

## 综述 Reviews

## 植物DNA甲基化研究进展

李娜, 张旻, 解莉楠, 李玉花\*

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

**摘要:** DNA甲基化是一种重要的表观遗传修饰方式, 强烈地影响植物染色质结构和基因的表达, 因此植物DNA甲基化的研究对植物生长发育及进化过程的研究发展起着重要作用。本文概述了植物DNA甲基化的特征, 并对植物DNA甲基化的发生机制、生物学功能、检测分析方法等方面进行了综述, 旨在深入了解DNA甲基化对植物的影响。

**关键词:** DNA甲基化; RdDM; 基因调控; 植物发育; 检测方法

## Research Progress in DNA Methylation in Plants

LI Na, ZHANG Yang, XIE Li-Nan, LI Yu-Hua\*

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** DNA methylation is an important epigenetic modification, affecting chromatin structure and gene expression in plants. The research of DNA methylation is essential to plant development and evolution. This paper summarizes DNA methylation characteristics, related mechanism (RNA-dependent DNA methylation, RdDM), biological functions and detection methods in order to understand DNA methylation in plants.

**Key words:** DNA methylation; RdDM; gene regulation; plant development; detection methods

DNA甲基化是基因组DNA的一种重要表观遗传方式, 是在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的催化下, 以S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)为甲基供体, 将甲基转移到特定的碱基上的过程。DNA甲基化现象广泛存在于细菌、植物和动物中, 参与生物体的多种生物学过程。DNA甲基化在植物中具有物种、组织、器官、年龄特异性, 参与遗传功能的调控, 包括转录、复制、DNA修复、转基因和细胞分化, 在植物生长发育及进化过程中起着重要的调节作用。本文就植物DNA甲基化特征、发生机制、生物学功能及检测方法进行综述。

## 1 植物DNA甲基化及甲基转移酶

在植物中, DNA甲基化主要发生在对称序列CG中, 在CHG和CHH (H=A、C或T)序列中也有发生, 异染色质区域的DNA甲基化程度较高, 如着丝粒和中心体周围区域, 而大多数启动子区域甲基化程度较低。和动物的DNA甲基化比例(约3%~8%)相比, 植物具有较高的甲基化水平(6%~30%)。植物DNA甲基化方式有2种: 一种是维持甲基化(maintenance methylation), 即双链DNA

的其中一条链已存在甲基化, 另一条未甲基化的链被甲基化, 维持甲基化通过半保留复制将亲代的甲基化模式传递给子代; 另一种是从头甲基化(*de novo* methylation), 即两条链均未甲基化的DNA被甲基化, 这种方式不依赖于DNA复制, 是由不同的DNA甲基转移酶催化完成的。Jullien等人(2012)在对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)有性生殖过程中的DNA甲基化动态变化进行研究时发现, 在雌配子发生过程中, 维持甲基化方式几乎不发生, 而受精后在胚胎中从头甲基化与维持甲基化明显发生, 并且维持一定甲基化水平直到成株, 这种DNA甲基化动态变化周期对于拟南芥的繁殖具有一定意义。

植物DNA甲基化的发生和维持主要依赖于4种在结构和功能上不同的胞嘧啶甲基转移酶。第一种是维持DNA甲基转移酶(methyltransferase 1, MET1)家族, 在甲基转移酶中占统治地位, 主要功能是维持对称序列CG位点的甲基化, 最近研究发

收稿 2012-08-22 修定 2012-11-02

资助 中央高校基本科研业务费专项资金(DL09BA18)。

\* 通讯作者(E-mail: lyhshen@126.com; Tel: 0451-82191783)。

现在某些位点MET1也具有从头甲基化活性,可以使丢失的甲基化重新被甲基化,而且发生重新甲基化的CG位点是随机的,这有助于稳定植物体内甲基化水平,并提高甲基化模式的多样性(Zubko等2012)。第二种是结构域重排甲基转移酶(domains rearranged methyltransferase, DRM)家族,主要功能是从头甲基化,其在非对称CHH位点的甲基化作用最为突出。第三种是染色质甲基化酶(chromomethylase, CMT)家族,该类酶为植物所特有,负责维持CHG位点的甲基化,对维持基因组异染色质状态起一定作用。此外,在植物中还存在第四种甲基转移酶,如玉米(*Zea mays*)中的DMT104、拟南芥中的DMT11,它们可能是DNMT2 (DNA methyltransferase 2)家族的同系物,虽然它们在不少植物中是保守的,但其功能目前还不清楚(Goodrich和Tweedie 2002)。现今,已经从拟南芥、水稻(*Oryza sativa*)、胡萝卜(*Daucus carota*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、玉米、番茄(*Lycopersicon esculentum*)等多种植物中分离到各种DNA甲基转移酶编码基因。

综上所述,植物在发育过程中根据细胞内基因表达的需要,依赖于各种DNA甲基转移酶发生从头甲基化,而这种甲基化模式一旦建立,就可以通过复制过程,在维持甲基转移酶的作用下将新的DNA甲基化信息传递给子细胞,完成维持甲基化过程。

## 2 植物DNA甲基化的发生机制

在过去的数十年中,DNA甲基化的发生机制已深入研究,目前对在拟南芥中由RNA介导的DNA甲基化(RNA-dependent DNA methylation, RdDM)这一发生机制研究最为透彻。RdDM现象首次在受到类病毒感染的植物中发现(Wassenegge等1994),被认为是植物基因转录沉默的主要机制,参与多种表观遗传现象,如基因沉默、转座子抑制、基因组印记和副突变(Xie等2004; Herr等2005; Zaratiegui等2007)。在RdDM过程中,所产生的dsRNA (double-stranded RNA)和siRNA (small interfering RNA)给DNA甲基转移酶提供一种甲基化的信号,DNA甲基转移酶在接收到信号后作用于DNA靶位点上,建立起一种甲基化印记,然后通过DNA复制过程将这种甲基化状态传递下去。

