

巴西橡胶树体细胞胚发生过程中DNA甲基化分析

李辉亮, 郭冬, 彭世清*

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海口 571101)

摘要: 为探讨巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)自根幼态无性系与供体间差异产生的原因,应用甲基化敏感扩增多态性扩增技术,对巴西橡胶树体细胞胚发生过程中基因组 DNA 胞嘧啶甲基化程度和模式进行了分析。结果表明,在巴西橡胶树体细胞胚发生过程中不同阶段的 DNA 甲基化程度不同,以花药的 DNA 甲基化程度最高,体细胞胚的 DNA 甲基化水平最低。在体细胞胚发生过程中出现了 I、II 和 III 3 种类型的甲基化多态性带型的改变,包括他们的出现与消失。因此,橡胶树体细胞胚发生过程中可能通过 DNA 甲基化和去甲基化来调控基因的表达。

关键词: 橡胶树;体细胞胚;DNA 甲基化;甲基化敏感扩增多态性

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.05.007

Changes in DNA Methylation during Somatic Embryogenesis of *Hevea brasiliensis*

LI Hui-liang, GUO Dong, PENG Shi-qing*

(Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: In order to understand the causes of differences between self-rooting juvenile clone and donors of *Hevea brasiliensis*, the extent and pattern of cytosine methylation in genomic DNA of *H. brasiliensis* were studied by using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). The results showed that MSAP profiles of genomic DNA were different during somatic embryogenesis. The genomic DNA methylation of anther was the highest among all tissues, while that of somatic embryo was the lowest. Changes in types of MSAP bands among different tissues were frequently observed, including appearance and disappearance of types I, II, and III MSAP bands. Therefore, the gene expression could be regulated by DNA methylation or demethylation during somatic embryogenesis of *H. brasiliensis*.

Key words: *Hevea brasiliensis*; Somatic embryogenesis; DNA methylation; Methylation-sensitive amplification polymorphism

表观遗传是指不因 DNA 序列变化而发生的基因功能改变,这种改变又可随细胞的有丝分裂和/或减数分裂而遗传的现象。基因组 DNA 甲基化是表观遗传修饰的主要形式,是调节基因功能的重要手段。植物核基因组中胞嘧啶甲基化是一种普遍

的现象,5-甲基胞嘧啶(5-m-C)水平与基因组的重复序列水平相关。不同物种中 DNA 甲基化程度差异较大,如小麦(*Triticum aestivum*)基因组中约有 33% 的甲基化胞嘧啶^[1],而银杏(*Ginkgo biloba*)基因组中大约有 44% 的胞嘧啶被甲基化^[2]。DNA 甲基

收稿日期: 2014-11-17 接受日期: 2015-01-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170634); 海南省重大科技项目(ZDZX2013023-1)资助

作者简介: 李辉亮,男,博士,副研究员,研究方向为植物分子遗传。E-mail: lihui7532@126.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: shqpeng@163.com

化可以引起 DNA 高级结构的变化从而引发一系列的生物学功能,广泛参与细胞的脱分化及再分化、染色质结构的改变和基因组印记的调节等,在调控细胞的分化和维持细胞状态稳定中起着重要的作用^[3-7]。DNA 甲基化水平随环境条件及植物生长发育的进程而发生变化。过高或过低的甲基化水平都会导致植物生长发育的异常^[8]。因此, DNA 甲基化对于生物的生长发育具有非常重要的调控作用。

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)自根幼态无性系是通过花药组织培养获得的一种橡胶树种植材料,具有生长速度快、产胶量高、抗逆性强等特性,有可能作为新一代的橡胶树种植材料^[9-11]。目前对巴西橡胶树自根幼态无性系高产机制的研究仅限于形态学观察、排胶生理参数等,而缺乏直接的遗传、分子生物学等方面的证据,在一定程度上限制了巴西橡胶树自根幼态无性系在生产中的应用和大规模推广^[12]。巴西橡胶树自根幼态无性系和供体老态无性系的遗传物质 DNA 序列应该是相同的,组织培养在正常情况下不会改变遗传物质 DNA 的序列,因此自根幼态无性系与供体之间所表现出的差异,可能与表观遗传相关。本研究利用甲基化敏感多态性扩增(Methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)方法对巴西橡胶树花药组织培养过程中 DNA 甲基化的动态变化进行了分析,以期从表观遗传的角度探讨巴西橡胶树自根幼态无性系和供体之间产生差异的原因,为研究巴西橡胶树自根幼态无性系的遗传机制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

