

• 分子生药学专栏 •

DNA 甲基化及重亚硫酸盐测序法在药用植物中的应用策略

邢朝斌¹, 张妍彤¹, 王 卓², 宋 菊¹, 龙月红¹

1. 华北理工大学生命科学学院, 河北 唐山 063210

2. 华北理工大学药学院, 河北 唐山 063210

摘 要: DNA 甲基化是目前研究最为广泛的一种表观遗传学现象, 甲基化后的 DNA 可在不改变碱基序列的情况下对植物的表型进行调控。在高等植物中有 CG、CHG 和 CHH (H 代表 A、C 或 T) 3 种甲基化位点, 多发生于对称序列 CG 和重复序列中, 且不同物种中的甲基化程度和模式不同。药用植物功能基因启动子区域的 DNA 发生甲基化后, 可抑制基因的表达, 进而影响其次生代谢产物的积累, 导致品质差异的形成。在众多的 DNA 甲基化检测方法中, 重亚硫酸盐测序法可在单核苷酸水平上鉴别 DNA 甲基化的位点和程度, 是 DNA 甲基化分析的金标准。对其进行引物优化、技术改良后, 可有效地揭示药用植物的 DNA 甲基化情况, 这为阐明经典遗传学不能完全解释的药用植物品质差异等问题提供了技术支持, 并开辟了新的研究方向。

关键词: DNA 甲基化; 药用植物; 重亚硫酸盐测序; 表观遗传学; 品质差异

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)24-5063-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.001

Application strategy of DNA methylation and bisulfite sequencing in medicinal plants

XING Zhao-bin¹, ZHANG Yan-tong¹, WANG Zhuo², SONG Ju¹, LONG Yue-hong¹

1. College of Life Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

2. College of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

Abstract: DNA methylation is one of the most widely epigenetics phenomena, methylated DNA can regulate the phenotype of plants without changing the nucleotide sequence. In higher plants, there are three methylated sites, CG, CHG, and CHH (H stands for A, C, or T). They often occur in symmetrical sequences CG and repetitive sequence, and methylation degrees and patterns are different among different species. The methylation of functional gene promoters can suppress the gene expression in medicinal plants, and then affect the accumulation of secondary metabolites, resulting in quality variations. Among many methods for the DNA methylation detection, bisulfite sequencing can identify the site and extent of DNA methylation at single nucleotide level, which is the gold standard for DNA methylation analysis. Through optimizing primers and improving technology, it can effectively reveal the DNA methylation status for medicinal plants and provide technical support and a new research direction for clarifying some problems such as quality variations in medicinal plants, which are not completely explained by classical genetics.

Key words: DNA methylation; medicinal plants; bisulfite sequencing; epigenetics; quality variations

药用植物的有效成分是其产生疗效的物质基础, 研究其成因及影响因素是药用植物研究的核心内容。黄璐琦等^[1]从生物学的角度提出: 药用植物的有效成分是基因型与环境之间相互作用的产物, 可用公式表示为表型=基因型+环境饰变,

这里的表型指包括有效成分在内的所有药用植物的特征, 环境饰变是指由生境引起的表型任何不同遗传的变化。这一基于基因型是决定表型的基础, 环境是条件的假说在丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.^[2]、黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi^[3]、刺五

收稿日期: 2017-10-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31570683); 华北理工大学培育基金 (SP201508)

作者简介: 邢朝斌 (1975—), 男, 教授, 研究方向为分子生药学。Tel: (0315)3725859 Fax: (0315)3726341 E-mail: xzbheuu@126.com

加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.^[4]等药用植物的经典遗传学研究中陆续得到证实,并被普遍认可。但事实上,多细胞生物的每个细胞含有相同的DNA序列,但最终的表型却不尽相同。药用植物的研究中也存在相似的问题,如具有单核苷酸多态性的刺五加鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)基因与刺五加总皂苷量呈显著正相关的AGAACG基因型中,尚存在30%的低量个体^[4]。进一步对刺五加SE基因家族的分析结果显示,各成员在皂苷量和基因型相同个体间的表达情况并不完全相同^[5]。这说明单纯的经典遗传学分析无法全面揭示药用植物有效成分量差异形成的分子机制,DNA序列变异以外的其他遗传机制可能发挥着重要作用。