RdDM的发生机制主要包括两个步骤:24-nt siRNAs的生物合成及siRNAs信号定位到靶DNA区域,启动从头甲基化的发生。以上两个步骤都需要RNA聚合酶IV (DNA-dependent RNA polymerase IV, PolIV)和RNA聚合酶V (DNA-dependent RNA polymerase V, PolV)的参与。作为植物所特有的RNA聚合酶,PolIV和PolV均为多亚基复合体,含有12个亚基,由RNA聚合酶II (DNA-dependent RNA polymerase II, PolII)演变而来,12个亚基一一对应。PolIV和PolV的一些亚基的结构和功能已经被鉴定分析,包括NRPD/E2、NRPD/E4、NRPE5及最大亚基NRPD/E1。但PolIV和PolV的转录调控机制并不清楚,目前研究发现,PolIV和PolV活性需要KTF1 (KOW domain-containing transcription factor 1) (Huang等2009; He等2009a)、RDM4 (RNA-directed DNA methylation 4)/DMS4 (defective in meristem silencing 4) (He等2009b; Kanno等2010)转录因子的调控。

RdDM的发生首先是24-nt siRNAs的生物合成。以基因组上反向重复的DNA序列为模板,通过PolII转录出dsRNA,dsRNA在DCL3 (dicer-like protein 3)蛋白的作用下加工出24-nt的初级siRNA。甲基化酶HEN1 (huan enhancer 1)在siRNA 3'末端进行甲基化修饰,形成成熟的siRNA, HEN1的C末端有甲基转移酶活性区域,对siRNA 3'末端进行甲基化修饰后,甲基化基因可保护成熟的siRNA 3'末端不被其他酶所识别,防止siRNA降解,提高siRNA的稳定性。而PolIV可以以甲基化了的DNA为模板进行转录,产生出异常的ssRNA (single-stranded RNA),SNF2-like染色质重塑蛋白CLSY1 (CLASSY 1)可能促进这一过程。RDR2 (RNA dependent RNA polymerase 2)将ssRNA合成为dsRNA,同样在DCL3和HEN1作用下,产生出更多的成熟siRNA,从而放大了siRNA介导的甲基化修饰效应。随后成熟的siRNA与AGO4、AGO6或AGO9 (argonaute 4/6/9)结合成siRNA-AGO沉默效应复合物,在从头甲基化酶DRM2的作用下进行从头甲基化(He等2011; Zhang和Zhu 2011; Saze等2012)。最新研究发现SHH1 (sawadee homeodomain homolog 1)是siRNAs生物合成过程中的新成员,具有一个可与DNA结合的sawadee结构域,可

能募集PolIV定位到靶DNA (Law等2011)。

研究发现多种蛋白参与RdDM发生途径, 2009年Bies-Etheve等发现衔接蛋白KTF1既可以结合PolIV的转录本, 其C端富含的WG/GW重复序列又可以结合AGO4蛋白。当siRNA与AGO4结合时, KTF1与AGO4的相互作用增强了siRNA与PolIV转录本之间的联系, siRNA与PolIV转录本之间碱基互补配对(Bies-Etheve等2009)。以上复合物结合在一起形成一个功能复杂的RdDM复合效应器, 指导甲基转移酶DRM2对RdDM靶位点进行甲基化。PolIV转录本的生成需要RDM4、DRD1 (defective in RNA-directed DNA methylation 1)、DMS3 (defective in meristem silencing 3)/IDN1 (involved in de novo 1)和RDM1 (RNA-directed DNA methylation 1)。DRD1、DMS3/IDN1和RDM1形成一个稳定的蛋白复合体(DDR), DDR募集PolIV到特定的染色质区域(Law等2010)。RDM1可以结合甲基化的单链DNA, 作为RdDM复合效应器与靶DNA之间的桥梁, 募集PolIV和PolIII到特定的染色质区域(Gao等2010)。RDM4/DMS4作为PolIII和PolIV的调控因子, 与酵母IWR1 (interacts with RNA polymerase II)具有同源性(Kanno等2010), 类比IWR1的功能我们推测RDM4/DMS4可以结合PolIII/PolIV并携带其进入细胞核, 诱导聚合酶在RdDM靶位点的活性。SGS3-like蛋白J家族的IDN2 (involved in de novo 2)/RDM12 (RNA-directed DNA methylation 12)包含XS/XH结构域, 可与dsRNA的5'突出端结合, 稳定24-nt siRNA与转录本之间的碱基配对, 在*idn2*突变体中, siRNA的积累水平几乎不受影响, 表明IDN2/RDM12在siRNA生物合成途径的下游起作用(Finke等2012); 最近新发现的调控因子FDM1 (factor of DNA methylation 1)与IDN2同源, 可同时与siRNA、靶DNA结合, 在体内通过与自身及IDN2形成同源二聚体来参与调控, 其中XH结构域对FDM1的功能是必不可少的(Xie等2012)。甲基转移酶DRM2对RdDM靶位点进行甲基化这一过程需要SUVH2/9 [su(var)3-9 homolog 2/9]的帮助, SUVH2/9具有SET和SRA结构域, 与靶DNA的胞嘧啶结合后募集DRM2对RdDM靶位点进行从头甲基化(Johnson等2008)。Lorković等(2012)最近发现一个新的RdDM调控成员DMS11 (defective in

meristem silencing 11), 具有GHKL (gyrase, Hsp90, histidine kinase, MutL) ATP酶结构域, DMS3可体外诱导DMS11的活性, 在*dms11*突变体中siRNA积累, 靶序列的甲基化修饰水平受抑制, 推测在RdDM途径中DMS11为DMS3和其他调控蛋白提供ATP酶活性, 揭示GHKL ATP酶在植物表观遗传调控中扮演一个新的角色。

