

四倍体菘蓝基因组 DNA 甲基化的甲基化敏感扩增多态性分析

杨 飞¹, 徐延浩^{2*}

1. 长江大学医学院分子生物学部, 湖北 荆州 434023

2. 长江大学农学院 长江中游湿地农业教育部工程研究中心, 湖北 荆州 434025

摘要: 目的 分析四倍体菘蓝 *Isatis indigotica* 基因组 DNA 甲基化水平和模式。方法 采用甲基化敏感扩增多态性 (methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP) 方法, 对四倍体菘蓝基因组 DNA 的甲基化水平和模式进行分析。结果 筛选 36 对 MSAP 选择性引物进行扩增, 共得到 1 733 条清晰的条带。二倍体菘蓝基因组胞嘧啶甲基化水平为 24.05%, 四倍体菘蓝基因组胞嘧啶甲基化水平为 23.70%。检测到 83 个 (4.86%) CCGG 位点在四倍体菘蓝基因组中发生了 DNA 甲基化模式的改变, 其中 37 个 (2.13%) 位点发生了超甲基化, 36 个 (2.08%) 位点发生了去甲基化。结论 二倍体和四倍体菘蓝在 CCGG 位点上存在胞嘧啶甲基化状态的改变。

关键词: 菘蓝; 四倍体; 二倍体; DNA 甲基化; 甲基化敏感扩增多态性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)03-0344-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.03.022

Analysis on genome DNA methylation of tetraploid *Isatis indigotica* by methylation sensitive amplification polymorphism

YANG Fei¹, XU Yan-hao²

1. Department of Molecular Biology, College of Medicine, Yangtze University, Jingzhou 434023, China

2. Engineering Research Center, Ministry of Education, Wetland Agriculture in The Middle Reaches of The Yangtze River, College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China

Abstract: Objective To analyze genome cytosine methylation level and cytosine methylation patterns of tetraploid *Isatis indigotica*. **Methods** Methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) approach was used in this study to analyze the genome cytosine methylation level and cytosine methylation patterns of tetraploid *I. indigotica*. **Results** By using 36 pairs of selective primer combinations, 1 733 bands were obtained. The genome cytosine methylation levels of diploid and tetraploid *I. indigotica* were 24.05% and 23.70%, respectively. In all, 83 (4.86%) CCGG sites displayed cytosine methylation changes in tetraploid *I. indigotica*. Among these sites, 37 (2.13%) CCGG sites underwent hypermethylation changes and 36 (2.08%) CCGG sites underwent demethylation changes. **Conclusion** This result provides the evidence for cytosine methylation changes in CCGG sites of both diploid and tetraploid *I. indigotica*.

Key words: *Isatis indigotica* Fort.; tetraploid; diploid; DNA methylation; methylation sensitive amplification polymorphism

十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 干燥的叶入药为大青叶, 干燥的根入药为板蓝根, 两者都具有清热解毒, 凉血利咽的功效, 临床上用于温疫时毒、发热咽痛等^[1-2]。研究表明菘蓝提取物能提高免疫细胞功能、具有抗菌、抗病毒等多种药理活性; 其有效成分靛玉红还具有一定的抗肿瘤作用^[3-4]。

DNA 甲基化是表观遗传的一个重要方面, 参与植物生长发育的调控^[5-6]。DNA 甲基化为中药材年

龄测定^[8]、栽培和野生型鉴定提供了重要依据^[8]。甲基化敏感扩增多态性 (methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP) 能检测全基因组范围 CCGG 位点 DNA 甲基化状态而无需预先知道 DNA 的序列, 是研究 DNA 甲基化的一个重要方法^[9-11]。

多倍体育种是提高中药产量和品质的一个有效途径, 已有很多人工选育的多倍体药材推广^[12-14]。

收稿日期: 2012-10-04

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金课题 (20114220120003, 20114220120005); 湖北省自然科学基金湖北省自然科学基金 (2012FFB00104, 2010CDB04403); 湖北省教育厅科研项目 (Q20111307)

作者简介: 杨 飞 (1980—), 女, 博士, 讲师, 从事中药分子生物学研究。E-mail: yfwhu@163.com

*通信作者 徐延浩 Tel: (0716)8066652 E-mail: xyh09@yangtzeu.edu.cn

网络出版时间: 2013-01-08 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130108.0928.002.html>

