

# 运用 MSAP 技术测定谷子基因组 DNA 胞嘧啶甲基化水平

张雨欣<sup>1\*</sup>, 阮亚男<sup>1\*</sup>, 赵宸<sup>1</sup>, 薛敏敏<sup>1</sup>, 李博<sup>1</sup>, 王晶晶<sup>1</sup>, 刘洋<sup>1</sup>, 王凯玺<sup>2</sup>, 王红艳<sup>1</sup>

1 辽宁大学 生命科学院 植物表观遗传与进化实验室, 辽宁 沈阳 110036

2 辽宁省水土保持研究所, 辽宁 朝阳 122000

张雨欣, 阮亚男, 赵宸, 等. 运用 MSAP 技术测定谷子基因组 DNA 胞嘧啶甲基化水平. 生物工程学报, 2019, 35(2): 263–269.  
Zhang YX, Ruan YN, Zhao C, et al. Analysis of genomic DNA methylation level in foxtail millet by Methylation Sensitive Amplified Polymorphism. Chin J Biotech, 2019, 35(2): 263–269.

**摘要:** DNA 甲基化是真核生物一种重要的表观修饰形式。为了探讨谷子基因组 DNA 胞嘧啶甲基化的水平和模式, 以谷子 *Setaria italica* 的两个品种朝谷 58 号和豫谷 1 号为实验材料, 利用 *EcoR* I 和 *Hpa* II/*Msp* I 双酶切建立适合于谷子基因组的甲基化敏感扩增多态性 (MSAP) 分析体系。结果表明, 从 100 对 MSAP 选扩引物中, 筛选出 32 对 MSAP 引物组合, 在朝谷 58 号和豫谷 1 号中分别扩增产生 1 615、1 482 条清晰可辨且可重复的 DNA 条带, 其中包括 3 种类型的甲基化条带, 朝谷 58 号和豫谷 1 号的基因组中 CCGG 序列胞嘧啶甲基化水平分别为 6.93% 和 8.77%。这种谷子不同品种间甲基化水平和分布位点的差异为从表观遗传学的角度培育新品种提供了初步的理论依据和参考。

**关键词:** DNA 甲基化, 谷子, 甲基化敏感扩增多态性 (MSAP)

## Analysis of genomic DNA methylation level in foxtail millet by Methylation Sensitive Amplified Polymorphism

Yuxin Zhang<sup>1\*</sup>, Yanan Ruan<sup>1\*</sup>, Chen Zhao<sup>1</sup>, Minmin Xue<sup>1</sup>, Bo Li<sup>1</sup>, Jingjing Wang<sup>1</sup>, Yang Liu<sup>1</sup>, Kaixi Wang<sup>2</sup>, and Hongyan Wang<sup>1</sup>

1 Laboratory of Plant Epigenetics and Evolution, School of Life Sciences, Liaoning University, Shenyang 110036, Liaoning, China

2 Liaoning Institute of Soil and Water Conservation, Chaoyang 122000, Liaoning, China

**Abstract:** DNA methylation is an important type of epigenetic modification in eukaryotes. In order to research genome-wide

**Received:** May 25, 2018; **Accepted:** August 13, 2018

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31100172), Program for Liaoning Excellent Talents in University (No. LJQ2013003), Guidance Program of Natural Science Foundation, Department of Science and Technology, Liaoning Province (No. 20180550686), and Project in Shenyang Science and Technology Bureau (No. F16-205-1-49).

**Corresponding author:** Hongyan Wang. Tel: +86-24-62202232; E-mail: hongyan2003@126.com

\*These authors contributed equally to this work.

国家自然科学基金 (No. 31100172), 辽宁省高等学校优秀人才支持计划 (No. LJQ2013003), 辽宁省科技厅自然科学基金指导计划 (No. 20180550686), 沈阳市科技局项目 (No. F16-205-1-49) 资助。

methylation levels and patterns in foxtail millet (*Setaria italica*), the Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) analysis (employing double digestion with *EcoR* I and *Hpa* II/*Msp* I) was established and applied in two foxtail millet cultivars (Chaogu 58 and Yugu 1). The results showed that 32 pairs of MSAP primers were selected from 100 MSAP primers, and 1 615 and 1 482 clearly distinguishable and reproducible bands were amplified from Chaogu 58 and Yugu 1 respectively, including 3 types of methylation patterns. Cytosine methylation levels of CCGG context in Chaogu 58 and Yugu 1 were characterized as 6.93% and 8.77% respectively. Such different genomic DNA methylation levels between two foxtail millet varieties may provide a preliminary reference for the cultivation of this crop from a novel epigenetic viewpoint.