RdDM发生机制的研究在拟南芥中已取得重大进展, 并逐渐被人们所认识, 但这些研究主要集中于模式植物, 普通植物的甲基化发生机制仍缺乏研究。目前对PolIV/PolIII各个亚基功能和转录调控研究并不十分透彻, 虽然已经确定了一些参与RdDM途径的调控蛋白, 但在RdDM途径中是否存在新的调控因子, 是否还存在其他植物DNA甲基化的发生机制等诸多问题, 还有待在今后的研究中加以解决。尽管我们对DNA甲基化的调控机制了解越来越深入, 然而读取DNA甲基化编码信息和调节下游调控机制的许多方面仍不明朗。目前有几种关于DNA甲基化对下游调控机制模型: 第一种是DNA甲基化的修饰改变染色质结构, 影响核小体的定位进而影响靶DNA的转录调控; 第二种是在转录方面提出了更加直接的影响, 认为DNA的甲基化直接阻止了转录因子与靶序列的结合; 研究最为广泛的是第三种模型, 甲基CpG结合蛋白(methyl-CpG-binding proteins, MBPs)结合到甲基化CpG位点, 与其他转录抑制因子相互作用或募集组蛋白修饰酶形成异染色质结构, 进而调控下游信号。MBPs被认为是在DNA甲基化影响基因表达方面甲基化信号翻译的主要调控者, 但是否还有其他DNA甲基化信号调控下游机制, 仍需要人们不断研究探索。

### 3 植物DNA甲基化的生物学功能

植物DNA甲基化修饰作用在基因表达、细胞分化以及生长发育过程中起着重要的调节作用, DNA甲基化模式的改变可以影响植物的花期、育性、形态等, 并在植物印记、逆境胁迫、杂种优势方面起到一定的作用。植物中DNA甲基化的生物学作用主要体现在维持基因组稳定性和基因表达调控两大方面。

#### 3.1 维持基因组稳定性

转座元件在植物界普遍存在, 转座子不合适



的插入和转录会破坏基因组的稳定。然而自发转座的现象在植物界是比较少见的,原因是植物通过DNA甲基化的方式阻止了转座子的表达,防止转座子在基因组内或基因组间“跳跃”,减少转座子移动可能带来的危害(Lisch 2009)。邓兴旺研究组以玉米为研究对象,系统分析了DNA甲基化对转座子的影响,发现转座元件区域被高度甲基化,缺少转录活性,所以DNA甲基化现象对于玉米维持基因组稳定性尤为重要(Wang等2009)。甲基化是转基因沉默的直接原因,转基因甲基化的程度与基因沉默的程度呈正相关。当外源DNA转入植物体时会成为甲基化的目标,转入基因的启动子区和编码区往往发生甲基化,影响转基因的正常表达。Boyko等(2007)研究发现,烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)侵染烟草(*Nicotiana tabacum*)后,导致烟草及其后代基因组DNA甲基化水平整体升高,但编码抗病基因LRR (leucine rich repeats)结构域的区段甲基化水平降低,同时抗病基因的重组率升高。因此,植物DNA甲基化可以抑制转座子和外源DNA的转录,降低因非等位基因间的转座和重组导致的基因座破坏,抵御外来基因的干扰,从而维持基因组稳定性。

### 3.2 调节基因表达

DNA甲基化在不同时空、不同组织之间表达的变化是植物正常生长发育所必需的。水稻的*os-drm2*突变体在营养生长和生殖生长阶段都表现异常,如矮化、分蘖数减少、抽穗延迟、完全不育(Moritoh等2012)。DNA甲基化主要通过参与植物基因表达的调控,进而调节植物的生长发育,在植物印记、生物与非生物胁迫及杂种优势方面发挥着重要作用。基因的转录与否决定了基因表达的开启和关闭,而DNA甲基化在转录过程中起到了至关重要的作用。当基因处于表达状态时甲基化水平往往很低,随着生长发育的进行需要将该基因关闭,就会在该基因的启动子或编码区发生甲基化,使基因转录受到抑制,基因失活,终止其表达;而一些处于关闭状态的基因应生长发育的需求要进行活化,开启表达,这时该基因的启动子区或编码区发生去甲基化,转录表达。北大-耶鲁联合研究中心利用高覆盖率的tiling-path芯片技术深入分析了水稻第IV和第X号染色体的DNA甲基化

(Li等2008),发现DNA甲基化通过引起染色质结构、DNA构象、DNA稳定性及DNA与蛋白质相互作用方式的改变,从而抑制转录,进而调控基因表达。

**3.2.1 植物基因组印迹** 植物基因组印迹是某些开花植物在子代中部分基因单亲表达的一种表观遗传修饰现象,具有组织和发育时间特异性,印迹基因的表达是通过DNA甲基化和组蛋白甲基化修饰、ncRNA (noncoding RNA)及RNAi (RNA interference)的调控来实现的,其中DNA甲基化是印迹过程的基础,许多印迹调控区域(imprinting control regions, ICRs)都包含差异甲基化区域(differentially methylated regions, DMRs)。胚乳是植物发生基因组印迹的主要部位,某些印迹基因具有调节胚乳细胞分裂、生长及调节养分运输的功能(Berger和Chaudhury 2009),在种子发育和萌发过程中确保胚的正常生长及种子正常萌发,此外,研究还发现印迹基因作为激素信号传递基因参与茉莉酸(jasmonic acid, JA)、乙烯(ethylene, ET)、油菜素甾醇(brassinosteroid, BR)及生长素(auxin)信号途径(Hsieh等2011; Gehring等2011)。胚乳中不同亲缘等位基因的不对称性造成择亲表达现象, DNA糖基化酶DME (DEMETER)是在中央细胞中负责DNA去甲基化的主要作用因子,去除印迹基因如拟南芥的*FIS2* (*FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2*)、*FWA* (*FLOWERING WAGENINGEN*)、*MPC* (*MATERNALLY EXPRESSED PAB C-TERMINAL*)中母源等位基因5-胞嘧啶,而父源等位基因的甲基化状态仍由甲基转移酶MET1所维持,二者的拮抗作用造成不同亲源等位基因甲基化水平的差异,导致受精后胚乳中母源等位基因表达而父源等位基因沉默。最近,Rea等(2012)研究发现组蛋白H1参与DME介导的DNA去甲基化作用,*MEA* (*MEDEA*)、*FWA*、*FIS2*的母源等位基因在H1功能缺失突变体中DNA甲基化水平明显升高,导致胚乳中*MEA*、*FWA*、*FIS2*母源等位基因表达降低。玉米印迹基因*FIE2* (*FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM 2*)为母源等位基因表达,*FIE2*父源等位基因在中央细胞或精细胞中未检测到超甲基化,但在胚乳中却发生了超甲基化(Gutiérrez-Marcos等2006),说明受精后胚乳*FIE2*父源等位基

