

DNA甲基化在植物响应胁迫中的研究进展

张媛媛^{1,2}, 郑青松⁴, 李霞^{1,2,3,*}, 谭明谱^{1,*}

¹南京农业大学生命科学学院, 南京210095

²江苏省农业科学院粮食作物研究所, 江苏省优质水稻工程技术研究中心, 国家水稻改良中心南京分中心, 南京210014

³江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心, 江苏扬州225009

⁴南京农业大学资源环境学院, 南京210095

*共同通信作者: 李霞(jspplx@jaas.ac.cn)、谭明谱(tempo@njau.edu.cn)

摘要: 为了能够在胁迫条件下生存, 植物进化出复杂的机制来感知外部信号, 从而对环境变化做出最佳反应。表观遗传机制调控植物应答外界胁迫是近年来发现的重要机制之一, 其中DNA甲基化在该过程中处于核心地位。本文就近年来DNA甲基化在植物应答胁迫的生物学功能、作用机制以及未来的前景等进行阐述, 从而为DNA甲基化在植物遗传学中的研究以及应用提供理论参考。

关键词: 植物; DNA甲基化; 逆境; 功能; 机制

Research progress of DNA methylation in plant response to stress

ZHANG Manman^{1,2}, ZHENG Qingsong⁴, LI Xia^{1,2,3,*}, TAN Mingpu^{1,*}

¹College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

²Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Jiangsu High Quality Rice Research and Development Center, Nanjing Branch, China National Center for Rice Improvement, Nanjing 210014, China

³Jiangsu Province Food Crop Modern Industrial Technology Co-Innovation Center, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

⁴College of Resources and Environment, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

*Co-corresponding authors: Li X (jspplx@jaas.ac.cn), Tan MP (tempo@njau.edu.cn)

Abstract: In order to survive all kinds of stress conditions, plants have evolved complex mechanisms to sense external signals and respond to environmental changes in the best way. Epigenetic mechanisms regulating plant responses to external stress are one of the important mechanisms discovered in recent years, among which DNA methylation is at the core of epigenetic modification. In this paper, the biological function, mechanism and future prospect of DNA methylation in response to plant stress were described in recent years, so as to provide theoretical reference for the research and application of DNA methylation in plant genetics.

Key words: plant; DNA methylation; stress; function; mechanism

在自然状态下, 植物的整个生长周期均处于固着状态, 不像动物能够主动自发地躲避不良环境, 因此必然会受到来自外界生物与非生物胁迫的影响(杜康兮等2018)。为了能够在胁迫条件下生存, 植物进化出复杂的机制来感知外部信号, 从而对环境变化做出最佳反应, 其中表观遗传机制

调控植物应答外界胁迫是近年来发现的重要机制之一。目前, 人们一致认为表观遗传是研究没有

收稿 2020-03-12 修定 2021-01-26

资助 国家自然科学基金(31571585)、江苏省重点研发计划(现代农业) BE2019377和国家重点研发计划项目(2016YFD-0300501-03)。

DNA序列变化的、可遗传的改变基因表达的科学(Wu和Morris 2001)。DNA甲基化、染色质重塑及小RNA途径是表观遗传的重要途径之一,其中DNA甲基化在该过程中处于核心地位(Grativol等2012)。有关DNA甲基化的研究结果多集中于动物学和医学领域,而对植物DNA甲基化的研究近年来才开始受到重视,由于其在调节植物生命活动中的重要性,已成为现代遗传学研究所关注的热点。

1 DNA甲基化

甲基化是DNA的一种天然修饰方式,在真核生物中,甲基化只发生在胞嘧啶第5位碳原子上,由DNA甲基转移酶催化,以S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)为供体,将甲基转移到胞嘧啶上而生成5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m5C)。1925年, m5C首次在结核分枝杆菌的结核菌素水解产物中发现(Johnson和Coghill 1925)。随后,在植物中也发现了较高水平的m5C甲基化修饰(Bewick和Schmitz 2017)。

DNA胞嘧啶甲基化修饰主要包括不对称(mCp-HpH)甲基化和对称(mCpG和mCpHpG)甲基化。在植物中, DNA甲基化发生在所有胞嘧啶序列上,包括3种类型,即CG、CHG和CHH(其中H=A、C或T)。与哺乳动物相比,植物基因组中m5C比例相对较高,不同物种的范围在6%~25%(Steward等2000),具有物种、组织、器官和发育阶段的特异性(Vanyushin和Ashapkin 2011)。例如,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, CG、CHG和CHH的甲基化水平分别为24%、6.7%和1.7%(Dhar等2014)。野生型和栽培稻幼穗24.3%的胞嘧啶甲基化,比拟南芥高4倍,其CG、CHG和CHH的甲基化水平分别高达44.5%、20.1%和4.0%(Li等2012)。植物基因组DNA甲基化主要发生在对称序列CG富含区以及高度重复序列,集中在着丝粒重复区、核糖体RNA 编码重复区以及转座子(transposable elements, TEs)等区域(Zilberman等2007)。

2 DNA甲基化的主要检测方法

DNA甲基化的检测方法主要有4种(石鹏等2019),第一种为甲基化敏感扩增多态性(methylation sen-

sitive amplified polymorphism, MSAP) PCR法,即分别使用同裂酶*MSPI*、*HpaII*与内切酶*EcoRI*组合对基因组DNA进行双酶切,从而得到大小不同的DNA片段,然后连上相应的内切酶接头,根据接头序列设计相应的引物进行预扩增和选择性扩增,这种方法主要在早期DNA甲基化研究中使用(杨金兰等2007; Aina等2004; Correia等2013)。第二种为酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),该方法主要是对样品中的m5C进行精确定量,其使用与m5C特异结合的单克隆抗体和带有发光基团的二抗对甲基化的胞嘧啶进行定量(骆薇2011)。第三种为甲基化DNA免疫沉淀测序法(methylated DNA immunoprecipitation-sequencing, MeDIP-seq),该方法首先要针对m5C设计特异抗体,利用抗体对胞嘧啶甲基化的DNA、甲基结合域(methyl binding domain, MBD)或其他蛋白质结构域进行免疫共沉淀,然后将这些序列进行高通量测序(Stelplflug等2014; Xu等2017)。第二种和第三种方法均需要制备抗体,手段繁琐,应用不多。第四种为亚硫酸氢盐测序法(bisulfite sequencing),该方法是运用亚硫酸氢盐处理变性的基因组DNA片段,将其中未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶,而已被甲基化的胞嘧啶将不会被转换。接着通过PCR 反应扩增转变后的序列,将尿嘧啶转换为胸腺嘧啶,再结合高通量测序技术,未转化的甲基胞嘧啶最后以胞嘧啶形式被检测到,随着三代基因测序技术的应用和普及,这是目前常用的DNA检测方法(Liu等2017; Bian等2006)。

3 DNA甲基化在响应逆境胁迫中的作用

通常,植物遭受不同的生物和非生物胁迫均导致基因甲基化增加,从而导致基因组活性的降低。一旦胁迫减轻,大多数这些应激诱导的修饰被重置为基础水平,而一些修饰也可以在有丝分裂甚至减数分裂细胞中遗传,这种“应激记忆”可以帮助植物更有效地应对随后的胁迫,甚至跨代遗传(Dowen等2012; Chinnusarmy和Zhu 2009)。如拟南芥以5-甲基胞嘧啶DNA糖基化酶基因为中心,通过甲基化传感基因调控回路,响应胁迫,并可以实现跨代遗传(Williams和Gehring 2017)。

