

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2012)01-0011-05

干旱胁迫下马铃薯幼苗DNA甲基化研究

李媛媛¹, 程 鹏², 熊兴耀², 洪亚辉^{1*}

(1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南农业大学湖南省马铃薯工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是我国重要的粮食作物, 性喜阴湿凉爽的环境, 干旱严重影响着马铃薯的品质产量的稳定。试验采用 PEG-6000 模拟干旱胁迫处理 3 个品种的马铃薯幼苗, 并对其基因组 DNA 进行甲基化敏感扩增多态性 (Methylation-sensitive amplified polymorphism, MSAP) 分析, 在 20% 的 PEG 胁迫下, ‘大西洋’的基因组 DNA 甲基化程度随着时间的增长而有所增大。‘中薯 3 号’在 20% 的 PEG 胁迫下, 随着时间的增长, 甲基化基本趋势是减弱的。‘中薯 5 号’和‘中薯 3 号’情况类似, 其甲基化趋势基本上也是随着时间增长而降低的。将特异带回收测序和 Blast 比对, 结果表明其中几条带跟与萜类化合物合成等功能基因具有一定的同源性。

关键词: 马铃薯; DNA 甲基化; MSAP

DNA Methylation in Potato Under Drought Stress

LI Yuanyuan¹, CHENG Peng², XIONG Xingyao², HONG Yahui^{1*}

(1. College of Bio-science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China;

2. Hunan Potato Research Center, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: Potato is an important food crop, and adapts to cool and wet environments. However, drought seriously affects its quality and yield. In this research, three potato cultivars were treated with PEG-6000 to simulate drought stress. The extent and pattern of cytosine methylation of the genomes were assessed by using the technique of methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP). It was found that treated with 20% PEG-6000, DNA methylation of 'Atlantic' was increased, while that of DNA methylation of 'Zhongshu 3' and 'Zhongshu 5' decreased. Several variable MSAP profiles were isolated and sequenced, and the results were analyzed with Blast analysis. Blast analysis results showed that sequences had homology with some functional genes.

Key Words: potato; DNA methylation; MSAP

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是我国重要的粮食作物, 属于典型的温带气候作物, 性喜阴湿凉爽的环境, 干旱严重影响着马铃薯的品质产量的稳定。DNA 甲基化是一种重要的也是最常见的表观遗传修饰, 多数研究表明, 在一定的逆境胁迫下植物 DNA 甲基化的水平将发生不同的变化, 研究人员对蛇麻草的研究表明: 超低温处理和低温保存后的材料 and 对照经过甲基化敏感扩增多态性 (Methylation-sensitive amplified polymorphism, MSAP)

分析比较显示有 36% 的位点发生了甲基化变化^[1]。Kaity^[2]对超低温保存后的木瓜的表观遗传变异研究表明超低温技术中的快速冻融过程是影响植物存活率和基因组甲基化变化主要原因。而干旱胁迫下马铃薯基因组 DNA 甲基化水平的变化研究较少。本文采用 PEG-6000 模拟干旱胁迫处理 3 个品种的马铃薯幼苗并对其基因组 DNA 进行 MSAP 分析, 以研究干旱胁迫下马铃薯甲基化的变化情况。

收稿日期: 2011-06-03

基金项目: 国家科技支撑计划“高产优质专用马铃薯育种技术研究及新品种选育”(2006BAD01A06-1-8)。

作者简介: 李媛媛(1985-) 女, 硕士研究生, 研究方向为分子细胞遗传学。

* 通信作者(Corresponding author): 洪亚辉, 教授, 研究方向为分子细胞遗传学, E-mail: ly1843@163.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料马铃薯品种中薯 5 号、中薯 3 号和大西洋的无菌苗，由湖南农业大学马铃薯中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 马铃薯无菌苗的培养

