

人工老化玉米种子活力指标、生理指标与基因组DNA甲基化变异的研究

李春雷¹, 路明¹, 刘文国¹, 岳尧海¹, 祁新²

(1. 吉林省农业科学院, 吉林 公主岭 136100; 2. 吉林农业大学农学院, 长春 130118)

摘要: 以玉米单交种郑单958和先玉335为试验材料, 采用老化箱加速种子老化。随着种子老化时间的延长, 郑单958和先玉335种子的发芽率、发芽指数、活力指数逐渐降低, 老化至8 d, 种子活力指标降至极低的水平。过氧化物酶、过氧化氢酶活力逐渐降低, 电导率、丙二醛含量逐渐升高。MSAP分子标记扩增出2 750条有效峰值, 随老化时间的延长, 郑单958的CG甲基化水平呈现出逐渐降低的趋势, 先玉335的CG甲基化水平逐渐升高。基因组DNA的CHG与CHG+CG甲基化水平变化不规律, 郑单958基因组DNA的CHG和CG+CHG甲基化均高于对照, 先玉335基因组DNA的CHG甲基化均低于对照。郑单958和先玉335的DNA发生甲基化模式变异, 郑单958 DNA的CG去甲基化模式变异高于超甲基化, 先玉335 DNA的CG去甲基化模式变异低于超甲基化。相关性分析表明, 种子的活力指标、生理指标与基因组DNA的CG甲基化相关系数较高。

关键词: 玉米; 种子活力; 生理指标; DNA甲基化

中图分类号: S513.01

文献标识码: A

Analysis of Artificial Aging Maize Seed Vigor and Physiological Index Related to Genome DNA Methylation Variation

LI Chun-lei¹, LU Ming¹, LIU Wen-guo¹, YUE Rao-hai¹, QI Xin²

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100;

2. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Seeds of two hybrid cultivars Zhengdan958 and Xianyu335 were artificially aged by artificial aging chamber. Germination rate, vigor index, germination index were reduced gradually along the seed aging. Seeds of two hybrid cultivar germination rate, vigor index and germination index were dropped to the extremely low level when aged eight days. Peroxidase activities, catalase activities of Zhengdan958 and Xianyu335 reduced gradually while malonaldehyde content and conductance raised gradually. The 2 750 amplified effective peak value by MSAP biomarker showed that Zhengdan958 CG methylation level reduced gradually followed seed aging. While the CG methylation level of Xianyu335 got higher gradually. Seeds genome DNA CHG and CG+CHG methylation level changed have no regulation. Zhengdan958 genome DNA CHG and CG+CHG methylation were higher than contrast. Xianyu335 genome DNA CHG methylation was lower than contrast. Zhengdan958 and Xianyu335 DNA occurred methylation mode variation. Zhengdan958 genome DNA CG hypo mode variation was higher than hyper. While Xianyu335 DNA CG hyper mode variation was lower than hyper. The correlation analysis of seed vigor index with DNA methylation level showed that seed vigor indexes and Physiological indexes have a higher correlation with DNA CG methylation level.

Key words: Maize; Seed vigor; Physiological index; DNA methylation

收稿日期: 2014-09-01

作者简介: 李春雷(1986-), 男, 硕士, 从事玉米遗传育种工作。

E-mail: 418558174@qq.com

祁新和刘文国为本文通讯作者。

种子活力是个抽象、复杂而综合的概念, 表现在发芽率、出苗率、成苗率、畸形苗率、鲜物质量、干物质量、抗逆境能力等方面, 这些性状是多基因控制的数量性状。数量性状的表达往往受环境条件的影响, 并不同程度地表现出基因型与环境之间的互作^[1]。