3.1 响应生物逆境

植物被一系列病原体侵入,但只有少数病原体成功引起疾病,大多数的攻击可以通过植物本身的复杂免疫系统来抵消(Muthamilarasan和Prasad 2013)。植物能通过DNA甲基化模式和水平的改变介导对细菌以及病毒等生物胁迫的应答过程。如拟南芥可通过转座子DNA去甲基化激活免疫应答基因以及一些防御基因的转录,从而限制了细菌病原体假单胞菌——丁香假单胞菌在叶中的增殖和维管束内繁殖,表现抗菌特性(Yu等2013a)。这些重复序列或转座子内DNA甲基化动态变化可以响应水杨酸应激,调节邻近基因(Dowen等2012);拟南芥中伸长复合体亚基2 (*elongator complex subunit 2, ELP2*)还可与植物免疫关键转录激活因子(*non-expressor of pathogenesis-related genes 1, NPR1*)互作,介导在病原菌诱导转录组重编程中的染色质调控,调控防御基因的动态表达(Wang等2013a)。小麦(*Triticum aestivum*)二倍体祖先小黑麦(*Aegilops tauschii*)在受白粉病菌(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Bgt*)感染后,植株中*ARGONAUTE4a (AGO4a)*显著下调,伴随着*AGO4a*分选的24nt-短链干扰RNA (24nt-short-interfering RNA, 24nt-siRNA)水平的显著降低,特别是对于转座子附近的基因,且携带CHH-低甲基化差异甲基化区域的转座子富含“应激反应”功能元件,包括受体激酶、过氧化物酶和致病相关基因等,可通过上调自身与*Bgt*防御有关的致病相关基因如 β -1,3-葡聚糖酶基因、DNA甲基化酶(*DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2, DRM2*)诱导基因沉默,从而增强植物对*Bgt*的抗性(Geng等2019)。不同类型的病原菌如*Psc (Plectosphaerella cucumerina)*和*Hpa (Hyaloperonospora arabidopsidis)*对拟南芥的侵染中,大多数DNA-directed RNA poly-merase V subunit 1 (*NRPE1*)和REPRESSOR OF SILENCING 1 (*ROS1*)依赖的防御基因调节均受DNA甲基化调控(Sánchez等2016)。TE-siR815是另一种微型反向重复转座元件(miniature inverted repeat transposable element, MITE)衍生的siRNA,由*WRKY45-1*的内含子产生,这是粳稻(*Oryza sativa* ssp. *japonica*)的天然变体,TE-siR815可以通过RNA介导的DNA甲基化(RNA directed

DNA methylation, RdDM)抑制*WRKY45*,从而在调节细菌性疾病中起负面作用。*WRKY45-1*的过表达可以增强对稻瘟病菌的抗性(Zhang等2016a)。水稻组氨酸脱乙酰酶(histone H₄ deacetylase, *Os-HDT701*)是组氨酸乙酰转移酶和组氨酸脱乙酰酶(histone acetyltransferases and histone deacetylases, HDACs)的基因,它是植物特异的HD2家族的一个成员,通过降低水稻中模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)和防御相关基因的组蛋白H₄乙酰化水平,对水稻的免疫力进行负调控(Ding等2012)。

植物使用由siRNA介导的RNA沉默作为对病毒的防御机制。在双生病毒感染下,病毒DNA靶向转录水平,而病毒衍生的转录物通过靶向转录后水平而沉默。绿豆中双足双粒病毒(*Mungbean yellow mosaic India virus, MYMIV*)可在大豆(*Glycine max*)中引起黄花叶病,通过观察病毒基因组的MYMIV伴生的siRNA的分布,观察到在抗性大豆品系PK416中,病毒DNA的基因间区域发生了更高水平的甲基化,且大多数源自病毒的siRNA与病毒基因间区域互补,其特异性siRNA分子的大小多为24 nt,而在易感品系JS335中,大多数siRNA对应于病毒基因组的编码区域,可见,病毒siRNA与其基因区域互补区域的差异与宿主植物对病毒的抗性存在密切关系(Yadav和Chattopadhyay 2011)。进一步用番茄卷叶病毒(*Tomato leaf curl virus, TLCV C2*)开放阅读框的发夹构建体转化番茄(*Lycopersicon esculentum*),观察到TLCV可通过从头合成的未甲基化DNA群体逃避宿主防御(Bian等2006)。通过分析番茄花叶病毒(*Tobacco mosaic virus, TMV*)感染的烟草(*Nicotiana tabacum*)中的转录物和基因组甲基化,观察到病原体响应基因*NtAlix1*的表达,并将其与DNA甲基化状态相关联,提示了依赖于产生双链转录物的病毒诱导基因沉默,可以被开发为在任何内源基因中引入DNA甲基化的有效工具,并应用于黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus, CMV*)的基因沉默系统(Kanazawa等2011)。啤酒花矮化类病毒(*Hop stunt viroid, HSVd*)的RNA表达影响宿主烟草的DNA甲基化(Castellano等2015)。同样地,大豆根表皮基因组的甲基化还对寄生的囊肿线虫

的相容起着重要作用, 差异甲基化部分控制线虫诱导的合胞体基因表达变化(Rambani等2015), 囊肿线虫寄生也诱导宿主根表皮基因组的表观遗传变化(Hewezi等2017)。

DNA甲基化不仅参与植物对病菌和病毒的免疫反应, 而且还参与植物与有益微生物的共生, 如摩西管柄囊霉(*Funneliformis mosseae*)系统地改变宿主植物天竺葵(*Geranium robertianum*) DNA甲基化(Varga和Soulsbury 2019)。DNA甲基化的重编程对菠萝(*Ananas comosus*)菌根的发育以及菌根共生细胞的分化是必需的(Satgé等2016; Nagymihály等2017)。专性根寄生植物刺五加绒球(*Phelipanche ramosa*)的种子对独脚金内酯的反应受不依赖脱落酸(abscisic acid, ABA)的DNA甲基化控制(Lechat等2015), 均显示了DNA甲基化在植物与微生物共生中的重要作用。

3.2 响应非生物逆境

DNA甲基化动态不仅在响应生物胁迫中发挥作用, 而且在响应非生物胁迫中发挥中重要作用, 这些非生物胁迫主要包括温度、盐、干旱以及重金属等。

3.2.1 温度

温度是影响植物分布和生长发育的重要因素之一。已有研究观察到高温和低温均引起DNA甲基化水平的改变。高温影响拟南芥DNA甲基化状态(Naydenov等2015)。对高温敏感性不同的棉花(*Gossypium hirsutum*)的DNA甲基化水平也不同, 在高温下, 棉花敏感系(H05)花药中DNA甲基化的全面破坏, 尤其是CHH甲基化(其中H=A、C或T), 其中24个核苷酸的siRNA水平的变化与DNA甲基化水平显著相关, 且其花药中的糖和活性氧(reactive oxygen species, ROS)代谢途径中的基因表达被显著调节, 但生长素的生物合成和信号传导途径仅略有改变(Ma等2018)。栓皮栎(*Quercus suber*) 在55°C高温胁迫时, DNA甲基化增加, 该物种可通过具有相反作用的组蛋白H3乙酰化, 共同调节对高温胁迫的适应(Correia等2013)。紫花扁豆(*Lablab purpureus*)可通过DNA甲基化缓解由水杨酸和NO介导高温导致的氧化胁迫伤害(Rai等2018)。