四倍体菘蓝具有产量高、抗逆性强的特点，在根、叶及生药性状上与其二倍体亲本有显著差异^[15-16]。四倍体菘蓝靛蓝量、氨基酸量、抗病毒活性成分高于二倍体^[15-17]，此外，还存在新的过氧化物同工酶位点和新的生物碱^[18-19]。多倍化过程中伴随着复杂的遗传、基因表达和表观遗传变化，特别是 DNA 甲基化状态的改变^[11, 20-21]。表达谱的研究发现，转录调控和次生代谢物合成的基因在四倍体菘蓝中表达增强^[22]。四倍体和二倍体菘蓝之间是否存在表观遗传学的差异是一个需要研究的问题。本研究利用 MSAP 技术，对二倍体和四倍体菘蓝全基因组范围 CCGG 位点 DNA 甲基化水平和模式进行比较分析。

1 材料

二倍体和四倍体菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 由第二军医大学张汉明教授惠赠并鉴定。种子置于 24 °C 的恒温培养箱中黑暗条件下萌发，2011 年 4 月 15 日定植于的泥炭土和蛭石（1：1）中，培养期间采用自然光照，自来水浇灌。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

称取 2.0 g 幼嫩的叶片，用 CTAB 法（2% CTAB，100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0，20 mmol/L EDTA pH 8.0，2.8 mol/L NaCl）提取基因组总 DNA。粗提的 DNA 加入 RNAase A 消化过夜，用苯酚-氯仿-异戊醇（25：24：1）抽提后用氯仿-异戊醇（24：1）抽提 1~2 次，用无水乙醇沉淀 DNA。DNA 干燥后溶于 TE 溶液。

2.2 MSAP 的酶切与连接

双酶切反应体系总体积 20 μL，其中 DNA 400

ng，NEB 10×缓冲液 2 μL，HpaII 20 U 或 MspI 10 U，EcoRI 10 U，100×BSA（10 mg/mL）0.2 μL。37 °C 温浴 5 h，75 °C 10 min 中止反应。双酶切反应体系中加入 EcoRI 接头（EcoRI 接头 I：CTCGTAGACTGCGTACC；EcoRI 接头 II：AATTGGTACGCATAC）5 pmol，HpaII/MspI 接头（HpaII/MspI 接头 I：GATCATGAGTCCTGCT；HpaII/MspI 接头 II：CGAGCAGGACTCATGA）50 pmol，T4 DNA 连接酶 1 μL（NEB），ATP 1 mmol/L。14 °C 水浴 12 h。75 °C 10 min 中止反应。

2.3 MSAP 的预扩增、选择性扩增和电泳

预扩增使用 50 ng（3 μL）酶切连接产物作为模板，25 μL PCR 反应体系含有 0.2 μmol/L EcoRI 和 HpaII/MspI 预扩增引物（EcoRI，HpaII/MspI）（EcoRI 预扩引物：GACTGCGTACCAATTC；HpaII/MspI 预扩引物：ATCATGAGTCCTGCTCGG），1×PCR 缓冲液，1.5 mmol/L MgCl₂，0.2 mmol/L dNTP，2 U Taq 酶。PCR 扩增程序为 94 °C 3 min；然后 94 °C 30 s，56 °C 40 s，72 °C 60 s 共 23 个循环；72 °C 延伸 10 min。

预扩产物用 0.1×TE 溶液稀 20 倍，取 1 μL 作为选择扩增的模板 DNA。选择性扩增引物对采用 EcoRI+3 个选择性碱基和 HpaII/MspI+3 个选择性碱基组成（表 1）。选择性扩增 PCR 反应体系和预扩增 PCR 反应体系相同。PCR 扩增程序为 94 °C 60 s，接下来 94 °C 30 s，65 °C 30 s，72 °C 60 s，每个循环退火温度降低 0.7 °C，执行 12 个循环；接着在 94 °C 30 s，56 °C 30 s，72 °C 60 s 扩增 23 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。