巴西橡胶树‘海垦 2’(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg. ‘Haiken 2’)花药组织培养再生植株由中国热带农业科学院热带生物技术研究所陈雄庭研究员提供。分别采集不同发育阶段的材料,包括花药、愈伤组织、体细胞胚、再生植株幼芽、再生植株叶和移栽大田植株芽,采集后迅速置于液氮中,于 -70℃ 冰箱保存备用。

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保存。*EcoR* I、*Hpa* II、*Msp* I 内切酶、T4 DNA 连接酶为 Forments 公司产品。pMD19-T 载体、*Taq* DNA 聚合酶和随机引物 DNA 标记试剂盒为

TaKaRa 公司产品, DNA 凝胶回收用试剂盒购自 Tiangen 公司, α -³²PdCTP 为北京市福瑞生物工程公司产品,杂交尼龙膜为法玛西亚公司产品。

1.2 基因组DNA的提取与纯化

基因组 DNA 的提取与纯化参照王关林等^[13]的方法。取 1~2 g 材料,用液氮研磨粉碎,加入 DNA 提取液(含 1.5% 的 CTAB, 1% 巯基乙醇), 65℃ 水浴 90 min,加入氯仿:异戊醇(24:1),抽提 2 次后,加 RNA 酶 37℃ 温浴过夜,苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)进行纯化,样品 DNA 溶于 1×TE (pH 8.0) 缓冲液中, -20℃ 保存备用。

1.3 MSAP分析

MSAP 分析参照 Xiong 等^[14]和 Portis 等^[15]的方法。分别用 *EcoR* I/*Hpa* II、*EcoR* I/*Msp* I 组合对基因组 DNA 进行酶切,连上接头,采用 MSAP 扩增程序^[14]进行 2 轮扩增,接头、引物序列见表 1。扩增产物经上样缓冲液变性后,用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染检测、多态性甲基化片段从变性聚丙烯酰胺凝胶的回收均按北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司提供的方法。甲基化多态性条带统计中,清晰的条带记为“1”,无带记为“0”。根据 *EcoR* I/*Hpa* II 或 *EcoR* I/*Msp* I 扩增条带的差异,统计各种材料基因组 DNA 甲基化水平。再根据同一位点甲基化的差异,分析 DNA 甲基化模式的差异及 3 种 MSAP 条带类型的转变。

1.4 多态性甲基化片段的扩增、测序

以回收片段为模板,采用原引物组合和选择性扩增程序进行 PCR 扩增。所得 PCR 产物经纯化回收后克隆到 pMD19-T 载体上。序列测定由上海 Invitrogen 生物技术有限公司完成。利用公共数据库 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行序列比对和分析。

1.5 Southern杂交分析

用 *EcoR* I/*Hpa* II 和 *EcoR* I/*Msp* I 对花药组织培养再生植株不同发育阶段的基因组 DNA 进行酶切,采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行分离并转膜,以已经克隆的片段为探针进行 Southern 杂交。探针标记按 TaKaRa 公司随机引物 DNA 标记试剂盒使