低温同样导致植株DNA甲基化状态改变, 在

玉米(*Zea mays*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、金鱼草(*Antirrhinum majus*)、十字花科芜菁(*Brassica rapa*)以及番茄(*Solanum lycopersicum*)中均有报道(Steward等2000, 2002; 王芳等2013; Liu等2017; Zhang等2016b)。如玉米ZmMII片段含有一个蛋白编码序列和类似反转录转座子的部分序列, 后者在冷胁迫条件下维持去甲基化状态, 同时冷诱导的玉米根特异性Ac/Ds转座子区域的低甲基化是由MET1表达的下调引起的(Steward等2000)。进一步研究发现冷胁迫诱导的ZmMII基因表达与核小体核心区DNA甲基化水平降低有关(Steward等2002)。低温处理下, 金鱼草的一个转座子Tam3在CpNpN基序上的甲基化状态发生了改变, 从而诱导了Tam3的转座(Hashida等2006)。冷诱导番茄风味的损失与挥发物质的合成以及DNA甲基化动态的改变密切相关(Zhang等2016b)。

3.2.2 盐胁迫

盐胁迫信号的感知和转导对植物的存活、生长和繁殖至关重要。已在多种植物的盐逆境中观察到DNA甲基化动态, 如棉花(李雪林等2009; Lu等2017)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) (Yaish等2018)、烟草(Kovářik等1997)和水稻等(Wang等2015; Ferreira等2015)。但不同物种在盐胁迫下的DNA甲基化动态表现不同。如盐处理诱导马铃薯品种‘Russet Burbank’总的DNA甲基化水平降低, 但并没有影响其干重(Sabbah等1995)。苜蓿在高盐胁迫下DNA甲基化增加尤为明显(Al-Lawati等2016)。进一步观察到过表达AtROSI的转基因烟草的类黄酮生物合成和抗氧化酶基因启动子区域甲基化状态改变, 导致了相关基因表达水平升高, 增加了对盐胁迫的耐受性(Bharti等2015)。拟南芥在高渗条件下通过RdDM途经调节盐诱导的转录因子MYB74(Xu等2015)。拟南芥DNA甲基化酶的突变体met1-3对盐的超敏反应, 并导致其后小RNA靶位点上胞嘧啶甲基化的大量减少, 并致靶基因钠转运蛋白基因(*AtHKT1*)的低表达(Baek等2010)。拟南芥的高渗应激记忆是由基因组中DNA甲基化不定位点介导的, 并受DNA糖化酶活性的限制(Wibowo等2016)。盐胁迫及其恢复过程中, 水稻的DNA甲基化水平呈基因型和组织特异性差异(Karan等2012;

Wang等2015; Ferreira等2015)。在盐胁迫下, 水稻R2R3类型的MYB转录因子基因(*OsMYB91*)启动子的DNA甲基化动态调节了相关基因的表达(Zhu等2015)。一个水稻转录因子(INDETERMINATE SPIKELET1, IDS1)通过其启动子上含有GCC盒的基序的DNA甲基化动态与transcriptional corepressor topless-related 1 (TCTR1)以及组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylase, HDA1)物理相互作用, 作为负调节剂, 参与了非生物胁迫应答基因的区域, 包括LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT PROTEIN1 (LEA1)和SALT OVERLY SENSITIVE1 (SOS1)的调节(Cheng等2018)。*OsHDT701*的过表达可增加盐和渗透胁迫的耐受性(Zhao等2014)。可见, 在盐胁迫下, 不同物种通过DNA甲基化参与调节耐盐基因机制是不同的。

3.2.3 干旱

干旱是植物生长发育过程中一个重要的非生物胁迫因素, 为了适应环境, 植物体内形成了一套响应干旱的机制(Zhang等2018a)。水稻干旱响应基因的甲基化显著增加(Yan等2010), 并以DK151和IR64为研究材料建立了水稻干旱的表观遗传图谱(Shaik和Ramakrishna 2012), 发现由于干旱胁迫诱导DNA甲基化位点的改变占全基因组DNA甲基化位点的12.1%, 而且29%的甲基化在胁迫解除时仍然被保留(Wang等2011)。在水分胁迫和灌溉条件下, 盆栽的2个高产水稻品种‘IR20’和‘CO43’, 以及2个具有耐干旱特性的水稻品种‘pmk3’和‘Paiyur local’, 发现在所有栽培水稻叶内部甲基化(5'-Cm-CGG-3')占优势, 表明在水稻DNA的5'-CCGG-3'序列中, 与mCpC二核苷酸相比, mCpG二核苷酸的频率较高。在胁迫下, 与灌溉对照相比, 干旱敏感品种(IR20)发生了DNA去甲基化, 而耐旱品种‘pmk3’和‘Paiyur local’则发生了DNA的甲基化, 均导致了基因表达的改变(Suji和Joel 2010)。在桉树(*Eucalyptus camaldulensis*)和尾叶桉(*Eucalyptus urophylla*)的杂交种(干旱敏感株VM05和耐旱株VM01)也观察到DNA甲基化基因型差异的表现, 耐旱株系的ABA生物合成和随后由PYR1-ABA受体复合物介导的ABA依赖性级联的诱导增强。而在水胁迫条件下, 耐旱株系还表现出水分响应的转录因子

*EgrDREB2.5*基因(代表ABA非依赖性级联)和钙依赖蛋白激酶基因*EgrCPK26* (与气孔开放和闭合有关)的表达增加。另一方面, 在所有条件下, 干旱敏感株系中DNA methyltransferase 1 (EgrMET1)和DECREASED DNA METHYLATION 1 (EgrDDM1)基因的表达水平高于耐受性的, 表明ABA和钙离子信号相关的表观遗传修饰也参与桉树水分缺乏对耐受性的影响(Martins等2018), 可见植物遭遇干旱时, 其内DNA甲基化的表现存在品种间差异。与此同时, 在干旱胁迫处理下, 降低水稻叶和根的甲基化程度有利于激活基因的表达, 从而提高水稻耐旱性(潘雅姣等2009)。大麦(*Hordeum vulgare*)根的表现也类似(Chwialkowska等2016); 水分胁迫诱导豌豆(*Pisum sativum*)根尖基因组中的胞嘧啶高甲基化, 而且与CCGG靶序列有关, 尤其是第二胞嘧啶中特异性甲基化显著增加(Labra等2002), 可见DNA甲基化的器官和组织特异性差异也是植物应对干旱胁迫的重要机制。*Asr1*是来自番茄的非转座子蛋白质编码基因, 其在拟南芥中缺乏直系同源物, 干旱条件导致其叶片*Asr1* DNA中胞嘧啶的110个不对称(CNN)位点中大约75个位点的甲基标记被去除, 伴随着抑制性H3K27me3表观遗传标记的减少和RNA水平的大量表达诱导, 这些去甲基化主要发生在内含子区域, 可见, 在干旱胁迫下, 导致了体细胞中新表观等位基因的产生(González等2011)。干旱胁迫显著诱导了4种水稻HAT基因(*OsHAC703*、*OsHAG703*、*OsHAF701*和*OsHAM701*)的表达(Fang等2014)。利用土壤根癌农杆菌菌株的T-DNA可整合到植物基因组的特征, 产生了跨物种的植物转基因技术, 冠瘿瘤中的高ABA水平也可介导DNA甲基化, 并调节参与干旱胁迫保护基因的表达(Gohlke等2013), 提示了未来通过DNA甲基化位点的改造改良作物干旱性状的前景。

3.2.4 重金属胁迫

较早的研究已经观察到重金属胁迫诱导植物DNA甲基化水平改变, 但变化趋势不同。其中Al³⁺、Cd²⁺和Cr⁶⁺等胁迫引起油菜(*Brassica campestris*)和萝卜(*Raphanus sativus*) DNA甲基化水平升高(Labra等2004; 杨金兰等2007)。而三叶草(*Trifolium repens*)和大麻(*Cannabis sativa*)受Ni²⁺、Cd²⁺和Cr⁶⁺等