表 1 MSAP 分析所用选择性引物序列及选择性引物组合

Table 1 Sequences and combinations of selective primers used in MSAP

选择性引物	选择性引物组合
HpaII/MspI+ATA	EcoRI+TAC, EcoRI+TAG, EcoRI+TCG, EcoRI+TCT, EcoRI+TGT, EcoRI+TGA
HpaII/MspI+ACT	EcoRI+TAC, EcoRI+TAG, EcoRI+TCG, EcoRI+TCT, EcoRI+TGT, EcoRI+TGA
HpaII/MspI+ATT	EcoRI+TAC, EcoRI+TAG, EcoRI+TCG, EcoRI+TCT, EcoRI+TGT, EcoRI+TGA
HpaII/MspI+TTC	EcoRI+AAC, EcoRI+AAG, EcoRI+ACT, EcoRI+ACA, EcoRI+AGT, EcoRI+ATA
HpaII/MspI+TAA	EcoRI+AAC, EcoRI+AAG, EcoRI+ACT, EcoRI+ACA, EcoRI+AGT, EcoRI+ATA
HpaII/MspI+TAG	EcoRI+AAC, EcoRI+AAG, EcoRI+ACT, EcoRI+ACA, EcoRI+AGT, EcoRI+ATA

选择性扩增产物加入等体积甲酰胺变性加样液（98%甲酰胺，10 mmol/L EDTA，0.025%溴酚兰和二甲苯青-FF）95 °C 变性 5 min，迅速至于冰上。变性的 PCR 产物用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶（含 7.5

mol/L 尿素）65 W 恒功率电泳 2 h。PAGE 胶的银染程序参照 Xu 等^[11]的方法。

2.4 MSAP 数据统计

为保证结果的真实可靠，二倍体和四倍体菘蓝

各取两组生物学重复，每组生物学重复进行 2 次技术重复试验。技术重复试验从 DNA 样品双酶切开始，然后进行预扩增-选择性扩增 PAGE 胶电泳-条带统计。只选取重复试验一致性强的引物组合所扩增的条带进行统计分析，共得到 1 733 条清晰的条带，每次试验都设置无 DNA 模板的阴性对照，避免样品的污染或引物二聚体扩增而得到的假条带。仅选择 PAGE 胶中分辨率高的条带统计，对于顶部和底部分辨率低的条带不进行统计。按照 PAGE 胶上同一水平位置上条带的有无进行统计，有条带的记为“1”，无条带的记为“0”，获得原始“0/1”矩阵。对“0/1”矩阵进行分析，得出多倍体和二倍体亲本基因组 DNA 甲基化状态的差异。

3 结果与分析

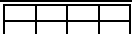

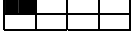
3.1 菘蓝基因组 DNA 甲基化水平分析

HpaII 和 MspI 识别相同的酶切位点 CCGG (真核生物中主要的甲基化位点)，但对甲基化敏感程度不同。HpaII 酶切未甲基化和单链外侧 C 甲基化的

CCGG 位点，MspI 酶切未甲基化和双链内侧 C 甲基化的 CCGG 位点 (表 2)。同一来源的 DNA 基因组如果在 HpaII 酶切扩增产物中有带，而在 MspI 酶切扩增产物中没有出现带，则说明该位点发生了单链外侧的胞嘧啶甲基化；如果 HpaII 酶切扩增产物中无带，但在 MspI 酶切扩增产物中有带，则说明该位点发生了双链内侧胞嘧啶甲基化；两者扩增产物中共有的带，说明该位点未发生甲基化。用 36 对选择性引物组合 (表 1) 分别对四倍体和二倍体菘蓝进行 MSAP 分析，在二倍体菘蓝基因组检测到 328 个 (19.19%) CCGG 位点存在双链内侧甲基化的修饰，83 个 (4.86%) CCGG 位点存在单链外侧甲基化的修饰，基因组甲基化水平为 24.05% (表 2)。在四倍体菘蓝基因组中检测到 321 个 (18.83%) CCGG 位点存在双链内侧甲基化的修饰，87 个 (4.87%) CCGG 位点存在单链外侧甲基化的修饰，基因组甲基化水平为 23.70% (表 2)。MSAP 分析表明，四倍体与二倍体菘蓝在 CCGG 位点上的甲基化水平并没有显著差异。

