

DNA 甲基化调控园艺植物生长发育及非生物胁迫应答研究进展

池小娜¹, 张欢欢², 顾文媛¹, 张兴民¹, 王玉萍¹

(¹甘肃农业大学园艺学院, 兰州 730070; ²南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: DNA 甲基化作为表观遗传调控的重要机制之一, 通常发生在植物胞嘧啶碱基中, 包含 CG、CHG、CHH 三种类型。主要影响染色质结构和基因的转录效率, 在植物细胞基因表达调控、基因组稳定性维持等方面起重要作用。非生物胁迫影响植物的生长发育和繁殖最终导致植物死亡。基于已有研究发现, DNA 甲基化可诱导非生物胁迫下植物的表型改变。DNA 甲基化水平在植物非生物胁迫生长过程存在的变化机制受到甲基化酶和去甲基化酶的影响。甲基化状态上调(启动)或下调(关闭)基因表达以确保自身适应生长及发育, 从而使植物在一定程度上适应和抵抗逆境伤害。这些信号转导通路可以引起植物形态、生理和生化的改变以适应逆境。本文对 DNA 甲基化功能及其在园艺植物的生长发育与非生物胁迫响应方面的研究进行了分析与总结, 探讨了 DNA 甲基化在园艺植物表观遗传研究中存在的问题及展望, 为园艺植物遗传改良及抗逆分子机理研究提供参考。

关键词: DNA 甲基化; 非生物胁迫; 生长发育; 园艺植物; 表观遗传调控

Research Progress of DNA Methylation on Regulating the Growth, Development and Abiotic Stress Response of Horticultural Plants

CHI Xiaona¹, ZHANG Huanhuan², GU Wenyuan¹, ZHANG Xingmin¹, WANG Yuping¹

(¹College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070;

²College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: As one of the important mechanisms of epigenetic regulation, usually occurs in plant cytosine bases, including CG, CHG and CHH. DNA methylation mainly affects chromatin structure and gene transcription level. DNA methylation plays important roles in transcriptional regulation and maintaining the genome stability. Abiotic stresses affect plant growth and reproduction and ultimately lead to plant death. Based on existing research findings, DNA methylation can induce phenotypic alterations in plants under stress. To cope with abiotic stresses, the change mechanism of DNA methylation level during growth is affected by methylase and demethylase. The signal transduction pathways can change the expression of some stress response genes, thus causing changes in plant morphology, physiology and biochemistry to adapt to adversity. Some genes are upregulated (initiate) or downregulated (close down) in expression in order to assure the adaptive growth and development of plant, thus enabling plants to adapt and resist stress damage to a certain extent. This article reviews the DNA methylation modification and its role in transcriptional regulation, research progress in the growth and development of horticultural plants, and the epigenetic regulation of abiotic stress as well as the problems and prospective of horticultural plants. It provides a reference for the genetic improvement of horticultural plants and deciphering the mechanism of stress resistance.

Key words: DNA methylation; abiotic stress; growth and development; horticultural plants; epigenetic regulation

收稿日期: 2023-02-21 修回日期: 2023-03-13 网络出版日期: 2023-03-30

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230221003>

第一作者研究方向为蔬菜遗传育种, E-mail: 1914313257@qq.com

通信作者: 王玉萍, 研究方向为蔬菜遗传育种, E-mail: wangyp@gsau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(31760351)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (31760351)

DNA 甲基化作为真核细胞的一种基因组修饰,通过改变染色质和蛋白质的结构调节基因组稳定性,且不会改变DNA的碱基序列,是表观遗传调控的重要机制之一^[1]。基因低水平甲基化(如持家基因)或去甲基化(如发育阶段特异表达、环境胁迫诱导表达以及组织特异性表达等基因)有利于基因的表达,基因高水平甲基化(如异染色质中的沉默基因)则关闭或沉默基因^[2]。DNA 甲基化调控植物生长发育和逆境应答关键基因的表达,在植物表观遗传调控中发挥重要作用^[3]。本文对DNA 甲基化修饰功能及其在园艺植物的生长发育调控与逆境响应方面的研究进展进行总结分析,为园艺植物遗传改良和逆境适应分子机理研究提供参考。

1 DNA 甲基化及功能

DNA 甲基化是在甲基转移酶的作用下,在基因组 CpG 二核苷酸胞嘧啶 5 号碳位共价键结合一个甲基基团,对基因表达水平的影响随序列背景和基因区域的不同而变化^[4]。植物基因组 DNA 的甲基化主要发生在 CG 位点,也广泛出现在 CHG 以及 CHH 位点(H 为 A、T、C),在细胞分裂过程中传递表观遗传信息,多样性调控基因表达^[5]。

DNA 甲基化分为建立、维持和去甲基化 3 个过程^[6]。甲基转移酶具有催化和维持 DNA 甲基化的作用,其中 *dnmt1* 主要参与 DNA 复制新合成链的完全甲基化,为持续性甲基转移酶,同时维持 DNMTs 的稳定;*dnmt3a* 和 *dnmt3b* 主要参与从头甲基化,合成甲基化酶,催化 S-腺苷甲硫氨酸和 DNA 链与结构域的结合^[7]。在 DNA 复制和细胞分裂过程中,不同靶向位点的 DNA 甲基化通过不同途径维持。CG 甲基化由 DNMT1 维持;CHG 甲基化由染色质甲基化酶(CMT, chromatin methylase)维持,CMT2/3 是植物特有的并能够参与异染色质 DNA 修饰;而 CHH 甲基化由结构域重排甲基转移酶(DMLs, domain rearrangement of methyltransferases)维持^[8]。DNA 去甲基化分为被动和主动两种形式。被动去甲基化是借助 DNA 半保留复制,原有的甲基化胞嘧啶被未甲基化胞嘧啶代替,DNA 甲基化水平降低。主动去甲基化是植物响应外界刺激,主动地改变基因组甲基化修饰模式,由沉默抑制因子 ROS1 家族转葡萄糖基酶来起始,增加的 IDM1、IDM2 和 IDM3 复合物是靶向 ROS1 所需的组蛋白乙酰转移酶复合物^[9]。ROS1 家族成员有 DME、DML2 和 DML3,能够切除 CG、CHG 和 CHH 中的 5-甲基胞嘧啶。