表 1 MSAP 接头和引物

Table 1 Adapters and primers in MSAP

	接头和引物 Adapter and primer	序列 Sequence (5'~3')
接头	<i>EcoR</i> I	CTCGTAGACTGCGTACC
Adapter	<i>EcoR</i> I	AATTGGTACGCAGTCTAC
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I	GACGATGAGTCTAGAA
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I	CGTTCTAGACTCATC
预扩增引物	<i>EcoR</i> I+A	GTAGACTGCGTACCAATTCA
Pre-amplification primer	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I+T	GATGAGTCTAGAACGGT
选择性扩增引物	<i>EcoR</i> I+AAG	GACTGCGTACCAATTCAAG
	<i>EcoR</i> I+AAA	GACTGCGTACCAATTCAAA
	<i>EcoR</i> I+ACC	GACTGCGTACCAATTACC
	<i>EcoR</i> I+ACT	GACTGCGTACCAATTCAC
	<i>EcoR</i> I+ATA	GACTGCGTACCAATTCATA
	<i>EcoR</i> I+ATC	GACTGCGTACCAATTCATC
	<i>EcoR</i> I+AGT	GACTGCGTACCAATTCAGT
	<i>EcoR</i> I+AGG	GACTGCGTACCAATTCAGG
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I+TAA	GATGAGTCTCTGAGCGGTAA
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I+TAT	GATGAGTCTCTGAGCGGTAT
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I+TCG	GATGAGTCTCTGAGCGGTTCG
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I+TAC	GATGAGTCTCTGAGCGGTAC
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I+TTT	GATGAGTCTCTGAGCGGTTT
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I+TTA	GATGAGTCTCTGAGCGGTTA
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I+TTC	GATGAGTCTCTGAGCGGTTC
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I+TCG	GATGAGTCTCTGAGCGGTTCG
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I+TCA	GATGAGTCTCTGAGCGGTCA
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I+TGC	GATGAGTCTCTGAGCGGTGC
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I+TGG	GATGAGTCTCTGAGCGGTGG
<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I+TGT	GATGAGTCTCTGAGCGGTGT	

用说明书进行, Southern 杂交按照 Sambrook 等^[16]方法进行。

2 结果和分析

2.1 体细胞胚发生过程的DNA甲基化

从表 2 可见, 采用 35 对引物分别从花药、愈伤组织、体细胞胚、再生植株幼芽、再生植株叶和移栽大田植株芽的基因组 DNA 中扩增出 1549、1537、1522、1533、1527 和 1536 条甲基化多态性条带, 其中以花药外植体的甲基化多态性条带最多(1549), 体细胞胚的最少(1522)。甲基化多态性条带有 I、II 和 III 等 3 种类型, 花药、愈伤组织、体细胞胚、再生植株幼芽、再生植株叶和移栽大田植

株芽中类型 I 的甲基化多态性条带分别为 1197、1194、1192、1199、1183 和 1191; 类型 II 的分别为 288、283、275、272、285 和 289; 类型 III 的分别为 64、60、55、62、59 和 56。花药、愈伤组织、体细胞胚、再生植株幼芽、再生植株叶和移栽大田植株芽 DNA 总甲基化位点的甲基化水平分别为 22.724%、22.316%、21.682%、21.787%、22.528% 和 22.461%, 以体细胞胚的甲基化水平最低(21.682%), 再生植株幼芽的次之, 花药的最高(22.724%)。

巴西橡胶树体细胞胚发生过程出现了一些组织特异性的甲基化多态性条带(图 1)。随着体细胞胚的发育, 各阶段都会出现不同甲基化多态性带型的改变, 包括不同类型条带的出现或消失, 和不同

表 2 巴西橡胶树体细胞胚发生过程中基因组 DNA 的甲基化

Table 2 DNA methylation during somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*

组织 Tissue	条带类型 Band type			总数 Total	甲基化总位点数 (II+III) Number of methylated sites	总甲基化率 Total Methylation rate (%)	内部甲基化率 Internal methylation rate (%)	外部半甲基化率 External hemi- methylation rate (%)
	I	II	III					
花药 Anther	1197	288	64	1549	352	22.724	18.593	4.132
愈伤组织 Callus	1194	283	60	1537	343	22.316	18.412	3.904
体细胞胚 Somatic embryo	1192	275	55	1522	330	21.682	18.068	3.614
再生植株幼芽 Bud of regenerated plant	1199	272	62	1533	334	21.787	17.743	4.044
再生植株叶 Leaf of regenerated plant	1183	285	59	1527	344	22.528	18.664	3.864
移栽大田植株芽 Bud of transplanting plant	1191	289	56	1536	345	22.461	18.815	3.646