种子老化造成的基因突变可能引起种质的遗传变异和漂变,从而丧失种质遗传的完整性^[2]。研究人工老化种子活力多是从经典遗传学角度来分析,经典遗传学不能解释逆境胁迫产生的变异是可遗传的^[3]。分析种子的活力常采用的分子标记有 RAPD、SSR、ISSR、AFLP^[4~9],这些分析标记都是基于 DNA 序列建立的,但在逆境胁迫下,种子 DNA 序列发生经典遗传学和表观遗传学变异。因此,从表观遗传学角度分析老化种子的活力具有深远意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

玉米杂交种郑单 958 和先玉 335,由吉林农业大学农学院提供。

1.2 试验方法

1.2.1 人工加速玉米种子老化

采用 LH-150S 型种子老化箱对玉米种子进行老化处理,老化处理前对老化箱采用 75%的乙醇喷雾消毒,1%的 NaClO 对种子浸泡 3 min 处理。老化处理温度为 50℃、相对湿度为 95%条件下处理 2、4、6、8 d,每隔 2 d 分别从老化箱内取出 500 粒老化的郑单 958 和先玉 335 玉米种子,以未老化处理的种子作为对照。

1.2.2 种子生理指标的测定

参照标准发芽试验,取 50 粒种子放入发芽盒,置于恒温 28℃人工气候箱内,每天光照 12 h 并记录发芽情况,第 7 天计算发芽率、发芽指数、活力指数。发芽率(GR)=G7/N×100%,发芽指数(GI)=∑(Gt/

Dt),活力指数(VI)=GI×S,G7:发芽 7 d 的总发芽数;N:供试种子总数;Gt:发芽开始后第 t 天的发芽数;Dt:相应的发芽天数;S:平均根长^[10]。

1.2.3 种子生理指标的测定

丙二醛含量、电导率值、过氧化物酶活力、过氧化氢酶活力的测定,参照张治安等^[11]植物生理学实验。预先将各处理种子在室温条件下用蒸馏水浸泡 24 h,采用 DDBJ-350 型电导率仪测定并计算种子外渗液电导率值,采用 TBA 比色法测定种子丙二醛含量,采用愈创木酚法测定种子过氧化物酶含量,采用紫外吸收法测定种子过氧化氢酶含量。所有指标的测定均重复 3 次,最终结果取平均值。

1.2.4 基因组总 DNA 的提取与检测

将老化玉米种子播在装有蛭石的营养钵内,定期浇灌无菌水,在 3 叶期选取有代表性的幼苗,取新鲜的叶片 0.2 g,采用改良 CTAB 法^[12]提取玉米叶片总 DNA,采用 Nanodrop 2000 测量 DNA 浓度,将 DNA 稀释成 30 ng/μL,置于-20℃冰箱中保存备用。

1.2.5 MSAP 分子标记分析

MSAP 包括以下几个步骤^[13]:酶切与连接、预扩增、选择性扩增、高效毛细管电泳、数据分析。采用限制性酶切组合 EcoRI/Hpa II:150 ng DNA,37℃进行酶切 120 min,8℃连接 5 h。EcoRI/Msp I:150 ng DNA,37℃进行酶切 340 min,8℃连接 5 h。酶切、预扩增与选扩增的体系为 20 uL,采用 1%的琼脂糖凝胶进行检测电泳条带。采用的接头、预扩增引物及选择性扩增引物见表 1。采用毛细管为分离通道,高压电场为驱动力的电泳分离分析法进行电泳。

表 1 MSAP 所用接头和引物序列
Table 1 Sequences of adaptors and primers for MSAP analysis

项 目 Item	接头/引物 Adapter /primer	序 列 Sequence
Adapters	EcoRI-adaptor I	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	EcoRI-adaptor II	5'-AATTGGTACGCAGTC-3'
	H/M-adaptor I	5'-GATCATGAGTCCTGCT-3'
	H/M-adaptor II	5'-CGAGCAGGACTCATGA-3'
Pre-selectiive primers	EcoRI+A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
	H/M+0	5'-ATCATGAGCCTGCTCGG-3'
Selective primers	H/M+3Primers sequence EcoRI Primers	A. 5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTCT-3'
		B. 5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTTCG-3'
		C. 5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTTG-3'
		D. 5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTGA-3'
		E. 5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTGC-3'
		F. 5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTAC-3'
		a. 5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
		b. 5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
		c. 5'-GACTGCGTACCAATTCAACA-3'

