

外源 NO 对转基因白桦外源基因表达及 DNA 甲基化的影响

孙丰坤¹ 李思达¹ 李吉祥¹ 陈晓慧¹ 曾凡锁^{1,2*}

(1. 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040 ;2. 林木遗传育种国家重点实验室, 哈尔滨 150040)

摘要 为探讨外源 NO 诱导转基因白桦外源基因表达与基因组 DNA 甲基化之间的关系,本研究分析了 NO 供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)对转基因白桦愈伤组织中外源基因 *BGT* 转录的影响,并对此过程中基因组 DNA 甲基化水平、甲基转移酶基因 *DRM*、*MET* 表达量及生理生化指标进行研究。结果表明 2 mmol · L⁻¹ SNP 处理后,转基因白桦防御酶活性、丙二醛(MDA)含量显著升高,表明高浓度 NO 对白桦细胞正常生命活动产生了伤害;甲基转移酶 *DRM* 和 *MET* 基因上调表达,基因组 DNA 甲基化水平由 10.6% 增加到 16.5%,外源基因 *BGT* 表达量在 6 h 时显著增加,3 d 时仅为对照的 0.46 倍,说明转基因白桦外源 *BGT* 基因的表达对高浓度 NO 响应明显且受基因组甲基化水平的影响。本研究揭示了转基因白桦外源 *BGT* 基因和甲基转移酶 *MET*、*DRM* 基因对高浓度 NO 的响应模式,分析了基因组甲基化水平及生理生化特征的变化,为转基因植物生长发育的表观遗传调控和外源基因表达影响机制的研究奠定基础。

关键词 NO 转基因白桦 基因表达 甲基化

中图分类号 S792.153 文献标志码 A doi 10.7525/j.issn.1673-5102.2017.06.010

Effects of Exogenous Nitric Oxide on Exogenous Gene Expression and DNA Methylation in Transgenic Birch

SUN Feng-Kun¹ LI Si-Da¹ LI Ji-Xiang¹ CHEN Xiao-Hui¹ ZENG Fan-Suo^{1,2*}

(1. College of Life science, Northeast Forestry University, Harbin 150040 ;2. Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Nation, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract In order to investigate the relationship between transgene expression and the methylation of genomic DNA induced by 2 mmol · L⁻¹ SNP in Transgenic birch, the effect of SNP (sodium nitroprusside) on the expression of exogenous *BGT*, methyltransferase gene *DRM*, *MET* and the level of DNA methylation were determined in transgenic birch callus. The activities of defense enzymes and the MDA (malondialdehyde) content in transgenic birch were increased significantly, which indicated high concentration of NO had harm on the normal life of birch cells. The methyltransferase *DRM* and *MET* genes were up-regulated and the methylation level of genomic DNA was increased from 10.6% to 16.5%. The transcription level of *BGT* was improved at 6 h and only 0.46 folds of the control at 3 d, which suggested the expression of exogenous *BGT* gene in transgenic birch was affected by high concentration of NO and the level of genomic methylation. The results revealed the response patterns of exogenous gene and methyltransferase gene and determined the genomic methylation level and physiological and biochemical characteristics to the high concentration of NO in birch, which will provide some references for further study of epigenetic regulation and regulation of exogenous gene expression in transgenic plants.

Key words NO 转基因白桦 基因表达 甲基化

基金项目 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572014DA04) ;国家自然科学基金项目(J1210053,31200463)

第一作者简介 孙丰坤(1989—),男,硕士研究生,主要从事植物基因工程方面的研究。

* 通信作者 E-mail zeng@nefu.edu.cn

收稿日期 2017-03-16

Foundation item The central university basic research business expenses special fund project(2572014DA04) ;National Natural Science Foundation of China(J1210053,31200463)

First author introduction SUN Feng-Kun(1989—),male,master,the main research direction :plant genetic engineering.

