

甲基化敏感扩增多态性技术(MSAP)在生态学中的应用

龚 治^{1,2}, 张亚楠³, 周世豪³, 符悦冠^{1,2*}

¹中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南 海口 571101; ²农业部热带作物有害生物综合治理重点实验室, 海南 海口 571101; ³海南大学环境与植物保护学院, 海南 海口 570228

摘要: DNA 甲基化是生物体内最为重要的表观遗传修饰形式之一, 在生态学上的应用越来越广泛。在收集、整理生态表观遗传学相关文献的基础上, 介绍了甲基化敏感扩增多态性技术(MSAP)的原理、优势与局限性及其在生态学上的应用和展望。MSAP 因其应用广泛、操作简便等优点成为研究 DNA 甲基化水平的有力工具, 特别是在探究生物体如何快速适应生境变化以及外来入侵生物如何突破遗传瓶颈等问题上。MSAP 技术能够很好地揭示生物种群内部或种群之间的表观遗传差异, 是对遗传多样性、遗传变异研究的有力补充。

关键词: 甲基化敏感扩增多态性技术; 生态学; 种群变异; 生态表观遗传学

Progress on methylation-sensitive amplified polymorphism and its application in ecology

Zhi GONG^{1,2}, Ya-nan ZHANG³, Shi-hao ZHOU³, Yue-guan FU^{1,2*}

¹Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China;

²Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Haikou, Hainan 571101, China;

³College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: DNA methylation is one of the most important modifications in epigenetics, and becomes increasingly popular in ecology. Based on published papers about ecological epigenetics, principle, advantages and limitations, applications and prospects in ecology are discussed. Methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) has been an effective method for DNA methylation because of its wide range of applications and simple operation, especially on subject of ecology problems, such as rapid adaptation to changing habitats and overcoming genetic bottleneck for alien invasive species. MSAP can reveal epigenetic variation within or between populations well, and acts as a powerful supplement to the study of genetic diversity and variation.

Key words: methylation-sensitive amplified polymorphism; ecology; population variation; ecological epigenetics

随着基因组时代的到来以及人们从基因水平对生物响应外界环境的认识, 基因型与表型间的相互作用越来越被人们知晓。虽然多个物种的基因全序列信息已经被公布, 但有关基因组如何行使其功能并适应复杂环境的研究进展却不大(Martin *et al.*, 2011; Pigliucci, 2010; Richards *et al.*, 2009, 2012a)。生态表观遗传学(ecological epigenetics)是研究表观遗传差异和生态表型变异之间关系的学科。表观遗传机制的变化能够改变基因表达和生

物体功能, 引起形态性状上的差异(Cubas *et al.*, 1999; Kucharski *et al.*, 2008; Manning *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 1999; Rakyan *et al.*, 2003), 但不改变 DNA 序列(Richards, 2006)。另外, 研究发现, 一些表观遗传标记可被稳定地遗传给下一代(Jablonka & Raz, 2009; Johannes *et al.*, 2009; Verhoeven *et al.*, 2010), 而表观遗传标志在个体和种群中差异较大(Herrera & Bazaga, 2010, 2011; Herrera *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Massicotte & Angers, 2012;

收稿日期(Received): 2015-10-16 接受日期(Accepted): 2015-11-28

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201103026-1, 201403075)

作者简介: 龚治, 男, 博士研究生。研究方向: 外来入侵生物与昆虫分子生物学。E-mail: zhigong11@163.com

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: fygcatas@163.com

Massicotte *et al.*, 2011; Richards *et al.*, 2012b; Schrey *et al.*, 2012)。因此,表观遗传学机制是生物个体对其环境反应机制的重要组成部分(Angers *et al.*, 2010; Richards *et al.*, 2010; Verhoeven *et al.*, 2010)。了解表观遗传差异将有助于解释生态和进化等方面的科学问题(Angers *et al.*, 2010; Bossdorf *et al.*, 2008; Richards *et al.*, 2008, 2010)。

