DNA甲基化研究进展及其在木本植物中的发展趋势

房媛媛^{1,2,3}, 肖亮^{1,2,3}, 卢文杰^{1,2,3}, 姚良臣^{1,2,3}, 李连政^{1,2,3}, 杜庆章^{1,2,3}, 张德强^{1,2,3*}

1. 北京林业大学林木分子设计育种高精尖创新中心, 北京 100083;

2. 北京林业大学, 林木育种国家工程实验室, 北京 100083;

3. 北京林业大学生物科学与技术学院, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083

* 联系人, E-mail: DeqiangZhang@bjfu.edu.cn,

收稿日期: 2019-06-11; 接受日期: 2019-11-22; 网络版发表日期: 2020-02-11

中央高校基本科研业务费(批准号: 2015ZCQ-SW-01)、北京市科技新星计划课题(批准号: Z181100006218024)和北京林业大学2019年度一流学科建设项目(批准号: 2019XKJS0308)资助

摘要 DNA甲基化是真核生物中分布最广也是最重要的表观遗传修饰类型。近年来, DNA甲基化调控动植物生长发育过程的研究引起了人们的广泛关注, 关于DNA甲基化在动植物遗传育种领域的研究进展也逐渐被报道。本文通过综述DNA甲基化基本概况、主要检测技术及其在木本植物中的研究进展, 进一步探讨了林木DNA甲基化研究的未来发展趋势及主要应对策略, 提出了全基因组水平的表观关联分析(epigenome-wide association study, EWAS)、CRISPR/dCas9(deactivated CRISPR-associated protein 9)系统与表观基因组等系统生物学研究方案, 为解析林木复杂性状的遗传调控机制及制定分子育种策略提供了新思路。

关键词 林木, 数量性状, DNA甲基化, 分子育种, EWAS

表观遗传学(epigenetics)是研究在核苷酸序列不发生改变的条件下, 基因功能发生可遗传的变化并最终导致表型变异的学科^[1]。表观遗传修饰类型主要包括DNA甲基化(DNA methylation)、组蛋白修饰(histone modification)以及非编码RNA(noncoding RNA)等。它们参与基因表达调控过程, 在响应生物体内或外界环境的刺激时会发生动态变化, 从而影响生物体的表型可塑性和环境适应性。通过探究植物基因组表观遗传修饰的分子机制, 可以更好地了解植物如何利用表观遗传修饰调控生长发育过程以及适应环境变化

等^[2]。DNA甲基化是目前研究最为广泛的表观遗传修饰类型, 也是在多年生木本植物中研究较多的一类表观遗传修饰类型, 本文主要围绕DNA甲基化的基本概念、检测方法以及DNA甲基化在木本植物中的研究进展等方面进行综述。

1 DNA甲基化概述

DNA甲基化是动植物调控基因表达的重要机制, 目前DNA甲基化的建立、维持以及去甲基化机制已

引用格式: 房媛媛, 肖亮, 卢文杰, 等. DNA甲基化研究进展及其在木本植物中的发展趋势. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 154–166

Fang Y Y, Xiao L, Lu W J, et al. Research progress and prospect of DNA methylation in perennial woody plants (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 154–166, doi: 10.1360/SSV-2019-0135

得到较为深入的解析, 一些植物或哺乳动物特有的途径也被阐明, 极大地加深了人们对于DNA甲基化的精确定位、维持以及修饰途径的理解^[3]. 在植物中, DNA甲基化主要通过DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)将S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)的甲基基团转移到胞嘧啶的第5位碳原子上, 形成5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m⁵C). 一般而言, 胞嘧啶甲基化可分为CG, CHG(H代表A、T、C), CHH三种类型. 其中, CG甲基化主要富集在CG岛区域, 主要由DNA甲基转移酶MET1(methyltransferase 1)来维持; CHG甲基化主要由DNA甲基转移酶CMT3(chromomethylase 3)来维持; 而CHH甲基化不能被维持, 只能在新的细胞周期中从头建立, 其通过DNA甲基转移酶DRM2(domains rearranged methyltransferase 2)或CMT2(chromomethylase 2)参与的RNA介导的DNA甲基化(RNA-directed DNA methylation, RdDM)途径建立^[4]. 在大多数情况下, DNA甲基化是一种稳定的表观遗传修饰标记, 例如, 研究人员在对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组DNA甲基化水平的研究中发现, 超过99%的甲基化位点可以通过减数分裂实现稳定遗传^[5]. 但在植物的发育过程中, 也可以观察到因环境改变发生重新甲基化和去甲基化导致的DNA甲基化水平差异现象, DNA从头甲基化由DNA甲基化酶DRMs(domains rearranged methyltransferases)参与的RdDM途径建立^[6-10], 研究表明, 高等植物基因组中的RdDM途径在沉默转座子以维持基因组的稳定性方面发挥重要作用^[11]. DNA去甲基化可以在DNA复制过程中, 由于维持甲基化途径的缺失而发生, 如拟南芥*met1*的缺失会导致全基因组甲基化水平降低^[12]; 也可以通过一系列酶催化去除甲基化的胞嘧啶而发生, 如植物体内的DNA糖基化酶DME(demeter)和ROS1(repressor of silencing 1)等^[13], 在拟南芥中过表达*ROS1*会导致胞嘧啶甲基化水平降低, 表明ROS1是一种去甲基化酶, 进一步研究发现, ROS1首先利用糖基化酶活性将5-甲基胞嘧啶从核酸链上移除, 然后通过其裂解酶活性在DNA链上碱基移除的位点处产生切口, 最后通过连接反应加上未甲基化的胞嘧啶, 完成DNA去甲基化过程^[14-17].