* Corresponding author E-mail zeng@nefu.edu.cn

Received date 2017-03-16

从 NO(1992 年)被 Science 评为“年度明星分子”以来,对其功能的研究逐渐成为植物学领域的热点,NO 对植物的影响具有浓度效应^[1],低浓度 NO 能够增强植物抗逆性^[2~4],调节植物的生长发育^[5~6],特异性诱导植物发生去甲基化^[7~8],但当 NO 浓度高于 0.05 mmol · L⁻¹ 则会对植物基因组造成损伤,抑制植物生长甚至死亡。近年来 NO 的过量污染正在加剧,主要有臭氧层空洞、酸雨、汽车尾气、水体污染、光化学烟雾等,正在威胁着植物生长和人类生产劳作,外源高浓度 NO 对植物基因组甲基化水平的影响研究较少,特别在本本植物中还未见报道。因此对高浓度 NO 环境下植物生理生化特征及基因组遗传稳定性的研究成为本研究的主要目标。

DNA 甲基化是转基因植物中外源基因沉默的主要原因,转入的外源基因或其整合位点通常会受到植物本身的排斥而发生甲基化,影响基因正常表达^[9~10]。同时,转基因植物在长期生长过程中,环境胁迫和信号产生的表观变异对外源基因的表达的至关重要^[11]。因此,外界高浓度 NO 对转基因植物基因组 DNA 甲基化水平、外源基因的表达水平及此过程中植物防御酶系统的影响成为本研究的主要目的。本研究通过 2 mmol · L⁻¹ SNP 处理转基因白桦愈伤组织,检测了外源基因 *BGT*、甲基化转移酶基因 *MET*、*DRM* 表达量及生理生化特征的变化情况,并分析白桦基因组 DNA 甲基化水平及模式,揭示了白桦基因组 DNA 甲基化、甲基转移酶 *MET*、*DRM* 对 NO 响应模式、NO 对白桦外源基因 *BGT* 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因白桦材料为詹亚光等(2001)获得的转 *BGT* 抗虫基因单拷贝高表达的无性系 TP46 实生苗。利用 WPM 培养基(附加 12 mg · L⁻¹ BA,20 g · L⁻¹ 蔗糖,5.3 g · L⁻¹ 琼脂),pH 为 5.5 ~ 6.0,诱导转基因白桦实生苗腋芽长出白桦组培苗,切取转基因白桦组培苗茎段,利用 NT 培养基(附加 0.1 mg · L⁻¹ BA + 0.01 mg · L⁻¹ TDZ,20 g · L⁻¹ 蔗糖,5.3 g · L⁻¹ 琼脂),pH 为 5.5 ~ 6.0,诱导获得转基因白桦愈伤组织,每隔 20 d 继代 1 次,培养温度为 25 ~ 27℃,光照强度为 150 μmol · m⁻² · s⁻¹,光照 16 h · d⁻¹。

将 NO 供体 SNP 添加到转基因白桦愈伤组织

培养体系中(50 mL 培养基接种 4 g(FW)愈伤组织),使 SNP 终浓度为 2 mmol · L⁻¹,对照组加入等体积无菌水,分别在 6 h、12 h、3 d、5 d、7 d 取材,每个处理重复 3 次。

1.2 方法

1.2.1 生理指标测定

称取 0.3 g(FW)白桦愈伤组织,测定超氧化物歧化酶(SOD)^[12]、过氧化物酶(POD)^[13]、过氧化氢酶(CAT)^[13]、苯丙氨酸解氨酶(PAL)^[14] 的活性及丙二醛(MDA)^[14] 含量。

1.2.2 基因表达量检测

采用 CTAB 法提取白桦愈伤组织总 RNA,利用 TOYOBO 反转录试剂盒反转录 1 μg RNA 成 cDNA 作为模板,模板稀释 10 倍后使用 Applied Biosystems 7500 进行 qRT-PCR,引物见表 1,实验方法参照 TOYOBO 荧光定量试剂盒说明书,每个样品重复 3 次,采用 2^{-ΔΔCT} 法进行结果分析。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Real-time quantitative PCR primers

名称 Name	核酸序列 Nucleic acid sequence(5'-3')
DRM-F	TGAGATGTGGAAGAAAGCAAGCAG
DRM-R	TCATACAGGAACCGTGAAATAGTGG
MET-F	TCCCCACCTTACCCATTGGTT
MET-R	AGGTTCTGATTGGCATGACCTTC
BGT-F	AACGGTAGATTVGCTGGAT
BGT-R	CAGAAGTTCCAGAGCCAAAG
TU-F	TCAACCGCCTTGTCTCTCAGG
TU-R	TGGCTCGAATGCACTGTTGG