表观遗传机制(如 DNA 甲基化、染色体重编码、组蛋白去乙酰化、位置效应和小 RNA 干扰)可影响基因表达,其中 DNA 甲基化(DNA methylation)是研究较为充分的表观遗传机制。DNA 甲基化通常是指一个甲基化的基团被连接到胞嘧啶上,而该胞嘧啶后紧跟一个 DNA 序列中的鸟嘌呤(Bossdorf *et al.*, 2010)。DNA 甲基化对基因表达具有多种影响,通常表现为降低基因活性(Bossdorf *et al.*, 2008; Jablonka & Lamb, 2006)。目前已有多种技术(如 HPLC、HPCE、重亚硫酸盐测序法、甲基化荧光法)能检测 DNA 甲基化的差异,其中甲基化敏感扩增多态性技术(methylation-sensitive amplified polymorphism, MSAP)是最常用的方法(Reyna-López *et al.*, 1997)。本文就 MSAP 技术的原理、优势和局限性及其在生态学上的应用进行综述和展望。

1 MSAP 原理

MSAP 是一种基于 AFLP 技术检测基因组甲基化变异的 PCR 技术(Reyna-López *et al.*, 1997)。该技术使用的限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hpa* II 对其识别序列 CCGG 上的甲基化胞嘧啶具有不同的敏感性(Roberts *et al.*, 2007)。*Hpa* II 对 2 条链上的内外侧胞嘧啶都甲基化及任一个胞嘧啶甲基化均不能酶切,即不能酶切含 mCCGG、CmCGG 和 mCmCGG 的位点,但可识别仅一条链上胞嘧啶被甲基化的位点;而 *Msp* I 可识别单链或双链上内部胞嘧啶被甲基化,但不识别外部胞嘧啶被甲基化,即不能酶切含 mCCGG 的位点(McClelland *et al.*, 1994; Roberts *et al.*, 2007)。基于此,可以将相同 DNA 序列扩增出不同的谱带,以此判断 DNA 5'-CCGG 位点胞嘧啶的甲基化状态和程度(Vos *et al.*, 1995)。

2 MSAP 的优势

MSAP 技术具有多方面的优势(Schrey *et al.*, 2013):(1)可用于研究非模式生物,甚至包括那些缺少基因组测序的物种;(2)技术上与 AFLP 技术

相似,如具有相同的试验方案、技能和试验设备;(3)具有较好的成本效益,容易按比例增加,且相同试剂能够用于不同的物种研究;(4)可在多个位点对大量个体进行批量筛选,从而产生大量数据来检测种群和处理中发生的突变与分化;(5)对环境诱导的 DNA 甲基化变异检测灵敏度高。因此,尽管 MSAP 在结果推理上具有一定的局限性,但仍具有非常大的潜力。

3 MSAP 在生态学上的应用

文献检索得知,近 12 年来在生态学领域共发表 MSAP 论文 200 多篇(图 1),该领域的论文数量总体上呈逐年增加的趋势,在 2014 年达到峰值(35 篇)。值得注意的是,近年来除植物以外的以其他物种作为研究对象的论文数量也在不断增加,如家麻雀 *Passer domesticus* (L.) (Schrey *et al.*, 2012)、鲁考弗美奇酵母菌 *Metschnikowia reukaufii* (Pitt & M. W. Mill) (Herrera *et al.*, 2012)、叶鼻蝠 *Hipposideros armiger* (Hodgson) (Liu *et al.*, 2012)等,表明 MSAP 技术的应用领域正不断扩大。