目前, 大量研究表明, DNA甲基化在调节动植物生长发育过程和维持基因组稳定性中起至关重要的作用. 基因组不同区域的DNA甲基化会对基因活性产生

不同的影响, 如在基因启动子区的DNA甲基化通常抑制基因转录, 基因本体区域的甲基化与基因转录呈正相关, 而在基因间隔区域, DNA甲基化的主要作用是抑制潜在有害遗传元素的表达^[18]. 例如, Wang等人^[19]对玉米(*Zea mays*)的 α -醇溶蛋白基因启动子区域的DNA甲基化分析发现, 启动子的高甲基化能抑制醇溶蛋白基因的表达. Zhang等人^[20]通过构建拟南芥全基因组DNA甲基化图谱发现, 在重复序列以及产生小干扰RNA序列(small interfering RNAs, siRNAs)的区域被高度甲基化; 进一步分析表明, 在转录区域甲基化的基因具有高表达水平, 而启动子区甲基化的基因具有更高层次的组织特异性表达. 甜瓜(*Cucumis melo*)中*CmWIP1*基因上游区域由于一个转座子的插入, 导致该基因的甲基化水平上升, 使得两性花突变成雌性花, 表明DNA甲基化可以通过调控基因表达从而影响植物的性别决定^[21]. Sheldon等人^[22]在对拟南芥开花过程的研究中发现, 由于DNA甲基化水平的降低导致开花基因表达下调而延迟开花. Zhong等人^[23]通过对番茄(*Solanum lycopersicum*)果实成熟过程中4个时期的全基因组DNA甲基化状态进行检测, 发现DNA甲基化水平在果实发育过程中是动态变化的. 以上研究表明, 生物体的DNA甲基化分布具有组织特异性、时空特异性及染色体区域特异性, 并进一步揭示了动植物通过DNA从头甲基化和去甲基化机制精确调控基因表达从而影响性状变异的遗传机理.

2 木本植物DNA甲基化研究进展

与模式植物或一年生农作物的DNA甲基化研究相比, 多年生木本植物DNA甲基化研究进展相对缓慢, 但大多数木本植物具有多年生、生长周期长、野生性强、群体变异丰富等特点, 这些特点决定了其林木DNA甲基化研究工作的独特性与创新性. 近年来, 随着DNA甲基化研究方法的发展, 树木环境适应性以及木材品质性状等方面的表观遗传调控机制研究取得了显著进展, 提高了人们对木本植物DNA甲基化水平及其表观遗传效应的认识.

2.1 林木DNA甲基化主要检测技术

依据分辨率水平的不同, 林木DNA甲基化检测技术(表1)主要分为高效液相色谱技术(high performance

表 1 DNA甲基化检测技术

Table 1 technique for detecting DNA methylation

方法	基本原理	分辨率	主要覆盖范围	GC偏好性	是否需要参考基因组	参考文献
高效液相色谱(HPLC)	水解处理、紫外检测	全基因组	全基因组	无	否	[24~26]
甲基化敏感扩增多态性(MSAP)	酶切	60 bp	高CG区域	有	否	[24,27,28]
全基因组重亚硫酸盐测序(WGBS)	Bisulfite处理	单碱基	全基因组	无	是	[29,30]
简化基因组重亚硫酸盐测序(RRBS)	酶切、Bisulfite处理	单碱基	启动子和CpG岛	无	是	[31,32]
甲基化DNA免疫共沉淀测序(MeDIP-seq)	抗体富集	100 bp	高CG区域	有	是	[31,33,34]
目标区域甲基化测序(Target-BS)	探针捕获、Bisulfite处理	单碱基	取决于探针设计	无	是	[31,34]