DNA 甲基化通过干扰转录因子对顺式元件的识别和结合抑制转录,或者招募染色质重塑或修饰因子,导致基因失活。DNA 甲基化沉默转座元件和外源侵入序列,影响亲本印记基因形成,基因转录沉默和影响转录本的可变剪接^[10],在维持植物基因组稳定、调控生长发育及响应非生物胁迫方面发挥重要作用。DNA 甲基化和去甲基化途径汇聚在 MEMS 上,以调节 ROS1 的表达。在 RNA 介导的 DNA 甲基化(RdDM, RNA-dependent DNA methylation)突变体中,24-nt siRNAs 的生物合成和 siRNAs 信号定位启动从头甲基化发生均需要 RNA 聚合酶 IV(PolIV, DNA-dependent RNA polymerase IV)和 RNA 聚合酶 V(PolV, DNA-dependent RNA polymerase V)的参与。而恢复 MEMS 甲基化和 ROS1 的表达会导致数千个基因组区域的 DNA 甲基化的累积损失,并逐步恶化其生长表型^[11]。因此,维持甲基化和去甲基化活性间的平衡对植物生长发育至关重要。

2 DNA 甲基化调控园艺植物生长发育

2.1 DNA 甲基化对嫁接的影响

嫁接对缩短园艺植物生长期、增强抗病性及提高产量具有重要作用。研究发现,将葫芦甬砧 1 号嫁接到西瓜早佳 8424 后,DNA 甲基化水平在开花期表现出持续升高,PPR(Pentatricopeptide repeat)和 WD40(WD-repeat protein40)蛋白基因表达持续上调^[12]。Cao 等^[13]发现甘蓝甲基化酶基因 *dDMF7* 和 *uDMF32* 在嫁接过程中差异表达,并发现甲基化差异片段可以匹配嫁接自交 GS1(Grafting-selfing 1)、GS3(Grafting-selfing 3)和 GS5(Grafting-selfing 5)中的 siRNA,植株出现早开花,表明 siRNA 在 DNA 甲基化诱导嫁接过程中起重要作用。siRNA 可诱导砧木 DNA 甲基化,西瓜嫁接到南瓜后,砧木和接穗间发生 miRNA 转移,嫁接后的植株比原植株的平均甲基化水平增加 1.8 倍,总甲基化水平增加了 1.2 倍^[14]。由此可见,植株甲基化水平对嫁接有直接影响,促使嫁接后植株开花期提前。

2.2 DNA 甲基化对开花和性别影响

DNA 甲基化可调控园艺植物春化相关基因的表达和光周期,促进早开花,延长观赏期^[15]。Bruno 等^[16]发现拟南芥不经春化处理,通过 DRD1 和特异性 RNA 聚合酶 PolIVb 作用,促进 RNA 导向的从头甲基化和同源 DNA 沉默,DNA 甲基化水平降低,也能促进开花。Kondo 等^[17]发现紫苏 DNA 甲基化调

控参与春化相关的开花位点基因(*FLC*)的表达,不经光周期诱导直接通过非特异性去甲基化或在甲基化区域去甲基化,也能提早开花。张涛等^[18]发现降低牡丹甲基转移酶基因 *PsDRM* 或上调去甲基化酶基因 *PSROS1* 的表达水平,均可打破花芽休眠,提早开花^[19]。表明牡丹光周期开花相关基因的表达受到 DNA 甲基化的调控。

在雌雄异株植物中, DNA 甲基化对性染色体的活性起重要的调控作用^[20]。DNA 甲基化可加速 Y 染色体特异性区域的异染色质化,改变或者沉默 Y 染色体特异性区域的基因^[21]。番木瓜中, Y/Y^h 染色体性别决定区 SDR 及其对应的 X 染色体区域被高度甲基化修饰,性别决定区的甲基化修饰与番木瓜性染色体相关联^[22]。有些单性花的性别改变与甲基化水平调控有关,如环境变化、插入转座子或者甲基化抑制剂均会促进 DNA 的甲基化状态改变而使性别发生改变^[23]。低温处理下黄瓜茎尖的甲基胞嘧啶频率和甲基化水平降低,黄瓜的雌花数目增加^[24]。甜瓜中 CmWIP1 启动子区由于 ORF3 附近插入转座子 Gyno-hAT 发生甲基化,导致主茎发育从雄性到雌性发生转变^[25]。Akagi 等^[26]用甲基化抑制剂 5-氮杂胞苷(5-AzaC)处理柿树发育中的雄花,通过甲基化抑制剂竞争性地与 DNMTs 作用,使启动子中的 SINE (Short interspersed nuclear element) 插入而沉默,降低 DNA 甲基化导致其雌性化。