3.1 MSAP 与抗逆性研究

生物体在逆境条件下(如啃食、低温、盐、金属离子等),其 DNA 甲基化的水平和模式均会发生改变。Herrera & Bazaga (2011)以紫罗兰 *Viosa cazorlensis* (Gand.) 野生种群为对象,利用 AFLP 和 MSAP 技术研究取食对自然种群的遗传和表观遗传特征的影响。发现个体中的 DNA 甲基化存在显著差异,并与啃食程度相关;有些甲基化位点上的差异与特殊的 AFLP 标记相关。该研究揭示了 MSAP 分析针对某一特定外界刺激的必要性。Xin *et al.* (2015)研究发现,低温处理 48 h 后,马铃薯胞嘧啶甲基化水平从 37.71% 增加到 56.51%,其甲基化模式的变化主要来自双链 DNA 上 CG 的全甲基化;通过 78 个多态性 DNA 片段测序及半定量 PCR 检测,发现与冷应激相关的基因可以通过甲基化或半甲基化状态的变化进行调节。Zeng *et al.* (2015)对水曲柳 *Fraxinus mandschurica* Rupr.、绒毛白蜡 *Fraxinus velutina* Torr 及其杂交的 F_1 代间的甲基化水平与模式进行了分析。结果表明:杂交 F_1 代幼苗具有较好的耐盐性和生长优势,但其 DNA 甲基化模式变为外部胞嘧啶甲基化(7.34%)。这提示了耐盐性与 DNA 甲基化改变相关。Chen *et al.* (2015)

检测了拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) 幼苗在不同 Cu 浓度处理下,甲基化敏感扩增多态性的变化。结果发现:在 0.25 与 1.0 mg · L⁻¹ Cu 处理下,幼苗的根生长率和鲜重没有发生显著变化,但其 MSAP 率先增高,然后再随着 Cu 离子浓度的增高而降低。MSAP 对低浓度 Cu 离子应激较为敏感,可用作 Cu 污染的早期诊断和生态安全评估。另外,鲁考弗美奇酵母处于外界不同环境时,其 DNA 甲基化模式也发生相应变化 (Herrera *et al.*, 2012)。花蜜糖分的组成、浓度和它们之间的相互

作用能显著影响 MSAP 位点从非甲基化到甲基化转变的概率;用甲基化抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-AZA)处理后,鲁考弗美奇酵母群落的生长被显著抑制;DNA 甲基化模式的变化与鲁考弗美奇酵母从不同生境中获取资源的能力密切相关,且呈正相关关系。

由此可见,MSAP 能够很好地检测到逆境条件下生物体的 DNA 甲基化水平和模式变化,从而为研究其逆境相关基因的表达调控奠定较好的基础。

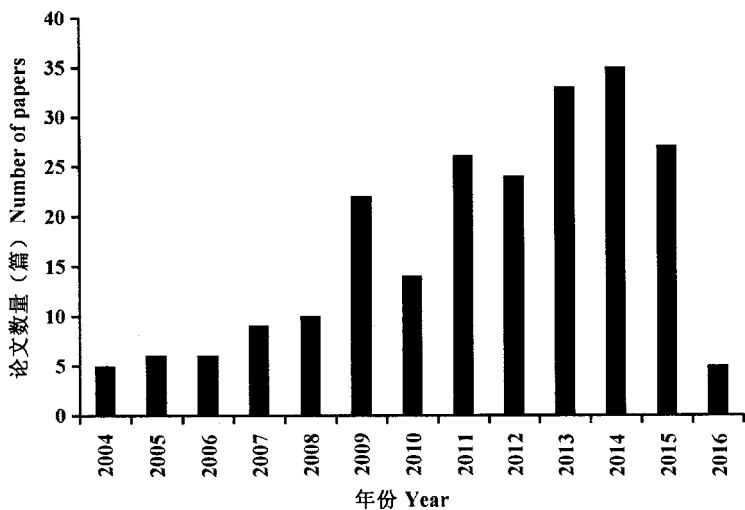


图 1 2004—2016 年生态学领域发表的关于 MSAP 的论文数量
Fig.1 The number of papers on application of MSAP in ecology from 2004 to 2016