随着遗传学的发展,人们发现在DNA序列不发生改变的情况下,表达模式也可以发生改变的表观遗传学现象。其产生原因包括DNA、组蛋白、染色质水平的表观遗传学修饰等,其中DNA甲基化(DNA methylation)是重要原因之一^[6-7]。这为阐明单纯基于DNA序列变异等经典遗传学无法全面揭示的药用植物品质差异问题提供了新的研究方向。目前对DNA甲基化的研究主要集中于模式生物和农作物,而药用植物领域的此类报道较少。本文对DNA甲基化的研究成果进行总结,探讨相关研究方法在药用植物中的应用策略,以期揭示药用植物有效成分差异形成的分子机制及药用植物种质资源的评价等提供依据。

1 DNA甲基化及其在植物中的特点

DNA甲基化一般是指DNA复制后,在DNA甲基转移酶的作用下,将S-腺甘酰甲硫氨酸分子上的甲基转移到DNA分子中胞嘧啶残基的第5位碳原子上,形成5-甲基胞嘧啶的过程,它是真核细胞生物基因组重要的修饰方式之一^[6]。植物中的DNA甲基化以该种形式为主,可占到基因组DNA中胞嘧啶碱基的1/3,除此之外,也有少量以N₆-甲基腺嘌呤和7-甲基鸟嘌呤的形式存在,但占比极少^[8]。通常核糖体RNA编码序列、着丝粒和中心体、转座子序列等异染色质区域的DNA甲基化程度通常较高,而大多数功能基因启动子区域的DNA甲基化程度较低^[9]。

在高等植物中有CG、CHG和CHH(H代表A、C或T)3种甲基化位点,其中主要发生于对称序列CG和重复序列中^[10],最多可以占到总胞嘧

啶数的50%^[11],而哺乳动物中这一比例则高达60%~90%^[12]。另外,动物体中CHG和非对称位点CHH位点的甲基化比例较小,植物体中非对称位点CHH发生的DNA甲基化频率较高,但种间差异显著^[13]。不只在动、植物之间,即使在植物内部,DNA甲基化程度也存在较大差异。目前在已经进行基因组DNA甲基化分析的34种植物中,甜菜 *Beta vulgaris* Linn. 的DNA甲基化水平远高于任何植物,且具有较高度度的CHH位点甲基化,这与拟南芥中全基因组DNA甲基化程度较低,且CG位点的DNA甲基化在所有物种中最低的特点显著不同^[14]。在重复序列中,CHG和CHH位点的DNA甲基化程度存在很大的种间差异,且经人工栽培的物种(如葡萄、木薯等)往往具有较低的CHH位点DNA甲基化水平^[10]。

2 DNA甲基化的模式

DNA甲基化包括从头甲基化和维持甲基化2种模式。从头甲基化是指在从未发生甲基化的位点上发生甲基化修饰,建立DNA甲基化的过程;而维持甲基化是指维持甲基化的酶可识别新合成的半甲基化双链DNA,并将甲基添加到新链的非甲基化胞嘧啶上^[15]。

植物中3种位点DNA甲基化的建立均需经过1条通过小RNA的DNA甲基化途径来实现^[16]。该途径中,RNA依赖的RNA聚合酶2(RNA-dependent RNA polymerase 2, RDR2)首先以长30~40 nt的RNA为模板合成双链RNA,随后该RNA被切割为长24 nt的小RNA^[17]。双链小RNA中的1条链与argonaute 4(AGO4)蛋白结合后再与事先转录产生的长链非编码RNA通过碱基配对形成复合体^[18],该复合体进而吸引域重排甲基转移酶2(domains rearranged methyltransferase, DRM2)转移到靶位点,最终完成将S-腺甘酰甲硫氨酸分子上的甲基转移到靶位点胞嘧啶残基第5位碳原子上的过程,从而实现DNA的甲基化^[19]。这一过程被称为RNA介导的DNA甲基化(RNA-directed DNA methylation, RdDM)^[20]。一旦DNA甲基化建立后,其维持机制因甲基化位点的不同而不同。CG位点发生的甲基化依赖DNA甲基转移酶1(DNA methyltransferase 1)在甲基化调节因子(variant in methylation, VIM)的辅助下进行维持^[21],CHG位点的DNA甲基化通过植物特异性的染色质甲基转移酶3(chromomethylase 3)和组蛋白H3K9me2修