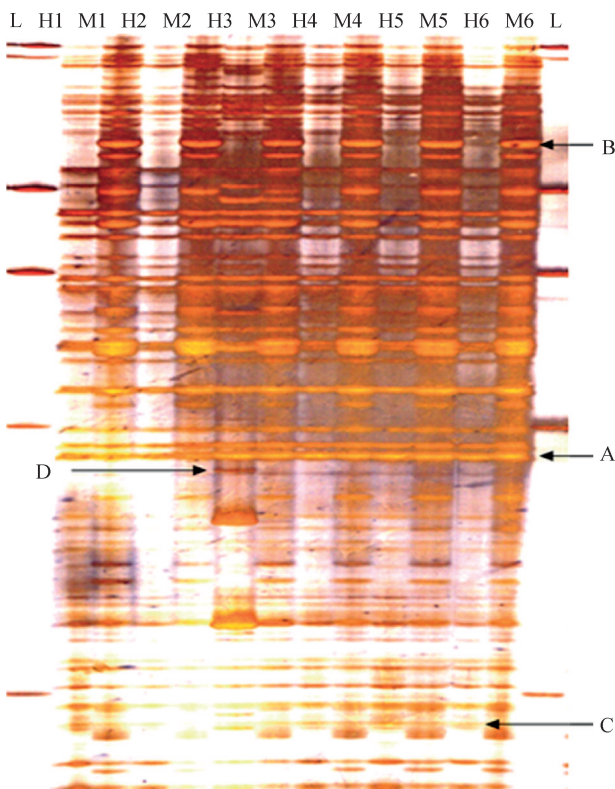


图 1 引物组合 *EcoR* I+*AAC-Hpa* II/*Msp* I+TAG 在体细胞胚发生过程的 DNA 甲基化变化。L: 标准分子量; H: *EcoR* I/*Hpa* II 酶切; M: *EcoR* I/*Msp* I 酶切; 1: 花药; 2: 愈伤组织; 3: 体细胞胚; 4: 再生植株幼芽; 5: 再生植株叶; 6: 移栽大田植株芽; A、B、C、D 分别表示类型 I、II、III 及组织特异性 MSAP 条带。

Fig. 1 Changes in DNA-methylation by combination primers of *EcoR* I+*AAC-Hpa* II/*Msp* I+TAG. L: Standard molecular marker; H: Digested by *EcoR* I/*Hpa* II; M: Digested by *EcoR* I/*Msp* I; 1: Anther; 2: Callus; 3: Somatic embryo; 4: Bud of regenerated plant; 5: Leaf of regenerated plant; 6: Bud of transplanting plant; A, B, C, and D present MSAP bands of type I, type II, type III, and tissue-specific band, respectively.

类型条带的相互转换,有超过 17 种以上的模式(表 3)。从花药诱导为愈伤组织时,类型 I、II 和 III 的甲基化多态性带分别有 10、7、2 条带消失;从愈伤组织发育为体细胞胚时类型 II 的甲基化多态性带消失最多,达 19 条,类型 III 消失的条带数为 11;体细胞胚发育为再生植株幼芽的过程中,消失和出现的类型 I 条带都比较多。可见,类型 I 甲基化多态性带的变化最大(表 4)。

2.2 甲基化多态性片段的验证

为了进一步验证甲基化多态性的真实性,分别选取一条类型 II 和 III 的甲基化多态性片段作探针进行 Southern 杂交验证。结果表明,杂交出的条带与 MSAP 的带型一致(图 2),表明甲基化条带多态性的真实可靠。而多出的一些或大或小的杂交条带可能是巴西橡胶树基因组中具有高同源性的序列或同源的多拷贝基因,由于杂交探针序列过短造成的非特异杂交。

2.3 甲基化片段的序列分析

随机选取 14 条组织特异性的条带进行回收,采用相同的选择性扩增引物进行二次扩增,将扩增产物克隆到 pMD19-T 载体上送测序公司进行测序。通过 NCBI 在 GenBank 公共数据库中对获得的序列进行 BLAST 比对,结果表明,有 6 个片段与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 ABC transporter、ATP-binding protein、ASYMMETRIC LEAVES 2、acyl-CoA synthetase、acyltransferase-like protein、