重金属胁迫后, 基因组DNA甲基化水平反而降低(Aina等2004); 而玉米在 Pb^{2+} 下, 相关基因的甲基化则有高有低(Ding等2014)。葛才林等(2002)用不同浓度的 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 重金属离子处理水稻和小麦, 发现基因组DNA甲基化水平的改变还存在剂量效应。大麦在缺铁的条件下DNA甲基化也是重要的调节机制之一(Bocchini等2015)。李利红等(2012)发现 SO_2 胁迫导致拟南芥 NIT_2 基因启动子区甲基化水平降低, NIT_2 基因转录上调。综上, DNA甲基化动态对植物重金属的响应随物种和金属离子而异。

3.2.5 其他非生物胁迫

已知ROS1是一种DNA修复蛋白, 通过启动子DNA去甲基化、抑制同源依赖的转录基因沉默, 并发现拟南芥 $ROS1$ 突变体对基因毒性药物甲基甲磺酸盐和过氧化氢的敏感性增强(Gong等2003)。已发现植物缺氮可改变DNA甲基化水平, 如水稻(Kou等2011)和羊草(*Leymus chinensis*) (Yu等2013b)。玉米中一个低能氮离子(N^+)植入引起转座子Mutator元件(MuDR)的甲基化水平降低, 从而增加 $mudrA$ 和 $mudrB$ 的表达量(Qian等2010)。同样地, 拟南芥遭遇磷饥饿, DNA甲基化也是其重要的调节方式之一(Yong-Villalobos等2015)。水稻遭遇除草剂处理后观察到全基因组水平的DNA甲基化动态(Lu等2016)。拟南芥EFFECTOR OF TRANSCRIPTION (ET)功能的丧失不仅能导致多效性发育缺陷, 而且 et 突变体花和幼苗的DNA甲基化特异性差异表达基因和其特异性差异甲基化区域具有各自的特点, 而且通过DNA修复影响了紫外线应激反应(Tedeschi等2019)。在缺氧和再氧化恢复条件下, 水稻种子萌发和胚芽鞘发育过程也观察到DNA甲基化动态(Narsai等2017)。

4 DNA甲基化在响应逆境中的动态调节机制

植物细胞核内, 在RNA依赖的RNA聚合酶的作用下, 可使单链RNA形成双链RNA或插入重复序列的转录产物, 形成双链RNA, 随后在Dicer-like 3 (DCL3)的作用下, 这些较长的双链RNA (double-stranded RNA, dsRNA)被加工成24nt-siRNA, 再通过作用于不同基因序列的甲基转移酶, 导致基

因发生DNA甲基化。植物DNA的甲基化和与之拮抗的去甲基化, 共同决定了基因组总的甲基化水平及其分布模式, 对维持正常的基因转录和基因组稳定性至关重要。一个特定的DNA甲基化状态是由从头甲基化、甲基化维持以及去甲基化的动态调控所实现的, 这些过程受到多个酶的催化, 并且受到不同调控通路的调控(Zhang等2018a) (图1)。

4.1 RNA介导的DNA甲基化(RNA directed DNA methylation, RdDM)的建立

从头甲基化即在DNA复制后的新生链中, DNA甲基化酶在没有甲基化修饰的位点上重新催化DNA甲基化。RdDM途经是DNA甲基化动态的第一个关键通路(Matzke等2015)。典型的RdDM通路主要包括24nt siRNAs的生物发生(需要Pol IV、RDR2和DCL3组分参与)以及从头甲基化(需要依赖Pol V的支架RNA、ago4结合的24nt-siRNAs和从头开始的DNA甲基转移酶的参与)等2个关键步骤。除此之外, 植物还存在涉及Pol II-RDR6-DCL2/4的非典型通路, 它依赖21~22 nt-siRNAs连接转录后和转录基因沉默通路。RdDM是通过Pol IV依赖的小干扰作用, 靶向于基因组的特定区域, 即与靶区Pol V转录的支架RNA相互作用的RNA位点。通过分析了苔藓植物、石松植物、单核植物、裸子植物和被子植物的蛋白质组、小RNA以及核糖体DNA中的胞嘧啶甲基化, 发现被子植物是陆生植物中唯一存在于RdDM途径关键基因的物种(Ma等2015)。ALY1编码RNA结合核输出蛋白, 拟南芥ALY蛋白通过特异性RdDM途经中ARGO6和Pol V活性的调节, 参与输出mRNA (Choudury等2019)。Pol IV通过SAWADEE同源域被招募到目标基因座蛋白(SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1, SHH1), 一种锯齿状结构域蛋白, 通过其Tudor结构域识别未甲基化的H3K4和甲基化的H3K9。SUVH2和SUVH9通过结合已甲基化的CG二核苷酸的SRA (SET and RING finger-associated)结构域, 增强了Pol V对含有已存在DNA甲基化位点的再募集。一些RdDM的靶标还与部分沉默的抑制因子ROS1重叠, ROS1具有DNA糖基化水解酶活性, 它作用于DNA沉默激活子复合物AGOs的主动去甲基化。这

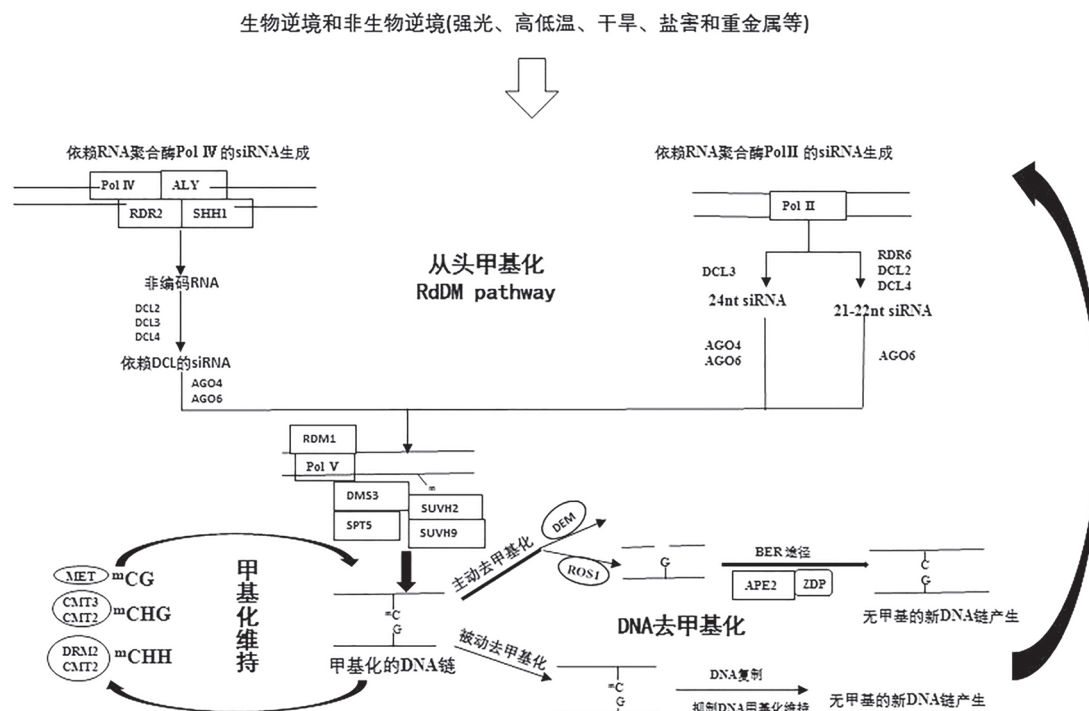


图1 植物DNA甲基化响应逆境的动态调节图

Fig. 1 Dynamics and regulation of DNA methylation in plants under different stress