因是通过从头甲基化获得其基因印迹的, 而从头甲基化是哺乳动物基因印迹的主要特点, 这拓宽了对植物基因印迹机制的理解。全基因组测序技术极大地推进了人们对于植物印迹基因寻找, 如受DNA甲基化调控的新印迹基因拟南芥*HDG8* (*HD-ZIP gene 8*)、*HDG9* (*HD-ZIP gene 9*)、*HDG3* (*HD-ZIP gene 3*) (Gehring等2009)编码HD-ZIP (homeodomain-leucine zipper)转录因子, 前两者为母源表达基因, 后者为父源表达基因。尽管全基因组测序技术在基因组整体水平上揭露了许多印迹基因, 但基因印迹是一个复杂的调控网络, 目前对基因印迹发生机制及印迹基因又是如何调节胚乳发育仍不清楚, 如印迹基因*AtBMI1C*的表达就是在CG DNA甲基化、RNA指导的非CG DNA甲基化及PcG (polycomb group)复合体活性三者间相互作用下进行调控的(Bratzel等2012)。Wöhrmann等(2012)对一个200 bp长的*MEA*印迹调控区域(ICRs)进行研究, 该调控区域对于*MEA*的活性和表达是必需的且在调控过程中不依赖于DME和MET1, 这暗示着在*MEA*位点还有其他调控因子参与基因印迹。因此, 基因印迹机制及印迹基因功能有待于进一步研究。

**3.2.2 生物与非生物胁迫** 植物DNA甲基化水平和状态在盐碱、重金属、干旱、低温、病原物侵染等非生物和生物胁迫条件下会发生变化, 许多受甲基化变化诱导的基因与胁迫反应有关, 因此DNA甲基化被认为是植物响应逆境胁迫的分子机制, 更为重要的是, 由胁迫引起的大部分DNA甲基化变异在世代间可稳定遗传。研究表明, 对水稻进行干旱胁迫发现水稻DNA甲基化水平升高且呈现出组织特异性, 其中根部甲基化水平升高幅度尤为明显(潘雅姣等2009)。大豆(*Glycine max*)在盐胁迫条件下有4个转录因子包括1个MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)、1个B-Zip (basic region-leucine zipper)和2个AP2/DREB家族成员的甲基化状态发生动态变化, 从而调控其在逆境下的生长代谢途径(Song等2012)。Bilichak等(2012)对盐胁迫处理拟南芥进行甲基化分析, 发现拟南芥在盐处理条件下DNA甲基化水平升高, 且这种超甲基化现象主要发生在外显子而不是内含子上, 基因组5'末端与3'末端的甲基化

状态比中央部位变化更加明显。小麦(*Triticum aestivum*)种子在响应低温胁迫时发生甲基化与去甲基化位点的变化, 且去甲基化过程占主导(陈芳等2009)。重金属胁迫对植物DNA甲基化的影响比较复杂, 有些植物表现为DNA甲基化水平升高, 有些则表现为甲基化水平降低, 如镉、铬胁迫导致油菜(*Brassica napus*)、萝卜(*Raphanus sativus*) DNA甲基化水平升高(Labm等2004; 杨金兰等2007), 而镍、镉、铬胁迫导致白三叶(*Trifolium repens*)、大麻(*Cannabis sativa*) DNA甲基化水平降低(Aina等2004), 表明不同物种中可能存在不同的基因组DNA甲基化机制来抵御重金属胁迫。在对拟南芥*nprp2*突变体的研究中发现, *nprp2*突变体对灰霉菌(*Botrytis cinerea*)和黄瓜萎蔫病菌(*Plectosphaerella cucumerina*)这两种病原物易感性增强, *nprp2*编码PolIV/PolV的第二大亚基, PolIV/PolV在RdDM途径中起重要作用, 表明RdDM参与植物免疫遗传, 为DNA甲基化调控植物抗病免疫力提供证据(López等2011)。DNA甲基化变异对胁迫响应机制目前还不十分清楚, 可能是DNA通过甲基化或去甲基化的修饰, 改变染色体的结构, 调节某些基因表达, 使植物体产生或启动对逆境胁迫的应答机制, 将毒害降低, 从而提高植物对不良环境的适应。

**3.2.3 杂种优势** 杂种优势是杂交子代在生长、成活、繁殖能力或生产性能等方面均优于双亲均值的生物界普遍存在的现象, McClintock在1975年就提出DNA甲基化可能在杂合体形成过程中发挥作用。杂种优势现象实际上就是基因表达调控的外在表现, 杂交种与亲本间不同的DNA甲基化模式可能是杂种优势表达的一个原因。Hepburn等(1991)认为自交能导致甲基化程度的逐渐积累, 而杂交能使甲基化程度得以解除或重新编排。Tsafaris和Kafka (1998)在对玉米杂交种及其亲本基因组甲基化程度分析中得出DNA甲基化有基因型、组织和发育时期特异性, 并且杂交种甲基化水平(27.4%)低于两亲本(31.4%和28.3%), 认为杂交种DNA甲基化降低使基因表达增强, 表现杂种优势。而对水稻杂交种和双亲DNA甲基化程度分析却得出相反的结果(Xiong等1999), 杂交种甲基化水平(18%)高于两亲本(均为16.3%)。对于水稻杂

交种而言, 虽然总体上甲基化程度与杂种优势不相关, 但某些特异位点上甲基化程度的改变却对杂种优势有显著效应, 有的位点上甲基化降低对杂种优势有利, 而有的位点甲基化增强对杂种优势有利, 这说明杂种优势产生过程可能与一部分基因的表达和另一部分基因的沉默有关。Shen等(2012)发现拟南芥杂交种的大部分DNA甲基化发生位点与亲本的甲基化位点不同, 并且杂交种的DNA甲基化发生区域有siRNA的存在, 这暗示着RdDM可能指导杂交种的DNA甲基化发生。目前, 杂种优势已经被广泛应用于作物生产中, 是培育高产、优质、抗病虫、耐逆优良作物品种的有效途径, 并且促进了植物的进化。

