

植物 DNA 甲基化研究方法及进展

陈 曦, 王 锐, 丁国华

(哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江省高等院校植物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要: 该文在详细介绍 DNA 甲基化机制、原理与研究方法的基础上, 概述了国内外有关 DNA 甲基化研究的热点, 分析了盐胁迫、氮处理、重金属处理、热胁迫、干旱胁迫等不同胁迫条件下同种植物间基因的差异性表达和 RNA 介导的 DNA 甲基化和 DNA 去甲基化等; 阐述了多种检测植物 DNA 甲基化水平的技术, 尤其对 MSAP 技术的基本原理、基本程序和应用实例进行了较为细致的介绍; 并对未来植物 DNA 甲基化研究进行了展望。

关键词: DNA; 甲基化; 进展; 方法; MSAP

中图分类号: Q 943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2013)12—0188—04

当前, 有关植物 DNA 甲基化的研究不断发展延伸, 逐渐形成了较成熟的研究体系, 虽然此类研究在许多植物种类中尚属空白, 却已经为某些关键问题的解答提供了重要参考。DNA 甲基化是最早发现的基因表观修饰的方式之一, 可能存在于所有高等生物中。DNA 甲基化调控了基因的表达^[1], DNA 甲基化能关闭某些基因的活性, 而去甲基化则诱导了基因的重新活化和表达。基因高度甲基化往往是非活化状态的标志, 这些甲基化可在诱导下发生去甲基化, 从而使之具有转录活性。DNA 甲基化属于表观遗传学范畴, 在各种真核细胞表达调控中有着重要的意义。

1 植物 DNA 甲基化概述

1.1 DNA 甲基化

在经典遗传学中, 基因序列的改变会引起生物体表现型的改变, 可以由亲代传给子代, 然而现代分子生物学则认为细胞中生物信息的表达是受 2 种因素控制的, 1 种是遗传调控 (genetic); 另 1 种是表观遗传调控 (epigenetic)。遗传调控提供了“生产”维持生命活动所必须的蛋白质“蓝本”; 而表观遗传调控则指细胞怎样、何时何地表达这些遗传信息。这 2 个因素的调控构成一个网络, 控制基因的转录、转录后加工、翻译以及翻

后修饰等各个环节, 从而保证了生命的周而复始。

DNA 甲基化可以称作是细胞记忆的一种机制, 是表观遗传学研究的“主角”, 其中 5’胞嘧啶甲基化是真核生物 DNA 甲基化的主要形式^[1]。DNA 的甲基化是在 DNA 甲基化转移酶(DNMTs)的作用下使 CpG 二核苷酸 5’端的胞嘧啶转变为 5’甲基胞嘧啶^[2~4], 这种 DNA 修饰方式并没有改变基因序列, 由于甲基化 DNA 不容易被转录, 因此 DNA 甲基化被认为在发育的时序上限制获得可转录基因。DNA 甲基化是基因组 DNA 在转录水平上进行调控的一种自然修饰方式, 在高等植物中广泛存在。其中胞嘧啶 C5 位的甲基化最为常见即 5-甲基胞嘧啶 (5mC), 而这些甲基化的胞嘧啶多集中于 CpG 岛上。DNA 甲基化是一种重要的遗传外修饰, 是表观遗传的重要组成部分, 它参与了基因表达、生长发育、逆境胁迫应答等过程^[5~7]。随着对甲基化研究的不断深入, 各种甲基化研究的新思路、新方法应运而生以满足不同类型研究的需求。