liquid chromatography, HPLC)、甲基化敏感定量PCR技术(methylation-sensitive quantitative polymerase chain reaction, MS-qPCR)以及重亚硫酸盐转化方法(bisulfite conversion, BisCo)与高通量测序结合的技术手段。不同DNA甲基化检测技术的应用需要根据具体研究目标、参考基因组序列的可用性和样本数量等来选择。其中, HPLC技术可以在不需要参考基因组的条件下, 对林木全基因组DNA甲基化水平进行定量, 但是其操作体系较为繁琐^[24], 是应用较早的DNA甲基化检测技术。例如, Baurens等人^[25]利用HPLC技术对相思树(*Acacia mangium*)两种不同形态的叶片进行了全基因组DNA甲基化定量分析发现, 由于成年组织的DNA甲基化水平低于幼年组织, 导致叶片形态的相变。裸子植物通常具有非常庞大的基因组, 并且存在大量的重复序列, 其序列组装十分困难, Li等人^[26]利用优化的HPLC体系准确地对离体培养的红豆杉(*Taxus chinensis*)细胞基因组甲基化水平进行了定量发现, 两种不同培养时长细胞的DNA甲基化水平存在显著差异, 这与先前研究结果一致, 因此, 优化的HPLC体系为植物离体培养的DNA甲基化变异研究提供了理论基础。MS-qPCR技术以限制性核酸内切酶为基础, 能够在全基因组水平检测内切酶识别的特定位点甲基化水平, 并且速度快, 成本低, 可以同时处理大量样品^[24], 其中MSAP(methylation-sensitive amplification polymorphism)技术特定识别CCGG位点, 在木本植物的DNA甲基化检测中应用较为广泛。例如, Song等人^[27]利用MSAP技术对4种胁迫处理的小叶杨(*Populus simonii*)的全基因组DNA甲基化修饰位点进行检测, 通过对DNA甲基化水平的比较分析, 揭示了小叶杨响应不同逆境胁迫时的DNA甲基化差异修饰模式。Ma等人^[28]

在对木本花卉梅(*Prunus mume*)的研究中, 利用MSAP技术发现, 叶片的长度、宽度和面积与总甲基化水平呈正相关, 从而揭示了DNA甲基化水平在叶片表型变异中的重要作用。研究者利用亚硫酸盐对基因组DNA进行处理, 使得未甲基化的胞嘧啶脱氨基转化为尿嘧啶, 经PCR扩增并测序后, 未甲基化胞嘧啶变为胸腺嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶保持不变, 该方法可以在单碱基分辨率水平分析特异链的DNA甲基化模式, 从而构建DNA甲基化图谱^[24]。例如, 苏畅^[35]在白桦(*Betula platyphylla*)中利用重亚硫酸盐测序(bisulfate-sequencing, BS)技术, 构建了单碱基分辨率的甲基化图谱, 并与白桦的转录组数据联合分析, 进一步揭示了DNA甲基化的转录调控作用。

依据甲基化测序方法的不同, 林木DNA甲基化检测技术(表1)主要分为甲基化DNA免疫共沉淀测序技术(methylated DNA immunoprecipitation sequencing, MeDIP-seq)、全基因组重亚硫酸盐测序技术(whole genome bisulfite sequencing, WGBS)、简化基因组重亚硫酸盐测序技术(reduced representation bisulfite sequencing, RRBS)以及第三代测序技术等。MeDIP-seq技术以抗体富集为基础, 利用甲基化特异性抗体或含有甲基结合结构域的蛋白通过免疫沉淀富集基因组甲基化片段, 然后对CG密集的高甲基化区域进行高通量测序, 可以快速有效地发现基因组中的DNA甲基化区域的分布特征, 从而分析不同组织样本间的DNA甲基化变异模式^[31,33,34]。WGBS技术将重亚硫酸盐转化方法和高通量测序相结合, 可以在全基因组范围内精确分析单个胞嘧啶的甲基化状态, 从而构建精细的全基因组DNA甲基化图谱, 是目前甲基化测序的金标准^[31], 例如, Ausin等人^[30]利用WGBS技术构建了裸子