1.2.6 数据处理与分析

所有活力指标、生理指标、基因组DNA的CG、CHG和CG+CHG的甲基化水平数据采用Excel软件对数据进行统计分析。根据高效毛细管电泳技术(HPCE)测定HpaⅡ和MspⅠ酶切的电泳长度和丰度,测得有效值记为1,无效值记为0。甲基化敏感多态性包括(0、1)和(1、0),若EcoRI/HpaⅡ酶切位点无效,EcoRI/MspⅠ酶切位点有效,记为CG(0、1),表示该位点发生了内侧全甲基化;若EcoRI/HpaⅡ酶切位点有效,EcoRI/MspⅠ酶切位点无效,记为CHG(1、0),表示该位点发生了单链外侧甲基化。采用DPS 3.01统计软件对种子活力指标、生理指标与DNA甲基化水平进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 人工老化处理对玉米种子活力指标、生理指标的影响

不同老化时间处理的郑单958和先玉335的种子活力指标如表2所示。随着种子老化时间的延长,种子的发芽率、发芽指数、活力指数、根长均呈

显著下降趋势。郑单958发芽率、发芽指数高于先玉335,但先玉335的活力指数高于郑单958。玉米种子老化2 d的活力指标维持在较高水平,老化4、6、8 d的种子活力明显下降,老化至8 d,种子发芽率、发芽指数、活力指数均降至极低的水平。随着老化时间的延长,郑单958和先玉335种子电导率、丙二醛含量呈现升高趋势,过氧化物酶活力、过氧化氢酶活力呈下降的趋势。老化至2 d,种子的生理指标下降趋势不明显,老化至6、8 d时的先玉335电导率上升速度加快,明显超过郑单958。老化至8 d时,电导率和丙二醛含量均升到最高值,种子的丙二醛含量是对照的2.7和2.0倍。与对照相比,老化至8 d的种子过氧化物酶和过氧化氢酶活力显著降低,先玉335过氧化物酶活力降低了91%,郑单958酶活力降低了90%。先玉335过氧化氢酶活力降低了82%,郑单958过氧化氢酶活力降低了76%。老化处理的郑单958脱氢酶活性高于同时期的先玉335,先玉335在老化4 d时脱氢酶活力变化幅度较大,而郑单958在老化6 d时脱氢酶活力变化幅度较大。

表2 人工老化玉米种子活力指标、生理指标的测定结果
Table 2 Determination of artificial aging maize seed vigor indexes

品 种 Variety	老化时间 (d) Aging time	发芽率 (%) GR	发芽指数 GI	活力指数 VI	电导率 [μS/(cm·g·mL)] Conductance	丙二醛 (μmol/g) Malonaldehyde	过氧化物酶 [u/(g·min)] Peroxidase	过氧化氢酶 (u/g) Catalase
郑单958	0	88.7	31.4	385.3	0.44	0.35	464.12	314.21
	2	67.3	25.5	301.7	0.47	0.38	413.58	307.36
	4	25.3	8.4	74.4	0.58	0.48	272.46	264.95
	6	8.6	1.7	9.5	0.59	0.82	204.35	109.54
	8	1.3	0.2	0.5	0.74	0.92	45.25	76.37
先玉335	0	83.3	30.5	507.5	0.41	0.43	401.37	264.23
	2	62.6	25.3	402.5	0.43	0.44	386.43	254.38
	4	27.3	7.8	89.7	0.54	0.65	297.95	154.45
	6	7.3	1.1	8.4	0.76	0.79	103.34	134.12
	8	0.7	0.1	0.2	0.84	0.88	36.56	48.45