1.2 植物 DNA 甲基化研究进展

1.2.1 国内研究热点 随着研究的不断深入, 人们对甲基化的研究从开始的研究其机理、单种植物的甲基化状况到后来试图去改变甲基化, 以寻求更深入的研究表观遗传学对生物的作用机理和影响程度^[8]。许多研究都在直接或间接的说明植物 DNA 甲基化对基因表达调控过程的重要意义, 研究较多的有盐胁迫、氮处理、重金属处理及干旱胁迫、热胁迫等。提升植物基因组的甲基化水平可以达到抗盐胁迫的效果, 推断这可能是植物抗盐性机理之一。另外, 不同品种间的耐盐性也存在差异, 这些差异也与甲基化水平相关。另外, 在水亏缺盐分高的豇豆根尖基因组中检测到有超甲基化的情况; 盐胁迫

第一作者简介: 陈曦(1987-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 研究方向为植物学分子生物学。E-mail: water_drinkme@163.com

责任作者: 丁国华(1963-), 男, 山东梁山人, 教授, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: hsdddgh@hrbnu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30830027); 黑龙江省高校科技创新团队研究计划资助项目(KJTD-2011-2); 哈尔滨师范大学科技发展预研计划资助项目。

收稿日期: 2013—01—04

下的玉米幼苗甲基转移酶表达量减少,基因组甲基化程度降低;盐胁迫造成油菜特异位点的低甲基化,用浓度为 10~200 mmol/L 的 NaCl 胁迫油菜植株,结果不同甲基化类型消失、出现或发生转换,包括甲基化从头合成与去甲基化^[9]。氮处理可使 DNA 甲基化发生变异。运用 MSAP 技术对水稻进行研究,显示在低氮及无氮水平下,处理样本的 DNA 甲基化水平较大幅度的降低,其中,以 CNG 甲基化水平的降低为主,进一步对其进行 Southern 杂交,结果发现多个结构基因及转座子基因的探针都发生了改变,从而验证了 CNG 位点的去甲基化现象^[10]。重金属处理在致死浓度范围以内影响甲基化的状况。将拟南芥种子置于不同浓度的氯化镉培养基中,并设计无处理对照,2 周后移苗解除胁迫,发现低浓度 CdCl₂ 可以促进拟南芥种子的萌发,浓度在 0.5 mg/L 时萌发率最高。分别提取叶幼苗期和抽薹期基因组 DNA,采用 MSAP 技术分析其甲基化情况,结果显示随着 CdCl₂ 浓度的增加,其 DNA 甲基化程度也随之增高^[11]。热胁迫影响植物的生长、发育及种子寿命。以油菜耐热品种和不耐热品种的种子为试材,检测不同温度下种子的活力及基因组 DNA 的甲基化水平,通过 MSAP 方法检测,热胁迫后的种子基因组 DNA 甲基化水平降低,同时发生了甲基化和去甲基化现象,也就是说,在热胁迫过程中,种子可能通过 DNA 甲基化的变化来调控相关基因表达以应对高温胁迫^[12]。干旱胁迫会使 DNA 甲基化会表现出一定时空特异性和品种特异性。研究水稻抗旱和旱敏感样本苗期和分蘖期 DNA 甲基化的变化,再分别比较叶片和根部 DNA 甲基化的变化情况,结果显示水分胁迫导致 DNA 甲基化平均水平显著升高,其中根部甲基化增加幅度相对明显,另外, DNA 甲基化水平及状态变化在品种间存在差异,因此干旱胁迫反应过程中,试验结果可能还与品种抗旱性相关^[13]。

1.2.2 国外研究的新方向 1942 年, Waddington^[14] 就首次提出了 epigenetics 一词,并指出表观遗传与遗传是相对的,从此揭开了表观遗传学研究的新篇章,其中 DNA 甲基化作为表观遗传修饰的重要形式又随之被冠以浓墨重彩的一笔。RNA 介导的 DNA 甲基化是基因组表观遗传修饰的重要形式,它最初是在类病毒侵染的转基因植物中发现的,在拟南芥中研究的最为深入,在所有位点的重新甲基化、CG 和 CHG 位点的维持甲基化以及 CHH 位点的去甲基化中都有涉及。Habu 等^[15] 发现植物中 MOM1 可以不依赖 DNA 甲基化的引起转录后的基因沉默;此外,拟南芥突变体中检测出 RNA 的积累以及不同位点不同程度的低甲基化^[16]。病原菌胁迫