表 2 二倍体和四倍体菘蓝基因组 CCGG 位点 DNA 甲基化水平

Table 2 DNA methylaton levels of CCGG sites in genome of diploid and tetraploid *I. indigotica*

CCGG 位点甲基化状态	EcoRI-HpaII 酶切	EcoR I-Msp I 酶切	二倍体带型数(%)	四倍体带型数(%)
	+	+	1 298 (75.95)	1 297 (76.30)
	-	+	328 (19.19)	321 (18.83)
	+	-	83 (4.86)	87 (4.87)

表格代表 CCGG 双链；黑色的格子代表甲基化的位点；“+”有带；“-”无带

Boxes represent double strand of CCGG; black boxes represent methylated sites; “+” band present; “-” band absent

3.2 四倍体菘蓝基因组 DNA 甲基化模式分析

选择性引物组合在二倍体和四倍体菘蓝中共扩增得到 1 733 条清晰的条带 (图 1)。根据 MSAP 带纹模式在四倍体菘蓝相对于二倍体亲本的关系，MSAP 带纹模式可以分为 2 个大类，一类是严格遗传自二倍体亲本，即没有 DNA 甲基化的改变 (A1~A3)；另外一类带纹在多倍体中与二倍体亲本不一致，即 DNA 甲基化状态发生改变。DNA 甲基化状态改变的类群又可以进一步分为发生超甲基化的位点 (H1~H5) 和发生去甲基化的位点 (D1~D5)。

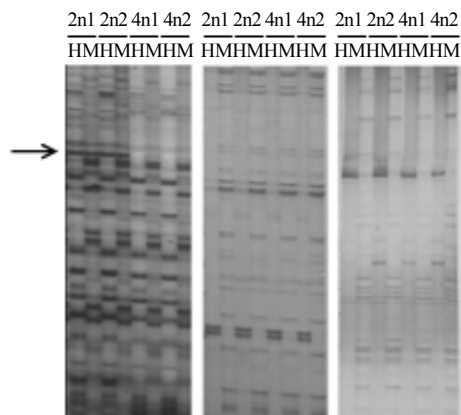
对 MSAP 结果的分析表明，共 73 个 (4.21%) CCGG 位点在四倍体菘蓝中发生了甲基化状态的改变，其中 37 个 (2.13%) 位点发生了超甲基化，36 个 (2.08%) 位点发生了去甲基化。这说明虽然四倍体菘蓝与二倍体菘蓝基因组 CCGG 位点 DNA 甲基化水平相当，但部分 CCGG 位点甲基化模式发生了变

化。此外，15 个位点发生双链内侧甲基化 (H3 和 D1) 的改变，6 个位点发生单链外侧甲基化 (H2 和 D2) 的变化 (表 3)。这说明在四倍体菘蓝中，DNA 甲基化状态的改变主要发生在双链内侧甲基化位点。

4 讨论

通过 MSAP 分析发现，在菘蓝基因组加倍的过程中，基因组 CCGG 位点 DNA 甲基化水平并没有明显的改变，这与在拟南芥、芸薹属多倍体中研究的结果类似^[23-24]。但 MSAP 仅能分析基因组 CCGG 位点单链外侧甲基化和双链内侧甲基化，还需通过 HPLC 等方法确定全基因组其他位点的 DNA 甲基化水平，才能进一步明确菘蓝基因组在多倍化过程中 DNA 甲基化水平是否真的没有改变。

MSAP 分析检测到菘蓝基因组 4.21% 的 CCGG 位点的甲基化状态在多倍化的过程中发生了变化。本实验不能排除四倍体菘蓝基因组甲基化状态的改



2n1-二倍体菘蓝样本1 2n2-二倍体菘蓝样本2 4n1-四倍体菘蓝样本1 4n2-四倍体菘蓝样本2 H-EcoRI-HpaII 酶切扩增电泳带 M-EcoRI-MspI 酶切扩增电泳带; 选择性引物组合依次为 HpaII/MspI+ACT×EcoRI+TAC, HpaII/MspI+ATT×EcoRI+TAG, HpaII/MspI+TTC×EcoRI+ACT; 箭头所示为 DNA 甲基化状态发生改变的位置