部分参考自Zhang等(2018a)一文。BER: 碱基切除修复(base excision repair)途径。

些专一的组分包括Snf2染色质重塑相关基因亚家族(DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1, DRD1)的成员, 这些元件对Pol IV和Pol V的转录是必要的。此外, Pol V功能需要一些特异DNA修复蛋白, 如RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1 (RDM1)、DEFECTIVE IN MERISTEMSILENCING 3 (DMS3)、SUPPRESSOR OF TY INSERTION 5-LIKE (SPT5L)和microRNA-CHD1A C (MORC), 这些蛋白在开花植物中高度发达, 可能在开花植物发挥特殊的作用。虽然已经对RdDM途径及其主要元件有了基本的认识, 但是其精细途径十分复杂, 这些认识也多来自模式植物拟南芥的证据, 该途径是否在植物中普遍存在, 还缺乏更多的证据。未来还需要对启动RNA及其核酸配对元件的性质持开放态度, 尤其在RdDM不同位点中的Pol II和Pol V以及在siRNA介导的基因沉默或其他途径的Pol IV和Pol V, 均会有更多替代元件出现, 来丰富对该过程的认识(Castellano等2015)。

4.2 DNA甲基化的维持

植物DNA甲基化维持决定于胞嘧啶的序列以及其对应的DNA甲基化酶。RdDM途径可改变RNA-DNA中几乎所有的胞嘧啶(CG、CHG和CHH, 其中H可为A、T或者C)序列。植物中鉴定到3类结构不同的胞嘧啶甲基转移酶, 分别是甲基转移酶(methyltransferase 1, MET1)、染色质甲基化酶(chromomethylase 3, CMT3)及结构域重排甲基转移酶(domains rearranged methylase, DRM) (李青芝等2014), 其中MET1主要参与对称CpG胞嘧啶甲基化的维持(Lindroth等2001); 植物特有的CMT3主要对着丝粒附近重复区和转座子序列的非对称CpNpG进行甲基化(Lindroth等2001; Tompa等2002); 不对称甲基化的维持也可能受到MET1和CMT3的影响, 因为SUVH2和SUVH9可以识别MET1依赖的甲基化, 从而在一些RdDM位点上招募POL V, 并且由于CMT3依赖的CHG甲基化增加了H3K9me2水平, 从而促进了CMT2催化的非CG甲基化。DRM甲基化酶

主要催化非对称位点CpNpN的从头甲基化(Cao和Jacobsen 2002), 包括DRM1和DRM2 (Zhu 2008)。CMT3与组蛋白甲基转移酶[SU(VAR)3-9HOMOLOG4, SUVH4]家族成员协同工作, 在H3K9上维持组蛋白H₃的甲基化, 这是受抑制染色质的标志(Du等2014)。CMT2在含有组蛋白H₁的异染色质上催化CHH甲基化, 抑制RdDM, 并受染色质重组蛋白DDM1影响, DDM1在对称胞嘧啶序列中维持DNA甲基化也是必需的。

4.3 DNA去甲基化

缺乏DNA甲基化酶以及甲基化供体则导致DNA去甲基化, DNA去甲基化即已经发生甲基化的胞嘧啶脱去甲基恢复到初始状态的过程。去甲基化分主动和被动两种形式, 被动去甲基化抑制了DNA复制后从头甲基化和对称位点的甲基化维持; 而植物中主动去甲基化是通过一个双功能糖基化酶和裂解酶直接将甲基化胞嘧啶从DNA上碱基切除修复(base excision repair, BER)途径来实现的(Morales-Ruiz等2006)。在拟南芥中已发现了4种双功能的DNA糖基化酶, 分别为ROS1、DME1 (TRANSCRIPTION ALACTIVATOR DEMETER)以及DML2 (DEM-ETER-LIKE PROTEIN)和DML3等去甲基酶(Gong等2003; Ortega-Galisteo等2008)。拟南芥ROS1/DEMETER家族的m5C DNA糖基化酶是真核生物中第一个遗传特征的DNA去甲基化酶(Gong等2003), ROS1优先靶向转座子和基因间区域。水稻中也鉴定了ROS1同系物DNA GLYCOSYLASE/LYASE 701影响反转座子Tos17的换位(Tang等2016)。在拟南芥中APURINIC/APYRIMIDINIC ENDONUCLEASE2 (APE2)与ZINC FINGER DNA (ZDP)在主动DNA去甲基化和DNA损伤修复中发挥重叠作用(Li等2018)。在m5C切除期间, DME分别通过连续的 β -和 δ -消除产生3-磷酸- α,β -不饱和醛和3-磷酸末端, 不同功能的拟南芥APURINIC/APYRIMIDINIC SITE LYASE (APE1L)、APE2和ARP参与这些核苷酸延伸(Lee等2014)。研究进一步发现ZDP和ROS1在体外相互作用, 并在体内共定位于核质位点中, 在主动DNA去甲基化途径的一个分支中, ZDP在ROS1的下游起作用(Martínez-Macías等2012)。拟南芥中DNA去甲基

化的调节因子IDM1在缺乏组蛋白H3K4二甲基化或三甲基化的染色质位点处, 结合甲基化DNA并乙酰化H₃, 以产生允许5-甲基胞嘧啶DNA糖基化酶起作用的染色质环境, 免于基因沉默(Qian等2012)。ROS1也作用基因附近转座子, 从而建立转座子和基因之间的边界, 以阻止转座子附近的DNA甲基化和基因沉默扩展(Tang等2016)。ROS1在基因组区域的定位是被一些抗转录蛋白复合介导, 如IDM (Lang等2015; Duan等2017)。在拟南芥中鉴定的一个细胞因子(ANTI-SILENCING 1, ASI1)蛋白具有溴相邻的同源结构域和RNA识别基序, 它通过与IBM1的内含子异染色重复元件结合, 并结合基因转录物, 以促进其3'末端多聚腺苷酸化, 确保IBM1全长转录本的正确表达(Wang等2013b)。

5 展望

在植物中, DNA甲基化功能主要有参与基因组印记、转座子和其他重复DNA序列的沉默以及内源基因表达的调节; 而且与动物不同, 在植物中, DNA甲基化状态和甲基化的变换往往能忠实地被后代继承(Akimoto等2007; Boyko和Kovalchuk 2011)。但是植物DNA甲基化机制又是非常复杂的, 因物种、基因型、组织以及作用元件而异。虽然目前已经对植物DNA甲基化有了大量系统地研究, 已经了解DNA甲基化的发生以及产生的生物学效应, 但是很多研究都来自拟南芥的研究成果。值得欣慰的是, 由于水稻基因组的复杂性质, 其不连续的异染色质和广泛分布的DNA甲基化(Li等2008), 最近又绘制了水稻籼粳亚种在基因表达、生长发育以及胁迫响应中的DNA甲基化图谱(Zhang等2018b), 与其他植物物种相比, 水稻已显示了具有不同的表观遗传调控机制和表观遗传多样性, 因此, 未来以作物为研究材料的DNA甲基化机制, 将丰富人们对植物表观遗传机制的认识; 实际上, 植物DNA甲基化动态变化并不是孤立的, 是DNA水平修改的第一步, 它与后续的基因转录、RNA以及组蛋白修饰均观察到很多密切的联系, 这些表观遗传机制是否有“cross talk”, 即内在的交互机制, 还知之甚少; 第三, 加快了解甲基化动态对发育细胞的获得性培养, 可以帮助植物加快发育, 尤其是