饰的核小体进行特异性互作来维持^[22], CHH 位点发生的 DNA 甲基化仅能在新的细胞周期中重新建立, 而不能被维持^[23]。

与其他物种相比, 植物的 3 种甲基化位点均具有单独的 DNA 甲基化维持途径, 因此, 其 5-甲基胞嘧啶浓度也相对较高。通常, 被子植物中的 DNA 甲基化位点与转座子和重复序列相关联, CG 位点的 DNA 甲基化表现出集中于基因转录区域, 而 CHG 和 CHH 位点的 DNA 甲基化主要出现于转座子中, CHH 位点的 DNA 甲基化通常分布于转座子的末端 (图 1)^[10]。

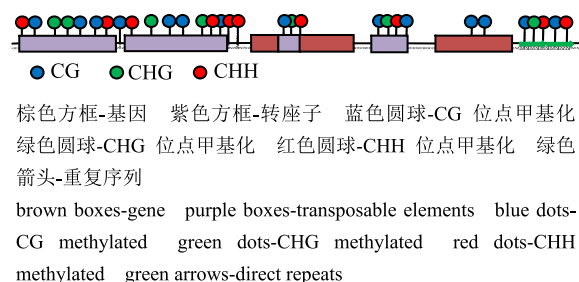


图 1 植物通用甲基化模式

Fig. 1 Generic methylation patterns in plants

3 DNA 甲基化对药用植物基因表达的影响

DNA 甲基化可影响植物功能基因的表达。植物功能基因启动子区域的 DNA 发生甲基化后, 可阻止转录因子结合到启动子的甲基化区域, 从而抑制基因的表达, 成为植物转录调控的有效机制之一^[24]。具有转座子的玉米功能基因侧翼区域中分布有长 100 bp 的 CHH 岛, 该区域中的 CHH 位点甲基化率高于 25%, 抑制基因的转录, 同时也保护沉默的转座子免受邻近基因的活性影响^[25]。但基因编码区的甲基化一般不会影响基因表达^[26]。中药材金银花的来源植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 和其自然诱变产生的变种红白忍冬 *L. japonica* Thunb. var. *chinensis* (Wats.) Bak., 在合成其主要药用成分绿原酸过程中的各关键酶氨基酸序列完全一致, 但基因表达量和绿原酸量在两者之间差异显著^[27]。特定基因 DNA 甲基化分析结果表明, 红白忍冬苯丙氨酸裂解酶 2 (phenylalanine ammonia-lyase 2) 基因侧翼区域的启动子-109 bp 至-279 bp 处 DNA 甲基化程度要高于忍冬, 且二者间 CG 位点的 DNA 甲基化程度显著不同, 说明 DNA 甲基化是造成两者间品质和关键酶基因表达差异的重要原因^[28]。去甲基化因子 5-氮杂胞苷 (5-azacytidine) 处理石斛组培苗后, 其中的

多糖和生物碱量及生物合成关键酶基因的表达量均显著上升, 去甲基化后可能激活了上述基因表达^[29]。这说明, DNA 甲基化和去甲基化修饰对药用植物功能基因的表达水平均具有重要的调控作用。