1.2.3 随机扩增多态性 DNA 标记技术(Random Amplified Polymorphic DNA,RAPD)检测表观遗传变异

采用 CTAB 法提取白桦愈伤组织基因组 DNA,用 *Hpa* II、*Msp* I 内切酶分别对 DNA 进行酶切,PCR 筛选得到 20 对可产生多态性片段的引物(表 2),经琼脂糖凝胶电泳后依据条带变化进行胞嘧啶甲基化分析,原则如下:若 *Msp* I 酶切后扩增有条带而对应的 *Hpa* II 没有带,其后发生变化的,为内侧胞嘧啶完全甲基化位点;若 *Hpa* II 酶切后扩增有条带而对应的 *Msp* I 没有带,其后发生变化的,为外侧胞嘧啶半甲基化位点;若 *Hpa* II 和 *Msp* I 酶切后扩增均有条带,其后发生变化的,为未甲基化位点。

表 2 RAPD 引物名称及序列

Table 2 RAPD primers

名称 Name	序列 Nucleic acid sequence (5'-3')	名称 Name	序列 Nucleic acid sequence (5'-3')
S22	TGCCGAGCTG	S259	GTCAGTGCGG
S34	TCTGTGCTGG	S218	GATGCCAGAC
S39	CAAACGTCGG	S487	CCCCGATGGT
S29	GGGTAACGCC	S230	GGACCTGCTG
S7	GGTGACGCAG	S207	GGCAGGCTGT
S17	AGGGAACGAG	S377	CCCAGCTGTG
S438	GGTGAGGTCA	S208	AACGGCGACA
S48	GTGTGCCCCA	S315	CAGACAAGCC
S258	GAGGTCCACA	S264	CAGAAGCGGA
S428	ACCTCAGCTC	S216	GGTGAACGCT

2 结果与分析

2.1 2 mmol · L⁻¹SNP 处理下转基因白桦甲基转移酶基因 *DRM*、*MET* 及外源基因 *BGT* 表达分析

2 mmol · L⁻¹SNP 处理下转基因白桦无性系 TP46 甲基转移酶基因 *MET*、*DRM*(图 1A) 均上调表达。*MET* 基因转录水平呈现先上升后下降的趋势,3 d 时表达量达到最大值,为对照组的 51.1 倍;*DRM* 基因响应时间较早,12 h 时达到最大值,为对照组的 38.1 倍,之后表达量开始下降但仍高于对照组。外源基因 *BGT*(图 1B) 响应明显,6 h 前 *BGT* 基因上调表达,12 h 表达量下降,仅为对照组的 0.46 倍,之后转录水平升高且均大于对照组,3 d 时出现最大值,为对照组的 16.9 倍。

2.2 2 mmol · L⁻¹SNP 处理下转基因白桦生理指标分析

植物依靠体内 SOD、POD、CAT 的酶促反应清除过量的氧活性自由基,从而维持细胞内活性氧的平衡。2 mmol · L⁻¹SNP 处理后,SOD、POD、CAT

活性均显著升高。SOD 活性先上升后下降再上升,6 h、12 h 时 SOD 活性显著高于对照;*POD*、*CAT* 活性呈逐渐升高的趋势,分别在 3 d 后和 7 d 时显著高于对照组。*PAL* 作为催化苯丙烷类代谢反应的限速酶,在植物生长发育、抗病抗逆境中起重要作用,2 mmol · L⁻¹SNP 处理后,*PAL* 活性呈现逐渐升高的趋势,5 d 时酶活性最高,为对照组的 1.03 倍。