植物挪威云杉(*Picea abies*)全基因组单碱基分辨率甲基化图谱,揭示了其全基因组的DNA甲基化修饰模式,发现CG和CHG类型的DNA甲基化平均水平高于其他大多数已研究的植物,而CHH甲基化类型较低,揭示了不同物种全基因组DNA甲基化修饰模式的丰富性和特异性.对于RRBS技术,首先利用限制性内切酶对基因组进行酶切,再进行Bisulfite测序,从而对基因组甲基化水平进行分析;该技术主要关注CG富集区域的甲基化,更有针对性地研究覆盖区域的甲基化状态,是一种准确、高效、经济的DNA甲基化检测方法,可以极大提高CG区域的测序深度,并且能通过酶切位点过滤掉部分降解片段,从而减少序列转换后由于特异性降低造成对结果的影响^[31,32].牛津纳米孔测序(oxford nanopore sequencing)以及单分子实时测序(single molecule real time (SMRT) sequencing by PacBio)等第三代测序技术可直接从测序的原始数据读取不同的碱基修饰,如PacBio SMRT技术是利用在测序过程中碱基修饰产生的信号延迟这一特点,通过检测相邻两个碱基之间的测序时间来检测碱基修饰情况,即碱基存在修饰时,DNA聚合酶的合成速度会减慢,相邻两峰之间的距离增大,以此来识别不同的碱基修饰.

随着生物学、物理学与化学等技术的发展与交叉融合,DNA甲基化检测技术将会不断完善,将多种测序技术结合,可用于研究某些难以测序的区域,这将极大地推动木本植物DNA甲基化组数据的挖掘与分析,加快DNA甲基化遗传调控机制的研究进展.

2.2 DNA甲基化在木本植物生长发育中的调控作用

近年来,随着DNA甲基化研究技术的飞速发展,越来越多地参与调控多年生木本植物生长发育过程的DNA甲基化分子机制逐渐被揭示,下面将主要介绍DNA甲基化在木本植物环境适应性和生长发育调控等方面的研究工作(表2).

DNA甲基化作为一种稳定的、可遗传的表观遗传修饰,通过调控基因表达和转座子的转座来调节植物的发育、形态和生理变化^[48-54],在植物环境适应性方面发挥了重要作用.研究人员通过对挪威云杉的DNA甲基化图谱分析发现,挪威云杉基因组由于转座子含量较高而高度甲基化,表明DNA甲基化会富集在转座子区域抑制转座子的转座从而维持基因组的稳定性^[30].由于林木生长周期长,在生长与发育过程中,必

表 2 DNA甲基化在木本植物中的生物学功能

Table 2 Biological function of DNA methylation in woody plants

DNA甲基化功能类型	应用树种	生物学功能	检测方法	参考文献
生长发育调控	相思树(<i>Acacia mangium</i>)	调控衰老过程	HPLC	Monteuuis等人 ^[36]
	毛果杨(<i>Populus trichocarpa</i>)	调控组织生长分化	MeDIP-seq	Vining等人 ^[37]
	红豆杉(<i>Taxus chinensis</i>)	次生代谢物调控	HPLC	Li等人 ^[26]
	小叶杨(<i>Populus simonii</i>)	叶片形状与光合性状	MSAP	Ci等人 ^[38]
	香脂杨(<i>Populus balsamifera</i>)	性别决定	WGBS	Bräutigam等人 ^[39]
	日本落叶松(<i>Larix kaempferi</i>)	木材材质性状	MSAP	Diao等人 ^[40]
	梅(<i>Prunus mume</i>)	叶片表型	MSAP	Ma等人 ^[28]
	柑橘(<i>Citrus sinensis Osbeck</i>)	果实成熟	WGBS	Huang等人 ^[41]
环境适应性	海岸红杉(<i>Sequoia sempervirens</i>)	影响表型可塑性	HPLC	Huang等人 ^[42]
	小叶杨(<i>Populus simonii</i>)	逆境胁迫响应	MSAP	Song等人 ^[27]
	挪威云杉(<i>Picea abies</i>)	影响性状变异	WGBS	Ausin等人 ^[30]
	蓝桉(<i>Eucalyptus globulus</i> Labill)	发育异时性调控	MeDIP-seq	Hasbún等人 ^[43]
	加州白栎(<i>Quercus lobata</i>)	环境适应性	RRBS	Gugger等人 ^[44]
	欧美杨(<i>Populus × euramericana</i>)	表观遗传记忆	HPLC	Le Gac等人 ^[45]
	欧洲黑杨(<i>Populus nigra</i>)	生物钟调控	MeDIP-seq	Ding等人 ^[46]
	欧洲黑杨(<i>Populus nigra</i>)	响应干旱胁迫	WGBS	Sow等人 ^[47]