可导致抗性基因出现低甲基化,此外,在全基因组范围内还会出现超甲基化现象^[17~18], Peng 等^[19] 认为这有利于植物逆境适应与进化。TMV 感染烟草后,病原菌响应基因在过敏性反应出现后 12 h 表达量迅速上升,24 h 后, Southern 杂交检测表明甲基化已明显下降。病原菌感染后,可增强对相同或类似胁迫的抗性^[20], 揭示抗性基因甲基化、表达与同源重组变化可能传递或部分传递给后代。近年来涌现出 10 余种 DNA 甲基化的检测技术,除了上述所介绍的基于分子生物学的研究外,同时借助于化学的甲基化研究方法正在悄然兴起^[21],大致可以分为 2 类:特异位点的甲基化检测和全基因组的甲基化分析。近年来,科学家们在 DNA 定点检测、结构分析和药物设计方面做了大量工作^[22],有机化学和解析方法都可以用于甲基化检测。例如,荧光阳离子共轭聚合物(CCP)建立了甲基化检测,2008 年,CCP1(Cationic conjugated polyelectrolytes)与单核苷酸以延长为基础用来检测甲基化所发生的特定位点,如 P16。这个方法包含重亚硫酸盐处理和 PCR 扩增^[23~24]。此外还有胞嘧啶甲基化钒氧化^[25]、胞嘧啶甲基化锇氧化^[26~28]和 1,4-2 甲基萘醌氧化单个光电子等^[29]。其它分析方法对甲基化检测也有重要意义,并逐渐被认识和应用。其中,高效液相色谱法可以对全基因组 DNA 进行甲基化检测^[30~31],可作甲基化图谱分析,此法是目前测定基因组 DNA 中 5mC 总量最标准的方法;基因芯片技术可用于甲基化检测^[32],且芯片种类不一,基因芯片是近十几年来发展极快的一项技术平台,具有高通量、高灵敏度、快速自动等显著的特点^[33],CpG 岛甲基化检测芯片也有所发展,但速度缓慢。目前国际上仅几个研究小组在开展 DNA 甲基化芯片的研究工作。各种芯片技术以不同的 DNA 预处理方法为基础,包括限制性内切酶和免疫沉淀等^[34]。

2 植物 DNA 甲基化检测和研究方法

2.1 甲基化的主要检测方法

DNA 胞嘧啶甲基化分析可以针对特定序列,也可以针对全基因组,根据检测的目的可以选择不同的分析方法。将这些方法进行总结,大致可分为 3 类:第 1 类以 HPLC 技术为基础,主要检测全基因组甲基化水平^[35];第 2 类以测序为基础,主要检测特定序列胞嘧啶甲基化位点^[36];第 3 类以 PCR 技术为基础,既可以分析全基因组甲基化水平,也能分析特异序列的甲基化位点^[37]。

2.2 主要研究方法举例——MSAP

2.2.1 MSAP 基本原理 MSAP(Methylation-sensitive amplified polymorphism, DNA 甲基化敏感扩增多态性)是一种敏感性好、实用性强的检测 DNA 甲基化的技术。该方法是在 AFLP 技术的基础上发展而来的,利用对

DNA 甲基化敏感性不同的同裂酶(Hpa II 和 Msp I)分别切割 DNA, 它们都能识别并切割 5'-CCGG 序列, 但该过程受识别序列中胞嘧啶的甲基化程度影响。Hpa II 对甲基化敏感, 当识别序列中有 1 个或 2 个胞嘧啶碱基被甲基化时则不能切割(2 条链都甲基化), Msp I 对甲基化不敏感, 能切割内甲基化的 C5'CGG, 但不能切割 5' CCGG。用 EcoR I/Hpa II 和 EcoR I/Msp I 分别对基因组 DNA 限制消化, 将产生的不同酶切产物添加接头, 进行 PCR 扩增、PAGE 电泳、银染, 产生可见的具有不同酶切型式的谱带, 即可得知 DNA 甲基化信息。