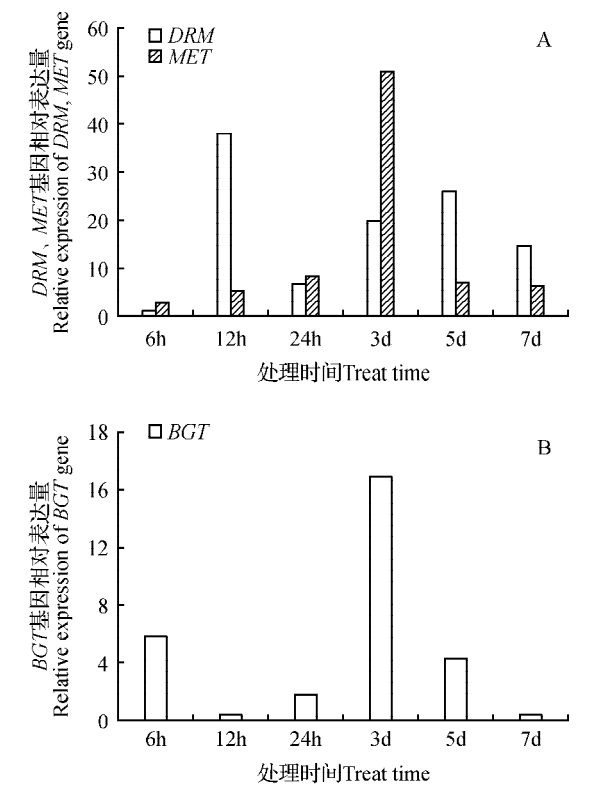


图 1 2 mmol · L⁻¹SNP 处理下 *DRM*、*MET* 及 *BGT* 基因相对表达量

Fig. 1 Relative expression of *DRM*, *MET* and *BGT* genes in birch under 2 mmol · L⁻¹ SNP treatment

表 3 2 mmol · L⁻¹SNP 处理后转基因白桦 DNA 甲基化水平及模式分析

Table 3 DNA methylation level and pattern of transgenic birch after 2 mmol · L⁻¹ SNP treatment

	RAPD 总位点数 Total number of RAPD sites	未甲基化 CCGG 位点数 Non methylated CCGG sites (%)	甲基化 CCGG 位点数 Methylated CCGG sites (%)	内侧全甲基化位点数 Number of inner methylation sites (%)	外侧胞嘧啶半甲基化 Number of outer methylation sites (%)
对照 Control	198	177 (89.39)	21 (10.6)	13 (61.91)	8 (38.09)
6 h	195	174 (89.23)	31 (15.9)	18 (54.55)	13 (39.39)
12 h	210	180 (85.71)	30 (14.29)	14 (46.67)	16 (53.33)
24 h	185	157 (84.86)	28 (15.14)	16 (57.14)	12 (42.86)
3 d	200	167 (83.50)	33 (16.50)	11 (48.65)	12 (51.35)
5 d	230	194 (84.35)	36 (15.65)	20 (55.56)	16 (44.44)
7 d	208	178 (85.58)	30 (14.42)	17 (56.67)	13 (43.33)