**Keywords:** DNA methylation, foxtail millet (*Setaria italica*), methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP)

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传学修饰方式, 与许多重要的生物过程相关, 其中包括染色质结构维持、基因印记、细胞分化等<sup>[1]</sup>。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase) 的催化作用下, 将 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 上的甲基转移到胞嘧啶的第 5 位碳原子上, 形成 5-甲基胞嘧啶 (5-mC)<sup>[2]</sup>。植物细胞中, DNA 甲基化主要发生在 CG、CHG 和 CHH 位点上 (H 指 A、C、T 三种碱基), 由不同的 DNA 甲基转移酶调控<sup>[3]</sup>。DNA 甲基化主要分布于着丝粒区和重复序列中, 其中转座子常常被高度甲基化, 使得植物的基因组保持相对稳定<sup>[4]</sup>。植物的甲基化水平会因为物种、器官、生长时期不同而不同, 并以此来调节植物生长发育、器官分化甚至影响植物进化<sup>[1,4-7]</sup>。随着对 DNA 甲基化研究的不断深入, 已经发展了很多方法来检测 DNA 甲基化的水平, 其中 MSAP 技术以其多态性高、信息量大、操作简单等优点被广泛应用于植物 DNA 甲基化检测<sup>[7-10]</sup>。

甲基化敏感扩增多态性, 即 MSAP 技术 (Methylation sensitive amplified polymorphism) 是由 AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 技术发展而来的<sup>[5]</sup>。其原理是运用限制性内切酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 识别 CCGG 序列, 限制性内切酶 *EcoR* I 识别 GAATTC 序列, 将 *Hpa* II 和 *Msp* I 分别和 *EcoR* I 组合对基因组进行酶切, 再加上相应的限制性内切酶的接头, 根据接头序列设计引物, 对 CCGG 位点甲基化进行特异性扩增<sup>[6-7]</sup>。虽然 *Hpa* II 和 *Msp* I 两种限制性内

切酶识别的位点相同, 但两者对 DNA 甲基化敏感程度存在很大的差异, 利用其敏感性的不同可以检测出总甲基化水平, 并区分 DNA 的全甲基化和半甲基化等甲基化状态。已有众多研究者采用这一方法取得了一系列的研究成果, 王聪聪等利用 MSAP 技术分析不同单株叶籽银杏 DNA 甲基化水平与模式, 统计发现不同单株 DNA 甲基化水平差异极显著, 正常银杏 DNA 甲基化水平低于叶籽银杏 DNA 甲基化水平<sup>[8]</sup>。Zheng 等利用 MSAP 技术评估水稻两个品种在幼苗期处于正常条件和干旱胁迫下的原代和第 6 代的 DNA 甲基化变化, 发现 29% 干旱诱导的 DNA 甲基化变异位点在胁迫解除后仍然可以保持, 并且在干旱条件下 DNA 甲基化的变异具有组织特异性, 其中分蘖期比抽穗期和孕穗期的甲基化水平显著下降<sup>[9]</sup>。李照令等利用 MSAP 技术研究不同浓度 Cd 处理对拟南芥幼苗基因组 DNA 甲基化水平的影响, 发现 3 个处理组的 DNA 甲基化水平均高于对照, 并且随着处理浓度的增加, 其甲基化水平随之降低<sup>[10]</sup>。

谷子又称为粟, 是起源于我国的传统优势作物之一, 一直在北方大面积种植。由于谷子具有抗旱耐瘠、水分利用率高、适应性强、营养价值高等优点, 近年来受到研究人员的重视<sup>[11]</sup>。谷子的测序工作在 2012 年完成, 基因组大小约为 515 Mb, 基因组序列相对较小, 富含重复序列, 并且有一些转录组测序也已完成, 为功能基因的研究提供了良好条件<sup>[12-15]</sup>。但在表观遗传学的研究领域, 关