2.2.2 MSAP 的基本程序 提取高质量基因组 DNA 酶切连接后进行预扩增, 将预扩增产物稀释 40 倍后, 作为选择性扩增的模板备用; 基于不同的选择性扩增引物组合进行选择性扩增, 根据不同的变量进行标记; 产物变性后在 6% 的序列胶上跑电泳, 即进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳; 将胶板进行银染, 统计并分析 DNA 条带^[38]。MSAP 方法所检测的“CCGG”位点甲基化结果有 4 种类型, 第Ⅰ类型: Hpa II 和 Msp I 都有带; 第Ⅱ类型: Hpa II 有带, Msp I 无带; 第Ⅲ类型: Hpa II 无带, Msp I 有带, 第Ⅳ类型: Hpa II 和 Msp I 都无带(表 1)。

表 1 MSAP 方法检测的甲基化结果

Table 1 Methylation results detected by MSAP

类型	酶切类型		DNA 甲基化模式
	Hpa II	Msp I	
I	1	1	无甲基化活或内侧胞嘧啶半甲基化
II	1	0	胞嘧啶外侧半甲基化
III	0	1	内侧胞嘧啶全甲基化
IV	0	0	内外侧胞嘧啶全甲基化或序列变异

注: Hpa II 和 Msp I 只能准确识别Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ类型的情况, 因此统计的“CCGG”在基因组水平甲基化程度可能比实际低。

3 MSAP 方法应用实例

MSAP 法近年来被广泛用于水稻^[39~41]、棉花^[42]、苹果^[43]和拟南芥^[44]等基因组的胞嘧啶甲基化检测, 其它研究中也用于对香蕉^[45]、油棕^[46]、马铃薯^[47]等 DNA 甲基化状况的了解。另外, 付胜杰等^[48]利用 MSAP 技术分析了小麦的甲基化水平, 结果表明, 叶锈菌虽没有诱导稳定且特异的植物基因组 DNA 胞嘧啶位点的甲基化模式发生改变, 但子代及其感病亲本之间存在着表观遗传学差异。王春国等^[49]研究表明, 不同倍性西瓜中, DNA 甲基化均有发生, 但不论是从总甲基化率还是全甲基化率看, DNA 甲基化水平与倍性高低关系并不大, 三倍体西瓜表现出较为显著的低甲基化水平特征等。

4 展望

近 10 a 来, 植物 DNA 甲基化的机制、原理与研究方法等逐渐被人们所认知, 其中 RNA 介导的 DNA 甲基化

和 DNA 去甲基化等也都是现在的研究热点, 国内外检测 DNA 甲基化的技术也应运而生, 而且随着研究的不断广泛、深入, 新的研究方法层出不穷, 实用的技术快速被推而广之。其中 MSAP 技术逐渐成为主要应用的技术, 若与其它分子生物学方法如 DNA 分子遗传标记、DNA 重组技术、DNA 微阵列等结合起来进行综合研究, 将在分子水平上揭示调控基因时空特异表达机理建立起有力的技术平台, 在研究功能基因、改良植物性状、改变植物抗逆性等方面发挥重要作用, 从而使其在杂种优势消除转基因沉默, 研究功能基因, 改良植物表型性状, 提高植物适应性等方面发挥重要作用。