须不断地适应各种环境压力,大量研究表明,树木的表观遗传记忆在环境适应性中起到了重要作用^[55-58]。例如,对挪威云杉体细胞胚胎表观遗传记忆的研究发现^[59-62],胚胎发育过程中不同的温度会导致成年树芽的物候期或耐寒性等性状发生变化,表明胚胎向成年树传递了表观遗传记忆^[63],揭示了胚胎发生过程中对温度的表观遗传记忆是影响胚芽物候期的重要因素^[64]。Le Gac等人^[45]通过分析杨树(*Populus × euramericana*)不同生长条件下越冬休眠芽顶端分生组织(shoot apical meristem, SAM)的DNA甲基化水平发现,其全基因组DNA甲基化水平随着环境条件变化而变化,并且至少可以保持6个月,表明这种DNA甲基化的记忆有助于树木对环境变化的适应。

DNA甲基化对林木的株高、胸径和木材品质等复杂性状的调控具有重要作用。Diao等人^[40]利用MSAP技术检测日本落叶松(*Larix kaempferi*)未成熟木质部基因组的DNA甲基化,共获得4002个DNA甲基化多态性位点,在鉴定的361个影响木材化学或物理性状的标记中发现一些标记单独影响早材或晚材等物理性状,表明DNA甲基化在木材形成过程中发挥重要作用。鉴定基因组中与MSAP标记连锁的候选基因,可以进一步推动表观遗传变异在多年生木本植物改良中的应用。研究人员认为,DNA甲基化影响栓皮栎(*Quercus suber*)的软木质量,这是其经济价值的主要制约因素,Inácio等人^[65]通过MSAP检测栓皮栎成年树的软木组织中的DNA甲基化模式,发现了4个MSAP标记与木材内含物和孔隙度这两个最重要的品质性状显著相关,表明DNA甲基化水平影响木栓形成层活动,从而导致软木的表型变异。

DNA甲基化的精确动态调控对细胞的命运和个体发育至关重要,不同的个体或组织甚至某个发育时期都有特定的甲基化修饰模式。在植物体中,DNA甲基化水平的动态变化可以调控基因的时空表达,从而在转录水平上调控个体的生长、发育、成熟和衰老等进程。研究人员在对成熟果实的果皮着色机制的研究中发现,DNA甲基化参与调控了与花青苷积累有关基因的表达,来影响果实着色^[41,66,67]。An等人^[68]在对苹果(*Malus domestica*)果实成熟过程中着色分子机制的研究中发现,花青素合成中关键调节因子基因的启动子区域DNA甲基化水平会影响花青素的积累。Huang等人^[69]将5个不同成熟期柑橘(*Citrus sinensis* Osbeck)的

DNA甲基化和转录组的数据整合分析发现,在柑橘成熟过程中DNA甲基化在全基因组水平显著上升,这与在番茄^[70,71]和草莓^[72](*Fragaria × ananassa*)成熟过程中DNA甲基化水平下降呈现相反的趋势,进一步分析表明,柑橘成熟过程中DNA甲基化水平上调与DNA去甲基化酶基因表达的下调有相关性,从而解析了DNA甲基化修饰对果实成熟相关基因的精确调控机制。全基因组DNA甲基化水平的动态变化被认为是体外培养系统再生植株表型变异的原因之一,对于林木生长环境适应性具有重要意义。Vining等人^[73]在对毛果杨(*Populus trichocarpa*)基因组DNA甲基化水平动态变化的研究中,对比了7种不同组织类型的DNA甲基化水平,并进一步对毛果杨离体去分化和再生过程中的甲基化重组进行了研究,发现再分化组织中的DNA甲基化不能恢复到原代外植体的水平^[37],表明DNA甲基化通过抑制基因时空特异性表达,从而调控组织的生长分化,进一步揭示了DNA甲基化调控生长发育的遗传机制。