2.3 DNA 甲基化对果实发育的影响

果实生长发育是受转录因子参与的多基因调控的复杂过程^[27],与 DNA 甲基化水平密切相关,不同园艺植物 DNA 甲基化调控机制不同^[28]。研究表明,在肉质果实成熟过程中存在广泛的表现遗传重编程,其中 DNA 甲基化介导的转录调控起着核心作用。在桃果实成熟过程中, *PpTPS1* 和 *PpTPS3* 表达增加与其启动子 5-甲基胞嘧啶水平降低有关^[29-30]。番茄成熟果实的 DNA 甲基化水平受到甲基化酶和去甲基化酶共同影响^[31]。用 5-azaC 处理,可使番茄早熟。番茄 *ROS1* 的同源基因 *SIDML2* 是果皮成熟过程中表达的主要基因,降低 *SIDML2* 的表达或敲除可以抑制番茄的成熟^[32]。在番茄果实成熟过程中,鉴定出超过 13000 个低甲基化区域,而这些区域几乎都是 *SIDML2* 低甲基化的必需区域,表明 *SIDML2* 在成熟过程中对介导 DNA 去甲基化起重要作用。同时, *SIDML2* 在突变体中表达的减少伴随着其启动子的高度甲基化^[33]。这些结果揭示了 *SIDML2* 介导的 DNA 去甲基化与番茄果实成熟过程

之间的关系。结果表明,依赖于 *SIDML2* 的启动子去甲基化与许多成熟基因的表达密切相关,并协调了 DNA 去甲基化的表达。

研究发现,在果实成熟期,番茄^[34]和草莓^[35]的 DNA 甲基化水平下降与 siRNA 水平降低相关,而甜橙^[36]和葡萄^[37]的 DNA 甲基化水平下降则是由于 *ROS1* 的同源基因 *SIDML2* 在果实成熟过程中表达量上升,阻止了 24-nt siRNA 介导的甲基化通路,使 DNA 甲基化水平降低。甜橙成熟过程中 DNA 去甲基化酶基因 *CsDME*、*CsDML1*、*CsDML4* 和 *CsDML3* 表达水平升高,导致 DNA 甲基化水平降低^[38]。番木瓜中 *CpPDS*、*CpXTH30*、*CpXTH31* 和 *CpACO4* 在果实成熟的甲基化序列进程中持续去甲基化,诱导基因 *CpROS1.1* 和 *CpROS1.2* 在果实着色期和成熟期显著上调表达,促进果实成熟^[39]。Xiao 等^[40]发现通过下调甲基化基因 *CaMET1-like1*、*CaMET1-like2*、*CaCMT2*、*CaCMT4-like* 等可促进辣椒提前成熟。

3 DNA 甲基化调控园艺植物非生物胁迫响应

3.1 响应干旱和盐胁迫

干旱影响植物细胞的伸长和膨大,导致 DNA 甲基化水平和甲基化模式发生变化以响应干旱胁迫(图 1)^[41-42]。韩雅楠等^[43]发现黄芪 DNA 甲基化水平随 PEG-6000 处理浓度的增加而降低(56.6%~26.1%),这与干旱胁迫下的茄子^[44]和豌豆^[45]的甲基化水平变化趋势一致。袁溢等^[46]发现甘蓝型油菜甲基化水平在干旱胁迫 12 h 时最高,其中亲本白菜型油菜的甲基化水平最高,不同世代的 Bn-S1~Bn-S4 之间,抗旱性强弱表现为:甘蓝 > Bn-S3 > Bn-S4 > Bn-S1 > Bn-S2 > 白菜型油菜,通过甲基化敏感扩增多态性技术分析干旱胁迫下的甘蓝型油菜,发现甲基化水平升高,表明提高植物甲基化水平有利于提高其抗旱能力。Xu 等^[47]发现苹果秦冠和蜜脆干旱胁迫处理后甲基化转移酶 *MdCMT3* 和 *MdCMT2* 的表达量升高,两个品种均表现出较强的抗旱性。

在沙枣^[48]和辣椒^[49]中, *MYBS1* 参与幼苗盐胁迫响应与表达,与 DNA 甲基化水平呈负相关。盐胁迫处理会加剧甲基化的变化幅度,黄瓜种子萌发过程中甲基化水平呈先升高后降低的变化趋势,萌发 1 d 后甲基化水平最高,比第 8 d 高 1.12%,以双链内侧甲基化为主^[50]。低浓度 NaCl 胁迫下,观赏植物盐穗

木的 *HcROS1* 基因表达量变化不大,但高浓度 NaCl (700 mmol/L)胁迫 72 h 表达量显著升高,DNA 甲基化水平持续下降,*HcRos1* 的表达量升高,表明高浓度盐胁迫降低甲基化水平,增强植物的耐盐性^[51]。盐胁迫下,苜蓿 DNA 甲基转移酶同源的两个基因的 mRNA 序列(R4 和 R6)的表达水平分别增加了 5 和 10 倍,甲基化水平降低^[52]。由此可见,植物能够通过调控 DNA 甲基化水平以及相关基因的表达程度,提高植物的抗盐能力。