3.2 MSAP 与遗传多样性研究

MSAP 是以 AFLP 技术为基础发展而来的。AFLP 作为一种常用的分子标记方法,已大量应用于种质资源多样性、遗传图谱构建及基因定位等研究。因此,MSAP 也可应用于遗传多样性方面的研究。Massicotte *et al.* (2011)利用 MSAP 技术研究全雌性克隆鱼 *Chrosomus eos-neogaeus* 的种群表观遗传变异。该研究分离出了 15 个 MSAP 候选位点,并对其进行了亚硫酸氢钠测序,以鉴定 DNA 甲基化差异的确切位点。其中 4 个候选位点不能被识别,至少有 11 个位点被推测与斑马鱼 *Brachydanio rerio* 基因组存在一定的相似性。此外,测序表明,在相邻位置有额外的 DNA 甲基化变异,有些位点则总是被甲基化或总是非甲基化。Roy *et al.* (2015)对 3 种玉米品种进行了遗传多样性分析,揭示出品种分化不仅与遗传变异有关,而且与表观遗传变异相关。Guarino *et al.* (2015)对撒丁岛上的杨树进行了遗传多样性分析,发现杨树的遗传多样

性水平十分有限,然而其表观遗传变异水平较高,环境条件显著影响了链内胞嘧啶的半甲基化。不同地理分布的相同克隆分株,其甲基化不一样。该研究表明,植物的多样性不应局限于遗传方面,而应考虑表观遗传差异性(特别是在无性繁殖情况下)。洪柳和邓秀新(2005)对 24 个脐橙品种的胞嘧啶甲基化模式和程度进行了评估。结果表明:脐橙基因组的 CCGG 序列中检测到 4.7%~15.0%的 DNA 发生甲基化;18 对扩增引物中有 10 对显示具有多态性,总共得到 639 条带,其中 43 条带为甲基化多态性带,平均甲基化多态性(P)比率达 6.7%。DNA 甲基化在脐橙中发生频繁且品种之间的甲基化模式存在较大差异,脐橙 CCGG 序列中胞嘧啶甲基化外部(15.0%)多于内部(4.7%)。

以上研究均在不同程度上证明了 DNA 甲基化是自然种群随机变异的重要来源之一,而 MSAP 技术则是 DNA 甲基化多态性的重要定量方法。

3.3 MSAP 在入侵生物上的应用

入侵植物日本虎杖 *Fallopia japonica* (Houtt.) 是研究物种对新环境适应的表观遗传的重要研究材料。日本虎杖能够入侵到不同的生境,并且其大多数性状在种群内和种群间具有显著差异,但其遗传多样性非常低。利用 AFLP 和 MSAP 分子标记, Richards *et al.* (2012b) 研究了日本虎杖对新生境(沙滩、盐沼、路边)响应的差异及与其表观遗传差异性之间的相关性。结果显示:在 200 个 AFLP 位点中,只检测到 4 个位点具有多态性,同时检测到 8 个单倍型,但样本之间存在较大的表观遗传差异。180 个 MSAP 位点中,19 个多态性位点产生了 128 个表观基因型,并且有些表观遗传位点因生境条件而产生变异。水花生 *Aiternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. 是一种能够水陆两生的外来入侵植物,不同生境的水花生表现出不同的表型,然而其遗传变异却非常低。Gao *et al.* (2010) 通过 MSAP 分析不同来源地的水花生的遗传变异和表观遗传变异,研究发现:78.2% 的甲基化变化与不同水源相关,说明表观遗传调节系统具有敏感的环境性和灵活性,从而从分子水平上描述了水花生入侵不同生境的机理。因此,MSAP 在解释外来入侵生物在短时间内入侵新生境的分子机制上具有重要作用。