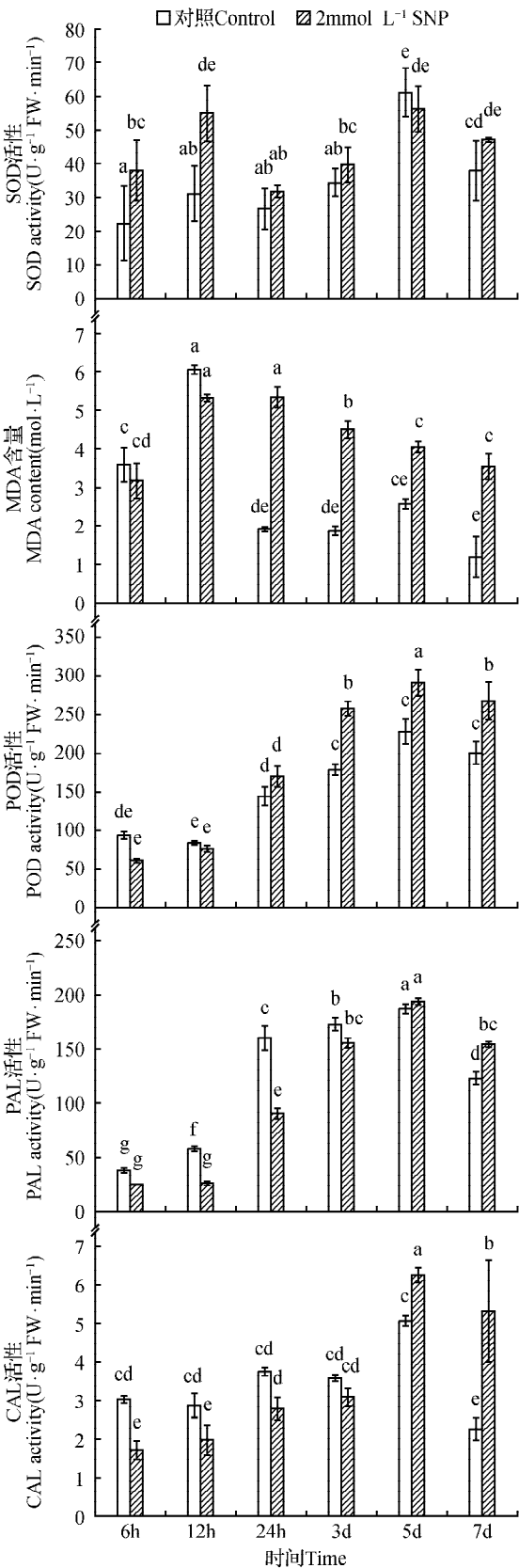


图2 2 mmol · L⁻¹ SNP 处理后转基因白桦防御酶活性及 MDA 含量

Fig.2 Defense enzyme activity and MDA content of birch treated with 2 mmol · L⁻¹ SNP

MDA 是植物细胞膜脂氧化的产物,其含量在一定程度上可反应植物损伤程度。2 mmol · L⁻¹ SNP 处理后,白桦组织内 MDA 含量显著增加,在 24 h 时 MDA 含量达到对照的 4.65 倍,之后 MDA 含量一直维持较高水平且差异显著。

2.3 2 mmol · L⁻¹ SNP 处理下转基因白桦 DNA 甲基化水平分析

利用甲基化敏感不同的 *Msp* I 和 *Hpa* II 结合 RAPD 分子标记技术,检测了 2 mmol · L⁻¹ SNP 处理后转基因白桦愈伤组织 DNA 甲基化水平及模式的改变。通过对 20 对引物产生多态性片段(图 3)及 DNA 甲基化模式、水平(表 3)进行差异统计,20 对引物 21 个模板共得到 575 条条带,SNP 处理使转基因白桦基因组 DNA 甲基化水平明显升高,3 d 时达到最大值,占全部 RAPD 位点数的 16.5%,TP46 白桦甲基化位点数平均值达到 14.8%,主要以内侧胞嘧啶甲基化为主,占整体甲基化水平的 54.45%。

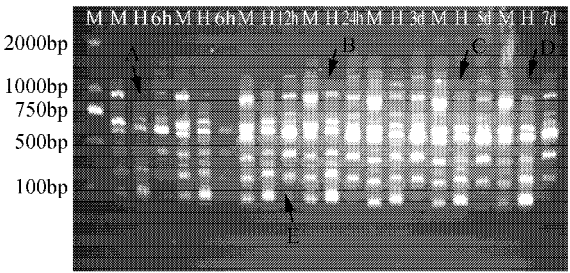


图3 S29 号引物多态性扩增结果 M. *Msp* I ;H. *Hpa* II ;A - D. 差异条带位置

Fig.3 The polymorphism amplification results of S29 primer M. *Msp* I ;H. *Hpa* II ;A - D. The position of the difference strips

3 讨论

NO 作为激活植物过敏性反应和系统获得性抗性的内源信号分子广泛存在于植物体内,不但能够调节植物生长发育过程,还在非生物胁迫中发挥重要作用^[2~6,15],其通过复杂的信号通路一方面减少活性氧 ROS 的生成,另一方面可以诱导抗氧化酶活性的升高来减轻氧化胁迫伤害^[16]。但高浓度 NO 却会对植物的生长产生毒害作用^[1]。

本研究发现,2 mmol · L⁻¹ SNP 处理的白桦愈伤组织中,活性氧自由基清除酶 SOD、POD、CAT 在不同时间达到其活性最大值且与对照组差异显著,PAL 活性显著增强,说明白桦通过防御酶活性

的升高来减轻外界 SNP 对细胞的伤害,维持正常生命活动;同时 MDA 含量的降低也可以看出随着时间的延长,白桦膜系统的伤害程度逐渐降低,但直至 7 d,MDA 含量仍高于对照组,再次证明了高浓度 NO 会对植物产生毒害作用。NO 提高防御酶活性的主要原因是其对含铁相关酶类有很高亲和性^[17],本研究中 NO 对植物防御酶活性诱导效果不同的原因可能与 NO 在相关酶信号转导中的位置有关,也可能与外界高浓度 SNP 胁迫下防御酶在膜脂过氧化中的位置和调节机制有关。