将 3 个马铃薯品种的无菌苗在 50 mL MS 固体培养基上，每瓶培养基接种 6~7 根无菌苗，于温度 (25 ± 1)℃条件下培养，每 20 d 继代 1 次，得到大量马铃薯无菌幼苗。将长至 2 cm 左右的苗移入液体培养基中进行多层滤纸床静止培养：培养方法同李建武等^[3]，在 25℃，2 000~3 000 lx 条件下培养。

1.2.2 干旱胁迫处理

培养 20 d 后，待马铃薯试管苗长出大量根系，在超净工作台内去除剩余的 MS 培养液，加入 50 mL 含 20 % PEG-6000 的 MS 培养液进行干旱胁迫处理，对照加入 50 mL 不含 PEG-6000 的 MS 培养基。每个品种每个时间梯度处理 4 瓶，设 2 瓶对照，每天取样，持续 6 d。

1.2.3 DNA 的提取

每天分别称取对照和经 PEG 处理的样品的植物组织 1.0 g，加液氮研磨成粉末，以 CTAB 法提取植物 DNA。待 DNA 完全溶解后加入 5 μL RNA 酶，37℃保温 30 min 后用核酸蛋白仪检测 DNA 的浓度，0.8%琼脂糖凝胶电泳，检查 DNA 的质量。-20℃保存。

1.2.4 MSAP 检测

MSAP 分析采用 Zhao 等^[4]方法，采用的接头、预扩增引物及选择性扩增引物见表 1。大致包括以下几个步骤：酶切与连接、预扩增、选择性扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染检测、数据分析。MSAP 扩增产物经 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，硝酸银染色后进行 H(*EcoR* / *Hpa*)和 M(*EcoR* / *Msp*)泳道条带数及带型统计分析。

1.2.5 特异带测序比对分析

使用上海杰美聚丙烯酰胺凝胶 DNA 回收试剂盒对特异性片段进行回收。连接转化后，将菌液送至华大测序，测序结果进行 Blast 比对和同源性分析。

2 结果与分析

2.1 PEG-6000 胁迫下马铃薯苗的生长情况

随着胁迫时间的增长，马铃薯苗的生长明显受

表 1 *EcoR* MSAP 选择性扩增引物
Table 1 Sequence of adapter primers used for MSAP analysis

接头与引物名称 Adapters and primers	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
<i>EcoR</i> I-adapterI	5'-CTCGTAGACTGCGTACC
<i>EcoR</i> I-adapterII	5'-AATTGGTACGCAGCTAC
<i>Hpa</i> / <i>Msp</i> -adapterI	5'-CGAGCAGGACTCATGA
<i>Hpa</i> / <i>Msp</i> -adapterII	5'-GATCATGAGTCTCTGCT
<i>EcoR</i> I + A	GACTGCGTACCAATTCA
H/M + 0	ATCATGAGTCCTGCTCGG
H/M-TCT	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCT
H/M-TTG	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTG
H/M-TCG	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCCG
H/M-TGA	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGA
H/M-TCC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCC
H/M-TAC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAC
H/M-TTA	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTA
H/M-TTC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTTC
E-ACC	GACTGCGTACCAATTCAACC
E-ACA	GACTGCGTACCAATTCAACA
E-ACT	GACTGCGTACCAATTCAACT
E-AGG	GACTGCGTACCAATTCAAGG
E-AAC	GACTGCGTACCAATTCAAC
E-ACG	GACTGCGTACCAATTCAACG
E-AAG	GACTGCGTACCAATTCAAG
E-AGC	GACTGCGTACCAATTCAAGC