增强顽拗型植物物种和基因型的胚胎发生能力和全能性,可加速濒危植物的保护以及提高植物基因工程的效率;第四,植物DNA甲基化动态水平影响着植物的生长发育、响应生物和非生物逆境以及跨代遗传,加强研究控制其水平的机制,可以丰富植物应对各种外界不良环境的新策略。相信未来,通过更多科学家的关注和深入研究,通过改变植物甲基化动态水平以及其他表观遗传信息,改变基因表达,从而为创造出更多农艺性状改善作物的远大前景将不远了。

参考文献(References)

- Aina R, Sgorbati S, San tagostino A, et al (2004). Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. *Physiol Plant*, 121: 472–480
- Akimoto K, Katakami H, Kim HJ, et al (2007). Epigenetic inheritance in rice plants. *Ann Bot*, 100: 205–217
- Al-Lawati A, Al-Bahry S, Victor R, et al (2016). Salt stress alters DNA methylation levels in alfalfa (*Medicago* spp.). *Genet Mol Res*, 15: 15018299
- Baek D, Jiang JF, Chung JS, et al (2010). Regulated AtHKT1 gene expression by a distal enhancer element and DNA methylation in the promoter plays an important role in salt tolerance. *Plant Cell Physiol*, 52: 149–161
- Bewick AJ, Schmitz RJ (2017). Gene body DNA methylation in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 36: 103–110
- Bharti P, Mahajan M, Vishwakarma AK, et al (2015). *AtROS1* overexpression provides evidence for epigenetic regulation of genes encoding enzymes of flavonoid biosynthesis and antioxidant pathways during salt stress in transgenic tobacco. *J Exp Bot*, 66: 5959–5969
- Bian XY, Rasheed MS, Seemanpillai MJ, et al (2006). Analysis of silencing escape of tomato leaf curl virus: an evaluation of the role of DNA methylation. *Mol Plant Microbe In*, 19: 614–624
- Bocchini M, Bartucca ML, Ciancaleoni S, et al (2015). Iron deficiency in barley plants: phytosiderophore release, iron translocation, and DNA methylation. *Front Plant Sci*, 6: 514
- Boyko A, Kovalchuk I (2011). Genome instability and epigenetic modification-heritable responses to environmental stress? *Curr Opin Plant Biol*, 14: 260–266
- Cao XF, Jacobsen SE (2002). Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in *de novo* DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol*, 12: 1138–1144
- Castellano M, Martinez G, Pallás V, et al (2015). Alterations in host DNA methylation in response to constitutive expression of Hop stunt viroid RNA in *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant Pathol*, 64: 1247–1257
- Cheng XL, Zhang SX, Tao WC, et al (2018). INDETERMINATE SPIKELET 1 recruits histone deacetylase and a transcriptional repression complex to regulate rice salt tolerance. *Plant Physiol*, 178: 824–837
- Chinnusamy V, Zhu JK (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 133–139
- Choudury SG, Shahid S, Cuerda-Gil D, et al (2019). The RNA export factor ALY1 enables genome-wide RNA-directed DNA methylation. *Plant Cell*, 31: 759–774
- Chwialkowska K, Nowakowska U, Mroziejewicz A, et al (2016). Water-deficiency conditions differently modulate the methylome of roots and leaves in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot*, 67: 1109–1121
- Correia B, Valledor L, Mónica M, et al (2013). Is the interplay between epigenetic markers related to the acclimation of cork oak plants to high temperatures? *PLOS One*, 8: e53543
- Dhar MK, Vishal P, Sharma R, et al (2014). Epigenetic dynamics: role of epimarks and underlying machinery in plants exposed to abiotic stress. *Int J Genomics*, doi: 10.1155/2014/187146
- Ding B, Bellizzi M del R, Ning YS, et al (2012). HDT701, a histone H₄ deacetylase, negatively regulates plant innate immunity by modulating histone H₄ acetylation of defense-related genes in rice. *Plant Cell*, 24: 3783–3794
- Ding HP, Gao J, Qin C, et al (2014). The dynamics of DNA methylation in maize roots under Pb stress. *Int J Mol Sci*, 15: 23537–23554
- Downen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, et al (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: E2183–E2191
- Du JM, Johnson LM, Groth M, et al (2014). Mechanism of DNA methylation-directed histone methylation by KRYPTONITE. *Mol Cell*, 55: 495–504
- Du KX, Shen WH, Dong AW (2018). Advances in epigenetic regulation of abiotic stress response in plants. *Chin Bull Bot*, 53: 581–593 (in Chinese with English abstract) [杜康兮, 沈文辉, 董爱武(2018). 表观遗传调控植物响应非生物胁迫的研究进展. *植物学报*, 53: 581–593]
- Duan CG, Wang XG, Xie SJ, et al (2017). A pair of transposon-derived proteins function in a histone acetyltransferase complex for active DNA demethylation. *Cell Res*, 27: 226–240
- Fang H, Liu X, Thorn G, et al (2014). Expression analysis of histone acetyltransferases in rice under drought stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 443: 400–405
- Ferreira LJ, Azevedo V, Maroco J, et al (2015). Salt tolerant