2.3 群体DNA甲基化研究进展

群体表观遗传学研究是定位动态生长过程中表观数量性状位点(epigenetic quantitative trait locus, epiQTL)的基础,目前已成功应用于多种动植物,并鉴定到多个与数量性状显著相关的DNA甲基化标记,从而解析了生长发育过程中复杂数量性状的表观遗传机制。例如,Ci等人^[38]对505株小叶杨种质资源群体进行全基因组DNA甲基化位点检测,通过关联分析和对甲基化差异位点的测序,获得了130个候选基因,对其中6个候选基因的表达分析表明,这些基因可能在叶片发育和光合作用调控中发挥重要作用。马开峰^[74]利用MSAP技术检测了毛白杨(*Populus tomentosa*)种质资源群体432个基因型个体的木质部基因组DNA甲基化水平,并将其与材质性状进行关联分析,发现树高与甲基化/非甲基化相对水平显著相关,并检测到1101个MSAP标记位点与胸径、树高和木质素含量等9个表型性状显著关联,表明DNA甲基化对树木的木材品质性状具有重要影响。DNA甲基化可以通过调控基因的表达来影响复杂性状,这对植物的环境适应性至关重要。例如,Eichten等人^[75]对51个玉米近交系的全基因组甲基化图谱进行分析,共鉴定了3720个DMRs(differentially methylated regions),通过重组自交系证明大部

分DMRs是可遗传的,并且会影响邻近基因的表达从而引起表型变异,证实了DNA甲基化可作为与基因表达相关的稳定的表观遗传标记.拟南芥的1001表观基因组项目通过分析1001个拟南芥基因组的单碱基分辨率甲基化图谱,提供了DNA甲基化与地理和气候起源相关的证据^[76].此外,DNA甲基化被认为与杂种优势(heterosis)有关^[77,78],Lauss等人^[78]通过分析500多株拟南芥表观遗传杂交(epigenetic hybrid plants, Epihybrid)样本的甲基化组、转录组和基因组等数据发现,亲本间的DNA甲基化位点差异可以直接或间接地影响拟南芥子代的杂种优势,而不受遗传变化的影响,为揭示杂种优势的分子机制提供了重要的理论依据.

大量研究表明,自然群体内存在丰富的DNA甲基化变异^[5,79],包括单甲基化多样性位点(single methylation polymorphism, SMPs)、DMRs等且与表型变异存在显著相关性,因此DNA甲基化位点可作为一种稳定的表观遗传标记用于表观全基因组关联分析(epigenome-wide association study, EWAS)^[80-82].EWAS策略将DNA甲基化变异和复杂性状进行关联,检测到与目标性状显著连锁的DNA甲基化变异位点,在表观遗传学层面对复杂性状的遗传效应进行解析.Ong-Abdullah等人^[83]利用EWAS策略在油棕榈(*Elaeis guineensis*)中检测到影响果实外壳厚度的表观遗传位点,并且发现该位点是一种水稻的LINE类反转座子*Karma*,其低甲基化水平在油棕榈的厚壳无性系中是普遍存在的,表明*Karma*的甲基化模式可以显著影响果实外壳厚度.群体表观遗传学以及EWAS策略的应用,加深了对动植物DNA甲基化在复杂性状中遗传调控机制的认识,但是在多年生木本植物领域尚未系统开展群体DNA甲基化研究工作.相信开展林木复杂性状EWAS研究将成为林木表观遗传学领域的前沿热点.

3 林木DNA甲基化的未来发展及应对策略

鉴于目前林木DNA甲基化研究体系不完善、表观遗传机制解析不深入这一现状,本文基于团队近年来在林木群体DNA甲基化领域的研究进展,结合当前生物技术发展的理论前沿,拟提出以下几个解决策略(图1),以期进一步深化林木群体DNA甲基化研究,加快林木表观遗传改良进程.

3.1 基于靶向表观基因组编辑技术阐明DNA甲基化遗传调控机制

近年来,随着基因组编辑技术(genome editing)的发展与完善,基于CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)开发的CRISPR/dCas9(deactivated CRISPR-associated protein 9)系统可以用于基因组上位点特异性DNA的去甲基化以及从头甲基化,即靶向表观基因组编辑技术,这是一种新兴的在表观遗传层面调控基因表达的技术,其目的是剖析调控过程中的表观遗传机制.例如,Liu等人^[84]利用Tet1(ten-eleven translocation 1)或Dnmt3a(DNA methyltransferases 3a)与失去催化活性的Cas9(dCas9)融合在小鼠体内实现靶向DNA甲基化编辑,将dCas9-Tet1或-Dnmt3a融合蛋白靶向甲基化或非甲基化启动子序列,分别导致内源性报告基因的激活或沉默.Lei等人^[85]通过构建dCas9-MQ1融合蛋白在小鼠体内实现了快速靶向DNA甲基化,且未对全基因组DNA甲基化水平产生影响;Xiong等人^[86]利用人工得到的DNA甲基转移酶(MTases)融合dCas构建dCas-sMTase实现了人体细胞靶向DNA甲基化;Papikian等人^[87]将具有烟草(*Nicotiana tabacum*)DNA甲基转移酶催化结构域(NtDRMcd)的SunTag系统与CRISPR/dCas9连接,导入拟南芥中可以靶向特定的甲基化位点,并且在基因组中实现位点特异性DNA去甲基化.因此,如果可以利用位点特异性DNA去甲基化、从头甲基化修饰技术,对EWAS分析得到的显著DNA甲基化位点进行高精度编辑,将为阐明候选表观调控位点影响表型变异的分子机制提供关键技术支持.