到了影响，出现了叶片枯黄等现象。胁迫末期叶片枯黄现象更加明显。显然干旱胁迫对马铃薯的生长起到了制约的作用。

2.2 MSAP 技术分析 3 个马铃薯品种的 DNA 甲基化变化

本研究通过选择性引物筛选，从 64 对引物中筛选出了 14 对较合适的选择性扩增引物，用 1 对预扩增引物和 14 对选择性扩增引物的组合进行聚合酶链式反应，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测了 3 个马铃薯品种在不同 PEG 胁迫时间(1~6 d)基因组 DNA 甲基化修饰的情况。观察聚丙烯酰胺凝胶电泳图，对带型进行统计，采用通用的记带原则(只计清楚的带，不计模糊的带)，从‘中薯 3 号’样品扩增得到 439~467 条带，从‘中薯 5 号’样品扩增得到 440~458 条带，‘大西洋’样品得到 424~437 条带，甲基化变化占了扩增总带数的 16.0%~20.7%。

通过对聚丙烯酰胺凝胶电泳扩增带型比较发现，3 种马铃薯材料在 PEG 胁迫下 DNA 甲基化情况均产生了一定变化。MSAP 中运用了一对甲基化敏感酶 *Hpa* II 和 *Msp* I，可识别 CCGG 位点，但对甲基化的敏感程度不同：*Hpa* 不能识别甲基化的 CCGG 位点，但能识别半甲基化的 CCGG 位点；*Msp* I 不能识别外侧胞嘧啶甲基化的 CCGG 位点^[5]。因此由 *Eco* RI + *Hpa* II 和 *Eco* RI + *Msp* I 酶切后的材料可能出现的以下 4 种谱带情况(*Eco* RI + *Hpa* II 酶切的凝胶板记为 H，*Eco* RI + *Msp* I 酶切的凝胶板记为 M)：(1)H 和 M 中同一位点都有酶切带，表示样本的 CCGG 位点为非甲基化位点；(2)H 中有带，M 中没带，可认为该位点外侧胞嘧啶半甲基化；(3)H 中无带，M 中有带，可推知该位点的 CCGG 位点内侧胞嘧啶甲基化；(4)H 和 M 在同一点上都没带，则该位点可能不存在 CCGG，也可能是该位点内外侧胞嘧啶同时甲基化。将以上这 4 种情况分别记为 I、II、III、IV。这 4 种情况每种又可以分为几个亚类(I、II、III 各有 4 亚类，IV 有 3 亚类)，II、II1、III1 是 PEG 处理后未变化的带，对试验的条带进行统计后发现，公共条带即未甲基化的条带在扩增结果中占了绝大多数，在甲基化的条带中，第三种情况的带型出现的较多，即材

料完全甲基化的情况较多。I、II、III 其它 3 个亚类与 IV 大类均代表了马铃薯受 PEG 胁迫后 DNA 甲基化变异的情况。

分析表 2 和表 3 中的数据可以发现，3 个品种均出现了去甲基化现象：在‘大西洋’用 PEG 处理的第一天出现了去甲基化的现象，‘中薯 3 号’在第三天出现了去甲基化现象，‘中薯 5 号’的去甲基化则出现在胁迫的第五天。

同时从表 3 中我们可以看出‘大西洋’在第一天时甲基化条带共 103 条，其中变异条带 24 条，甲基化变异率 23%；‘中薯 3 号’第三天甲基化条带共 118 条，其中变异条带 26 条，甲基化变异率 22%；‘中薯 5 号’第五天的甲基化条带共 110 条，其中变异条带 19 条，甲基化变异率 17%。大西洋品种除了胁迫的第三天减少的带多于增加带，总体趋势还是甲基化带数的增多，即在 20% 的 PEG 胁迫下，‘大西洋’的基因组 DNA 甲基化程度增高。‘中薯 3 号’除了胁迫的第三天减少的带少于增加的带，其基本的趋势是甲基化带数的增多，即在 20% 的 PEG 胁迫下，随着时间的增长，‘中薯 3 号’的甲基化趋势是减弱得。‘中薯 5 号’和‘中薯 3 号’情况类似，除了第五天甲基化减少的带少于增加的带外甲基化趋势基本上是减弱的。

