concept and possible rejuvenation of arborescent species. Limits and promises of shoot apical meristems to ensure successful cloning // Breeding tropical trees: Population structure and genetic improvement strategies in clonal and seedling forestry. Proc Conference IUFRO. Cambridge: Cambridge University Press: 106 – 118.
- Monteuuis O, Doubeau S, Verdeil J L. 2008. DNA methylation in different origin clonal offspring from a mature *Sequoiadendron giganteum* genotype. *Trees*, 22: 779 – 784.
- Reyna-Lopez G E, Simpson J, Ruiz-Herrera J. 1997. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphism. *Molecular Genetics and Genomics*, 253: 703 – 710.

- Ruiz-García L, Cervera M T, Martínez-Zapater J M. 2005. DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development. *Planta*, 222: 301 – 306.
- Salmon A, Ainouche M L, Wendel J F. 2005. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology*, 14: 1163 – 1175.
- Saze H, Shiraishi A, Miura A, Kakutani T. 2008. Control of genomic DNA methylation by a jmjC domain-containing protein in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 319: 462 – 465.
- Sharma S K, Bryan G J, Winfield M O, Millam S. 2007. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: A comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta*, 226: 1449 – 1458.
- Shen Yong-bao, Shi Ji-sen. 2001. DNA extraction from different tissues of *Ginkgo* and Chinese chestnut. *Journal of Nanjing Forestry University*, 25 (6): 80 – 82. (in Chinese)
- 沈永宝, 施季森. 2001. 银杏、板栗不同组织 DNA 的提取. *南京林业大学学报*, 25 (6): 80 – 82.
- Shen Yong-bao, Shi Ji-sen, Zhao Hong-liang. 2005. Identification on the main cultivated varieties of *Ginkgo biloba* using ISSR DNA marker. *Scientia Silvae Sinicae*, 41 (1): 202 – 204. (in Chinese)
- 沈永宝, 施季森, 赵洪亮. 2005. 利用 ISSR DNA 标记鉴定主要银杏栽培品种. *林业科学*, 41 (1): 202 – 204.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23 (21): 4407 – 4414.
- Vaughn M W, Tanurd I C M, Lippman Z, Jiang H M, Carrasquillo R, Rabinowicz P D, Dedhia N, McCombie W R, Agier N, Bulski N, Colot V, Doerge R W, Martienssen R A. 2007. Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology*, 5: 174.
- Wang Li, Xing Shi-yan, Yang Ke-qiang, Wang Zheng-hua, Guo Yan-yan, Shu Huai-rui. 2006. Genetic relationships of ornamental cultivars of *Ginkgo biloba* analyzed by AFLP techniques. *Acta Genetica Sinica*, 33 (11): 1020 – 1026. (in Chinese)
- 王 利, 邢世岩, 杨克强, 王正华, 郭彦彦, 束怀瑞. 2006. 银杏观赏品种遗传关系的 AFLP 分析. *遗传学报*, 33 (11): 1020 – 1026.
- Wang Xiao-mei, Song Wen-qin, Liu Song, Li Xiu-lan, Chen Rui-yang. 2001. AFLP markers related to sex in a dioecious plant, *Ginkgo biloba* L. *Journal of Nankai University: Natural Sciences Edition*, 34 (1): 5 – 9. (in Chinese)
- 王晓梅, 宋文芹, 刘 松, 李秀兰, 陈瑞阳. 2001. 利用 AFLP 技术筛选与银杏性别相关的分子标记. *南开大学学报: 自然科学版*, 34 (1): 5 – 9.
- Xing Shi-yan, Li Ji-hong, Wang Jing-mei, Yao Lin-mei, Han Chen-jing, Zhang Fang. 2009. Summary of epigenetic variation in plants. *Molecular Plant Breeding*, 7 (5): 996 – 1003. (in Chinese)
- 邢世岩, 李际红, 王京梅, 姚林梅, 韩晨静, 张 芳. 2009. 植物表观遗传变异. *分子植物育种*, 7 (5): 996 – 1003.
- Xiong L Z, Xu C G, M A S, Maroof S, Zhang O. 1999. Patterns of cytosine methylation in an elicit hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 26 (3): 439 – 446.
- Yun Jung Oh, Hee Chung, Jae Gyeong Yu, Young Doo Park. 2009. Newly developed MSAP analysis reveals the different polymorphism patterns in transgenic tobacco plants with the dsRNA *MET1* gene. *Plant Biotechnol Rep*, 3 (2): 139 – 145.
- Zhang M S, Yan H Y, Zhao N, Lin X Y, Pang J S, Xu K Z, Liu L X, Liu B. 2007. Endosperm-specific hypo methylation, and meiotic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) inter-strain hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 115: 195 – 207.
- Zhang X Y, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan S W L, Chan H M, Henderson L R, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen S E, Ecker J R. 2006. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, 12: 1189 – 1201.
- Zhang Yong, Deng Ke-jun, Zhang Tao, Peng Jin-hua, Zhou Jian-ping, Ren Zheng-long. 2009. Analysis on genomic DNA methylation modification of rye by methylation-sensitive amplification polymorphism. *Journal of Triticeae Crops*, 29 (4): 559 – 564. (in Chinese)
- 张 勇, 邓科君, 张 韬, 彭金华, 周建平, 任正隆. 2009. 黑麦基因组 DNA 甲基化修饰位点的 MSAP 分析. *麦类作物学报*, 29 (4): 559 – 564.
- Zilberman D, Gehring M, Tran R K, Ballinger T, Henikoff S. 2007. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics*, 39: 61 – 69.