表 3 巴西橡胶树体胚发生过程中不同组织的 MSAP 模式

Table 3 MSAP patterns and their respective abundance during somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*

序号 No.	花药 Anther	愈伤组织 Callus	体细胞胚 Somatic embryo	再生植株幼芽 Bud of plant	再生植株叶 Leaf of regenerated plant	移栽大田植株芽 Bud of transplanting plant	MSAP 条带数 Number of MSAP bands
1	I	I	I	I	I	I	1120
2	II	II	II	II	II	II	245
3	III	III	III	III	III	III	65
4	I						5
5	II						3
6	III						1
7		I					3
8		II					2
9			I				5
10			II				3
11			III				2
12				I			3
13				III			2
14						I	2
15						III	1
16					I		2
17		I	I				2
18	II	II	II	I	I	I	2
19	I	I	II	II	II	II	1
20	I	I	I	I	I	II	1
其他 Others							31

表 4 巴西橡胶树体胚发生过程 MSAP 条带的变化

Table 4 Changes in MSAP band type during somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*

带型变化 Band change	花药 Anther	愈伤组织 Callus	体细胞胚 Somatic embryo	再生植株幼芽 Bud of regenerated plant	再生植株叶 Leaf of regenerated plant	移栽大田植株芽 Bud of transplanting plant	总数 Total
Ia → Id		10	6	12	17	5	50
IIa → IIId		7	19	4	5	6	41
IIIa → IIIId		2	11	5	3	3	24
Id → Ia		7	5	16	4	8	40
IIId → IIa		3	6	5	12	7	33
IIIId → IIIa		2	3	12	3	5	25
I → II		6	2	3	7	4	22
I → III		1	4	5	4	1	15
II → I		2	3	10	2	1	18
III → I		4	2	1	6	7	20

a: 出现; d: 消失。

a: Appearance; d: Disappearance.

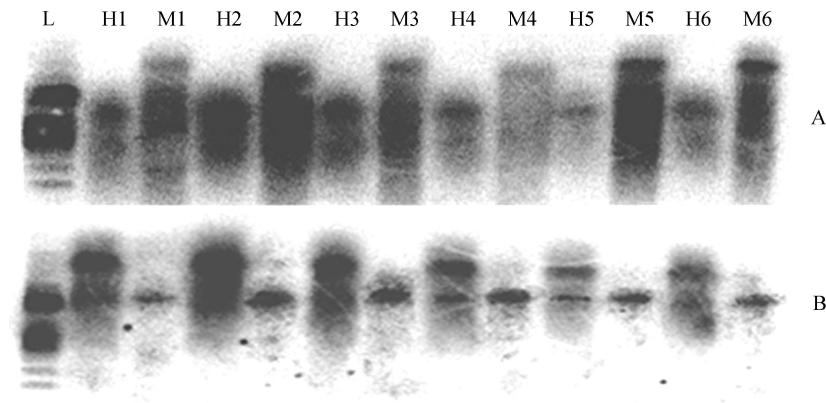


图 2 DNA 甲基化的 Southern blot 验证。A: 类型 II; B: 类型 III; L: 标准分子量; H: *EcoR* I/*Hpa* II 酶切; M: *EcoR* I/*Msp* I 酶切; 1: 花药; 2: 愈伤组织; 3: 体细胞胚; 4: 再生植株幼芽; 5: 再生植株叶; 6: 移栽大田植株芽。

Fig. 2 Verification of DNA methylation by Southern blot. A: Type II; B: Type III; L: Standard marker; H: Digested by *EcoR* I/*Hpa* II; M: Digested by *EcoR* I/*Msp* I; 1: Anther; 2: Callus; 3: Somatic embryo; 4: Buds of regenerated plant; 5: Leaves of regenerated plant; 6: Bud of transplanting plant.