NO 不但参与了植物的生长发育和对外界胁迫应答等生理过程^[5,15],还会对植物基因组的表观遗传稳定性产生影响,诱导 DNA 甲基化的变异^[18]。植物中 *MET* 基因具有维持 CpG 位点甲基化功能,能够维持植物体内的甲基化水平^[19],*DRM* 具有催化 DNA 从头甲基化的活性,在响应相应信号和建立甲基化印记中发挥重要作用。本研究中高浓度 SNP 处理下,白桦基因组 DNA 甲基化水平显著升高,甲基化位点总数由 10.6% 增加到了 16.5%,这与高粱中的研究结果一致^[9],表明高浓度 NO 使白桦 DNA 甲基化水平显著升高。白桦 *DRM* 基因表达量对高浓度 NO 响应明显,在 12 h 时达到最高,说明白桦基因组内发生了从头甲基化,白桦 *MET* 基因同样表现为上调表达,在 3 d 时表达量达到最高,推测原因是此时白桦基因组内的高甲基化水平的维持需要 *MET* 的参与,总之,白桦甲基转移酶 *DRM* 和 *MET* 的上调表达在基因组 DNA 甲基化水平升高过程中起着重要作用,白桦基因组甲基化水平的增加可能是为了抵御外界高浓度 NO 对白桦的损伤。

众所周知,DNA 甲基化是转基因植物外源基因沉默的主要原因,本研究材料为转 *BGT* 抗虫基因单拷贝且高表达的无性系 TP46 白桦,2 mmol · L⁻¹ SNP 处理 6 h 时,外源基因 *BGT* 基因上调表达,表明外源基因 *BGT* 对外界高浓度 NO 响应明显。6 h 后,白桦甲基转移酶 *DRM* 基因表达量逐渐升高,基因组 DNA 甲基化水平显著增加,外源 *BGT* 基因的表达量开始下降,12 h 时,白桦 *DRM* 基因表达量达到最高,此时外源 *BGT* 基因表达量仅为对照组的 0.46 倍,可以看出,6 h 后白桦 *DRM* 基因表达量的升高及基因组甲基化水平的增加使得外源 *BGT* 基因的表达受到抑制。有意思的是,6 h 后虽然白桦 *MET* 基因转录及基因组 DNA 甲基化维持在一个较高水平,但 *BGT* 基因表达量却在 24 h 后

开始升高且在 3 d 时达到最大值,推测原因是在白桦基因组 DNA 甲基化水平不变的情况下,外源基因 *BGT* 相关表达核酸序列发生了去甲基化,转录水平逐渐升高,同样 Boyko 等在研究 *LRR* 转基因烟草时发现,烟草花叶病毒侵染烟草后导致基因组 DNA 甲基化水平升高,但抗病基因 *LRR* 结构域编码区段甲基化水平却在降低^[20]。本研究中对于外源基因 *BGT* 相关核酸序列是否发生了去甲基化还需进一步研究。

综上所述,本研究分析了外源高浓度 NO 对转基因白桦外源基因 *BGT* 表达量的影响,明确了基因组 DNA 甲基化水平及模式、生理生化特征的变化情况,为进一步研究外界高浓度 NO 对植物生长发育的调控机制提供理论依据,同时为以后的林木遗传育种及生产实践提供理论依据及方法参考。