于谷子的研究还处于刚刚起步的阶段,谷子在正常生长条件下全基因组甲基化的水平尚未深入研究。因此,本研究以两个优势种——朝谷 58 号和豫谷 1 号为例,对谷子基因组 DNA 胞嘧啶甲基化水平进行评估,以了解谷子在正常生长条件下全基因组甲基化水平差异和模式特点,以期为进一步从表观遗传学的角度培育谷子新品种提供初步的理论依据和参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

朝谷 58 号和豫谷 1 号,分别由辽宁省水土保持研究所和中国农业科学院作物科学研究所提供。其中,豫谷 1 号是目前谷子遗传研究中应用最广泛的品种,也是基因组测序的品种<sup>[15-16]</sup>;朝谷 58 是适应辽西干旱半干旱地区自然条件的优秀品种,抗逆性强,且丰产稳产,是谷子抗逆性状基因挖掘的好材料<sup>[17]</sup>。两个品种均播种于灭菌土壤中,并在自然光照条件下生长,8 周后选取叶片完全展开且长势一致的倒三叶、倒四叶叶片进行采集,液氮冷冻后在-80℃冰箱中保存。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 DNA 提 取

采用改良的 CTAB 方法提取谷子叶片的基因组 DNA<sup>[18]</sup>。所用试剂购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

#### 1.2.2 DNA 甲基化敏感多态性分析

分别用 *EcoR* I/*Hpa* II、*EcoR* I/*Msp* I 组合对基因组 DNA 进行酶切,连接接头(表 1),实验所用酶购买自 NEB 公司,所用引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 2)。每对引物进行 5%的聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染后对清晰可辨、可重复的带型进行记录,并对其位点进行 MSAP 分析。实验根据泳道内有无条带,将清晰可重复的条带记为“1”,同一位置没有条带记为

表 1 MSAP 接头

Table 1 MSAP adapters

Adapters	Sequences (5'-3')
<i>EcoR</i> I -adapter I	CTCGTAGACTGCGTACC
<i>EcoR</i> I -adapter II	AATTGGTACGCAGTC
<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I - adapter I	GATCATGAGTCTCTGCT
<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I - adapter II	CGAGCAGGACTCATGA

表 2 MSAP 扩增引物

Table 2 MSAP amplification primers

<i>EcoR</i> I primers	Sequences (5'-3')	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I primers	Sequences (5'-3')
<i>E</i> +A	GACTGCGTACCAATTCA	<i>H/M</i> +0	ATCATGAGTCCTGCTCGG
<i>E</i> -AAC	GACTGCGTACCAATTCAAC	<i>H/M</i> -TCT	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCT
<i>E</i> -AAG	GACTGCGTACCAATTCAAG	<i>H/M</i> -TCG	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCC
<i>E</i> -ACA	GACTGCGTACCAATTCACA	<i>H/M</i> -TCC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCC
<i>E</i> -ACT	GACTGCGTACCAATTTCACT	<i>H/M</i> -TTC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC
<i>E</i> -ACC	GACTGCGTACCAATTTCAACC	<i>H/M</i> -TTG	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC
<i>E</i> -ACG	GACTGCGTACCAATTTCAACG	<i>H/M</i> -TTA	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC
<i>E</i> -AGC	GACTGCGTACCAATTTCAAGC	<i>H/M</i> -TGA	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGA
<i>E</i> -AGG	GACTGCGTACCAATTTCAAGG	<i>H/M</i> -TGT	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGT
<i>E</i> -AGA	GACTGCGTACCAATTTCAAGA	<i>H/M</i> -TGC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGC
<i>E</i> -ATC	GACTGCGTACCAATTTCAATC	<i>H/M</i> -TAC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAC

Note: *E* and *H/M* represent *EcoR* I and *Hpa* II/*Msp* I, respectively.