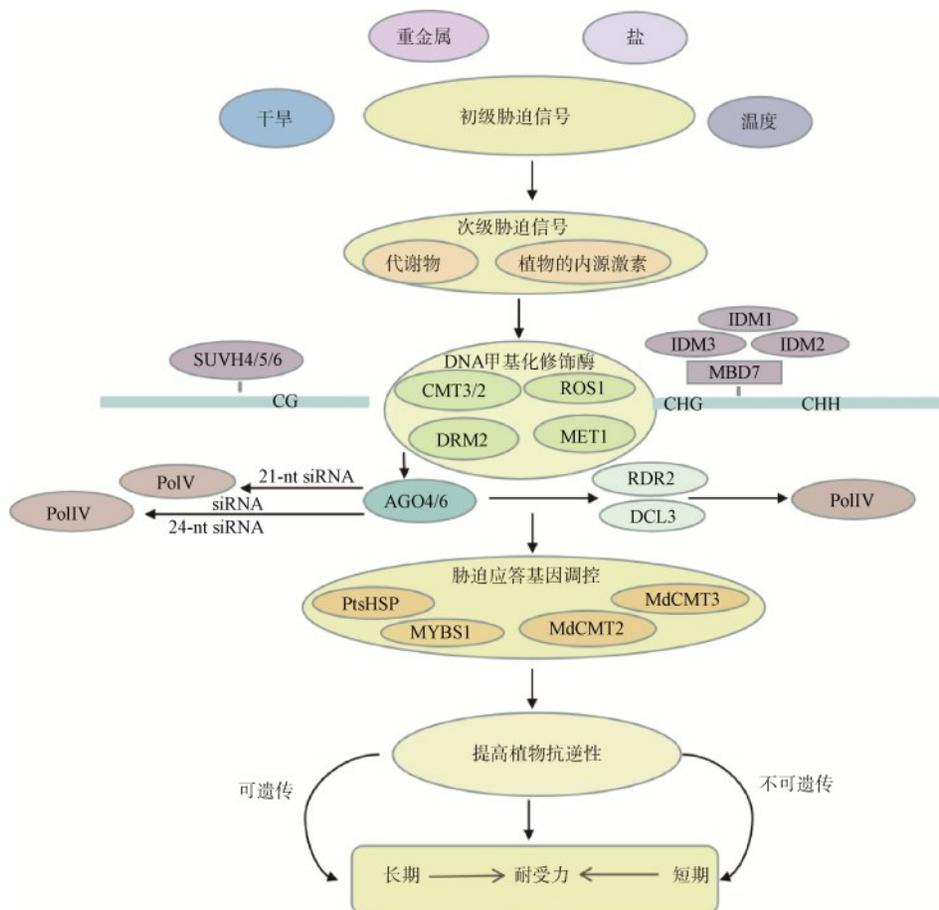
3.2 响应温度胁迫

温度胁迫诱导植物 DNA 甲基化水平发生变化,激活转座子和基因表达以缓解伤害(图 1)^[53]。高温胁迫下半夏热激蛋白基因启动子区发生 DNA 去甲基化,诱导 *PtHSP70*、*PtHSP90* 和 *PtsHSP* 表达显著上调^[54],这与高温胁迫下萝卜^[55]和白菜^[56]的甲基化水平变化趋势一致。香菇耐热和热敏感菌株的 DNA 甲基化在高温胁迫后比例分别上升 43.22% 和 27.03%,全甲基化比例分别上升了 26.42% 和

8.69%,说明高温可诱导香菇菌株甲基化水平提高,且耐热菌株甲基化水平变化大于热敏感菌株^[57]。低温胁迫下,苹果叶片和果实中 ROS1 通过降低花青素相关基因(*MdCHS*、*MdCHI*、*MdF3H*、*MdANS* 和 *MdUFGT*)和 *MdMYB10* 启动子区的甲基化水平,增加花青素的积累^[58]。Gai 等^[59]发现低温处理过程中牡丹花芽去甲基化位点连续增多,DNA 甲基化水平降低,花芽萌动率与成花率显著升高。冷驯化过程中,油菜 *BramMDH1*、*BraKAT2*、*BraSHM4*、*Bra4CL2* 甲基化基因水平降低,能够提高生长速度^[60]。因此,植物能够通过 DNA 甲基化水平改变来维持基因组稳定,增强植物对温度胁迫的耐性。

3.3 响应重金属胁迫

重金属胁迫下植物基因组的甲基化水平发生改变,快速修饰植物 DNA,导致基因表达发生改变(图 1)^[61]。重金属胁迫对植物的影响因物种和剂量的不同而异。在不同浓度的镉(50、250 和 500 mg/L)胁迫下,萝卜基因组中甲基化的比率分别增加了 1%、



AGO4/6、RDR2、DCL3、SUVH4/5/6: 蛋白; →: 促进; —: 互动
 AGO4/6、RDR2、DCL3、SUVH4/5/6: Protein; →: Promote; —: Interact

图 1 DNA 甲基化对植物非生物胁迫的响应

Fig. 1 Response of DNA methylation to abiotic stress in plants

3% 和 5%, 甲基化水平随胁迫处理浓度的增加而升高, 激活保护酶活性增强植物的抗逆性^[62], 这与铅胁迫下萝卜 DNA 甲基化水平变化一致^[63]。铜胁迫诱导黑藻 DNA 的甲基化修饰有两种方式, 一种是通过上调 DRM2、CMT 和 SUV16 同源蛋白基因的表达, 提高 DNA 甲基化水平; 另一种方式是诱导产生异常的 DNA 结构, 产生活性氧阻止 DNA 甲基化^[64]。通过两种方式调节甲基化水平来修饰其基因组, 响

应铜胁迫。铝胁迫下六堡茶苗叶片的甲基化水平在铝浓度为 200 mg/L 时达到最高, 400 mg/L 时下降, 高浓度的铝抑制了 DNA 甲基转移酶的活性, 甲基化水平降低^[65](表 1)。重金属胁迫是一个相对复杂的过程, 不同植物响应重金属胁迫的表观遗传调控机制不同, 但均通过甲基化修饰改变 DNA 构象, 导致染色体结构变化, 影响 DNA 和蛋白质的互作, 调控基因表达以应答重金属胁迫。