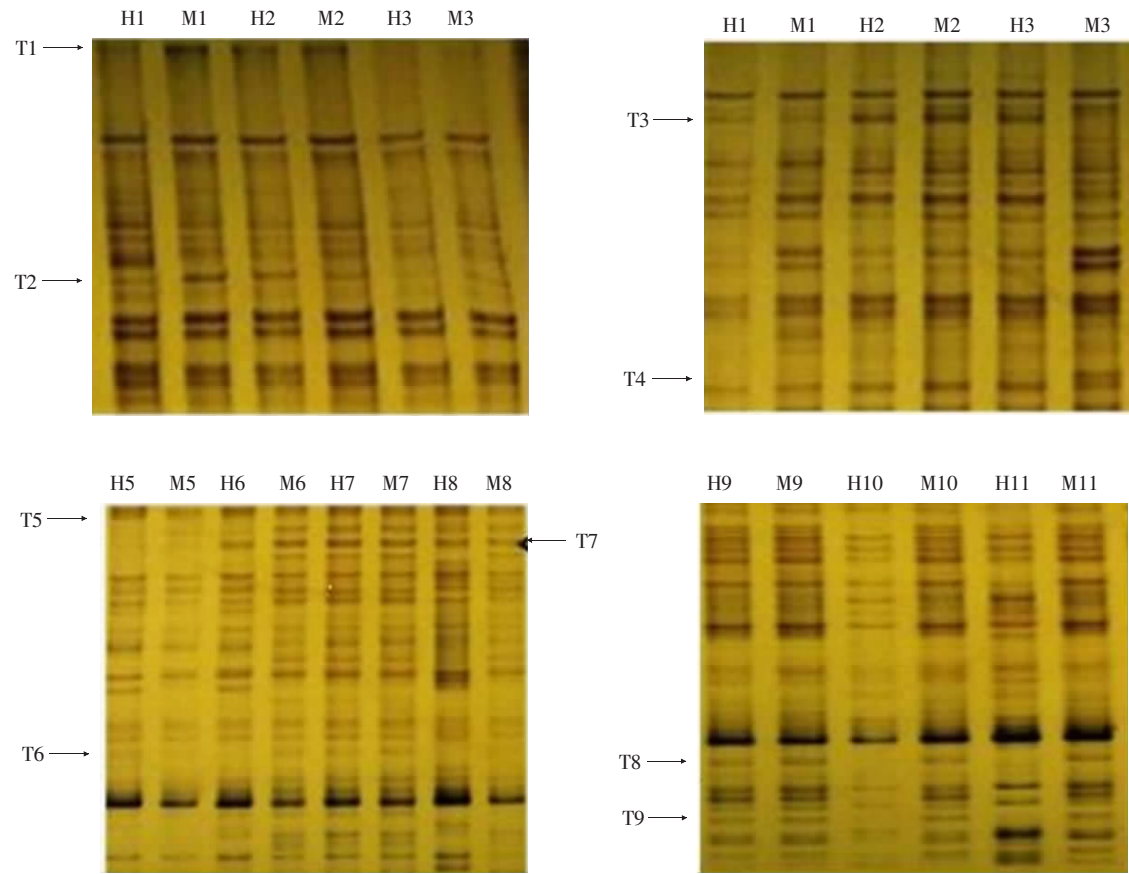
表 2 甲基化带型统计

Table 2 Band patterns of DNA methylation in potato leaves under drought stress

	对照		样品		PEG 处理天数 (d) Days after PEG treatment																	
	Control		Sample		大西洋 Atlantic						中薯 3 号 Zhongshu 3						中薯 5 号 Zhongshu 5					
	H	M	H	M	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
I1	1	1	1	1	349	351	355	347	349	351	358	361	355	362	364	367	363	372	352	356	350	361
I2			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I3			0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
I4			0	0	4	2	2	1	2	1	5	5	12	8	4	3	5	4	8	6	9	5
1	1	0	1	0	28	33	16	25	26	26	22	26	35	38	31	37	26	24	35	32	34	38
2			1	1	2	1	1	2	1	3	1	1	4	2	0	1	2	1	0	1	0	2
3			0	1	1	1	0	1	2	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
4			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1	0	1	0	1	51	47	51	52	49	50	52	51	57	56	50	51	52	56	53	52	55	50
2			1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV1	0	0	1	1	10	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	8	0
IV2			1	0	5	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0
IV3			0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1