4 DNA 甲基化对药用植物品质的影响

在植物的生长过程中, DNA 甲基化参与调节各种表型特征的形成及生长发育等几乎所有生物学过程, 如果甲基化水平过低, 就会导致植物生长发育及表型异常^[30]。HPLC 法检测曼地亚红豆杉 *Taxus media* cv. *Hicksii* 全基因组 DNA 甲基化的结果表明, 其 DNA 总体甲基化水平高低与紫杉醇的量呈显著的负相关关系^[31]。以有性繁殖为主的人参基因组 DNA 中 20.81% 的位点呈甲基化状态, 不同年龄样本之间的甲基化状态差别显著^[32]。相对于野生人参, 人工栽培措施使得人参具有相对较低的胞嘧啶甲基化水平, 其中 CHG 位点的 DNA 甲基化水平下降最多^[33], 说明 CHG 位点的 DNA 甲基化对栽培措施和环境条件较为敏感, 可迅速改变。另外, CHG 位点的胞嘧啶甲基化状态及人参的表型与栽植地点的改变是可逆的, 这说明环境诱导的表观遗传改变可调节相关基因的表达、影响药材品质, 并且这种改变完全依赖于特定环境的作用^[34]。换言之, 低水平的 DNA 甲基化是造成栽培人参和野生人参品质差异的直接原因。

不仅人工栽培和野生条件这种巨大的环境改变可导致药用植物 DNA 甲基化水平的改变, 单一环境因子也可产生一定的影响。如红光和远红光照射沉香 *Aquilaria agallocha* (Lour.) Roxb 后, 转座子和基因间隔区的 DNA 甲基化状态变化较小, 而启动子区域 CHH 位点的 DNA 甲基化水平显著改变, CHG 位点次之, 而 CG 位点的 DNA 甲基化水平相对不变。伴随着 DNA 甲基化的改变, 基因的表达及葫芦素的量也随之相应改变, 这表明光质可以通过改变 CHH 和 CHG 位点的 DNA 甲基化水平来影响功能基因的表达, 进而调控其次生代谢产物葫芦素的合成^[35]。用紫外线照射黄花蒿 *Artemisia annua* L. 后, 其青蒿醛 $\Delta^{11(13)}$ 双键还原酶基因启动子区域的 4 个 CG、4 个 CHH 和 2 个 CHG 位点发生去甲基化, 提高该基因的表达量, 最终使青蒿素的产量提高 1.91 倍^[36]。杨飞等^[37]研究表明, 高温胁迫导致菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 基因组 82 个 CCGG 位点中 58 个位点发生了甲基化, 24 个位点发生了去甲基化。对蒲公英 *Taraxacum officinale* F. H. Wigg.

进行包括食草动物取食、病原体侵染等胁迫处理后,其 DNA 甲基化程度及位点显著改变,且其甲基化状态可传递给后代^[38]。

体外培养获得的刺五加胚性愈伤组织的甲基化水平很低,非胚性愈伤组织则呈高度甲基化状态,没有再生的能力^[39],轮叶党参 *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. F. 组织培养过程中的 DNA 甲基化状态显著改变^[40]。这说明利用组织培养获取药用植物再生个体或直接生产次生代谢产物的过程中,同样也伴随着 DNA 甲基化状态的改变。

尽管目前对药用植物 DNA 甲基化的研究已有一定进展,但与传统的模式生物相较而言,整体尚处于初级探索阶段。尤其对 DNA 甲基化调控药用植物次生代谢过程的作用靶点、作用机制等还缺乏系统深入的研究。

5 DNA 甲基化分析方法的比较

随着 DNA 甲基化研究在模式生物中的深入开展,其配套的研究方法、技术手段已日趋成熟,迄今为止,已有至少 25 种检测 DNA 甲基化的相关技术在动植物中得到应用,根据原理的不同可分为甲基化敏感性位点、亲和色谱和重亚硫酸氢盐转化三大类^[41]。基于甲基化敏感性位点的方法有甲基化敏感扩增多态性 (methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP)、甲基化敏感 PCR (methylation-sensitive PCR, MS-PCR)、差异甲基化杂交 (differential methylation hybridization, DMH) 等;基于亲和色谱的方法有质谱、高效液相色谱、荧光毛细管电泳等;基于重亚硫酸氢盐转化的方法有甲基化特异性 PCR、结合重亚硫酸盐限制性分析、全基因组重亚硫酸氢盐测序、甲基化敏感寡核苷酸引物扩增等^[42]。但由于多数药用植物的基础生物学背景过于薄弱^[43],加之成本高^[44]、技术复杂^[45]和分辨率^[46]等原因使基于甲基化敏感位点和亲和色谱的方法难于在药用植物中广泛应用。而基于重亚硫酸盐转化的方法核心是重亚硫酸盐测序^[47],经其处理后能够使 5-甲基胞嘧啶和胞嘧啶得以准确区分,即提供了单核苷酸水平的分辨率,被称为是 DNA 甲基化分析的金标准^[48]。因此,其在药用植物 DNA 甲基化的定性和半定量分析中具有重要的应用价值^[41]。