3.2 基于EWAS和CITs研究策略解析SMP与SNP位点互作效应

随着DNA甲基化检测技术的飞速发展,人们发现,在基因组水平存在大量稳定遗传的DNA甲基化位点.例如Hofmeister等人^[5]在拟南芥中发现,自然突变产生的SMP数量比单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNPs)高出至少4个数量级,且超过99%可参与减数分裂、进行稳定遗传.因此,DNA甲基化位点可作为一种稳定的表观遗传标记和其他DNA分子标记位点联合分析与应用.进一步研究发现,相邻的SMP位点与SNP位点存在复杂的互作关系^[75,88].例如,Eich-

图 1 林木DNA甲基化研究策略. A: DNA甲基化修饰类型; B: 利用表观全基因组关联分析鉴定稳定甲基化位点; C: 利用CITs (causal inference test)揭示稳定甲基化位点与连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)范围内单核苷酸多态性相互作用关系; D: 利用基因编辑阐明甲基化修饰与遗传变异位点的作用机制

Figure 1 Research strategies of forest DNA methylation. A: DNA methylation modification types; B: identifying the stable methylation sites by epigenome-wide association study; C: revealing the association between stable methylation sites and single nucleotide polymorphism within linkage disequilibrium (LD) by causal inference tests (CITs); D: deciphering the molecular mechanism of DNA methylation modification and genetic variation by genome editing

ten等人^[75]在玉米自交系的研究中发现, 超过1/2的DMR与邻近的SNP有显著关联, 大约300个基因的表达模式与DNA甲基化变异显著相关, 并通过重组自交系证明了大部分DMRs是可遗传的; Voisin等人^[89]利用线性模型对人群中与肥胖有关的等位基因和邻近的DNA甲基化之间的关系进行检测发现, 与肥胖关联的多个SNPs与附近的基因内DNA甲基化变化有显著相关性, 表明DNA甲基化可以单独调控基因影响性状形成, 也可以联合SNP共同调控表型变异. 为了探讨遗传变异和表观遗传变异间的相互作用及其影响复杂性状

的程度, 因果关系推断(causal inference tests, CITs)统计学方法近期被广泛应用; 该方法能够检验两个位点的相互作用关系, 已成功应用于剖析哺乳动物的DNA甲基化与SNP互作调控表型变异的分子机制^[82,90]. Zhou等人^[91]利用该策略在对人群中银屑病数据的综合分析中发现, DNA甲基化能够调控DNA遗传变异进而对表型产生影响; Volkov等人^[92]利用CITs证明了基因变异改变人类脂肪组织中的DNA甲基化, 从而介导代谢性状的变化. 上述研究证实, DNA甲基化既可以作为“触发器”影响SNP进而控制表型, 也可以充当SNP调

控表型的“介导者”。利用上述EWAS和CITs研究策略,可系统发掘林木基因组上具有显著遗传效应的候选SMP以及SNP位点,并解析它们之间的遗传交互作用,为林木复杂性状调控机制的研究提供了新的视角。

3.3 通过创制特殊研究材料揭示DNA甲基化表观遗传规律

在植物中,DNA甲基化变异可能导致基因表达水平的改变,从而产生表型变异。Johannes等人^[93]利用拟南芥野生型和DNA甲基化缺失的突变体构建epiRIL,发现DNA甲基化的缺失导致某些基因转录被重新激活,揭示了隐藏的遗传变异来源。而在其他植物,如水稻中DNA甲基化完全缺失通常会导致植株死亡^[94,95]。Ji等人^[96]开发了表观突变(epimutagenesis)技术克服了植物因丧失DNA甲基化而死亡的难题,这是一种通过全基因组随机去甲基化快速产生DNA甲基化突变体的技术,该技术利用人类DNA去甲基化酶TET(ten-eleven translocation)在拟南芥中过表达,产生可遗传给后代的广泛的低水平基因组甲基化,从而揭示植物中隐藏的表型变异。林木遗传学家可以在木本植物中通过生物学手段构建低DNA甲基化水平的个体,也可以利用林木种质资源群体鉴定的低DNA甲基化水平个体与正常水平的个体杂交。通过对杂交子代及其亲本甲基化组、基因组、转录组以及代谢组等数据进行综合分析,系统剖析DNA甲基化位点在亲本与子代之间的遗传机制,揭示亲本等位基因之间的DNA甲基化差异