2.2 人工老化处理对玉米种子DNA甲基化水平的影响

不同老化时间玉米种子的DNA甲基化水平如表3所示。对扩增的2 750条有效丰值进行统计分析,老化玉米种子DNA甲基化水平发生不同程度的变化。郑单958的CG甲基化水平变化从15.64%到12.80%,与对照对比,随着老化程度的增加,郑单958的CG甲基化水平呈现出降低的趋势,老化8 d时,CG甲基化显著下降。先玉335的CG甲基化水平从10.95%到16.95%,呈现逐渐升高趋势,与郑单958

相反。郑单958和先玉335的CHG甲基化水平变化没有一定的规律,但经老化处理的郑单958的CHG均高于对照,老化处理的先玉335的CHG均低于对照。郑单958和先玉335的CG+CHG甲基化水平变化没有一定的规律性,郑单958的CG+CHG甲基化水平从28.76%到32.58%,先玉335的CG+CHG甲基化水平从24.11%到33.31%,郑单958和先玉335经老化处理,CG+CHG的甲基化水平呈升高的趋势(先玉335老化至2 d除外)。

表3 人工老化玉米种子DNA甲基化水平
Table 3 DNA methylation level of artificial aging seeding

品种 Variety	老化时间(d) Aging time	CG甲基化(%) CG methylation	CHG甲基化(%) CHG methylation	CG+CHG甲基化(%) CG+CHG methylation
郑单958	0	15.64	13.13	28.76
	2	15.56	17.02	32.58
	4	15.67	15.64	31.31
	6	15.27	13.71	28.98
	8	12.80	18.58	31.38
先玉335	0	10.95	17.27	28.22
	2	11.75	12.36	24.11
	4	15.35	14.25	29.60
	6	16.40	15.13	31.53
	8	16.95	16.36	33.31

注:CG甲基化为CCGG内侧全甲基化(双链CmCGG),CHG甲基化为CCGG外侧单甲基化(单链mCCGG)。
Note: CG methylation represent CCGG Full methylation(5'CmCGG in double strands), CHG methylation represent CCGG methylation(5'mCCGG single strand).

2.3 人工老化玉米种子DNA甲基化的变异模式

CG超甲基化为CG位点升高,CG去甲基化为CG位点降低;CHG超甲基化为CHG位点升高,CHG去甲基化为CHG位点降低。不同老化时间玉米种子的DNA甲基化变异模式如表4所示。郑单958和先玉335 DNA的CG和CHG位点均产生了不同程度甲基化的变异模式。与对照相比,老化处理的郑单958 CG超甲基化变异频率是6.65%~8.76%,CG去甲基化模式变异频率是10.36%~12.44%;CHG超甲基化模式变异频率是7.75%~12.33%,CHG去甲基化模式变异频率是8.15%~9.53%。先玉335

经老化处理CG超甲基化模式变异频率是7.49%~10.91%,CG去甲基化模式变异频率是6.69%~8.73%;CHG超甲基化变异频率是5.82%~7.05%,CHG去甲基化变异频率是8.58%~12.04%。随着老化时间的延长,先玉335 DNA的CHG甲基化变异模式增加。郑单958 DNA的CG去甲基化变异模式高于超甲基化;先玉335 DNA的CG超甲基化变异模式高于去甲基化,CHG的超甲基化变异模式低于去甲基化。郑单958 CG超甲基化变异模式低于先玉335,而CG去甲基化变异模式高于先玉335。

表4 人工老化玉米种子DNA甲基化变异模式
Table 4 DNA methylation variation model of artificial aging seeding %

甲基化水平 Methylation level	老化时间(d) Aging time							
	郑单958				先玉335			
	2 d	4 d	6 d	8 d	2 d	4 d	6 d	8 d
CG超甲基化	6.65	8.76	8.29	6.98	10.58	8.80	10.91	7.49
CG去甲基化	11.71	12.44	10.36	11.56	6.69	6.95	8.73	7.09
CHG超甲基化	9.20	10.04	7.75	12.33	6.07	5.82	7.05	6.22
CHG去甲基化	9.20	9.53	8.44	8.15	8.58	10.65	11.27	12.04
CG+CHG超甲基化	1.20	1.02	0.65	1.67	1.42	1.02	1.64	1.31
CG+CHG去甲基化	1.13	1.42	1.31	1.24	1.93	1.24	1.45	0.98