“0”。统计每对引物扩增出的总条带数和其中的甲基化条带数，每个引物组合做3次重复。

酶切连接体系、预扩、选扩体系参照 Wang 等反应体系进行<sup>[19]</sup>。

PCR 产物电泳及银染：PCR 扩增后的产物经 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银染色后，统计凝胶上各种模式的片段<sup>[19]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物筛选和 DNA 甲基化图谱构建

本研究是通过使用 *EcoR* I 和 *Hpa* II/*Msp* I 的引物组合扩增 PCR 片段，从而得到基因组甲基化“CCGG”位点的变异模式，引物组合由 10 个 *EcoR* I 引物和 10 个 *Hpa* II/*Msp* I 引物自由组合而成，共 100 对组合。从中筛选出 32 对可以扩增出条带分布均匀、带多清晰的引物组合完成选择性扩增实验，以朝谷 58 号为例，选用的 32 对引物组合及其扩增条带的统计情况见表 3。

MSAP 中 *Hpa* II 和 *Msp* I 是两种同裂酶，它们的酶切位点均为 CCGG，但二者对酶切位点甲基化修饰的敏感性不同，其中 *Hpa* II 可以识别并切开外侧胞嘧啶半甲基化位点，*Msp* I 可以识别并切开内侧胞嘧啶全甲基化位点<sup>[20]</sup>。因此 DNA 样品经 *EcoR* I/*Hpa* II (*H*) 和 *EcoR* I/*Msp* I (*M*) 酶切扩增后的产物在 PAGE 胶上会出现如下 3 种甲基化类型：I 型：*E+H* 和 *E+M* 都有带，表明 CCGG 位点未发生甲基化；II 型：*E+H* 有带，*E+M* 无带，表明 CCGG 位点处于半甲基化状态，即 DNA 甲基化只发生在一条链上，其互补链上没有；III 型：*E+H* 无带，*E+M* 有带，表明 CCGG 序列中的内侧 CG 位点处于全甲基化状态，即 DNA 甲基化同时发生在两条链的内侧胞嘧啶上。图 1 展示了朝谷 58 号和豫谷 1 号不同引物的选择性扩增图谱，表 4 统计了朝谷 58 号和豫谷 1 号的胞嘧啶甲基化水平。

表 3 朝谷 58 号 32 对引物组合及其扩增条带统计表  
Table 3 Statistical table of 32 pairs of primers and their amplified bands in Chaogu 58

No.	<i>EcoR</i> I+3 primers	<i>H/M</i> +3 primers	Amplified bands
1	<i>E</i> -AAC	<i>H/M</i> -TCT	46
2	<i>E</i> -AAC	<i>H/M</i> -TTC	51
3	<i>E</i> -AAC	<i>H/M</i> -TTA	40
4	<i>E</i> -AAC	<i>H/M</i> -TCC	49
5	<i>E</i> -AAG	<i>H/M</i> -TTC	55
6	<i>E</i> -AAG	<i>H/M</i> -TTA	48
7	<i>E</i> -ACA	<i>H/M</i> -TTG	66
8	<i>E</i> -ACA	<i>H/M</i> -TTA	53
9	<i>E</i> -ACT	<i>H/M</i> -TCG	44
10	<i>E</i> -ACT	<i>H/M</i> -TTA	58
11	<i>E</i> -ACT	<i>H/M</i> -TGT	30
12	<i>E</i> -ACT	<i>H/M</i> -TGC	38
13	<i>E</i> -ACC	<i>H/M</i> -TCG	43
14	<i>E</i> -ACC	<i>H/M</i> -TTG	45
15	<i>E</i> -ACC	<i>H/M</i> -TTA	55
16	<i>E</i> -ACC	<i>H/M</i> -TGC	40
17	<i>E</i> -ACG	<i>H/M</i> -TTA	39
18	<i>E</i> -ACG	<i>H/M</i> -TCC	28
19	<i>E</i> -AGC	<i>H/M</i> -TTC	42
20	<i>E</i> -AGC	<i>H/M</i> -TTA	61
21	<i>E</i> -AGG	<i>H/M</i> -TCC	54
22	<i>E</i> -AGG	<i>H/M</i> -TTA	50
23	<i>E</i> -AGG	<i>H/M</i> -TGC	43
24	<i>E</i> -AGA	<i>H/M</i> -TCT	51
25	<i>E</i> -AGA	<i>H/M</i> -TCG	52
26	<i>E</i> -AGA	<i>H/M</i> -TTC	57
27	<i>E</i> -AGA	<i>H/M</i> -TTA	72
28	<i>E</i> -ATC	<i>H/M</i> -TTC	66
29	<i>E</i> -ATC	<i>H/M</i> -TTG	73
30	<i>E</i> -ATC	<i>H/M</i> -TTA	48
31	<i>E</i> -ATC	<i>H/M</i> -TGT	69
32	<i>E</i> -AGC	<i>H/M</i> -TCG	50

Note: *E* and *H/M* represent *EcoR* I and *Hpa* II/*Msp* I, respectively.