6 重亚硫酸盐测序法分析药用植物 DNA 甲基化的策略

6.1 重亚硫酸盐测序法的基本流程

重亚硫酸盐测序法分析药用植物 DNA 甲基化的基

本流程见图 2。将药用植物的 DNA 提取后,进行重亚硫酸盐处理。DNA 在高盐、高温和低 pH 值的重亚硫酸盐处理条件下,未甲基化的胞嘧啶转变成尿嘧啶。随后以处理的 DNA 为模板的 PCR 扩增中,这些转化的尿嘧啶碱基被更换为胸腺嘧啶。而重亚硫酸盐处理并不影响甲基化的胞嘧啶残基,因此这些甲基化的胞嘧啶得以维持^[47]。进而将扩增产物连接载体、转化大肠杆菌感受态细胞后,通过测序并与未处理样本的序列进行比对来鉴定哪些位点发生了 DNA 甲基化。

6.2 重亚硫酸盐处理的效率

精确鉴定 DNA 甲基化水平及位点的关键是重亚硫酸盐处理下非甲基化胞嘧啶的完全转化^[41],但当大量模板 DNA 经重亚硫酸盐处理后,并非全部

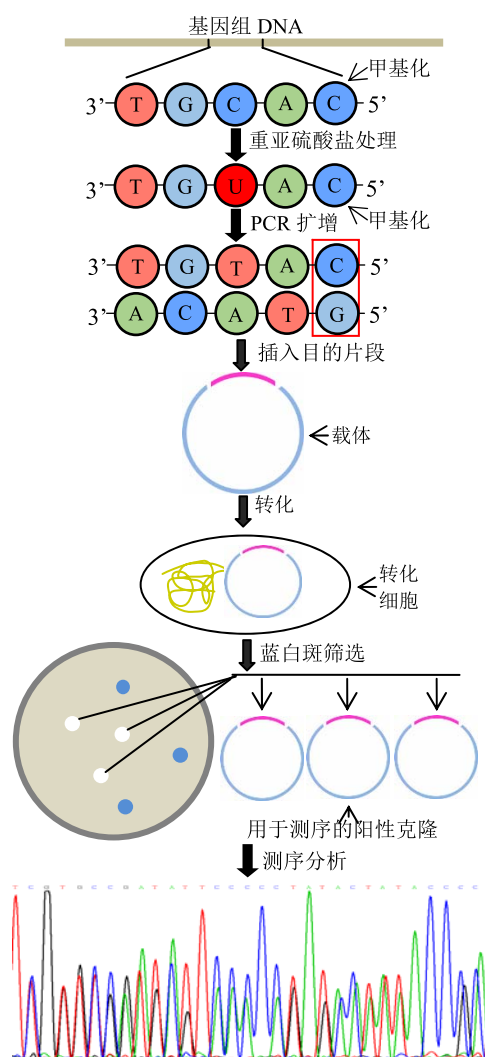


图 2 重亚硫酸盐测序法示意图^[41]

Fig. 2 Schematic representation of bisulfite sequencing technique

未甲基化的胞嘧啶均能转变成尿嘧啶,即使在最佳转化条件下也会有约0.5%不能发生转化^[49]。因此在后期的克隆测序过程中,每个甲基化位点应至少对10个以上的不同克隆样本进行测序确认,以保证DNA甲基化位点不被遗漏。另外,与靶基因平行的阴性对照也是获得准确结果的必要条件^[50]。