总之, DNA甲基化参与植物基因表达调控, 在植物生长发育过程中起着重要的作用。目前对DNA甲基化与春化作用、花器官形成、逆境胁迫、杂种优势、基因印记、体细胞无性系变异等方面的相关性都有了一定程度的了解, 但DNA甲基化调节基因表达的详细机制还有待于更深入的研究, 相信随着DNA甲基化检测方法的快速发展, 人们能够更好地利用DNA甲基化的生物学功能, 调节植物的生长发育, 同时对植物表观遗传学的发展也将具有深远意义。

#### 4 植物DNA甲基化检测方法

表观遗传学的研究现已成为热点, 用于检测植物DNA甲基化的方法也随之不断涌现。DNA甲基化的检测流程大体分为两个步骤: 待检测样品的前期处理及目标序列的定位和甲基化状态的检测。下面对DNA甲基化检测流程及3种常用的植物DNA甲基化检测方法加以介绍。

##### 4.1 待测样品的前期处理方法

由于DNA聚合酶无法区分甲基化及非甲基化的胞嘧啶, 所以在普通PCR过程中, 甲基胞嘧啶被胞嘧啶取代, 失去了甲基化的标志, 并且甲基基团是定位在DNA大沟上, 杂交技术也不能揭露DNA甲基化信息, 因此, 对待测的DNA样品需要进行前期的处理, 主要有以下3种预处理方法。

(1) 限制性内切酶消化法。此法是经典的DNA甲基化研究方法, 利用不同限制性内切酶对甲基化位点的敏感性差异特点, 对DNA进行酶切: 对于不存在甲基化的DNA, 甲基化敏感的限制性

内切酶在识别位点处切断DNA; 对于甲基化的DNA, 则不能切断。所使用的经典酶对是*HpaII*/*MspI*, 常用于植物mCCGG位点甲基化的检测。甲基化敏感扩增多态性法(methylation-sensitive amplified polymorphism, MSAP)就是利用同裂酶*HpaII*/*MspI*对识别序列CCGG的甲基化敏感性的不同, 产生不同的DNA切割片段, 从而揭示甲基化位点。由于该方法成本较低, 操作简便, 已被广泛应用于水稻(张勇等2009)、麻疯树(*Jatropha curcas*) (Kanchanaketu等2012)、马铃薯(*Solanum tuberosum*) (李媛媛等2012)、石莼(*Ulva reticulata*) (Gupta等2012)、野生大麦(*Hordeum brevisubulatum*) (Shan等2012)等基因组的胞嘧啶甲基化水平的研究。对4种烟草叶片的MSAP分析结果表明, 同胞系烟草之间的基因组DNA甲基化程度呈现明显差异(‘Yunyan No.2’为50.62%, ‘K326’为40.74%, ‘Yunyan 85’为44.44%, ‘Yunyan 87’为30.86%) (Fu等2012)。Cao等(2012)采用MSAP技术对耐碱盐生植物虎尾草(*Chloris virgata*)进行盐碱胁迫, 检测根部及叶片的甲基化状态, 发现盐胁迫下根部甲基化水平升高幅度(5.29%)比叶片(0.75%)大, 碱胁迫下根部甲基化水平升高幅度(14.17%)比叶片(1.26%)更加剧烈, 这暗示碱胁迫较盐胁迫更具有破坏性和复杂性, 根部DNA甲基化调控在植物耐盐碱性方面起到了重要的作用。MSAP技术的优点是无需知道被测DNA的序列信息, 可在全基因组范围检测CCGG位点的胞嘧啶甲基化水平, 且操作相对简便、易分析; 但其局限性在于不能测定非CCGG位点的甲基化, 在一定程度上低估了基因组DNA胞嘧啶甲基化水平。

(2) 亲和层析和免疫沉淀法。此法是目前最新、最简便的富集甲基化DNA的方法, 利用甲基结合域蛋白(methyl-CpG-binding domain, MBD)结合甲基化的CpG位点, 或者通过单克隆抗体特异性识别m5C来分离、富集得到甲基化DNA。其中, 免疫共沉淀结合基因芯片法(methylated DNA immunoprecipitation chip, MeDIP-chip)是免疫共沉淀法预处理DNA与基因芯片技术相结合的可快速、高通量检测整个基因组和特定位点甲基化状态的一种方法, 即利用5-甲基胞嘧啶的单克隆抗体通过免疫沉淀富集甲基化片段, 荧光标记探针后, 与



CpG岛芯片进行杂交, 检测杂交信号, 对杂交结果进行分析, 每个点的信号强度即可代表对应位点的甲基化状态。该方法已广泛应用于植物DNA甲基化检测上, 如拟南芥(Zilberman等2007)和水稻(Li等2008)的全基因组DNA甲基化分析。

(3)亚硫酸氢盐转化法。此法是目前映射甲基胞嘧啶最精确的方法, 用亚硫酸氢盐处理DNA样品, 未甲基化的胞嘧啶(C)处理后转化为尿嘧啶(U), 而甲基化的胞嘧啶保持不变, 随后的PCR扩增使尿嘧啶(U)转化为胸腺嘧啶(T), 对PCR产物进行测序并与未用亚硫酸氢盐处理的序列作比较, 就可判断CpG位点是否发生甲基化。这种方法非常适用于在单核苷酸水平上检测DNA甲基化。如亚硫酸氢盐测序法(bisulfite sequencing)就是将亚硫酸氢盐转化法与测序技术相结合, 检测基因组中胞嘧啶单核苷酸甲基化状态的一种相对高效的方法, 是检测甲基化的“金标准”, 由Frommer等(1992)最先报道。该方法的优点在于可靠性和精确度都很高, 可获得样品DNA中CpG位点的全部甲基化信息, 缺点在于需要大量PCR和测序操作, 过程较为繁琐、昂贵, 因此适用于重复序列少的小基因组样品的甲基化分析。目前, 随着测序技术的发展, 亚硫酸氢盐测序法能够更加快速、有效地用于DNA甲基化检测中, 现已有报道亚硫酸氢盐结合新一代测序技术, 对拟南芥全基因组进行测序, 完成了约120 Mb基因组DNA甲基化图谱分析(Cokus等2008)。在2007年开发出来的专门针对植物、用于分析亚硫酸氢盐测序得到的序列的甲基化状态的软件CyMATE也极大地发展了该技术。