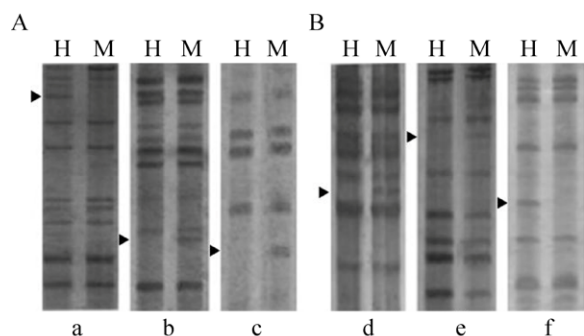


图 1 朝谷 58 号 (A) 和豫谷 1 号 (B) 不同引物组合选择性扩增图

Fig. 1 Selective amplification plot of Chaogu 58 (A) and Yugu 1 (B) by different primer combinations. Primer combinations: a: *E*-AAC *H/M*-TTA; b: *E*-ATC *H/M*-TTG; c: *E*-AGA *H/M*-TCT; d: *E*-AAC *H/M*-TCC; e: *E*-ACT *H/M*-TTA; f: *E*-AGG *H/M*-TCC; ►: methylation variation site.

## 2.2 甲基化修饰水平分析

### 2.2.1 朝谷 58 号的甲基化水平

从 100 对 MSAP 选扩引物中, 选出 32 对适合朝谷 58 号的 MSAP 引物组合, 共扩增产生 1 615 条清晰可辨且可重复的 DNA 条带。从表 4 可以看出, 辽宁省优势品种朝谷 58 在全基因组水平上 CCGG 位点胞嘧啶甲基化比例为 6.93%, 其中内侧全甲基化比例为 4.27%, 单链半甲基化比例为 2.66%。从结果看出朝谷 58 号在 CCGG 位点上的胞嘧啶甲基化主要发生在内侧胞嘧啶上。

### 2.2.2 豫谷 1 号的甲基化水平

从 100 对 MSAP 选扩引物中, 选出 32 对适合于豫谷 1 号的 MSAP 引物组合, 共扩增产生 1 482 条清晰可辨且可重复的 DNA 条带。在全基因组水平上 CCGG 位点的甲基化比例为 8.77%, 根据条带类型统计, 其中内侧胞嘧啶全甲基化比例为 6.41%, 半甲基化比例为 2.36%, 豫谷 1 号在 CCGG 位点上的胞嘧啶甲基化也主要发生在内侧胞嘧啶上。

### 2.2.3 朝谷 58 号与豫谷 1 号全基因组甲基化水平的比较分析

在计算全基因组 CCGG 位点上的胞嘧啶甲基化水平后 (表 4), 发现朝谷 58 号的甲基化水平低于豫谷 1 号, 这种甲基化水平的差异是由于两个品种胞嘧啶内侧全甲基化位点差异造成的。同时, 两个品种的胞嘧啶内侧全甲基化水平均高于单链半甲基化水平, 说明在谷子基因组中这种对称性的胞嘧啶内侧全甲基化位点是甲基化修饰的主要形式。此外, 单链胞嘧啶半甲基化水平在两个品种中没有明显差异。仪治本等<sup>[21]</sup>在运用 MSAP 技术研究玉米杂交种及其亲本基因组 DNA 胞嘧啶甲基化水平中, 其选用的第一组亲本 Mo 17 与 Suwan 5 的全甲基化水平分别为 17.1% 和 24.4%, 第二组亲本 Suwan 1 与太 3221 的全甲基化水平分别为 24.6% 和 21.6%, 与本实验的研究结果相同, 说明同种作物的不同品种之间的全甲基化水平也不同。

表 4 朝谷 58 号和豫谷 1 号的胞嘧啶甲基化水平

Table 4 Cytosine methylation levels of Chaogu 58 and Yugu 1

Sample	Band type			Total amplified bands	Non methylated rate (%)	Total methylated rate (%)	Fully methylated ratio (%)	Hemi methylated ratio (%)
	I	II	III					
Chaogu 58	1 503	43	69	1 615	93.07	6.93	4.27	2.66
Yugu 1	1 352	35	95	1 482	91.23	8.77	6.41	2.36

Note: total methylated rate (%) = [(II + III)/(I + II + III)] × 100; fully methylated ratio (%) = [(III)/(I + II + III)] × 100; hemi methylated ratio (%) = [(II)/(I + II + III)] × 100; non methylated ratio (%) = [(I)/(I + II + III)] × 100.