4 MSAP 的局限性

MSAP 技术有 2 个局限 (Schrey *et al.*, 2013): (1) 当用 *Msp* I 和 *Hpa* II 酶不能切割 (Salmon *et al.*, 2008) 时,试验所观察到的条带模式均可由遗传原因(限制性位点的突变、邻近限制性位点发生变化)和表观遗传原因(超甲基化、限制位点所有胞嘧啶甲基化)产生,致使一些甲基化状态被遗漏;(2) AFLP 型条带模式的记分方法有待进一步商榷,由于 PCR 的差异导致实验室之间很难达成统一标准,且每个样本都必须进行 2 个反应之间的比较,因此在某些情况下, *Msp* I 和 *Hpa* II 酶切反应间的不同可能是由限制性酶切不一致或 PCR 反应的差异造成,而并不是因为甲基化差异性所致。

另外,MSAP 只能通过产生的不同片段长度来推断基因组范围内的表观遗传变异,每个位点的相邻序列未知。因此只能借助提取和片段序列测序,在数据库中确定其同源序列 (Massicotte *et al.*, 2011;

Salmon *et al.*, 2005)。此外,MSAP 不能区分杂合体之间的表观遗传差异性。

5 MSAP 的未来发展

由于 MSAP 技术存在的局限性,在未来的研究中应注意以下问题。第一,同时收集遗传多样性和 DNA 甲基化多态性数据。这些数据对于了解生物体对环境应答反应过程中所表现的遗传因素与基因遗传因素之间的相互作用非常重要 (Herrera & Bazaga, 2011; Richards *et al.*, 2012b)。第二,同时使用 MSAP 以外的技术来确定甲基化靶标,可显著增加试验结果的可靠性。抽提 MSAP 条带进行测序和亚硫酸氢盐测序 (Massicotte *et al.*, 2011) 都将解决 MSAP 技术局限性的第一步。随着新一代测序技术的发展,下一代测序技术已经应用到表观生态学上 (Platt *et al.*, 2015; Robertson & Richards, 2015)。第三,如果必要,可使用如 5-氮胞苷等药物进行试验性甲基化抑制,以更好地获得 DNA 甲基化对表型影响的研究结果 (Bossdorf, 2010; Herrera *et al.*, 2012)。第四,把同质园试验加入到自然变异研究中 (Richards *et al.*, 2012b),同时实验室内应统一处理样本 (Herrera *et al.*, 2012)、调查外来入侵物种 (Richards *et al.*, 2012b)、明晰环境刺激因子 (Herrera & Bazaga, 2011) 和区分生境条件 (Herrera *et al.*, 2012; Richards *et al.*, 2012b) 等。

此外,许多研究表明:表观遗传学机制是种群入侵新生境在生境范围内扩增的重要机理 (Chwedorzewska & Bednarek, 2012; Richards *et al.*, 2012b; Schrey *et al.*, 2012)。DNA 甲基化将在生物种群响应和快速适应全球气候变化引发的环境变化过程中发挥越来越重要的作用。其对环境响应、全球变化及人类健康等一系列生物学问题均有较好的启示作用。通过分析多个种群在一系列环境下的差异,MSAP 技术能够辨别出对环境变化具有最大调节能力的特异种群(或物种)。这将告诉我们哪个种群因缺少必要的多样性而处于下降危险中。而这些问题最终都归结为基因型如何转换为表型的解密。MSAP 技术能够用于目标特异性技术之间的联合,从而解析 DNA 甲基化在个体应对环境变化中的作用。