表 1 DNA 甲基化在园艺植物生长发育和非生物胁迫响应方面的研究

Table 1 Studies of DNA methylation on growth and development, and abiotic stress response of horticultural plants

园艺作物 Horticultural crops	影响因素 Influence factor	全基因组/基因水平变化 Genome wide/gene level change	参考文献 Reference
番茄 Tomato	果实成熟	下调	[34]
草莓 Strawberry	果实成熟	下调	[35]
甜橙 Orange	果实成熟	上调	[36]
葡萄 Grape	果实发育和成熟	上调	[37]
番木瓜 Papaya	果实成熟	下调	[39]
辣椒 Pepper	果实成熟	下调	[40]
黄瓜种子 Cucumber seeds	盐胁迫	下调	[50]
紫花苜蓿 Lucerne	盐胁迫	上调	[52]
白菜幼苗 Cabbage seedlings	高温胁迫	下调	[56]
萝卜 Turnip	镉胁迫	上调	[62]
萝卜 Turnip	铅胁迫	上调	[63]
葫芦 Calabash	嫁接后	上调	[12]
紫苏 Perilla	甲基化诱导光周期改变	下调	[17]
甜瓜 Melon	转座子	上调	[25]
柿树 Persimmon tree	性别决定基因性别雌性化	下调	[26]
蒙古黄芪 Mongolian astragalus	水分亏缺	下调	[43]
油菜 Rapeseed	水分亏缺	下调	[46]
半夏 Pinellia ternate	高温胁迫	下调	[54]
萝卜 Turnip	高温胁迫	下调	[55]
香菇菌丝 Shiitake mushroom mycelium	高温胁迫	上调	[57]
油菜 Brassica rapa	低温胁迫	下调	[60]
苹果 Apple	低温胁迫	下调	[58]
六堡茶苗 Liubao tea seedlings	铝胁迫	下调	[65]
苹果 Apple	干旱胁迫	上调	[47]
牡丹 Paeonia suffruticosa	赤霉素处理	下调	[18]
甘蓝 Sprouts	嫁接后	上调	[13]

4 小结与展望

表观遗传调控园艺植物生长发育和非生物胁迫应答是一个复杂的过程。DNA 甲基化与园艺植物的生长发育及逆境胁迫应答密切相关, 有些位置的 DNA 甲基化在胁迫后会稳定遗传给后代, 提高抗逆性。尽管 DNA 甲基化在园艺植物生长发育和非生物胁迫表观调控方面的研究取得了新进展, 但仍有许多表观遗传与 DNA 甲基化的关系未被挖掘, 如: (1) 园艺植物逆境适应中有很多和 DNA 甲基化相关联的基因, 发掘更多确切的基因可更好地提高

植物的抗逆能力; (2) 园艺植物嫁接后 DNA 甲基化水平与变异的具体机制还不清楚; (3) 揭示园艺植物育种中如何通过调节 DNA 甲基化水平来改变性状并遗传给后代的机理等。这些问题的进一步探索研究, 将为阐明并揭示园艺植物甲基化调控生长发育及逆境胁迫应答机制以及培育性状优良的园艺植物新品种提供理论依据。

参考文献

- [1] Niederhuth C E, Bewick A J, Ji L, Alabady M S, Kim K D, Li Q, Rohr N A, Rambani A, Burke U J A, Egesi C,