### 3 讨论

DNA 甲基化在植物的生长发育中具有重要意义, 甲基化的变化会影响农作物的表型、花期和产量<sup>[22-23]</sup>。另外, Zhong 等研究表明在番茄果实成熟过程中 DNA 甲基化的变化发挥重要作用<sup>[24]</sup>。本研究通过 100 对引物组合筛选获得 32 对有效的引物组合, 检测两个谷子品种在 CCGG 位点 DNA 甲基化水平。朝谷 58 号和豫谷 1 号分别检测到 1 615 条和 1 482 条条带, 但由于 MSAP 技术使用的限制性内切酶只能识别和切割 CCGG 序列, 对其他位点的甲基化不能检测, 其检测位点具有局限性, 所以对于基因组中实际甲基化水平评估偏低<sup>[20]</sup>, 即实验数据得到朝谷 58 号和豫谷 1 号全基因组 CCGG 序列胞嘧啶甲基化所占的比例为 6.93% 和 8.77%, 要低于谷子两个品种各自的甲基化水平。Xiong 等在研究水稻杂交种及其亲本的甲基化模式中发现, 其中亲本 Zhenshan 97 和 Minghui 63 的胞嘧啶甲基化水平基本相同为 16.3%, 而杂交后代的 Shanyou 63 的胞嘧啶甲基化水平低于两种亲本, 说明其杂交后代和亲本之间的甲基化水平也会存在差异<sup>[25]</sup>。谷子不同品种间的甲基化差异可能是其表型和性状差异原因, 这种差异可以为培育新型的谷子品种提供表观遗传学方向的思路。

### REFERENCES

- [1] Richards EJ. DNA methylation and plant development. *Trends Genetics*, 1997, 13(8): 319–323.
- [2] Feng SH, Jacobsen SE, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 2010, 330(6004): 623–627.
- [3] Finnegan EJ, Kovac KA. Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol*, 2000, 43(2/3): 189–201.
- [4] Singer T, Yordan C, Martienssen RA. Robertson's mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene decrease in DNA methylation (DDM1). *Genes Dev*, 2001, 15(5): 591–602.
- [5] Wang ZC, Li ZA, Li SP. The technology of MSAP and its applications in plant. *Biotechnol Bull*, 2006(S1): 195–196 (in Chinese).  
王子成, 李忠爱, 李锁平. MSAP 技术及其在植物上的应用. *生物技术通报*, 2006(S1): 195–196.
- [6] Han YN, Zhao XJ, Cai L. Application of methylation-sensitive amplified polymorphism technology in plant stress resistance. *Biotechnol Bull*, 2010(6): 71–74, 79 (in Chinese).  
韩雅楠, 赵秀娟, 蔡禄. MSAP 技术在植物抗逆性方面的应用. *生物技术通报*, 2010(6): 71–74, 79.
- [7] Li WG, Chang TJ, Gong HM. Methylation-sensitive amplified polymorphism and its application to plant genetics. *Biotechnology*, 2008, 18(1): 83–87 (in Chinese).  
李卫国, 常天俊, 龚红梅. MSAP 技术及其在植物遗传学研究中的应用. *生物技术*, 2008, 18(1): 83–87.
- [8] Wang CC, Xing SY, Li JH, et al. DNA methylation levels and patterns in different ginkgo *Biloba* L. var. *Epiphylla* Mak. by methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *J Nucl Agric Sci*, 2013, 27(4): 399–407 (in Chinese).  
王聪聪, 邢世岩, 李际红, 等. 不同单株叶籽银杏 DNA 甲基化水平与模式的 MSAP 分析. *核农学报*, 2013, 27(4): 399–407.
- [9] Zheng XG, Chen L, Li MS, et al. Transgenerational variations in DNA methylation induced by drought stress in two rice varieties with distinguished difference to drought resistance. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e80253.
- [10] Li ZL, Wang HT, Chen HJ, et al. Studying genomic methylation of *Arabidopsis thaliana* seedlings under cadmium stress using MSAP. *J Agro-Environ Sci*, 2014, 33(1): 28–36 (in Chinese).  
李照令, 王鹤潼, 陈瑞娟, 等. 运用 MSAP 研究镉胁迫对拟南芥幼苗基因甲基化的影响. *农业环境科学学报*, 2014, 33(1): 28–36.
- [11] Xu ZG, Fu LB, Zhong FN. Analysis on the regional comparative advantage of grain production in China. *Chin Agric Resour Region Plann*, 2001, 22(1): 45–48 (in Chinese).  
徐志刚, 傅龙波, 钟甫宁. 中国粮食生产的区域比较优势分析. *中国农业资源与区划*, 2001, 22(1): 45–48.
- [12] Zhang GY, Liu X, Quan ZW, et al. Genome sequence of foxtail millet (*Setaria italica*) provides insights into grass evolution and biofuel potential. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(6): 549–554.