表 3 3 个马铃薯品种在 PEG 处理后的甲基化增减趋势
Table 3 Trend of DNA methylation of potatoes under PEG stress

项目 Item	PEG 处理天数(d) Days after PEG treatment																	
	大西洋 Atlantic						中薯 3 号 Zhongshu 3						中薯 5 号 Zhongshu 5					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
总数 Total	103	85	70	81	80	81	81	83	118	107	86	92	85	86	97	92	110	96
减少 Decrease	4	2	2	1	2	1	5	5	12	8	4	3	5	4	8	6	9	5
增加 Increase	20	3	1	3	3	4	2	1	14	5	1	1	2	2	1	2	10	3
合计 Total	24	5	3	4	5	5	7	6	26	13	5	4	7	6	9	8	19	8
百分比(%)Percentage	23	6	4	5	6	6	9	7	22	12	6	4	8	7	9	9	17	8



注：泳道 H1 和 M1：大西洋的对照；H2、M2、H3 和 M3：大西洋胁迫样品；泳道 H5、M5：中薯 3 号的对照；H6、M6、H7、M7、H8、M8：中薯 3 号的胁迫样品；泳道 H9、M9：中薯 5 号的对照；H10、M10、H11、M11：中薯 5 号的胁迫样品；T1-T9：样品 DNA 特异带。
Note: Lane H1 and M1: Genomic DNA digested by *EcoR* + *Hpa* and *EcoR* + *Msp* separately from control of Atlantic; Lane H2, M2, H3 and M3: Genomic DNA digested by *EcoR* + *Hpa* and *EcoR* + *Msp* separately from PEG treatments of Atlantic DNA; Lane H5 and M5: Genomic DNA digested by *EcoR* + *Hpa* and *EcoR* + *Msp* separately from control of Zhongshu 3; Lane H6, M6, H7, M7, H8 and M8: Genomic DNA digested by *EcoR* + *Hpa* and *EcoR* + *Msp* separately from PEG treatments of Zhongshu 3 DNA; Lane H9 and M9: Genomic DNA digested by *EcoR* + *Hpa* and *EcoR* + *Msp* separately from control of Zhongshu 5; Lane H10, M10, H11 and M11: Genomic DNA digested by *EcoR* + *Msp* and *EcoR* + *Msp* separately from PEG treatments of Zhongshu 5 DNA; and T1-T9: Specified DNA.

图 1 DNA 甲基化敏感性扩增的部分结果
Figure 1 Parts of MSAP results

表 4 DNA 甲基化多态性片段序列比对结果
Table 4 Blast results of DNA methylation polymorphic sequences

编号 Code	长度 Length	序列比对结果 Features flanking or in this part of subject sequence	来源品种 Resource
T1	606 bp	gb EU545469.1 <i>S. tuberosum</i> iron superoxide dismutase (FeSOD) gene, partial	大西洋胁迫第一天
T2 T8	248 bp	ABBFA_001057//ferrichrome transport ATP-binding protein	中薯 3 号第三天
T4	138 bp	GQ221265.1 <i>S. lycopersicum</i> starch synthase III precursor, mRNA, partial	中薯 3 号第三天
T6	82 bp	1.gb EU403426.2 <i>S. tuberosum</i> granule-bound starch synthase (GBSS) mRNA, partial 2.gb DQ387451.1 <i>S. tuberosum</i> granule-bound starch synthase mRNA, partial	中薯 3 号第三天
T9	61 bp	rRNA: 4.5S ribosomal RNA	中薯 5 号第五天