参考文献

- [1] Dahl C, Guldberg P. DNA methylation analysis techniques[J]. Biogerontology, 2003(4):233~250.
- [2] 孙颖, 葛峰, 刘迪秋, 等. 植物中 DNA 甲基化模式及其相关机制[J]. 植物生理学报, 2011, 47(8):745~751.
- [3] Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in Arabidopsis[J]. Cell, 2006, 126:1189~1201.
- [4] Suzuk M M, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics[J]. Nat Rev Genet, 2008(9):465~476.
- [5] Zilberman D, Gehring M, Tran R K, et al. Genomewide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription[J]. Nat Genet, 2007, 39(1):61~69.
- [6] Lu G Y, Wu X M, Chen B Y, et al. Detection of DNA methylation changes during seed germination in rapeseed[J]. Chinese Sci Bull, 2006, 51(2):182~190.
- [7] 杨金兰, 柳李旺, 龚义勤, 等. 辐射迫下萝卜基因组 DNA 甲基化敏感扩增多态性分析[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2007, 33(3):219~226.
- [8] 赵云雷, 叶武威, 王俊娟, 等. DNA 甲基化与植物抗逆性研究进展[J]. 西北植物学报, 2009, 29(7):1479~1489.
- [9] 彭海, 张静, 肖迫与植物 DNA 甲基化育种中的潜在应用与挑战[J]. 自然科学进展, 2009, 190(3):248~256.
- [10] 宋欣欣, 刘宝. 低氮水平下诱导的水稻 DNA 甲基化变异[D]. 长春: 东北师范大学, 2009.
- [11] 王子成, 马洪霞, 何艳霞. 重金属镉对拟南芥 DNA 甲基化的影响[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(2):115~118.
- [12] 高桂珍, 应菲, 陈碧云, 等. 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.
- [13] 潘雅姣, 傅彬英, 王迪, 等. 水稻干旱胁迫诱导 DNA 甲基化时空变化特征分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(9):3009~3018.
- [14] Waddington C H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters[J]. Nature, 1942, 150:563~565.
- [15] Habu Y M, Mathieu O, Tariq M, et al. Epigenetic regulation of transcription in intermediate heterochromatin[J]. EMBO Rep, 2006, 7(12):1279~1284.
- [16] Wang M B, Dennis E S. SPT5-like, a new component in plant[J]. EMBO Rep, 2009, 10(6):573~575.
- [17] Law J A, Jacobson S E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals[J]. Nature, 2011(11):204~220.
- [18] 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.
- [19] Peng H, Zhang J. Plant genomic DNA methylation in response to stresses: Potential applications and challenges in plant breeding[J]. Progress in Natural Science, 2009, 14(4):265-271.
- [20] Dong X. Genetic dissection of systemic acquired resistance[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2001(4):309-314.
- [21] Tian Tian, Wang S R, Wu J G, et al. Advances in methodology of DNA methylation assay[J]. Science China Chemistry, 2011, 54(8):1233-1243.
- [22] Yan S, Huang R, Zhou Y, et al. Aptamer-based turn-on fluorescent four-branched quaternary ammonium pyrazine probe for selective thrombin detection[J]. Chem Commun, 2011, 47:1273-1275.
- [23] Feng X, Duan X, Liu L, et al. Cationic conjugated polyelectrolyte molecular beacon complex for sensitive, sequence-specific, real-time DNA detection[J]. Langmuir, 2008, 24:12138-12141.
- [24] Feng F, Wang H, Han L, et al. Fluorescent conjugated polyelectrolyte as an indicator for convenient detection of DNA methylation[J]. J Am Chem Soc, 2008, 130:11338-11343.
- [25] Bareyt S, Carell T. Selective detection of 5-methylcytosine sites in DNA [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47:181-184.
- [26] Nomura A, Tainaka K, Okamoto A. Osmium complexation of mismatched DNA: effect of the bases adjacent to mismatched 5-methylcytosine [J]. Bioconjug Chem, 2009, 20:603-607.
- [27] Okamoto A. 5-methylcytosine-selective osmium oxidation[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2007, 26:1601-1604.
- [28] Okamoto A. Chemical approach toward efficient DNA methylation analysis[J]. Org Biomol Chem, 2009(7):21-26.