ATOFP1/OFPI (Ovate family protein 1)和 protein binding/transcription repressor 片段具有很高的同源性,而另外 8 个片段没有找到同源的基因片段。

3 讨论

高等植物基因组 DNA 甲基化程度因种类而异,从 4.6%~40% 不等。本研究巴西橡胶树的平均甲基化率约为 22.25%,低于毛竹(*Phyllostachys heterocycla*)的 32.12%^[17],而高于水稻(*Oryza sativa*, 17%)^[14]和苹果(*Malus pumila*, 21%)^[18]。李林海等^[19]应用 MSAP 技术对巴西橡胶树‘热研 8-79’的老态和幼态无性系叶片基因组 DNA 甲基化进行了研究,认为幼态无性系的甲基化率为 33.2%,老态无性系的甲基化率为 22.9%,略高于本研究的平均甲基化率。差异产生的原因可能与实验材料及检测方法(如引物数量、引物的差异、银染检测条件等)等相关。

对木本植物发育阶段的 DNA 甲基化水平和模式已有研究报道。Fraga 等^[20]报道成年期木本植物的分生组织的甲基化水平显著高于童期和类童期分生组织;Monteuuis 等^[21]认为随着树木发育 DNA 甲基化水平和模式会发生改变。本研究结果表明,巴西橡胶树体细胞胚发生过程中不同组织间的 DNA 甲基化水平存在一定差异,其中体细胞胚的 DNA 甲基化水平最低,为 21.682%,而花药的 DNA 甲基化程度最高,为 22.724%。在巴西橡胶树体胚发生过程中,每个阶段都存在 DNA 甲基化和去甲

甲基化的情况,不同时期 DNA 甲基化或去甲基化会分别占主导地位,从愈伤组织到体细胞胚阶段去甲基化比较明显,这与体细胞胚再分化时需启动大量基因表达相一致。而在后续发育过程中类型 II 或 III 的甲基化条带增加比较明显,表明部分基因正在关闭或沉默。

对部分特异性甲基化 DNA 片段进行同源比对,结果表明,14 个甲基化多态性 DNA 片段中有 6 个片段的基因编码区能找到同源序列,8 个找不到同源序列,这些找不到同源序列的甲基化片段很有可能就是基因的启动子区域或内含子区域,这与 Cervera 等^[22]对拟南芥的研究结果相似。这 6 个片段中,有与 ABC transporter 和 ATP-binding protein 基因的同源片段,拟南芥中 ABC transporter 和 ATP-binding protein 与光形态建成和幼苗根早期发育相关^[23-24];有与 *ASYMMETRIC LEAVES 2* 基因的同源片段,*ASYMMETRIC LEAVES 2* 在拟南芥中参与叶的极性建立^[25]。这些与巴西橡胶树体细胞胚发生有关的基因片段,可为进一步研究橡胶树体细胞胚发生与特异基因表达调控的关系提供线索。

参考文献

- [1] Lund G, Messing J, Viotti A. Endosperm-specific demethylation and activation of specific alleles of α -tubulin genes of *Zea mays* L. [J]. *Mol Gen Genet*, 1995, 246(6): 716-22.
- [2] Li J H, Xing S Y, Wang C C, et al. Analysis on genomic DNA methylation modification of *Ginkgo biloba* by methylation-sensitive amplification polymorphism [J]. *Acta Hort Sin*, 2011, 38(8): 1429-1436.