2.3 差异片段测序及序列分析结果

图 1 为部分 MSAP 的特异带型, 将特异带切胶回收测序, 结果输入至 ncbi 的 Blast 比对。结果表明, 其中 4 条带与马铃薯抗逆基因 *Fe-SOD*、与萜类化合物合成、蛋白激酶基因 *StPK1* 启动子等有一定的同源性(表 4)。

3 讨 论

植物的不可移动性使之在受到外界的胁迫时只能通过调节自身的生理生化机制等来适应或规避逆境胁迫对其的伤害, 同时还需保证遗传上的稳定, 表观遗传的修饰的研究就很有意义。大量研究表明, 在逆境胁迫下植物 DNA 甲基化水平会发生不同的变化。如超低温保存有常温及低温保存无可比拟的优点, 可以避免细胞继代过程中产生的遗传不稳定性, 并且超低温保存还可以减少污染, 而超低温处理过程对于保存的材料实质上是一种逆境胁迫的过程, 在此过程中材料的基因组 DNA 序列并未发生变化, 但是甲基化状态发生了变化^[6-7]; 曲先^[8]对马铃薯进行超低温保存做了 MSAP 技术分析, 发现超低温保存后的马铃薯材料均发生了 DNA 甲基化水平变化, 有甲基化增加现象, 也有脱甲基化变化, 总体上的主要趋势是脱甲基化。

盐胁迫也是一种研究较多引起植物 DNA 甲基化水平变化的逆境胁迫, 钟兰和王建波^[9]运用高效液相色谱技术对小麦耐盐品种德抗 961 和盐敏感品种豫麦 34 经盐胁迫后叶片和根的 DNA 中 5-甲基胞嘧啶含量的变化情况进行了检测, 其测定结果表明: 经 NaCl 处理后, 耐盐品种德抗 961 叶片和根 DNA 中的 5-甲基胞嘧啶的百分含量有明显的下降的趋势, 而经 NaCl 处理 10 d 后, 盐敏感品种豫麦 34 叶片和

根 DNA 中的 5-甲基胞嘧啶的百分含量都比耐盐品种德抗 961 低。由此可推测 DNA 超甲基化可能是植物耐盐机制的一部分。李雪林^[10]以棉花为材料进行盐胁迫, 发现经不同浓度的 NaCl 处理后根基因组 DNA 甲基化比率均低于对照。Dyachenko 等^[11]对耐盐植物冰叶日中花进行了盐胁迫处理, 发现在盐胁迫条件下 CCWGG 序列也发生了超甲基化。

本试验发现, 在 PEG-6000 胁迫下, 随着时间的增长, 各马铃薯品种的处理组 DNA 甲基化升降具有不同趋势, 虽然外侧 C 半甲基化和内侧 C 完全甲基化及甲基化总体水平都无特别明显的变化规律, 但综合表 4、5、6 总结可发现: 大西洋品种在第一天甲基化程度是最大的, 且在第一天其出现了去甲基化的现象, 变异率最大; ‘中薯 3 号’是在第四天的甲基化比例最大, 同时也发生了去甲基化现象, 变异率最大; ‘中薯 5 号’与‘中薯 3 号’类似, 但是此种现象发生在第五天。随着 PEG-2000 胁迫时间的增长, ‘大西洋’表现出甲基化增多的趋势, ‘中薯 3 号’和‘中薯 5 号’则呈现的是甲基化减少的趋势。将特异片段回收, 测序比对后发现与马铃薯抗逆基因 *Fe-SOD*、与萜类化合物合成、蛋白激酶基因 *StPK1* 启动子等有一定的同源性, 可以推知这些基因表达与干旱胁迫相关。后期可采用荧光 PCR 等手段检测上述基因的表达量, 更好的从分子水平分析干旱胁迫下马铃薯苗甲基化变化。

[参 考 文 献]