6.3 重亚硫酸盐处理样本的PCR扩增

植物基因组中的CG量普遍高于动物,经重亚硫酸盐处理后会使得基因组中形成大量的尿嘧啶及重复序列,导致后期PCR扩增所用引物因目标区域少、 T_m 值低、特异性和稳定性不理想。此时若使用短引物则极易产生非特异性扩增,因此在实际操作中,采用31~50 bp的长引物,且反向引物的长度及 T_m 值低于正向引物可大大提高扩增效果^[51]。另外,由于待研究物种的基因组或目的基因的DNA甲基化情况未知,导致重亚硫酸盐处理后模板序列也是未知的,这使得引物的特异性难于保证,因此应通过设计多对引物进行大量摸索实验加以解决。

为了减少由体外使用DNA聚合酶引起的突变,具有3'→5'外切酶活性的高保真DNA聚合酶被广泛应用于基因的扩增。然而,基因组DNA链中的未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶后会阻碍此类DNA聚合酶作用的发挥,甚至完全不能扩增,因此并不适宜用于DNA甲基化的研究^[49]。而具有较强扩增高尿嘧啶模板及保真能力不依赖3'→5'外切酶活性的DNA聚合酶效果较好^[51]。

7 展望

生物在适应环境的过程中,基因组和DNA的甲基化常发生相关的变化^[52]。从基因组的DNA多态性角度解析药用植物品质差异及对药效物质合成调控的研究已有大量报道,但目前对DNA甲基化的认识多数来自于拟南芥和玉米等模式植物和农作物,药用植物中的相关工作尚处于起步阶段。对模式生物的研究表明,DNA甲基化的改变可能比任何基因组的遗传变化更早和更快地发生^[53],即DNA甲基化的变化具有突变效应^[52]。低DNA甲基化可使染色体发生重组,或使DNA中静止的移动元件活化后发生位移,导致移码突变等核苷酸变化^[54],而高甲基化则易使C-T或G-A发生转化,形成点突变^[55],从而产生新的表型以适应环境,并可将其传递给下一代^[56]。这说明,DNA甲基化除可通过改变关键酶基因的表达直接调控药用植物的次生代谢过程而影响药材品质外,还可通过间接导致的DNA

序列变异而发挥作用。说明DNA甲基化等表观遗传对药用植物品质形成的影响更大。因此,体现药用植物生物学本质的特化基因型研究,应将经典遗传与表观遗传相结合,科学、客观地反映各个地区不同的生态或地理条件长期选择而形成的药用植物的遗传本质。

总之,DNA的甲基化为药用植物研究中经典遗传学无法全面揭示的问题提供了新的思路,DNA甲基化也在阐明道地药材形成机制、药用植物品质差异等领域显示出广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 黄璐琦,陈美兰,肖培根. 中药材道地性研究的现代生物学基础及模式假说 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 494-496.
- [2] 黄璐琦,戴住波,吕冬梅,等. 探讨道地药材研究的模式生物及模型 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(9): 1063-1066.
- [3] 郭兰萍,王升,张霁,等. 生态因子对黄芩次生代谢产物及无机元素的影响及黄芩道地性分析 [J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(1): 66-74.
- [4] 邢朝斌,劳风云,龙月红,等. 刺五加鲨烯合酶和鲨烯环氧化酶基因单核苷酸多态性及其与总皂苷量的相关性研究 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2020-2024.
- [5] 龙月红,李非非,杨果,等. 刺五加鲨烯环氧化酶基因家族2成员表达特性的分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 59-62.
- [6] Zemach A, Mcdaniel I E, Silva P, et al. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation [J]. *Science*, 2010, 328(5980): 916-919.
- [7] Naydenov M, Baev V, Apostolova E, et al. High-temperature effect on genes engaged in DNA methylation and affected by DNA methylation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2015, 87(2): 102-108.
- [8] Pomraning K R, Smith K M, Freitag M. Genome-wide high throughput analysis of DNA methylation in eukaryotes [J]. *Methods*, 2009, 47(3): 142-150.
- [9] Zilberman D, Gehring M, Tran R K, et al. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(1): 61-69.
- [10] Gehring M. Prodigious plant methylomes [J]. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 197.
- [11] Doerfler W. DNA methylation and gene activity [J]. *Annu Rev Biochem*, 1983, 52: 93-124.
- [12] Ehrlich M, Gama-Sosa M A, Huang L H, et al. Amount