参考文献

- 洪柳, 邓秀新, 2005. 应用 MSAP 技术对脐橙品种进行 DNA 甲基化分析. *中国农业科学*, 38(11): 2301–2307.
- Angers B, Castonguay E and Massicotte R, 2010. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Molecular Ecology*, 19(7): 1283–1295.
- Bossdorf O, Arcuri D, Richards C L and Pigliucci M, 2010. Experimental alteration of DNA methylation affects the phenotypic plasticity of ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. *Evolutionary Ecology*, 24(3): 541–553.
- Bossdorf O, Richards C L and Pigliucci M, 2008. Epigenetics for ecologists. *Ecology Letters*, 11(2): 106–115.
- Chen R J, He L, Sun L Z, Wang H T, Song J and Liu W, 2015. Effects of copper stress on the growth and genomic DNA methylation of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Chinese Journal of Ecology*, 34(9): 2650–2657.
- Chwedorzewska K J and Bednarek P T, 2012. Genetic and epigenetic variation in a cosmopolitan grass *Poa annua* from Antarctic and Polish populations. *Polish Polar Research*, 33(1): 63–80.
- Cubas P, Vincent C and Coen E, 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature*, 401: 157–161.
- Gao L X, Geng Y P, Li B, Chen J K and Yang J, 2010. Genome-wide DNA methylation alterations of *Alternanthera philoxeroides* in natural and manipulated habitats: implications for epigenetic regulation of rapid responses to environmental fluctuation and phenotypic variation. *Plant, Cell and Environment*, 33(11): 1820–1827.
- Guarino F, Cicatelli A, Brundu G, Heinze B and Castiglione S, 2015. Epigenetic diversity of clonal white poplar (*Populus alba* L.) populations: could methylation support the success of vegetative reproduction strategy? *PLoS ONE*, 10(7): e0131480.
- Herrera C M and Bazaga P, 2010. Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet *Viola cazorlensis*. *New Phytologist*, 187(3): 867–876.
- Herrera C M and Bazaga P, 2011. Untangling individual variation in natural populations: ecological, genetic and epigenetic correlates of long-term inequality in herbivory. *Molecular Ecology*, 20(8): 1675–1688.
- Herrera C M, Pozo M I and Bazaga P, 2012. Jack of all nec-tars, master of most: DNA methylation and the epigenetic basis of niche width in a flower-living yeast. *Molecular Ecology*, 21(11): 2602–2616.
- Jablonka E and Lamb M J, 2006. The evolution of information in the major transitions. *Journal of Theoretical Biology*, 239(2): 236–246.
- Jablonka E and Raz G, 2009. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *The Quarterly Review of Biology*, 84(2): 131–176.
- Johannes F, Porcher E, Teixeira F K, Saliba-Colombani V, Simon M, Agier N, Bulski A, Albuissou J, Heredia F, Audigier P, Bouchez D, Dillmann C, Guerche P, Hospital F and Colot V, 2009. Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. *PLoS Genetics*, 5(6): e1000530.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S and Maleszka R, 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319: 1827–1830.
- Liu S, Sun K P, Jiang T L, Ho J P, Liu B and Feng J, 2012. Natural epigenetic variation in the female great roundleaf bat (*Hipposideros armiger*) populations. *Molecular Genetics and Genomics*, 287(8): 643–650.
- Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y G, Thompson A J, King G J, Giovannoni J J and Seymour G B, 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics*, 38(8): 948–952.
- Martin L B, Liebl A L, Trotter J H, Richards C L, McCoy K and McCoy M W, 2011. Integrator networks: illuminating the black box linking genotype and phenotype. *Integrative and Comparative Biology*, 51(4): 514–527.
- Massicotte R and Angers B, 2012. General-purpose genotype or how epigenetics extend the flexibility of a genotype. *Genetics Research International*, ID 317175.
- Massicotte R, Whitelaw E and Angers B, 2011. DNA methylation: a source of random variation in natural populations. *Epigenetics*, 6(4): 421–427.
- McClelland M, Nelson M and Raschke E, 1994. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, 22(17): 3640–3659.
- Morgan H D, Sutherland H G E, Martin D I K and Whitelaw E, 1999. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature Genetics*, 23(3): 314–318.
- Pigliucci M, 2010. Genotype-phenotype mapping and the end of the ‘genes as blueprint’ metaphor. *Philosophical Transactions*