- 李际红, 邢世岩, 王聪聪, 等. 银杏基因组DNA甲基化修饰位点的MSAP分析 [J]. 园艺学报, 2011, 38(8): 1429–1436.
- [3] Rossi V, Motto M, Pellegrin L. Analysis of the methylation pattern of the maize *opaque-2* (*O2*) promoter and *in vitro* binding studies indicate that the O2 B-Zip protein and other endosperm factors can bind to methylated target sequences [J]. J Biol Chem, 1997, 272(15): 13758–13765.
- [4] Wolffe A P, Matzke M A. Epigenetics: Regulation through repression [J]. Science, 1999, 286(5439): 481–486.
- [5] Ferguson-Smith A C, Surani M A. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes [J]. Science, 2001, 293(5532): 1086–1089.
- [6] Finnegan E J. Is plant gene expression regulated globally? [J]. Trends Genet, 2001, 17(7): 361–365.
- [7] Neelakandan A K, Wang K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications [J]. Plant Cell Rep, 2012, 31(4): 597–620.
- [8] Park J, Xu K, Park T, et al. What are the determinants of gene expression levels and breadths in the human genome? [J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(1): 46–56.
- [9] Wang Z Y, Chen X T, Wu H D. A new planting material of *Hevea brasiliensis*: Plant from somatic embryo [J]. Chin J Trop Agri, 2001(6): 11–15.
王泽云, 陈雄庭, 吴胡蝶. 橡胶树新型种植材料——体胚植株 [J]. 热带农业科学, 2001(6): 11–15.
- [10] Chen X T, Wang Z Y, Wu H D, et al. A new planting material of *Hevea Brasiliensis*: Self-rooting juvenile type clone [J]. Chin J Trop Crops, 2002, 23(1): 19–23.
陈雄庭, 王泽云, 吴胡蝶, 等. 橡胶树新种植材料——幼态自根无性系 [J]. 热带作物学报, 2002, 23(1): 19–23.
- [11] Hua Y W, Huang T D, Huang H S. Micropropagation of self-rooting juvenile clones by secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Breed, 2010, 129(2): 202–207.
- [12] Zhang Z L, Zheng X Q. A review of the studies on developmental phases of trees and its application for *Hevea brasiliensis* breeding [J]. J Trop Subtrop Bot, 2001, 9(3): 262–268.
张治礼, 郑学勤. 树木发育阶段理论及其在橡胶树育种中的应用 [J]. 热带亚热带植物学报, 2001, 9(3): 262–268.
- [13] Wang G L, Fang H J. The Principle and Technology of Plant Gene Engineering [M]. Beijing: Science Press, 1998: 370–372.
王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 370–372.
- [14] Xiong L Z, Xu C G, Saghai-Marouf M A, et al. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique [J]. Mol Gen Genet, 1999, 261(3): 439–446.
- [15] Portis E, Acquadro A, Comino C, et al. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. Plant Sci, 2004, 166(1): 169–178.
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 492–509.
- [17] Guo G P, Gu X P, Yuan J L, et al. Research on the features of DNA methylation in leaves of different chronological ages of *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens* based on the method of MSAP [J]. Hereditas, 2011, 33(7): 794–800.
郭广平, 顾小平, 袁金玲, 等. 不同生理年龄毛竹DNA甲基化的MSAP分析 [J]. 遗传, 2011, 33(7): 794–800.
- [18] Li X Q, Xu M L, Korban S S. DNA methylation profiles differ between field- and *in vitro*-grown leaves of apple [J]. J Plant Physiol, 2002, 159(11): 1229–1234.
- [19] Li H L, Li W G, Yang Z Q. MSAP analysis of juvenile clones and mature clones of *Hevea brasiliensis* [J]. Chin J Trop Crops, 2014, 35(4): 617–621.
李海林, 李维国, 杨朝渠. 橡胶树幼态与老态无性系间的MSAP分析 [J]. 热带作物学报, 2014, 35(4): 617–621.
- [20] Fraga M F, Rodríguez R, Cañal M J. Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata* [J]. Tree Physiol, 2002, 22(11): 813–816.
- [21] Monteuiis O, Douibeau S, Verdeil J L. DNA methylation in different origin clonal offspring from a mature *Sequoiadendron giganteum* genotype [J]. Trees, 2008, 22(6): 779–784.
- [22] Cervera M T, Ruiz-García L, Martínez-Zapater J. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers [J]. Mol Genet Gen, 2002, 268(4): 543–552.
- [23] Sukumar P, Maloney G S, Muday G K. Localized induction of the ATP-binding cassette B19 auxin transporter enhances adventitious root formation in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2013, 162(3): 1392–1405.
- [24] Zhao H T, Liu L, Mo H X, et al. The ATP-binding cassette transporter ABCB19 regulates postembryonic organ separation in *Arabidopsis* [J]. PLoS ONE, 2013, 8(4): e60809.
- [25] Iwakawa H, Iwasaki M, Kojima S, et al. Expression of the *ASYMMETRIC LEAVES2* gene in the adaxial domain of *Arabidopsis* leaves represses cell proliferation in this domain and is critical for the development of properly expanded leaves [J]. Plant J, 2007, 51(2): 173–184.