#### 4.2 甲基化状态的检测和目标序列的定位

前期处理实现了甲基化和非甲基化的胞嘧啶分离以后, 就可以对分离出的甲基化DNA片段进行检测和定位。目前对DNA甲基化的检测基于以下3种技术。

(1)基于凝胶分析。利用二维凝胶电泳技术(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)或聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE), 通过DNA片段在凝胶电泳上的位置改变来检测甲基化水平的变化。由于其操作繁琐、工作量大、分辨率低, 目前已逐渐被基因芯片和高通量测序技术所取代。

(2)基于基因芯片技术分析。基因芯片的出现为检测DNA甲基化的高通量提供了技术平台, 各种基于基因芯片分析DNA甲基化的方法是以不同的DNA预处理方法为基础, 结合甲基化检测芯片技术, 高通量获得甲基化信息, 在基因组中寻找新甲基化位点。DNA样品经预处理后, 与基因芯片杂交, 对杂交结果进行分析, 得到DNA甲基化信息。基于基因芯片技术检测DNA甲基化的方法由于其快速、高通量、精确度高等优点已成为DNA甲基化检测的有力手段, 但目前基于芯片分析技术所面临的问题是设计足够多的探针已覆盖更广的基因组范围。商业化的Infinium甲基化芯片可分析约450 000个CpG位点, 但这依然只占了人类基因组甲基化位点数的1.6%。

(3)基于高通量测序技术。高通量测序是目前最新、最有发展前景的大规模基因组DNA甲基化分析技术, 测序的目的是产生大量的序列信息, 通过高通量测序对比检测基因组DNA甲基化水平并定位, 高通量测序使得对一个物种的转录组和基因组进行细致全貌的DNA甲基化分析成为可能, 目前已广泛用于拟南芥、水稻等植物基因组DNA甲基化的研究, 并取得丰厚的成果, Hsieh等(2011)利用高通量测序技术在拟南芥胚乳中发现了43个可能的印迹基因。该技术的优点在于快速、有效且成本低, 与甲基化检测芯片相对比, 无需对样品组和对照组进行标记和杂交, 直接测序得到DNA甲基化信息。高通量测序可以和上述3种DNA样品处理方法相结合, 如亚硫酸氢盐直接测序法能够准确分析出每个碱基的甲基化状态, 酶切消化亚硫酸氢盐测序(reduced representation bisulfite sequencing, RRBS)是基于甲基化不敏感限制性内切酶(*MspI*)将基因组甲基化DNA消化成小片段DNA, 经亚硫酸氢盐处理后, 结合基因组高通量测序技术, 绘制出单碱基分辨率的全基因组甲基化图谱。最近又将MeDIP与高通量测序技术相结合(MeDIP-seq), 灵活度和精确度更高, 检测范围更广, 取代了传统的芯片杂交, 不存在由芯片杂交的荧光模拟信号带来的交叉反应和背景噪音问题, Vining等(2012)对毛果杨(*Populus trichocarpa*) 7个不同组织部位DNA的动态变化及基因表达的研究就是采用MeDIP-seq。但该方法倾向于富集高

CpG密度区域,低CpG密度区域的甲基化分析存在问题,并且无法精确到每个碱基的甲基化状态(Li等2010),因此这种方法更适合应用于基于大样本量、群体水平的研究。虽然高通量测序有诸多优点,但仍存在局限性,如后续大量测序数据的分析及不适用于小规模基因组的测序,如何分析并应用所获得的基因组信息,这些都是需考虑的。

DNA甲基化检测技术的不断改进使得人们对植物DNA甲基化的研究更加简单方便,除了以上几种常用的方法外,还有一些方法也比较常见,如高效液相色谱柱(high performance liquid chromatography, HPLC)、甲基化敏感性限制性内切酶(MS-RE)-PCR/Southern法、结合亚硫酸氢盐的限制性内切酶法(combined bisulfite restriction analysis, COBRA)、甲基化荧光检测(methylight)、限制性标记基因组扫描(restriction landmark genomic scanning, RLGS)、MBD柱层析与MS-RE联用技术(combination of methylated-DNA precipitation and methylation-sensitive restriction enzymes, COMPARE-MS)等。尽管DNA甲基化的研究进展迅速,发展了一系列的研究方法和技术,但目前这些方法都还存在着一定的局限性,因此面对具体问题,根据不同的样品和试验目的来选择最适合的解决方法就显得尤为重要。

## 5 展望

作为表观遗传修饰主要方式之一,DNA甲基化已成为研究热点。DNA甲基化现象广泛存在于植物细胞中,参与植物基因表达的调控,在植物的生长发育过程中起着非常重要的作用。虽然人们对DNA甲基化的研究开展了大量的工作,但研究还不够深入。RdDM是植物基因沉默的关键机制,具体调控途径还不十分清楚,有待于进一步研究其中的重要调控因子。基因启动子区和编码区的甲基化是如何调控基因表达的?两者在基因表达调控方面有何区别?目前有研究发现非启动子DNA甲基化可能对染色质活化状态的维持起到重要作用。植物DNA甲基化的建立与维持、基因转录是如何受甲基化调控的以及甲基化与去甲基化的动态调节,这些都需要深入了解。以上几方面的研究将有助于解释DNA甲基化的作用机理,阐明DNA甲基化在植物发育各阶段的作用。DNA甲