- and sensitive rice varieties display differential methylome flexibility under salt stress. *PLOS One*, 10: e0124060
- Ge CL, Yang XY, Liu XN, et al (2002). Effect of heavy metal stress on levels of methylation in DNA of crop. *Agro-environ Protect*, 21: 301–305 (in Chinese with English abstract) [葛才林, 杨小勇, 刘向农等(2002). 重金属胁迫对作物DNA胞嘧啶甲基化的影响. *农业环境保护*, 21: 301–305]
- Geng SF, Kong XC, Song GY, et al (2019). DNA methylation dynamics during the interaction of wheat progenitor *Aegilops tauschii* with the obligate biotrophic fungus *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *New Phytol*, 221, DOI: 10.1111/nph.15432
- Gohlke J, Scholz CJ, Kneitz S, et al (2013). DNA methylation mediated control of gene expression is critical for development of crown gall tumors. *PLOS Genet*, 9: e1003267
- Gong ZZ, Morales-Ruiz T, Ariza RR, et al (2003). *ROSI*, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*, 111: 803–814
- González RM, Ricardi MM, Iusem ND (2011). Atypical epigenetic mark in an atypical location: cytosine methylation at asymmetric (CNN) sites within the body of a non-repetitive tomato gene. *BMC Plant Biol*, 11: 94
- Grativol C, Hemerly AS, Ferreira PCC (2012). Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Biochim Biophys Acta*, 1819: 176–185
- Hashida SN, Uchiyama T, Martin C, et al (2006). The temperature dependent change in methylation of the *Antirrhinum transposon Tam3* is controlled by the activity of its transposase. *Plant Cell*, 18: 104–118
- Hewezi T, Lane T, Piya S, et al (2017). Cyst nematode parasitism induces dynamic changes in the root epigenome. *Plant Physiol*, 174: 405–420
- Johnson TB, Coghill RD (1925). The discovery of 5-methylcytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus. *J Am Chem Soc*, 11: 2838–2844
- Kanazawa A, Inaba JI, Shimura H, et al (2011). Virus mediated efficient induction of epigenetic modifications of 5 endogenous genes with phenotypic changes in plants. *Plant J*, 65: 156–168
- Karan R, DeLeon T, Biradar H, et al (2012). Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. *PLOS One*, 7: e40203.
- Kou HP, Li Y, Song XX, et al (2011). Heritable alteration in DNA methylation induced by nitrogen-deficiency stress accompanies enhanced tolerance by progenies to the stress in rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Physiol*, 168: 1685–1690
- Kovářik A, Koukalová B, Bezděk M, et al (1997). Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. *Theor Appl Genet*, 95: 301–306
- Labra M, Ghiani A, Citterio S, et al (2002). Analysis of cytosine methylation pattern in response to water deficit in Pea root tips. *Plant Biol*, 4: 694–699
- Labra M, Grassi F, Imazio S, et al (2004). Genetic and DNA-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L. *Chemosphere*, 54: 1049–1058
- Lang ZB, Lei MG, Wang X, et al (2015). The methyl-CpG-binding protein MBD7 facilitates active DNA demethylation to limit DNA hyper-methylation and transcriptional gene silencing. *Mol Cell*, 57: 971–983
- Lechat MM, Brun G, Montiel G, et al (2015). Seed response to strigolactone is controlled by abscisic acid-independent DNA methylation in the obligate root parasitic plant, *Phelipanche ramosa* L. Pomel. *J Exp Bot*, 66: 3129–3140
- Lee J, Jang H, Shin H, et al (2014). AP endonucleases process 5-methylcytosine excision intermediates during active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res*, 42: 11408–11418
- Li JC, Liang WJ, Li Y, et al (2018). APURINIC/APYRIMIDINIC ENDONUCLEASE2 and ZINC FINGER DNA 3'-PHOSPHOESTERASE play overlapping roles in the maintenance of epigenome and genome stability. *Plant Cell*, 30: 1954–1970
- Li LH, Yi HL, Wang YW, et al (1999). Sulfur dioxide induces DNA methylation alteration of a gene encoding nitrilase 2 protein in *Arabidopsis* plants. *J Agro-Environ Sci*, 31 (4): 685–690 (in Chinese with English abstract) [李利红, 仪慧兰, 王艺雯等(2012). 二氧化硫胁迫诱导拟南芥 NIT2基因DNA甲基化修饰. *农业环境科学学报*, 31 (4): 685–690]
- Li QZ, Li CW, Yang TW (2014). Stress response and memory mediated by DNA methylation in plants. *Plant Physiol J*, 50: 725–734 (in Chinese with English abstract) [李青芝, 李成伟, 杨同文(2014). DNA甲基化介导的植物逆境应答和胁迫记忆. *植物生理学报*, 50: 725–734]
- Li X, Zhu JD, Hu FY, et al (2012). Single-base resolution maps of cultivated and wild rice methylomes and regulatory roles of DNA methylation in plant gene expression. *BMC Genomics*, 13: 300
- Li XL, Lin ZX, Nie YC, et al (2009) MSAP analysis of epigenetic changes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under salt stress. *Acta Agron Sin*, 35 (4): 588–596 (in Chinese with English abstract) [李雪林, 林忠旭, 聂以春等(2009). 盐胁迫下棉花基因组DNA表观遗传变化的MSAP分析. *作物学报*, 35 (4): 588–596]
- Li XY, Wang XF, He K, et al (2008). High-resolution mapping of epigenetic modifications of the rice genome uncovers interplay between DNA methylation, histone methylation,

- and gene expression. *Plant Cell*, 20: 259–276
- Lindroth AM, Cao X, Jackson JP, et al (2001). Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, 292: 2077–2080
- Liu TK, Li Y, Duan WK, et al (2017). Cold acclimation alters DNA methylation patterns and confers tolerance to heat and increases growth rate in *Brassica rapa*. *J Exp Bot*, 68: 1213–1224
- Lu XK, Shu N, Wang JJ, et al (2017). Genome-wide analysis of salinity-stress induced DNA methylation alterations in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using the Me-DIP sequencing technology. *Genet Mol Res*, 16: 1–16
- Lu YC, Feng SJ, Zhang JJ, et al (2016). Genome-wide identification of DNA methylation provides insights into the association of gene expression in rice exposed to pesticide atrazine. *Sci Rep*, 6: 18985
- Luo W (2011). The analysis of DNA methylation level during regeneration of transgenic birch (dissertation). Harbin: Northeast Forestry University (in Chinese with English abstract) [骆薇(2011). 转基因白桦微繁殖过程中DNA甲基化的变异机制(学位论文). 哈尔滨: 东北林业大学]
- Ma L, Hatlen A, Kelly LJ, et al (2015). Angiosperms are unique among land plant lineages in the occurrence of key genes in the RNA-directed DNA Methylation (RdDM) pathway. *Genome Biol Evol*, 7: 2648–2662
- Ma YZ, Min L, Wang MJ, et al (2018). Disrupted genome methylation in response to high temperature has distinct effects on microspore abortion and anther indehiscence. *Plant Cell*, 30: 1387–1403
- Martínez-Macías MI, Qian WQ, Miki D, et al (2012). A DNA 3' phosphatase functions in active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, 45: 357–370
- Martins GS, Freitas NC, Máximo WPF, et al (2018). Gene expression in two contrasting hybrid clones of *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* grown under water deficit conditions. *J Plant Physiol*, 229: 122–131
- Matzke MA, Kanno T, Matzke AJM (2015). RNA-directed DNA methylation: the evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plants. *Annu Rev Plant Biol*, 66: 243–267
- Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo AP, Ponferrada-Marin MI, et al (2006). DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 6853–6858
- Muthamilarasan M, Prasad M (2013). Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *J Biosciences*, 38: 433–449
- Nagy Mihály M, Veluchamy A, Györgypál Z, et al (2017). Ploidy-dependent changes in the epigenome of symbiotic cells correlate with specific patterns of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114: 4543–4548
- Narsai R, Secco D, Schultz MD, et al (2017). Dynamic and rapid changes in the transcriptome and epigenome during germination and in developing rice (*Oryza sativa*) coleoptiles under anoxia and re-oxygenation. *Plant J*, 89: 805–824
- Naydenov M, Baev V, Apostolova E, et al (2015). High-temperature effect on genes engaged in DNA methylation and affected by DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem*, 87: 102–108
- Ortega-Galisteo AP, Morales-Ruiz T, Ariza RR, et al (2008). *Arabidopsis* DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol Biol*, 67: 671–681
- Pan YJ, Fu BY, Wang D, et al (2009). Spatial and temporal profiling of DNA methylation induced by drought stress in rice. *Sci Agric Sin*, 42: 3009–3018 (in Chinese with English abstract) [潘雅姣, 傅彬英, 王迪等(2009). 水稻干旱胁迫诱导DNA甲基化时空变化特征分析. 中国农业科学, 42: 3009–3018]
- Qian WQ, Miki D, Zhang H, et al (2012). A histone acetyltransferase regulates active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Science*, 336: 1445–1448
- Qian YX, Cheng X, Liu Y, et al (2010). Reactivation of a silenced minimal mutator transposable element system following low-energy nitrogen ion implantation in maize. *Plant Cell Rep*, 29: 1365–1376
- Rai KK, Rai N, Rai SP (2018). Salicylic acid and nitric oxide alleviate high temperature induced oxidative damage in *Lablab purpureus* L plants by regulating bio-physical processes and DNA methylation. *Plant Physiol Biochem*, 128: 72–88
- Rambani A, Rice JH, Liu JY, et al (2015). The methylome of soybean roots during the compatible interaction with the soybean Cyst nematode. *Plant Physiol*, 168: 1364–1377
- Sabbah S, Raise M, Tal M (1995). Methylation of DNA in NaCl adapted cells of potato. *Plant Cell Rep*, 14: 467–470
- Sánchez AL, Stassen JHM, Furci L, et al (2016). The role of DNA (de)methylation in immune responsiveness of *Arabidopsis*. *Plant J*, 88: 361–374
- Satgé C, Moreau S, Sallet E, et al (2016). Reprogramming of DNA methylation is critical for nodule development in *Medicago truncatula*. *Nat Plants*, 2: 16166
- Shaik R, Ramakrishna W (2012). Bioinformatic analysis of epigenetic and micro RNA mediated regulation of drought responsive genes in rice. *PLOS One*, 7: e49331
- Shi P, Wang Y, Jin LF, et al (2019). Research progress on DNA methylation during plant tissue culture. *Chin J Trop Crops*, 40: 199–207 (in Chinese with English abstract) [石鹏, 王永, 金龙飞等(2019). 植物组织培养过程中的