- [13] Jo Y, Lian S, Cho JK, et al. *De novo* transcriptome assembly of *Setaria italica* variety Taejin. *Genomics Data*, 2016, 8: 121–122.
- [14] Tang S, Li L, Wang YQ, et al. Genotype-specific physiological and transcriptomic responses to drought stress in *Setaria italica* (an emerging model for Panicoideae grasses). *Sci Rep*, 2017, 7: 10009.
- [15] Bennetzen JL, Schmutz J, Wang H, et al. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. *Nature Biotechnol*, 2012, 30(6): 555–561.
- [16] Li W, Zhi H, Wang YF, et al. Analysis on the conditions of EMS treatment on Foxtail Millet. *J Hebei Agric Sci*, 2010, 14(11): 77–79 (in Chinese).  
李伟, 智慧, 王永芳, 等. 谷子 EMS 诱变的处理条件分析. *河北农业科学*, 2010, 14(11): 77–79.
- [17] Wang SS, Zhang N, Wang KX, et al. Genetic diversity of foxtail millet cultivars in western Liaoning province revealed by SSR markers. *Mol Plant Breed*, 2015, 13(5): 1091–1097 (in Chinese).  
王姗姗, 张宁, 王凯玺, 等. 中国辽西地区谷子品种遗传多样性的 SSR 分析. *分子植物育种*, 2015, 13(5): 1091–1097.
- [18] Kidwell KK, Osborn TC. Simple plant DNA isolation procedures//Beckmann JS, Osborn TC. *Plant Genomes: Methods for Genetic and Physical Mapping*. Netherlands: Springer 1992: 1–13.
- [19] Wang QM, Wang YZ, Sun LL, et al. Direct and indirect organogenesis of *Clivia miniata* and assessment of DNA methylation changes in various regenerated plantlets. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(7): 1283–1296.
- [20] Dong ZY, Wang YM, Zhang ZJ, et al. Extent and pattern of DNA methylation alteration in rice lines derived from introgressive hybridization of rice and *Zizania latifolia* Griseb. *Theoret Appl Genet*, 2006, 113(2): 196–205.
- [21] Yi ZB, Sun Y, Niu TT, et al. Genomic DNA cytosine methylations of corn hybrids and their parents. *Acta Bot Bor-Occidental Sin*, 2005, 25(12): 2420–2425 (in Chinese).  
仪治本, 孙毅, 牛天堂, 等. 玉米杂交种及其亲本基因组胞嘧啶甲基化水平研究. *西北植物学报*, 2005, 25(12): 2420–2425.
- [22] Gehring M, Henikoff S. DNA methylation dynamics in plant genomes. *Biochim Biophys Acta Gene Struct Expr*, 2007, 1769(5/6): 276–286.
- [23] Sung S, He YH, Eshoo TW, et al. Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nat Genetics*, 2006, 38(6): 706–710.
- [24] Zhong SL, Fei ZJ, Chen YR, et al. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(2): 154–159.
- [25] Xiong LZ, Xu CG, Maroof MAS, et al. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(3): 439–446.

(本文责编 郝丽芳)