- Schmutz J, Grimwood J, Jackson S A, Springer N M, Schmitz J M. Widespread natural variation of DNA methylation within angiosperms. *Science*, 2018, 362: 1182-1186
- [2] Li J, Jia W, Wang H. Morpho-physiological adaptation and DNA methylation of wheat seedlings under osmotic stress. *Crop and Pasture Science*, 2020, 52: 349-355
- [3] Tang K, Lang Z B, Zhang H, Zhu J K. The DNA demethylase ROS1 targets genomic regions with distinct chromatin modifications. *Nature Plants*, 2016, 2: 16169
- [4] Zhang H M, Lang Z B, Zhu J K. Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19: 489-506
- [5] Liu G F, Xia Y D, Liu T K, Dai S J, Hou X L. The DNA methylome and association of differentially methylated regions with differential gene expression during heat stress in *Brassica rapa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19 (5): 1414
- [6] Calarco J P, Borges F, Donoghue M T A, Van Ex F, Jullien P, Lopes T, Gardner R, Berger F, Feijó J A, Becker J D, Martienssen R A. Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell*, 2012, 151: 194-205
- [7] Ingouff M, Selles B, Michaud C. Live-cell analysis of DNA methylation during sexual reproduction in *Arabidopsis* reveals context and sex-specific dynamics controlled by noncanonical RdDM. *Genes and Development*, 2017, 31: 72-83
- [8] Cécile D, Mounir E M, Dominique G, Arnaud C, Cyrielle P, Paola B, Joëlle R. Combined analysis of DNA methylation and cell cycle in cancer cells. *Epigenetics*, 2015, 10(1): 82-91
- [9] Michael T P. Plant genome size variation: Bloating and purging DNA. *Briefings in Functions Genomics*, 2014, 13: 308-317
- [10] 毛新国, 李昂, 景蕊莲. 植物DNA甲基化与作物种质资源保存. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(6): 659-665, 697
- Mao X G, Li A, Jing R L. Plant DNA methylation and crop germplasm conservation. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2010, 11(6): 659-665, 697
- [11] Manu J D, Zhang P, Meng D Z, Marie-Stanislas R, Francesco P C, Philipp D, André K, Geraldine J, Bjarni V, Joanna J, Selen I, Viktor V, Song Q, Long Q, Gunnar R, Oliver S, Richard M C, Magnus N. DNA methylation in *Arabidopsis* has a genetic basis and shows evidence of local adaptation. *eLife*, 2015, 4: e05255
- [12] Fariborz H, Tie L, Kevin F, Ali S. Physiological, biochemical, and molecular aspects of grafting in fruit trees. *Horticulture Research*, 2022, 10: 32
- [13] Cao L, Yu N, Li J. Heritability and reversibility of DNA methylation induced by in vitro grafting between *Brassica juncea* and *B. oleracea*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27233
- [14] Avramidou E, Kapazoglou A, Aravanopoulos F A, Xanthopoulou A, Ganopoulos I, Tsaballa A, Madesis P, Doulis A G, Tsaftaris A. Global DNA methylation changes in Cucurbitaceae inter-species grafting. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2015, 15: 112-116
- [15] Qi X Y, Wang H B, Song A P, Jiang J F, Chen S M, Chen F D. Genomic and transcriptomic alterations following intergeneric hybridization and polyploidization in the *Chrysanthemum nankingense* × *Tanacetum vulgare* hybrid and allopolyploid (Asteraceae). *Horticulture Research*, 2018, 5: 5
- [16] Bruno H, Tatsuo K, Lucia D, Werner A, Antonius J M, Marjori M. Endogenous targets of RNA directed DNA methylation and polIV in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 2006, 25(12): 2828-2836
- [17] Kondo H, Shiraya T, Wada K C, Takeno K. Induction of flowering by DNA demethylation in *perilla frutescens* and *silene armeria*: Heritability of 5-azac dine-induced effects and alteration of the DNA methylation state by photoperiodic conditions. *Plant Science*, 2010, 178(3): 321-326
- [18] 张涛, 司福会, 张玉喜, 盖树鹏. 外源 GA₃ 影响牡丹花芽 DNA 甲基化水平和相关酶基因的表达分析. *中国农业科学*, 2018, 51(18): 3561-3569
- Zhang T, Si F H, Zhang Y X, Gai S P. Effect of exogenous gibberellin on DNA methylation level expression of related enzyme genes in tree peony floral buds. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(18): 3561-3569
- [19] Li S F, Zhang G J, Yuan J H, Deng C L, Gao W J. Repetitive sequences and epigenetic modification: Inseparable partners play important roles in the evolution of plant sex chromosomes. *Plant*, 2016, 243: 1083-1095
- [20] Hollister J D, Gaut B S. Epigenetic silencing of transposable elements: A trade-off between reduced transposition and deleterious effects on neighboring gene expression. *Genome Research*, 2009, 19(8): 1419-1428
- [21] 杨琳琳, 黄云彤, 付泽元, 徐启江. 园艺植物性别决定的表观遗传机制研究进展. *园艺学报*, 2022, 49 (7): 1602-1610
- Yang L L, Huang Y T, Fu Z Y, Xu Q J. Research progress on the epigenetic mechanisms of sex determination in horticultural plants. *Acta Horticulturae Sinica*, 2022, 49 (7): 1602-1610
- [22] Matzke M A, Mosher R A. RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15: 394-408
- [23] Herman J J, Sultan S E. DNA methylation mediates genetic variation for adaptive transgenerational plasticity. *Proceedings of the Royal Society B: BioLogical Sciences*, 2016, 283 (1838): 988
- [24] Lai Y S, Zhang X, Zhang W, Shen D, Wang H, Xia Y, Qiu Y, Song J, Wang C, Li X. The association of changes in DNA methylation with temperature-dependent sex determination in cucumber. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68: 2899-2912
- [25] Antoine M, Christelle T, Adnane B, Mazen R, Ronan F, Halima M, Michel P, Catherine D, Abdelhafid B. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature*, 2009, 461(7267): 1135-1138