基化的研究进展迅速,需要研究方法和技术的支 持,随着研究的不断深入,甲基化分析技术有待于更加完善,高通量的检测方法将发挥越来越重要的作用。

目前,我们采用MSAP方法,研究羽衣甘蓝自交亲和系与自交不亲和系种子在萌发过程中甲基化水平的差异,进一步验证自交退化现象与甲基化的相关性,旨在表观遗传学领域解释自交退化机理。并且通过高压静电场处理自交不亲和系羽衣甘蓝种子,对处理后种子DNA甲基化水平的差异及苗期生长势的变化进行研究,进一步探讨高压静电场对生物体的作用机理和物理因素,以及其对生物体的表观遗传学效应。同时,寻求自交不亲和系种子生长势恢复的有效手段,这对自交不亲和系亲本的繁殖及杂交育种都具有重要的意义。

## 参考文献

- 陈芳,王子成,何艳霞,曲先(2009). 超低温保存小麦种子和幼苗的遗传变异分析. 核农学报, 23 (4): 548~554
- 李媛媛,程鹏,熊兴耀,洪亚辉(2012). 干旱胁迫下马铃薯幼苗DNA甲基化研究. 中国马铃薯, 26 (1): 11~16
- 潘雅姣,傅彬英,王迪,朱苓华,黎志康(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 (9): 3009~3018
- 杨金兰,柳李旺,龚义勤,黄丹琼,王峰,何玲莉(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学报, 33 (3): 219~226
- 张勇,邓科君,张韬,杨足君,彭金华,周建平,任正隆(2009). 水稻基因组MSAP指纹图谱构建及DNA甲基化修饰位点分离与鉴定. 高技术通讯, 19 (9): 983~990
- Aina R, Sgorbati S, Santagostino A, Labra M, Ghiani A, Citterio S (2004). Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. *Physiol Plantarum*, 121 (3): 472~480
- Berger F, Chaudhury A (2009). Parental memories shape seeds. *Trends Plant Sci*, 14 (10): 550~556
- Bies-Etheve N, Pontier D, Lahmy S, Picart C, Vega D, Cooke R, Lagrange T (2009). RNA-directed DNA methylation requires an AGO4-interacting member of the SPT5 elongation factor family. *EMBO Rep*, 10 (6): 649~654
- Bilichak A, Ilnytskyi Y, Hollunder J, Kovalchuk I (2012). The progeny of *Arabidopsis thaliana* plants exposed to salt exhibit changes in DNA methylation, histone modifications and gene expression. *PLoS One*, 7 (1): e30515
- Boyko A, Kathiria P, Zemp FJ, Yao Y, Pogribny I, Kovalchuk I (2007). Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants (virus-induced plant genome instability). *Nucleic Acids Res*, 35 (5): 1714~1725
- Bratzel F, Yang C, Angelova A, Lopez-Torres G, Koch M, del Pozo



- JG, Calonje M (2012). Regulation of the new *Arabidopsis* imprinted gene *AtBMI1C* requires the interplay of different epigenetic mechanisms. *Mol Plant*, 5 (1): 260~269
- Cao DH, Gao X, Liu J, Wang XP, Geng SJ, Yang CW, Liu B, Shi DC (2012). Root-specific DNA methylation in *Chloris virgata*, a natural alkaline-resistant halophyte, in response to salt and alkaline stresses. *Plant Mol Biol Rep*, 30 (5): 1102~1109
- Cokus SJ, Feng SH, Zhang XY, Chen ZG, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE (2008). Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 452 (7184): 215~219
- Finke A, Kuhlmann M, Mette MF (2012). IDN2 has a role downstream of siRNA formation in RNA-directed DNA methylation. *Epigenetics*, 7 (8): 950~960
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 (5): 1827~1831
- Fu SL, Tang ZX, Liu L, Lu LM, Huang YB (2012). Variation of genomic DNA methylation in the nitrate reductase gene of sibling tobacco (*Nicotiana tabacum*) cultivars. *Genet Mol Res*, 11 (2): 1169~1177
- Gao ZH, Liu HL, Daxinger L, Pontes O, He XJ, Qian WQ, Lin HX, Xie MT, Lorkovic ZJ, Zhang S et al (2010). An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 465 (7294): 106~109
- Gehring M, Bubb KL, Henikoff S (2009). Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. *Science*, 324 (5933): 1447~1451
- Gehring M, Missirlian V, Henikoff S (2011). Genomic analysis of parent-of-origin allelic expression in *Arabidopsis thaliana* seeds. *PLoS One*, 6 (8): e23687
- Goodrich J, Tweedie S (2002). Remembrance of things past: chromatin remodeling in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18: 707~746
- Gupta V, Bijo AJ, Kumar M, Reddy CRK, Jha B (2012). Detection of epigenetic variations in the protoplast-derived germlings of *Ulva reticulata* using methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Mar Biotechnol*, 14 (1): 1~9
- Gutiérrez-Marcos JF, Costa LM, Dal Prà M, Scholten S, Kranz E, Perez P, Dickinson HG (2006). Epigenetic asymmetry of imprinted genes in plant gametes. *Nat Genet*, 38 (8): 876~878
- He XJ, Chen TP, Zhu JK (2011). Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res*, 21 (3): 442~465
- He XJ, Hsu YF, Zhu SH, Liu HL, Pontes O, Zhu JH, Cui XP, Wang CS, Zhu JK (2009b). A conserved transcriptional regulator is required for RNA-directed DNA methylation and plant development. *Genes Dev*, 23 (23): 2717~2722
- He XJ, Hsu YF, Zhu SH, Wierzbicki AT, Pontes O, Pikaard CS, Liu HL, Wang CS, Jin HL, Zhu JK (2009a). An effector of RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis* is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell*, 137 (3): 498~508
- Hepburn PA, Margison GP, Tisdale MJ (1991). Enzymatic methylation of cytosine in DNA is prevented by adjacent O<sup>6</sup>-methylguanine residues. *J Biol Chem*, 266 (13): 7985~7987
- Herr AJ, Jensen MB, Dalmay T, Baulcombe DC (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science*, 308 (5718): 118~120
- Hsieh TF, Shin J, Uzawa R, Silva P, Cohen S, Bauer MJ, Hashimoto M, Kirkbride RC, Harada JJ, Zilberman D et al (2011). Regulation of imprinted gene expression in *Arabidopsis* endosperm. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (5): 1755~1762
- Huang L, Jones AM, Searle I, Patel K, Voqler H, Hubner NC, Baulcombe DC (2009). An atypical RNA polymerase involved in RNA silencing shares small subunits with RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol*, 16 (1): 91~93
- Johnson LM, Law JA, Khattar A, Henderson IR, Jacobsen SE (2008). SRA-domain proteins required for DRM2-mediated *de novo* DNA methylation. *PLoS Genet*, 4 (11): e1000280
- Jullien PE, Susaki D, Yelagandula R, Higashiyama T, Berger F (2012). DNA methylation dynamics during sexual reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 22 (19): 1825~1830
- Kanchanaketu T, Sangduen N, Toojinda T, Hongtrakul V (2012). Genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) based on methylation-sensitive amplification polymorphism. *Genet Mol Res*, 11 (2): 944~955
- Kanno T, Bucher E, Daxinger L, Huettel B, Kreil DP, Breinig F, Lind M, Schmitt MJ, Simon SA, Gurazada SGR et al (2010). RNA-directed DNA methylation and plant development require an IWR1-type transcription factor. *EMBO Rep*, 11 (1): 65~71
- Labm M, Grassi F, Imazio S, Fabio TD, Citterio S, Sgorbati S, Agradi E (2004). Genetic and DNA methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L. *Chemosphere*, 54 (8): 1049~1058
- Law JA, Ausin I, Johnson LM, Vashisht AA, Zhu JK, Wohlschlegel JA, Jacobsen SE (2010). A protein complex required for polymerase V transcripts and RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 20 (10): 951~956
- Law JA, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Jacobsen SE (2011). SHH1, a homeodomain protein required for DNA methylation, as well as RDR2, RDM4, and chromatin remodeling factors, associate with RNA polymerase IV. *PLoS Genet*, 7 (7): e1002195
- Li N, Ye MZ, Li YR, Yan ZX, Butcher LM, Sun JH, Han X, Chen Q, Zhang XQ, Wang J (2010). Whole genome DNA methylation analysis based on high throughput sequencing technology. *Methods*, 52 (3): 203~212
- Li XY, Wang XF, He K, Ma YQ, Su N, He H, Stole V, Tongprasit W, Jin WW, Jiang JM 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 (2): 259~276
- Lisch D (2009). Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 60: 43~66
- López A, Ramírez V, García-Andrade J, Flors V, Vera P (2011). The RNA silencing enzyme RNA polymerase V is required for plant immunity. *PLoS Genet*, 7 (12): e1002434
- Lorković ZJ, Naumann U, Matzke AJM, Matzke M (2012). Involvement