2.4 DNA甲基化水平与种子活力指标、生理指标的相关性分析

老化玉米种子活力指标、生理指标与DNA的CG、CHG、CG+CHG甲基化水平相关性分析如表5所示。郑单958和先玉335种子活力指标与CG甲基

化相关性较高,先玉335种子活力与CG甲基化相关系数达到极显著负相关,发芽指数、活力指数与CG甲基化相关系数为1;郑单958种子的活力与CG甲基化的相关系数呈正相关,但不显著。郑单958和先玉335种子的活力指标与CHG甲基化水平相关性较

低,郑单 958 种子活力与 CG+CHG 的相关性较低;先玉 335 种子的活力与 CG+CHG 的相关性较高,与发芽指数相关系数达到显著水平。郑单 958 和先玉 335 DNA 的 CG 甲基化与生理指标相关性较高,达到显著或极显著水平(郑单 958 丙二醛除外),郑单 958 DNA 的 CG 甲基化与电导率、丙二醛呈负相关,与过氧化物酶过氧化氢酶呈正相关;先玉 335 DNA 的 CG 甲基化与电导率、丙二醛呈正相关,与过

氧化物酶过氧化氢酶呈负相关。郑单 958 和先玉 335 DNA 的 CHG 甲基化与玉米种子活力指标、生理指标相关性较低。郑单 958 DNA CG+CHG 甲基化与生理指标相关性较低,先玉 335 DNA CG+CHG 甲基化与生理指标相关性较高,均达到显著水平,与丙二醛相关系数为 0.9,与过氧化物酶活力相关系数为-0.88。

表5 人工老化玉米种子活力指标、生理指标与 DNA 甲基化的相关分析
Table 5 Correlation analysis of artificial aging maize seed vigor and DNA methylation level

品 种	甲基化水平	发芽率	发芽指数	活力指数	电导率	丙二醛	过氧化物酶	过氧化氢酶
Variety	Methylation level	GR	GI	VI	Conductance	Malonaldehyde	Peroxidase	Catalase
郑单 958	CG 甲基化	0.6	0.58	0.54	-0.87*	-0.78	0.83*	0.76
	CHG 甲基化	-0.4	-0.35	-0.34	0.6	0.36	-0.54	-0.32
	CG+CHG 甲基化	-0.1	-0.04	-0.06	0.18	-0.09	-0.13	0.13
先玉 335	CG 甲基化	-0.99**	-1.00**	-1.00**	0.92**	0.98**	-0.92*	-0.96**
	CHG 甲基	-0.03	-0.07	-0.03	0.28	0.24	-0.28	-0.24
	CG+CHG 甲基化	-0.79	-0.82*	-0.8	0.87*	0.90*	-0.87*	-0.88*

注: *为 $P<0.05$; **为 $P<0.01$ 。
Note: *, $P<0.05$; **, $P<0.01$.

3 结论与讨论

种子在人工高温、高湿的条件下发生剧烈的氧化作用,伴随着种子活力的降低,生理生化指标、内涵物质发生改变。刘月辉^[14]认为,种子的发芽势、发芽率、活力指数和发芽指数是反映种子活力变化较为可靠的指标。王鹤冰^[15]认为,种子的活力指数是表示种子活力大小最有效的指标。本研究认为,虽然郑单 958 的发芽率和发芽指数略高于先玉 335,但先玉 335 种子的活力指数明显高于郑单 958,单从活力指标可以初步的判断种子活力的高低,研究种子的活力应该从多角度来分析。