- [26] Akagi T, Henry I M, Kawai T, Comai L, Tao R. Epigenetic regulation of the sex determination gene *MeGI* in polyploid persimmon. *The Plant Cell*, 2016, 28: 2905-2915
- [27] 郭广平, 袁金玲, 吴晓丽, 顾小平. DNA 甲基化在植物研究中的应用现状与前景. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(3): 425-430
Guo G P, Yuan J L, Wu X L, Gu X P. DNA methylation and its application in plant research. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, 12(3): 425-430
- [28] Fortes A M, Granell A, Pezzotti M, Bouzayen M. Molecular and metabolic mechanisms associated with fleshy fruit quality. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1236
- [29] Zhou L L, Tang R K, Li X J, Tian S P, Li B B, Qin G Z. N6-methyladenosine RNA modification regulates strawberry fruit ripening in an ABA-dependent manner. *Genome Biology*, 2021, 22: 168
- [30] Li S, Chen K S, Donald G. Molecular and hormonal mechanisms regulating fleshy fruit ripening. *Cells*, 2021, 10(5): 1136
- [31] Wei C Y, Liu H R, Cao X M, Zhang M L, Li X, Chen K S, Zhang B. Synthesis of flavour-related linalool is regulated by *PpbHLH1* and associated with changes in DNA methylation during peach fruit ripening. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(10): 2082-2096
- [32] Wei C Y, Li M T, Cao X M, Jin Z N, Zhang C, Xu M, Chen K S, Zhang B. Linalool synthesis related *PpTPS1* and *PpTPS3* are activated by transcription factor *PpERF61* whose expression is associated with DNA methylation during peach fruit ripening. *Plant Science*, 2022, 317: 111200
- [33] Shan S S, Wang Z Q, Pu H L, Duan W H, Song H M, Li J K, Zhang Z K, Xu X B. DNA methylation mediated by melatonin was involved in ethylene signal transmission and ripening of tomato fruit. *Scientia Horticulturae*, 2022 (291): 110566
- [34] Gao Y, Lin Y J, Xu M, Bian H X, Zhang C, Wang J Y, Wang H Q, Xu Y P, Niu Q F, Zuo J H, Fu D Q, Pan Y, Chen K S, Harry K, Lang Z B, Zhang B. The role and interaction between transcription factor NAC-NOR and DNA demethylase SIDML2 in the biosynthesis of tomato fruit flavor volatiles. *New Phytologist*, 2022, 23(19): 11191
- [35] Lang Z B, Wang Y H, Tang K, Tang D G, Datsenko T, Cheng J F, Zhang Y J, Handa A K, Zhu J K. Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114 (22): 4511-4519
- [36] Cheng J F, Niu Q F, Zhang B, Chen K S, Yang R H, Zhu J K, Zhang Y J, Lang Z B. Downregulation of RdDM during strawberry fruit ripening. *Genome Biology*, 2018, 19(2): 212
- [37] Huang H, Liu R E, Niu Q F, Tang K, Zhang B, Zhang H, Chen K S, Zhu J K, Lang Z B. Global increase in DNA methylation during orange fruit development and ripening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, 116 (4): 1430-1436
- [38] Shanguan L F, Fang X, Jia H F, Chen M X, Zhang K K, Fang J G. Characterization of DNA methylation variations during fruit development and ripening of *Vitis vinifera* (cv. 'Fujiminori'). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2020, 26(4): 617-637
- [39] 周陈平, 杨敏, 郭金菊, 邝瑞彬, 杨护, 黄炳雄, 魏岳荣. 番木瓜成熟过程中全基因组DNA甲基化和转录组变化分析. *园艺学报*, 2022, 49(3): 519-532
Zhou C P, Yang M, Guo J J, Kuang R B, Yang H, Huang B X, Wei Y R. Dynamic changes in DNA methylome and transcriptome patterns during papaya fruit ripening. *Acta Horticulturae Sinica*, 2022, 49 (3): 519-532
- [40] Xiao K, Chen J, He Q M, Wang Y X, Shen H L, Sun L. DNA methylation is involved in the regulation of pepper fruit ripening and interacts with phytohormones. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(6): 1928-1942
- [41] Liu C X, Li H, Lin J, Wang Y, Xu X Y, Cheng Z M, Chang Y H. Genome-wide characterization of DNA demethylase genes and their association with salt response in pyrus. *Genes*, 2018, 9(8): 398
- [42] Virilouvet L, Fromm M. Physiological and transcriptional memory in guard cells during repetitive dehydration stress. *New Phytologist*, 2015, 205(2): 596-607
- [43] 韩雅楠, 赵犇鹏, 崔向军. 非生物胁迫蒙古黄芪基因组的MSAP分析. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(7): 3119-3125
Han Y N, Zhao B P, Cui X J. Genome MSAP analysis of astragalus mongholicus under abiotic stresses. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(7): 3119-3125
- [44] Moglia A, Gianoglio S, Acquadro A, Valentino D, Milani A M, Lanteri S, Comino C. Identification of DNA methyltransferases and demethylases in *Solanum melongena* L., and their transcription dynamics during fruit development and after salt and drought stresses. *PLoS ONE*, 2019, 14(10): 223581
- [45] Labra M, Ghiana A, Citterio S, Sgorbati S, Sala F, Vannini C, Ruffini-Castiglione M, Bracale M. Analysis of cytosine methylation pattern in response to water deficit in pea root. *Plant Biology*, 2002, 4: 694-699
- [46] 袁溢, 朱双, 方婷婷, 蒋金金, 王幼平. 人工合成甘蓝型油菜抗旱性及DNA甲基化水平分析. *作物学报*, 2019, 45(5): 693-704
Yuan Y, Zhu S, Fang T T, Jiang J J, Wang Y P. Analysis of drought resistance and DNA methylation level of resynthesized *Brassica napus*. *Acta Agronomica Sinica*, 2019, 45 (5): 693-704
- [47] Xu J D, Zhou S S, Gong X Q. Single-Base methylome analysis reveals dynamic epigenomic differences associated with water deficit in apple. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(2): 672-687
- [48] 耿红凯, 毕春竹, 韦淋馨, 宋振琪, 李红卫. 不同种源地沙枣幼苗对混合盐胁迫的生长及生理响应研究. *北京林业大学学报*, 2021, 43(10): 9-17