- of the Royal Society B: Biological Sciences, 365: 557–566.
- Platt A, Gugger P F, Pellegrini M and Sork V L, 2015. Genome-wide signature of local adaptation linked to variable CpG methylation in oak populations. *Molecular Ecology*, 24 (15): 3823–3830.
- Rakyan V K, Chong S, Champ M E, Cuthbert P C, Morgan H D, Luu K V K and Whitelaw E, 2003. Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine *Axin^{Fu}* allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5): 2538–2543.
- Reyna-López E G, Simpson J and Ruiz-Herrera J, 1997. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Molecular and General Genetics*, 253 (6): 703–710.
- Richards C L, Bossdorf O and Verhoeven K J F, 2010. Understanding natural epigenetic variation. *New Phytologist*, 187 (3): 562–564.
- Richards C L, Hanzawa Y, Katari M S, Ehrenreich I M, Engelman K E and Purugganan M D, 2009. Perspectives on ecological and evolutionary systems biology // Coruzzi G M and Gutiérrez R A. *Annual Plant Reviews Volume 35: Plant Systems Biology*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell: 331–349.
- Richards C L, Rosas U, Banta J, Bhambhani N and Purugganan M D, 2012a. Genome-wide patterns of *Arabidopsis* gene expression in nature. *PLoS Genetics*, 8(4): e1002662.
- Richards C L, Schrey A W and Pigliucci M, 2012b. Invasion of diverse habitats by few Japanese knotweed genotypes is correlated with epigenetic differentiation. *Ecology Letters*, 15(9): 1016–1025.
- Richards C L, Walls R L, Bailey J P, Parameswaran R, George T and Pigliucci M, 2008. Plasticity in salt tolerance traits allows for invasion of novel habitat by Japanese knotweed s. l. (*Fallopia japonica* and *F. ×bohemica*, Polygonaceae). *American Journal of Botany*, 95(8): 931–942.
- Richards E J, 2006. Inherited epigenetic variation — revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 7(5): 395–401.
- Roberts R J, Vincze T, Posfai J and Macelis D, 2007. REBASE — enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Research*, 35: D269–D270.
- Robertson M and Richards C, 2015. Opportunities and challenges of next-generation sequencing applications in ecological epigenetics. *Molecular Ecology*, 24(15): 3799–3801.
- Roy N, Choi J Y, Lim M J, Lee S I, Choi H J and Kim N S, 2015. Genetic and epigenetic diversity among dent, waxy, and sweet corns. *Genes & Genomics*, 37(10): 865–874.
- Salmon A, Ainouche M L and Wendel J F, 2005. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology*, 14(4): 1163–1175.
- Salmon A, Cloutault J, Jenczewski E, Chable V and Manzanares-Dauleux M J, 2008. *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Science*, 174 (1): 61–70.
- Schrey A W, Alvarez M, Foust C M, Kilvitis H J, Lee J D, Liebl A L, Martin L B, Richards C L and Robertson M, 2013. Ecological epigenetics: beyond MS-AFLP. *Integrative and Comparative Biology*, 53(2): 340–350.
- Schrey A W, Coon C A C, Grispo M T, Awad M, Imboma T, McCoy E D, Mushinsky H R, Richards C L and Martin L B, 2012. Epigenetic variation may compensate for decreased genetic variation with introductions: a case study using house sparrows (*Passer domesticus*) on two continents. *Genetics Research International*, ID 979751.
- Verhoeven K J F, Jansen J J, van Dijk P J and Biere A, 2010. Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. *New Phytologist*, 185(4): 1108–1118.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21): 4407–4414.
- Xin C H, Hou R K, Wu F, Zhao Y B, Xiao H H, Si W T, Ali M E, Cai L and Guo J B, 2015. Analysis of cytosine methylation status in potato by methylation-sensitive amplified polymorphisms under low-temperature stress. *Journal of Plant Biology*, 58(6): 383–390.
- Zeng F S, Li L L, Liang N S, Wang X, Li X and Zhan Y G, 2015. Salt tolerance and alterations in cytosine methylation in the interspecific hybrids of *Fraxinus velutina* and *Fraxinus mandshurica*. *Euphytica*, 205(3): 721–737.

(责任编辑:郭莹)