- DNA甲基化研究进展. 热带作物学报, 40: 199–207]
- Stelpflug SC, Eichten SR, Hermanson PJ, et al (2014). Consistent and heritable alterations of DNA methylation are induced by tissue culture in maize. *Genetics*, 198: 209–218
- Steward N, Ito M, Yamaguchi Y, et al (2002). Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *J Biol Chem*, 277: 37741–37746
- Steward N, Kusano T, Sano H (2000). Expression of Zm-MET1, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells. *Nuc Acids Res*, 28: 3250–3259
- Suji KK, Joel AJ (2010). An epigenetic change in rice cultivars under water stress conditions. *Electron J Plant Breed*, 1: 1142–1143
- Tang K, Lang ZB, Zhang H, et al (2016). The DNA demethylase ROS1 targets genomic regions with distinct chromatin modifications. *Nat Plants*, 2: 16169
- Tedeschi F, Rizzo P, Huong BTM, et al (2019). EFFECTOR OF TRANSCRIPTION factors are novel plant-specific regulators associated with genomic DNA methylation in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 221: 261–278
- Tompa R, McCallum CM, Delrow J, et al (2002). Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE3. *Curr Biol*, 12: 65–68
- Vanyushin BF, Ashapkin VV (2011). DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochim Biophys Acta*, 1809: 360–368
- Varga S, Soulsbury CD (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi change host plant DNA methylation systemically. *Plant Biol*, 21: 278–283
- Wang F, Shi R, Wang J (2013). Genetic variation of DNA Methylation in potato shoot tips after the cryopreservation by vitrification approach. *Mol Plant Breed*, 11: 351–357 (in Chinese with English abstract) [王芳, 石茹, 王舰(2013). 马铃薯茎尖玻璃化法超低温保存后DNA甲基化的遗传变异. 分子植物育种, 11: 351–357]
- Wang WS, Huang F, Qin Q, et al (2015). Comparative analysis of DNA methylation changes in two rice genotypes under salt stress and subsequent recovery. *Biochem Biophys Res Commun*, 465: 790–796
- Wang WS, Pan YJ, Zhao XQ, et al (2011). Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot*, 62: 1951–1960
- Wang XG, Duan CG, Tang K, et al (2013b). RNA-binding protein regulates plant DNA methylation by controlling mRNA processing at the intronic heterochromatin-containing gene IBM1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 15467–15472
- Wang YS, An CF, Zhang XD, et al (2013a). The Arabidopsis elongator complex subunit 2 epigenetically regulates plant immune responses. *Plant Cell*, 25: 762–776
- Wibowo A, Becker C, Marconi G, et al (2016). Hyperosmotic stress memory in *Arabidopsis* is mediated by distinct epigenetically labile sites in the genome and is restricted in the male germline by DNA glycosylase activity. *eLife*, 5: e13546
- Williams BP, Gehring M (2017). Stable transgenerational epigenetic inheritance requires a DNA methylation-sensing circuit. *Nat Commun*, 8: 2124
- Wu CT, Morris JR (2001). Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*, 293: 1103–1105
- Xu JD, Wang X, Cao HB, et al (2017). Dynamic changes in methylome and transcriptome patterns in response to methyltransferase inhibitor 5-azacytidine treatment in citrus. *DNA Res*, 24: 509–522
- Xu R, Wang YH, Zheng H, et al (2015). Salt-induced transcription factor MYB74 is regulated by the RNA-directed DNA methylation pathway in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 66: 5997–6008
- Yadav RK, Chattopadhyay D (2011). Enhanced viral intergenic region-specific short interfering RNA accumulation and DNA methylation correlates with resistance against a geminivirus. *Mol Plant Microbe In*, 24: 1189–1197
- Yaish MW, Al-Lawati A, Al-Harrasi I, et al (2018). Genome-wide DNA Methylation analysis in response to salinity in the model plant caliph medic (*Medicago truncatula*). *BMC Genomics*, 19: 78
- Yan HH, Kikuchi S, Neumann P, et al (2010). Genome-wide mapping of cytosine methylation revealed dynamic DNA methylation patterns associated with genes and centromeres in rice. *Plant J*, 63: 353–365
- Yang JL, Liu LW, Gong YQ, et al (2007). Analysis of genomic DNA methylation level in radish under cadmium stress by methylation-sensitive amplified polymorphism technique. *J Plant Physiol Mol Biol*, 33: 219–226 (in Chinese with English abstract) [杨金兰, 柳李旺, 龚义勤等(2007). 镉胁迫下萝卜基因组DNA甲基化敏感扩增多态性分析. 植物生理与分子生物学报, 33: 219–226]
- Yong-Villalobos L, González-Morales SI, Wrobel K, et al (2015). Methylome analysis reveals an important role for epigenetic changes in the regulation of the *Arabidopsis* response to phosphate starvation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112: E7293–E7302
- Yu A, Lepère G, Jay F, et al (2013a). Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in *Arabidopsis* antibacterial defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 2389–2394

- Yu YJ, Yang XJ, Wang HY, et al (2013b). Cytosine methylation alteration in natural populations of *Leymus chinensis* induced by multiple abiotic stresses. PLOS One, 8: e55772
- Zhang B, Tieman DM, Jiao C, et al (2016b). Chilling- induced tomato flavor loss is associated with altered volatile synthesis and transient changes in DNA methylation. Proc Natl Acad Sci USA, 113: 15580–12585
- Zhang HM, Lang ZB, Zhu JK (2018a). Dynamics and function of DNA methylation in plants. Nat Rev Mol Cell Biol, 19: 489–506
- Zhang HT, Tao Z, Hong HM, et al (2016a). Transposon-derived small RNA is responsible for modified function of WRKY45 locus. Nat Plants, 2: 16016
- Zhang Q, Liang Z, Cui XA, et al (2018b). N⁶-methyladenine DNA methylation in Japonica and Indica rice genomes and its association with gene expression, plant development and stress responses. Mol Plant, DOI: 10.1016/j.molp.2018.11.005
- Zhao JH, Zhang JX, Zhang W (2014). Expression and functional analysis of the plant-specific histone deacetylase HDT701 in rice. Front Plant Sci, 5: 764
- Zhu JK (2008). Epigenome sequencing comes of age. Cell, 133: 395–397
- Zhu N, Cheng SF, Liu XY, et al (2015). The R2R3-type MYB gene OsMYB91 has a function in coordinating plant growth and salt stress tolerance in rice. Plant Sci, 236: 146–156
- Zilberman D, Gehring M, Tran RK, et al (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an inter dependence between methylation and transcription. Nat Genet, 39: 61–69