参 考 文 献

1. Beligni M V, Lamattina L. Is nitric oxide toxic or protective? [J]. Trends in Plant Science, 1999, 4 (8) : 299 - 300.
2. Kaya C, Ashraf M. Exogenous application of nitric oxide promotes growth and oxidative defense system in highly boron stressed tomato plants bearing fruit [J]. Scientia Horticulturae, 2015, 185 : 43 - 47.
3. 关艳龙. 一氧化氮及一氧化碳参与植物逆境响应的机理研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2014.
Guan Y L. The study about the mechanism of Nitric Oxide and Carbon Monoxide responding to enviromental stress [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2014.
4. Domingos P, Prado A M, Wong A, et al. Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants [J]. Molecular Plant, 2015, 8 (4) : 506 - 520.
5. Duan X H, Li X N, Ding F, et al. Interaction of nitric oxide and reactive oxygen species and associated regulation of root growth in wheat seedlings under zinc stress [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 113 : 95 - 102.
6. 张艳艳, 章文华, 薛丽, 等. 一氧化氮在植物生长发育和抗逆过程中的作用研究进展 [J]. 西北植物学报, 2012, 32 (4) : 835 - 842.
Zhang Y Y, Zhang W H, Xue L, et al. Advance on NO function in Plant Growth, development and abiotic stress tolerance [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2012, 32 (4) : 835 - 842.
7. 冯奇志. 非生物胁迫诱导植物表观遗传变异研究 : (一)

- 外源一氧化氮(NO)诱导的高粱 DNA 甲基化变异和表型变异 ;(二)盐碱胁迫诱导水稻 DNA 甲基化变异 [D]. 长春 :东北师范大学,2012.
- Feng Q Z. Abiotic stress-induced epigenetic alterations in plants 1. Alteration of DNA methylation and phenotypic changes in sorghum(*Sorghum bicolor* L.) induced by exogenous nitric oxide ;2. Methylation alternations in rice (*Oryza sativa* L.) induced by the salt and alkaline stress [D]. Changchun :Northeast Normal University,2012.
8. 王艺雯. SO₂ 诱导拟南芥 DNA 甲基化变异过程中 H₂O₂ 和 NO 的作用 [D]. 太原 :山西大学,2012.
- Wang Y W. Role of H₂O₂ and NO in SO₂-induced alteration of DNA methylation in *Arabidopsis* [D]. Taiyuan : Shanxi University,2012.
9. Fu X, Kohli A, Twyman R M, et al. Alternative silencing effects involve distinct types of non-spreading cytosine methylation at a three-gene, single-copy transgenic locus in rice [J]. Molecular and General Genetics MGG, 2000, 263 (1) : 106 – 118.
10. Ochiai H, Harashima H, Kamiya H. Intracellular disposition of exogenous DNA in vivo : silencing, methylation and fragmentation [J]. FEBS Letters, 2006, 580 (3) : 918 – 922.
11. 王晓凤. 低温胁迫和激素对外源基因表达及愈伤组织防御酶活性的影响 [D]. 哈尔滨 :东北林业大学,2011.
- Wang X F. The effect of low temperature and hormones on expression of foreign genes and callus defensive enzyme activity [D]. Harbin :Northeast Forestry University,2011.
12. 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京 :高等教育出版社,2000 :55 – 56.
- Li H S. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment [M]. Beijing :Higher Education Press,2000 :55 – 56.
13. 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导 2 版 [M]. 广州 :华南理工大学出版社,2006 :72 – 73.
- Chen J X, Wang X F. Experimental instruction of plant physiology 2nd ed [M]. Guangzhou :South China University of Technology Press,2006 :72 – 73.
14. 薛应龙. 植物生理学实验手册 [M]. 上海 :上海科学技术出版社,1985 :191 – 192.
- Xue Y L. Laboratory manual of plant physiology [M]. Shanghai :Shanghai Science and Technology Press,1985 :191 – 192.
15. Durner J, Wendehenne D, Klessig D F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95 (17) : 10328 – 10333.
16. Vanlerberghe G C, McIntosh L. Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria [J]. Plant Physiology, 1996, 111 (2) : 589 – 595.
17. Wang X Y, Shen W B, Xu L L. Exogenous nitric oxide alleviates osmotic stress-induced membrane lipid peroxidation in wheat seedling leaves [J]. Acta Photophysiological Sinica, 2004, 30 (2) : 195 – 200.
18. Vasudevan D, Bovee R C, Thomas D D. Nitric oxide, the new architect of epigenetic landscapes [J]. Nitric Oxide, 2016, 59 :54 – 62.
19. Zubko E, Gentry M, Kunova A, et al. De novo DNA methylation activity of methyltransferase 1 (MET1) partially restores body methylation in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 2012, 71 (6) :1029 – 1037.
20. Boyko A, Kathiria P, Zemp F J, et al. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants : (virus-induced plant genome instability) [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35 (5) :1714 – 1725.