2n1-diploid *I. indigotica* sample 1 2n2-diploid *I. indigotica* sample 2 4n1-tetraploid *I. indigotica* sample 1 4n2-tetraploid *I. indigotica* sample 2 H-fragments obtained after digestion with EcoRI-HpaII M-fragments obtained after digestion with EcoRI-MspI; Selective primer combinations are HpaII/MspI + ACT × EcoRI + TAC; HpaII/MspI + ATT × EcoRI + TAG; HpaII/MspI + TTC × EcoRI + ACT. Arrow indicates DNA methylation changes

图1 二倍体和四倍体菘蓝 MSAP 电泳带纹模式
Fig. 1 MSAP electrophoresis of diploid and tetraploid *I. indigotica*

变是基因组结构变化引起的。DNA 甲基化能关闭基因的表达,而去甲基化则可以增强基因的表达^[5,25]。

随着高通量测序技术的进步,后续实验可以利用 ChIP-Seq 和亚硫酸盐测序法,在全基因组水平上对四倍体菘蓝基因组 DNA 甲基化改变的位点进行测序和转录分析,确定他们的生物学功能^[26]。

多倍体药用植物一般具有生物量大,抗逆性强,药用活性成分量高的特点^[13]。目前至少有 40 种药用植物已经获得多倍体,其中一些已在生产上得到应用^[12,14]。多倍体药用植物在生药学等方面与二倍体亲本相比存在明显差异^[15-16],但造成这些差异的内在机制并不清楚。对拟南芥^[24-25]、芸薹属^[11,23,27]等多倍体的研究表明,植物在多倍体化后往往伴随着基因组结构的改变、表观遗传调控模式的重塑和基因表达模式的改组。这些变化可能是多倍体产生新表现和抗性的分子基础^[27]。

目前对药用植物多倍体化后基因组结构和转录组变化的研究较少。对四倍体菘蓝转录组的分析表明,一些转录调控和次生代谢物合成的基因在四倍体中表达增强^[22]。本研究表明,二倍体和四倍体菘蓝基因组 CCGG 位点存在胞嘧啶甲基化状态的差异。这说明在四倍体菘蓝形成的过程中,基因组在表观遗传水平、转录水平上都发生复杂的变化。由此可见,多倍体药用植物的优良性状可能具有复杂

表3 四倍体和二倍体菘蓝 DNA 甲基化模式

Table 3 DNA methylation of both tetraploid and diploid *I. indigotica*

类型	MSAP 带型				MSAP 带型数	甲基化方式
	二倍体		四倍体			
	HpaII	MspI	HpaII	MspI		
A1	+	+	+	+	1 270	未发生甲基化
A2	+	-	+	-	77	未发生甲基化
A3	-	+	-	+	313	未发生甲基化
H1	+	+	-	-	19	超甲基化
H2	+	+	+	-	4	超甲基化
H3	+	+	-	+	5	超甲基化
H4	-	+	-	-	5	超甲基化
H5	+	-	-	-	4	超甲基化
D1	-	+	+	+	10	去甲基化
D2	+	-	+	+	2	去甲基化
D3	-	-	+	+	15	去甲基化
D4	-	-	-	+	3	去甲基化
D5	-	-	+	-	6	去甲基化

“+”-有带;“-”-无带; HpaI-EcoRI-HpaII 酶切; MspI-EcoRI-MspI 酶切

“+”-band present;“-”-band absent; HpaI-fragments obtained after digestion with EcoRI-HpaII; MspI-fragments obtained after digestion with EcoRI-MspI