- and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 1982, 10(8): 2709-2721.
- [13] Vanyushin B F, Ashapkin V V. DNA methylation in higher plants: Past, present and future [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1809(8): 360-368.
- [14] Niederhuth C E, Bewick A J, Ji L, *et al*. Widespread natural variation of DNA methylation within angiosperms [J]. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 194.
- [15] 杨秀玲, 丁波, 杨秋颖, 等. DNA 甲基化在植物与双生病毒互作中的作用 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2016, 5(46): 514-523.
- [16] Law J A, Jacobsen S E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(3): 204-220.
- [17] Haag J R, Ream T S, Marasco M, *et al*. *In vitro* transcription activities of Pol IV, Pol V, and RDR2 reveal coupling of Pol IV and RDR2 for dsRNA synthesis in plant RNA silencing [J]. *Mol Cell*, 2012, 48(5): 811-818.
- [18] Wierzbicki A T, Haag J R, Pikaard C S. Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes [J]. *Cell*, 2008, 135(4): 635-648.
- [19] Zhong X, Du J, Hale C, *et al*. Molecular mechanism of action of plant DRM *De Novo* DNA methyltransferases [J]. *Cell*, 2014, 157(5): 1050-1060.
- [20] Naumann U, Daxinger L, Kanno T, *et al*. Genetic evidence that DNA methyltransferase DRM2 has a direct catalytic role in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics*, 2011, 187(3): 977-979.
- [21] Woo H R, Dittmer T A, Richards E J. Three SRA-domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG methylation and epigenetic silencing in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genet*, 2008, 4(8): e1000156.
- [22] Lindroth A M, Cao X, Jackson J P, *et al*. Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation [J]. *Science*, 2001, 292(5524): 2077-2080.
- [23] Stroud H, Greenberg M V, Feng S, *et al*. Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the *Arabidopsis methylome* [J]. *Cell*, 2013, 152(1/2): 352-364.
- [24] Curradi M, Izzo A, Badaracco G, *et al*. Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(9): 3157-3173.
- [25] Li Q, Gent J I, Zynda G, *et al*. RNA-directed DNA methylation enforces boundaries between heterochromatin and euchromatin in the maize genome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(47): 14728-14733.
- [26] Chan S W, Henderson I R, Jacobsen S E. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(5): 351-360.
- [27] Yuan Y, Wang Z, Jiang C, *et al*. Exploiting genes and functional diversity of chlorogenic acid and luteolin biosyntheses in *Lonicera japonica* and their substitutes [J]. *Gene*, 2014, 534(2): 408-416.
- [28] Zha L, Liu S, Liu J, *et al*. DNA methylation influences chlorogenic acid biosynthesis in *Lonicera japonica* by mediating LjbZIP8 to regulate phenylalanine ammonia-lyase 2 expression [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1178.
- [29] 倪竹君, 殷丽丽, 应奇才, 等. 5-氮杂胞苷对石斛生物活性成分的影响 [J]. *浙江农业科学*, 2014(7): 1018-1020.
- [30] Matzke M A, Mette M F, Matzke A J. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 43(2/3): 401-415.
- [31] Li L, Li X, Fu C, *et al*. Sustainable use of *Taxus media* cell cultures through minimal growth conservation and manipulation of genome methylation [J]. *Process Biochem*, 2013, 48(3): 525-531.
- [32] 董亚娟, 程舟, 李珊, 等. HPLC 法测定不同年龄人参 DNA 的甲基化水平 [J]. *中草药*, 2007, 38(9): 1416-1418.
- [33] Li M R, Shi F X, Zhou Y X, *et al*. Genetic and epigenetic diversities shed light on domestication of cultivated ginseng (*Panax ginseng*) [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(11): 1612-1622.
- [34] Ngezahayo F, Wang X L, Yu X M, *et al*. Habitat-induced reciprocal transformation in the root phenotype of oriental ginseng is associated with alteration in DNA methylation [J]. *Chin Sci Bull*, 2011, 56(16): 1685-1690.
- [35] Kuo T C, Chen C H, Chen S H, *et al*. The effect of red light and far-red light conditions on secondary metabolism in agarwood [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 139.
- [36] Pandey N, Pandey-Rai S. Deciphering UV-B-induced variation in DNA methylation pattern and its influence on regulation of DBR2 expression in *Artemisia annua* L. [J]. *Planta*, 2015, 242(4): 869-879.
- [37] 杨飞, 徐延浩. 温度对菰蓝基因组 DNA 甲基化的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(6): 113-116.
- [38] Verhoeven K J, Jansen J J, van Dijk P J, *et al*. Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions [J]. *New Phytol*, 2010,