- [29] Yamada H, Tanabe K, Nishimoto S. Photocurrent response after enzymatic treatment of DNA duplexes immobilized on gold electrodes: electrochemical discrimination of 5-methylcytosine modification in DNA[J]. Org Biomol Chem, 2008(6):272-277.
- [30] Armstrong K M, Bermingham E N, Bassett S A, et al. Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA[J]. Biotechnol, 2010(6):113-117.
- [31] Zhang J J, Zhang L, Zhou K, et al. Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Anal Biochem, 2011, 413:164-170.
- [32] Shi X, Tang C, Zhou D, et al. Multiplex detection of CpG methylation using microarray combining with target-selection padlock probe[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411:1187-1194.
- [33] Kelkar A, Deobagkar D. A novel method to assess the full genome methylation profile using monoclonal antibody combined with the high throughput based microarray approach[J]. Epigenetics, 2009(4):415-420.
- [34] 张莉, 贾峰, 张广乐, 等. 植物DNA甲基化研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(6):3218-3221.
- [35] Johnston J W, Harding K, Bremner D H, et al. HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors[J]. Plant Physiol Biochem, 2005, 43:844-853.
- [36] Xu M, Li X, Korban S S. AFLP-based detection of DNA methylation [J]. Plant Mol Biol Rep, 2000, 18:361-368.
- [37] Herman J G, Graff J R. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93:9821-9826.
- [38] 吴春太, 李维国, 高新生, 等. MSAP技术及其在橡胶树遗传育种研究中的应用前景[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(11):9-14.
- [39] Ashikawa. Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars[J]. Plant Mol Biol, 2001, 45:31-39.
- [40] 张燕, 陈波. DNA甲基化敏感扩增多态性技术及其在作物遗传研究中的应用[J]. 西昌学院学报, 2009, 23(4):7-11.
- [41] 郑鑫, 马晓岗, 迟德钊, 等. 高活力水稻种子萌发过程中DNA甲基化变化的MSAP分析[J]. 青海大学学报, 2009, 27(9):18-21.
- [42] Liu B, Brubaker C L, Mergeai G, et al. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes[J]. Genome, 2001, 44:321-330.
- [43] Xu M, Li X, Korban S S. AFLP-based detection of DNA methylation [J]. Plant Mol Biol Rep, 2000, 18:361-368.
- [44] Cervera M T, Ruiz-Garcia L, Martinez-Zapater J M. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers[J]. Mol Genet Genomics, 2002, 268:543-552.
- [45] Peraza-Echeverria S, Herrera-Valencia V A, Kay A. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism[J]. Plant Sci, 2001, 161:359-367.
- [46] Matthes M, Singh R, Cheah S C, et al. Variation in oil palm tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102:971-979.
- [47] Joyce S M, Cassells A C. Variation in potato microplant morphology in vitro and DNA methylation[J]. Plant Cell Tiss, 2002, 70:125-137.
- [48] 付胜杰, 王晖, 冯丽娜, 等. 叶锈菌胁迫下的小麦基因组MSAP分析[J]. 遗传, 2009, 31(3):297-304.
- [49] 王春国, 古瑜, 陈成彬, 等. 不同倍性西瓜基因组DNA甲基化水平与模式的MSAP分析[J]. 分子细胞生物学报, 2009, 42(2):119-126.

Methods and Progress on Plant DNA Methylation

CHEN Xi, WANG Rui, DING Guo-hua

(Heilongjiang Key Laboratory of Plant, College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

Abstract: On the basis of a detailed introduction of the mechanism, theory and methods of DNA methylation, the important issues about DNA methylation at home and abroad were described; genes differentially expressed in the same species and DNA methylation and DNA demethylation under different stress conditions of salt stress, N treatment, heavy metal treatment, heat and drought stress and so on were analyzed. A variety of detection technologies of plant DNA methylation level were introduced, especially on the basic theory, procedure and examples of MSAP; the plant DNA methylation was also prospected.

Key words: DNA; methylation; progress; method; MSAP