- ment of a GHKL ATPase in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 22 (10): 933~938
- Moritoh S, Eun CH, Ono I A, Asao H, Okano Y, Yamaguchi K, Shimatani Z, Koizumi A, Terada R (2012). Targeted disruption of an orthologue of *DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2*, *OsDRM2*, impairs the growth of rice plants by abnormal DNA methylation. *Plant J*, 71 (1): 85~98
- Rea M, Zheng WG, Chen M, Braud C, Bhangu D, Rognan TN, Xiao WY (2012). Histone H1 affects gene imprinting and DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 71 (5): 776~786
- Saze H, Tsugane K, Kanno T, Nishimura T (2012). DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant Cell Physiol*, 53 (5): 766~784
- Shan XH, Li YD, Liu XM, Wu Y, Zhang MZ, Guo WL, Liu B, Yuan YP (2012). Comparative analyses of genetic/epigenetic diversities and structures in a wild barley species (*Hordeum brevisubulatum*) using MSAP, SSAP and AFLP. *Genet Mol Res*, 11 (3): 2749~2759
- Shen HS, He H, Li JG, Chen W, Wang XC, Guo L, Peng ZY, He GM, Zhong SW, Qi YJ et al (2012). Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression changes in two *Arabidopsis* ecotypes and their reciprocal hybrids. *Plant Cell*, 24 (3): 875~892
- Song YG, Ji DD, Li S, Wang P, Li Q, Xiang FN (2012). The dynamic changes of DNA methylation and histone modifications of salt responsive transcription factor genes in soybean. *PLoS One*, 7 (7): e41274
- Tsaftaris AS, Kafka M (1998). Mechanism of heterosis in crop plants. *J Crop Prod*, 1 (1): 95~111
- Vining KJ, Pomraning KR, Wilhelm LJ, Priest HD, Pellegrini M, Mockler TC, Freitag M, Strauss SH (2012). Dynamic DNA cytosine methylation in the *Populus trichocarpa* genome: tissue-level variation and relationship to gene expression. *BMC Genomics*, 13: 27
- Wang XF, Elling AA, Li XY, Li N, Peng ZY, He GM, Sun H, Qi YJ, Liu XS, Deng XW (2009). Genome-wide and organ-specific landscapes of epigenetic modifications and their relationships to mRNA and small RNA transcriptomes in maize. *Plant Cell*, 21 (4): 1053~1069
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL (1994). RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, 76 (3): 567~576
- Wohrmann HJ, Gagliardini V, Raissig MT, Wehrle W, Arand J, Schmidt A, Tierling S, Page DR, Schob H, Walter J (2012). Identification of a DNA methylation-independent imprinting control region at the *Arabidopsis MEDEA* locus. *Genes Dev*, 26 (16): 1837~1850
- Xie M, Ren GD, Zhang C, Yu B (2012). The DNA- and RNA-binding protein factor of DNA METHYLATION 1 requires XH domain-mediated complex formation for its function in RNA-directed DNA methylation. *Plant J*, 72: 491~500
- Xie ZX, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, 2 (5): 642~652
- Xiong LZ, Xu CG, Saghai Maroof MA, Zhang QF (1999). Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 261 (3): 439~446
- Zaratiegui M, Irvine DV, Martienssen RA (2007). Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell*, 128 (4): 763~776
- Zhang HM, Zhu JK (2011). RNA-directed DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol*, 14 (2): 142~147
- Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet*, 39 (1): 61~69
- Zubko E, Gentry M, Kunova A, Meyer P (2012). *De novo* DNA methylation activity of METHYLTRANSFERASE1 (MET1) partially restores body methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 71 (1): 1029~1037