的分子基础。本研究为研究多倍体药用植物的优良性状形成的分子基础及育种选育过程中的分子筛选提供了新的视角。

参考文献

- [1] 徐 晗, 方建国, 刘云海. 板蓝根最新研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(4): 10-11.
- [2] 杨 飞, 李立家. 菘蓝 rDNA 及端粒多色荧光原位杂交分析 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 972-975.
- [3] 赵玲敏, 杨占秋, 钟 琼, 等. 菘蓝的 4 种单体成分抗柯萨奇病毒作用的研究 [J]. 武汉大学学报: 医学版, 2005, 26(1): 53-57.
- [4] Spink B C, Hussain M M, Katz B H, *et al.* Transient induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in MCF-7 human breast cancer cells by indirubin [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(12): 2313-2321.
- [5] Cedar H, Bergman Y. The world of DNA methylation [J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81(1): 97-117.
- [6] Yang F, Zhang L, Li J, *et al.* Trichostatin A and 5-azacytidine both cause an increase in global histone H4 acetylation and a decrease in global DNA and H3K9 methylation during mitosis in maize [J]. *BMC Plant Biol*, 10(1): 178.
- [7] 董亚娟, 程 舟, 李 珊, 等. HPLC 法测定不同年龄人参 DNA 的甲基化水平 [J]. 中草药, 2007, 38(9): 1416-1418.
- [8] Ngezahayo F, Wang X L, Yu X M, *et al.* Habitat-induced reciprocal transformation in the root phenotype of Oriental ginseng is associated with alteration in DNA methylation [J]. *Chin Sci Bull*, 2011, 56(16): 1685-1689.
- [9] 薛 梅, 陈成彬, 陈 力, 等. 半夏多倍体复合体基因组 DNA 甲基化状态的 MSAP 分析 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1713-1716.
- [10] 高 寰, 张 铮, 周 婷, 等. 三叶木通 MSAP 反应体系的优化及引物筛选 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 572-576.
- [11] Xu Y, Zhong L, Wu X, *et al.* Rapid alterations of gene expression and cytosine methylation in newly synthesized *Brassica napus* allopolyploids [J]. *Planta*, 2009, 229(3): 471-483.
- [12] 张汉明, 许铁峰, 郭美丽, 等. 药用植物的多倍体育种 [J]. 中草药, 2002, 33(7): 1-3.
- [13] 何韩军, 杨跃生, 吴 鸿. 药用植物多倍体的诱导及生物学意义 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 1000-1006.
- [14] 武振华, 牛炳韬, 王新宇. 药用植物染色体加倍的研究进展 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(12): 2569-2574.
- [15] 乔传卓, 戴富宝. 两种倍性水平菘蓝的生药学研究 [J]. 中草药, 1995, 26(8): 423-426.
- [16] 乔传卓, 吴美枢, 戴富宝, 等. 菘蓝多倍体育种的研究 [J]. 植物学报, 1989, 31(9): 678-683.
- [17] 陈桂平, 客绍英. 二倍体及四倍体菘蓝氨基酸含量的测定分析 [J]. 中药材, 2011, 34(4): 506-508.
- [18] 乔传卓, 赵春丽. 菘蓝 (大青叶) 多倍体子代与亲本的种子凝胶电泳比较 [J]. 药学情报通讯, 1991, 9(4): 33-34.
- [19] 李 彬, 陈万生, 张汉明, 等. 四倍体板蓝根中的一个新生物碱 [J]. 药学学报, 2003, 38(6): 430-432.
- [20] Eckardt N A. A double lock on polyploidy-associated epigenetic gene silencing [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(1): 3.
- [21] Xu Y, Xu H, Wu X, *et al.* Genetic changes following hybridization and genome doubling in synthetic *Brassica napus* [J]. *Biochem Genet*, 2012, 50: 616-624.
- [22] Lu B, Pan X, Zhang L, *et al.* A genome-wide comparison of genes responsive to autopolyploidy in *Isatis indigotica* using *Arabidopsis thaliana* affymetrix genechips [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2006, 24(2): 197-204.
- [23] Xu Y, Zhao Q, Mei S, *et al.* Genomic and transcriptomic alterations following hybridisation and genome doubling in trigonomic allohexaploid *Brassica carinata* × *Brassica rapa* [J]. *Plant Biol*, 2012, 14(5): 734-744.
- [24] Madlung A, Masuelli R W, Watson B, *et al.* Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis allotetraploids* [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(2): 733-746.
- [25] Wang J, Tian L, Madlung A, *et al.* Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis polyploids* [J]. *Genetics*, 2004, 167(4): 1961-1973.
- [26] 谭建新, 孙玉洁. 表观基因组学研究方法进展与评价 [J]. 遗传, 2009, 31(1): 3-12.
- [27] Gaeta R T, Pires J C, Iniguez-Luy F, *et al.* Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(11): 3403-3417.