随着老化程度的加深,郑单 958 与先玉 335 种子的电导率值、丙二醛含量、过氧化物酶活力、过氧化氢酶活力的变化趋势一致,与张加强^[16]的观点相同。种子膜透性的变化导致种子电导率的变化,人工老化处理玉米种子的电导率增加,可以认为种子的膜透性发生明显的变化。从 老化玉米种子的电导率值可以看出,郑单 958 和先玉 335 种子膜透性均发生明显的变化。丙二醛是膜质发生氧化作用的产物,人工老化处理导致种子的丙二醛含量明显增加,老化过程中种子膜质发生过强烈的氧化作用。过氧化氢酶可以清除体内的 H_2O_2 ,从而降低外界环境对生物体本身的损伤。人工老化玉米种子的过氧化氢

酶活力降低,导致种子的抗逆境能力降低。研究人工老化玉米种子的活力多是从经典遗传学分析的。那潼^[17]的研究认为,老化种子过程中 DNA 发生不同程度的损伤。刘海英^[18]采用 SSR 分子标记和 QTL 定位,对玉米种子活力降低的相关性状进行 QTL 定位。马平安^[19]采用半定量 RT-PCR 技术对老化玉米种子 GA20x、 α -淀粉酶基因的表达进行检测,认为老化种子的 GA20x、 α -淀粉酶基因表达量的降低。植物 DNA 甲基化水平的动态变化与逆境胁迫密切相关,本研究主要是从表观遗传学来分析种子活力降低的原因,认为是由玉米种子的 CG+CHG 甲基化水平升高导致的。高桂珍^[20]认为,热胁迫导致油菜种子基因组 DNA 甲基化水平降低,以去甲基化现象为主。郑单 958 和先玉 335 的 DNA 甲基化水平发生不同程度的变化,CG 甲基化水平变化呈现出相反的变化趋势。经过老化处理的郑单 958 DNA 的 CHG 甲基化水平平均高于对照;先玉 335DNA 的 CHG 甲基化水平平均低于对照。这说明种子活力的降低, DNA 甲基化发生了变化,种子老化甲基化应答机制不同,但 2 份老化玉米种子的 CG+CHG 甲基化呈现升高的趋势,种子老化可能与 CG+CHG 甲基化的升高有关。范建成研究认为,蔡胁迫下水稻 DNA 甲基化水平及变异模式与基因型有关,CG 和 CHG 百分含量的变化无统一趋势或规律^[21]。