- 185(4): 1108-1118.
- [39] Chakrabarty D, Yu K W, Paek K Y. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) [J]. *Plant Sci*, 2003, 165(1): 61-68.
- [40] Guo W L, Wu R, Zhang Y F, *et al.* Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(8): 1297-1307.
- [41] Al H I, Al-Yahyai R, Yaish M W. Detection of differential DNA methylation under stress conditions using bisulfite sequence analysis [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1631: 121-137.
- [42] Li Y, Tollefsbol T O. DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 791: 11-21.
- [43] Ziller M J, Hansen K D, Meissner A, *et al.* Coverage recommendations for methylation analysis by whole-genome bisulfite sequencing [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(3): 230-232.
- [44] Yan P S, Chen C M, Shi H, *et al.* Dissecting complex epigenetic alterations in breast cancer using CpG island microarrays [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(23): 8375-8380.
- [45] Zhao N, Bell D A, Maity A, *et al.* Global analysis of methylation profiles from high resolution CpG data [J]. *Genet Epidemiol*, 2015, 39(2): 53-64.
- [46] Francischini J, Kemper E L, Costa J B, *et al.* DNA methylation in sugarcane somaclonal variants assessed through methylation-sensitive amplified polymorphism [J]. *Genet Mol Res*, 2017, 16(2): gmr16029585.
- [47] Kurdyukov S, Bullock M. DNA methylation analysis: Choosing the right method [J]. *Biology (Basel)*, 2016, 5(1): 3.
- [48] Cokus S J, Feng S, Zhang X, *et al.* Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning [J]. *Nature*, 2008, 452(7184): 215-219.
- [49] Li P, Demirci F, Mahalingam G, *et al.* An integrated workflow for DNA methylation analysis [J]. *J Genet Genomics*, 2013, 40(5): 249-260.
- [50] Erdmann R M, Souza A L, Clish C B, *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine is not present in appreciable quantities in *Arabidopsis* DNA [J]. *Genes Genomes Genetics*, 2015, 5(1): 1-8.
- [51] 王鹤潼, 宋 婕, 崔伟娜, 等. 植物位点特异性甲基化研究的引物设计及 PCR 体系优化 [J]. *农业环境科学学报*, 2016, 35(9): 1686-1693.
- [52] Kaup S, Grandjean V, Mukherjee R, *et al.* Radiation-induced genomic instability is associated with DNA methylation changes in cultured human keratinocytes [J]. *Mutat Res*, 2006, 597(1/2): 87-97.
- [53] Rapp R A, Wendel J F. Epigenetics and plant evolution [J]. *New Phytol*, 2005, 168(1): 81-91.
- [54] Feschotte C, Jiang N, Wessler S R. Plant transposable elements: Where genetics meets genomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(5): 329-341.
- [55] Gonzalgo M L, Jones P A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation [J]. *Mutat Res*, 1997, 386(2): 107-118.
- [56] Flatscher R, Frajman B, Schonswetter P, *et al.* Environmental heterogeneity and phenotypic divergence: Can heritable epigenetic variation aid speciation? [J]. *Genet Res Int*, 2012, doi: 10.1155/2012/698421.