- Geng H K, Bi C Z, Wei L X, Song Z Q, Li H W. Effects of salt stress on the growth and physiological and biochemical characteristics of *Elaeagnus angustifolia* seedlings from different provenances. *Journal of Beijing Forestry University*, 2021, 43(10): 9-17
- [49] Lopez S L, Calatayud N, Lopez-Galarza S. Uncovering salt tolerance mechanisms in pepper plants: A physiological and transcriptome approach. *BMC Plant Biology*, 2021, 21: 169-176
- [50] 黄韞宇, 张海军, 邢燕霞, 齐艳, 孙倩倩, 周春蕾, 赵冰, 郭仰东. NaCl胁迫对黄瓜种子萌发的影响及DNA甲基化的MSAP分析. *中国农业科学*, 2013, 46(8): 1646-1656
Huang Y Y, Zhang H J, Xing Y X, Qi Y, Sun Q Q, Zhou C L, Zhao B, Guo Y D. Effects of NaCl stress on seed germination and DNA methylation status detected by MSAP analysis in cucumber. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(8): 1646-1656
- [51] 杜驰, 张冀, 张丽丽, 张富春. 盐胁迫下盐穗木DNA甲基化程度与去甲基化酶基因(*Ros1*)表达的相关性研究. *新疆农业科学*, 2017, 54(5): 878-885
Du C, Zhang J, Zhang L L, Zhang F C. Study on the correlation between the degree of DNA methylation and the expression of demethylase gene (*Ros1*) in *Halostachys caspica* under salt stress. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2017, 54(5): 878-885
- [52] Lawati A, Bahry A, Victor R, Lawati A, Yaish M W. Salt stress alters DNA methylation levels in alfalfa (*Medicago* spp). *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2016, 15(1): 8299
- [53] Kovi M R, Sandve S R, Fjellheim S, Larsen A, Rudi H, Asp T, Kent M P, Rognli O A. Population structure, genetic variation and linkage disequilibrium in perennial ryegrass populations divergently selected for freezing tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 929
- [54] 晁秋杰, 刘晓, 韩磊, 马晨晨, 高荣荣, 陈颖, 施江, 熊雨婕, 薛涛, 薛建平. 高温胁迫诱导半夏基因组甲基化的变异分析. *中国中药杂志*, 2020, 45(2): 341-346
Chao Q J, Liu X, Han L, Ma C C, Gao R R, Chen Y, Shi J, Xiong Y J, Xue T, Xue J P. Variation analysis of genomic methylation induced by high temperature stress in *Pinellia ternata*. *Chinese Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, 45(2): 341-346
- [55] 曾子入, 贺从安, 张小康, 骆海波, 张雪丽. 高温胁迫诱导萝卜基因组甲基化变异分析. *分子植物育种*, 2018, 16(7): 2094-2098
Zeng Z R, He C A, Zhang X K, Luo H B, Zhang X L. Analysis of genome methylation mutation in radish (*Raphanus sativus* L.) induced by heat stress. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(7): 2094-2098
- [56] 许会会, 刘维信, 孙艳, 林多. 5-氮杂胞苷对白菜幼苗DNA甲基化和耐热性的影响. *园艺学报*, 2012, 39(3): 567-573
Xu H H, Liu W X, Sun Y, Lin D. The Effects of 5-azacytidine on DNA methylation and heat tolerance of seedlings of non-heading Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39(3): 567-573
- [57] 宋爽, 刘宇, 高琪, 赵爽, 王守现, 宋庆港. 高温胁迫下香菇基因组甲基化差异分析. *中国食用菌*, 2019, 38(10): 9-11, 16
Song S, Liu Y, Gao Q, Zhao S, Wang S X, Song Q G. Analysis of genomic DNA methylation of *Lentinula edodes* under heat stress. *Chinese Edible Fungi Association*, 2019, 38(10): 9-11, 16
- [58] Lu J Y, Yu Y S, Xi Z, Meng C C, Ting W, Jie Z, Yi F X, Ji T, Yun C Y. ROS1 promotes low temperature induced anthocyanin accumulation in apple by demethylating the promoter of anthocyanin-associated genes. *Horticulture Research*, 2022, 9: 7-10
- [59] Gai S P, Zhang F, Zhang Y X, Zheng G S. Analysis of genomic DNA methylation during chilling induced endodormancy release by methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) technology in tree peony. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(3): 261-267
- [60] Liu T K, Li Y, Duan W K, Huang F Y, Hou X L. Cold acclimation alters DNA methylation patterns and confers tolerance to heat and increases growth rate in *Brassica rapa*. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(5): 1213-1224
- [61] Regier N, Beauvais-Fluck R, Slaveykova V I, Cosio C. *Elodea nuttallii* exposure to mercury exposure under enhanced ultraviolet radiation: Effects on bioaccumulation, transcriptome, pigment content and oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 2016, 180: 218-226
- [62] 杨金兰, 柳李旺, 龚义勤, 黄丹琼, 王峰, 何玲莉. 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*, 2007, 33(3): 219-226
Yang J L, Liu L W, Gong Y Q, Huang D Q, Wang F, He L L. Analysis of DNA methylation sensitive amplified polymorphisms in radish genome under cadmium stress. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2007, 33(3): 219-226
- [63] 何玲莉, 沈虹, 王燕, 王娟娟, 龚义勤, 徐良, 柳李旺. 铅胁迫下萝卜基因组DNA甲基化分析. *核农学报*, 2015, 29(7): 1278-1284
He L L, Shen H, Wang Y, Wang J J, Gong Y Q, Xu L, Liu L W. Analysis of genomic DNA methylation level in radish under lead stress. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(7): 1278-1284
- [64] Shi D L, Zhuang K, Xia Y, Zhu C H, Chen C, Hu Z B, Shen Z G. *Hydrilla verticillata* employs two different ways to affect DNA methylation under excess copper stress. *Aquatic Toxicology*, 2017, 10(7): 97-104
- [65] 叶锦培, 李晓丽, 唐世斌, 严壮洧, 陈仕香, 刘海梅, 黄爱萍. 铝处理对六堡茶苗抗性生理和DNA甲基化水平的影响. *山东农业科学*, 2020, 52(4): 112-116
Ye J P, Li X L, Tang S B, Yan Z Y, Chen S X, Liu H M, Huang A P. Effects of aluminum treatment on resistance physiology and DNA methylation level of *Liubaotea* seedlings. *Shandong Agricultural Sciences*, 2020, 52(4): 112-116