从种子活力与DNA甲基化的相关性分析可以看出,CG甲基化与种子活力指标相关系数较高,先玉335与CG甲基化水平呈现出极显著负相关,CHG与种子活力的相关性较低,CG+CHG甲基化水平与先玉335种子活力相关性较高;郑单958 DNA的CG甲基化与电导率、丙二醛呈负相关,与过氧化物酶过氧化氢酶呈正相关。先玉335 DNA的CG甲基化与电导率、丙二醛呈正相关,与过氧化物酶过氧化氢酶呈负相关;郑单958 DNA CG+CHG甲基化与生理指标相关性较低,先玉335 DNA CG+CHG甲基化与生理指标相关性较高。可能在高温、高湿胁迫下郑单958和先玉335种子的DNA甲基化调控机制不同。因此,老化玉米种子DNA甲基化机理有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 陈利华,万 杉.不同温度条件下水稻种子活力QTL的定位分析[J].武汉植物学研究,2005(2):125-130.
Chen L H, Wan B. Mapping of QTL controlling seed vitality in rice under different temperature conditions[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2005(2): 125-130. (in Chinese)
- [2] Johnson R C. Genetic structure of regeneration populations of annual ryegrass[J]. Crop Sci., 1998, 38: 851-857.
- [3] Boyko A, Kovalchuk I. Epigenetic control of plant stress response[J]. Environ Mol Mutagen, 2007, 94(1): 61-72.
- [4] 方玉梅.甘蓝种子老化和修复过程中生理生化变化及RAPD分析[D].重庆:西南大学,2007.
- [5] 王 栋,卢新雄,张志娥,等. SSR标记分析种子老化及繁殖世代对大豆种质遗传完整性的影响[J].植物遗传资源学报,2010(2): 192-199.
Wang D, Lu X X, Zhang Z E, et al. Effect of seed aging and regeneration on genetic integrity in soybean by SSR markers[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2010(2): 192-199. (in Chinese)
- [6] 张 晗,卢新雄,张志娥,等.种子老化对玉米种质资源遗传完整性变化的影响[J].植物遗传资源学报,2005(3):271-275.
Zhang H, Lu X X, Zhang Z E, et al. Effect of seed aging on changes of genetic integrity in maize germplasm[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2005(3): 271-275. (in Chinese)
- [7] 王小丽.种子老化影响扁蓊豆种质资源遗传完整性的研究[D].兰州:甘肃农业大学,2010.
- [8] 胡小荣.几种农作物超干种子保存、生理生化机理和遗传稳定性研究[D].北京:中国农业大学,2005.
- [9] 宿 宇,王建光,卢新雄. AFLP分析人工老化对扁蓊豆遗传完整性的影响[J].草地学报,2012(1):125-129.
Su Y, Wang J G, Lu X X. Influence of ageing on genetic integrity of trigonella ruthenica[J]. Acta Agrestia Sinica, 2012(1): 125-129. (in Chinese)
- [10] 李春雷,马世骏,马静文,等.人工老化对玉米种子活力指标、内含物质含量及生理指标的影响[J].吉林农业大学学报,2014,3(5):505-509.
Li C L, Ma S J, Ma J W, et al. Effects of artificial aging on the seed vigor indexes, embedded substance content and physiological indexes of maize[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2014, 3(5): 505-509. (in Chinese)
- [11] 张治安,陈展宇,等.植物生理学实验技术[M].长春:吉林大学出版社,2008.
- [12] Kidwell K K, Osborn T C. Simple plant DNA isolation procedures[J]. Plant Genomes: Methods for Genetic and Physical Mapping, 1992: 1-3.
- [13] 钱晓伟,袁有禄,荣 平,等.盐胁迫下棉花基因组基于毛细管电泳的MSAP分析[J].中国生物化学与分子生物学报,2014(3): 298-306.
Qian X W, Yuan Y L, Rong P, et al. Analysis of methylation sensitive amplified polymorphism in cotton genome under salt stress based on capillary electrophoresis[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2014(3): 298-306. (in Chinese)
- [14] 刘月辉,王登花,黄海龙,等.辣椒种子老化过程中的生理生化分析[J].种子,2003(2):51-52,87.
Liu Y H, Wang D H, Huang H L, et al. Physiological and biochemical analysis of artificially aged pepper seed[J]. Seed, 2003(2): 51-52, 87. (in Chinese)
- [15] 王鹤冰.人工老化芥菜种子生理生化变化及基因组DNA损伤的ISSR研究[D].重庆:西南大学,2010.
- [16] 张加强,田树云,李晓辉.人工老化过程中玉米种子活力与一些生理指标变化的研究[J].种子,2007(6):46-48.
Zhang J Q, Tian S Y, Li X H. Study on seed vigour and physiological characteristics changes of maize seeds during artificial aging course[J]. Seed, 2007(6): 46-48. (in Chinese)
- [17] 那 潼.两种锦鸡儿种子人工老化中生理生化变化及基因组DNA损伤的ISSR研究[D].扬州:扬州大学,2007.
- [18] 刘海英.玉米种子活力相关性状的QTL定位及遗传效应分析[D].郑州:河南农业大学,2012.
- [19] 马平安.人工老化对玉米种子活力影响[D].郑州:河南农业大学,2010.
- [20] 高桂珍.热胁迫过程中白菜型油菜种子DNA的甲基化[J].作物学报,2011,37(9): 1597-1604.
Gao G Z. DNA methylation of seed in response to heat stress in brassica rapa[J]. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37(9): 1597-1604. (in Chinese)

(责任编辑:高 阳)