- [1] Peredo EL, Arroyo-García R. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.) [J]. Cryobiology, 2008, 57: 234-241.
- [2] Kaity A. Assessment of genetic and epigenetic changes following cry-

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2012)01-0016-03

拉萨市马铃薯和玉米间作栽培试验

曾钰婷, 刘正玉*, 斯 年, 许娟妮, 谭淑琼, 卫 华

(西藏自治区农牧科学院蔬菜研究所, 西藏 拉萨 850032)

摘 要: 为充分利用土地资源, 提高单位面积的产值, 增加农民的收益, 在拉萨市筛选适合马铃薯玉米间作的栽培模式。以引进的马铃薯新品种青薯9号为材料, 与玉米进行间作试验, 马铃薯、玉米净作为对照, 研究马铃薯/玉米在行比为2:2, 3:2和4:2栽培模式下的效益情况。结果表明: 马铃薯/玉米在行比为3:2栽培模式下的纯收益最高, 为8895.1元/667 m², 适宜在拉萨市推广。

关键词: 马铃薯; 玉米; 间作; 经济效益

Experiment on Potato Intercropping with Maize in Lhasa

ZENG Yuting, LIU Zhengyu*, SI Nian, XU Juanni, TAN Shuqiong, WEI Hua

(Institute of Vegetable Sciences, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa, Tibet 850032, China)

Abstract: The newly introduced potato cv. Qingshu 9 intercropping with maize in various ratios of potato row to maize row, 2:2, 3:2 and 4:2, was studied in Lhasa for their economic benefits, using monocropping of potato and maize as the control, in order to select a suitable pattern of potato intercropping with maize so that the land resource could be used efficiently, and output value on unit area and farmers benefit increased. The results indicated that the best net income, 8895.1 Yuan / 667 m², was achieved when potatoes were intercropped with maize with a ratio of 3 rows to 2 rows. This pattern of potato intercropping with maize should be recommended in Lhasa.

Key Words: potato; maize; intercropping; economic benefit

收稿日期: 2011-11-15

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助(Supported by China Agriculture Research System)(CARS-10-ES25)。

作者简介: 曾钰婷(1979-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事脱毒马铃薯高产栽培技术研究。

* 通信作者(Corresponding author): 刘正玉, 研究员, 主要从事马铃薯脱毒种薯繁育及马铃薯推广工作, E-mail: zyt14916@126.com。

- opreservation in papaya [J]. Plant Cell Rep, 2008, 27: 1529-1539.
- [3] 李建武, 王蒂, 司怀军. 马铃薯试管苗对水分胁迫的生理反应[J]. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(3): 319-323.
- [4] Zhao Y, Yu S, Xing C, et al. Analysis of DNA methylation in cotton hybrids and their parents [J]. Mol Biol, 2008, 42: 169-178.
- [5] McClell M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restrictive endonucleases and DNA modification methyltransferases [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22: 3640-3659.
- [6] Christopher M, Richards, Ann R, et al. Microsatellite primers for Texas wild rice (*Zizania texana*), and a preliminary test of the impact of cryogenic storage on allele frequency at these loci [J]. Conservation Genetics, 2004, 5: 853-859.
- [7] Leena R, Tuija A. Genome fidelity during short- and long-term tissue culture and differentially cryostored meristems of silver birch (*Betula pendula*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 83: 21-32.
- [8] 曲先. 低温疗法脱除马铃薯病毒及遗传变异分析[D]. 郑州: 河南大学, 2009.
- [9] 钟兰, 王建波. DNA超甲基化在小麦耐盐胁迫中的作用[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(1): 102-104.
- [10] 李雪林. 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.
- [11] Dyachenko O V, Zakharchenko N S, Shevchuk T V, et al. Effect of hypermethylation of CCWGG sequences in DNA of *Mesemb-ryanthemum crystallinum* plants on their adaptation to salt stress [J]. Biochemistry (Moscow), 2006, 71: 461-465.