对印记基因表达的影响机制^[97],并进一步解释杂种优势现象^[47],这对于林木分子设计育种具有重要意义。

4 展望

近年来,DNA甲基化研究方法不断被完善,从单独使用甲基化测序数据预测表观遗传机制和表观调控的生物学功能,发展到多组学联合分析的系统遗传学(systems genetics)。系统遗传学策略的应用极大地推动了多维度解释表观调控分子机制的发展,成为提高林木复杂性状表观遗传结构解析精度的一种重要手段。基于林木DNA甲基化研究现状,利用EWAS结合基因组编辑等技术开展林木群体水平DNA甲基化研究有助于研究人员在全基因组水平定位与重要性状关联的表观等位基因,加速林木数量性状遗传改良进程。在植物中,除DNA甲基化之外,其他形式的甲基化修饰类型也参与了生物体的基因表达调控、响应逆境胁迫等多个生长发育过程,例如RNA的5-甲基胞嘧啶(m⁵C)、1-甲基腺嘌呤(1-methyladenosine, m¹A)、6-甲基腺嘌呤(6-methyladenosine, m⁶A)以及组蛋白的甲基化修饰等,它们是表观遗传学的新兴热点研究领域,在动植物生长发育过程中也起到了重要作用,进一步表明了表观遗传调控是动植物生长过程中常见且必不可少的机制。因此,林木表观遗传调控机制研究是未来生物学研究的重要方向,可显著推动林木分子设计育种技术体系的发展,以此开启现代分子育种的新时代。

参考文献

- Robertson K D. Epigenetic mechanisms of gene regulation. *Epigenetics*, 1996, 3: 21
- Fortes A M, Gallusci P. Plant stress responses and phenotypic plasticity in the epigenomics era: Perspectives on the grapevine scenario, a model for perennial crop plants. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 82
- Law J A, Jacobsen S E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 204–220
- Stroud H, Greenberg M V C, Feng S, et al. Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the *Arabidopsis* methylome. *Cell*, 2013, 152: 352–364
- Hofmeister B T, Lee K, Rohr N A, et al. Stable inheritance of DNA methylation allows creation of epigenotype maps and the study of epiallele inheritance patterns in the absence of genetic variation. *Genome Biol*, 2017, 18: 155
- Johnson L M, Law J A, Khattar A, et al. SRA-domain proteins required for DRM2-mediated *de novo* DNA methylation. *PLoS Genet*, 2008, 4: e1000280
- Deleris A, Greenberg M V C, Ausin I, et al. Involvement of a Jumonji-C domain-containing histone demethylase in DRM2-mediated maintenance of DNA methylation. *EMBO Rep*, 2010, 11: 950–955

- 8 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*. *Genetics*, 2011, 187: 977–979
- 9 Matzke M A, Mosher R A. RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 570
- 10 Zhong X, Du J, Hale C J, et al. Molecular mechanism of action of plant DRM *de novo* DNA methyltransferases. *Cell*, 2014, 157: 1050–1060
- 11 Bond D M, Baulcombe D C. Epigenetic transitions leading to heritable, RNA-mediated *de novo* silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 917–922
- 12 Aufsatz W, Mette M F, Matzke A J M, et al. The role of MET1 in RNA-directed *de novo* and maintenance methylation of CG dinucleotides. *Plant Mol Biol*, 2004, 54: 793–804
- 13 Zhu J K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet*, 2009, 43: 143–166
- 14 Penterman J, Zilberman D, Huh J H, et al. DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 6752–6757
- 15 Gehring M, Huh J H, Hsieh T F, et al. DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell*, 2006, 124: 495–506
- 16 Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo A P, Ponferrada-Marín M I, et al. DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 6853–6858
- 17 Agius F, Kapoor A, Zhu J K. Role of the *Arabidopsis* DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11796–11801
- 18 Moore L D, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38: 23–38
- 19 Wang R X. Research of transcriptional regulation of Opaque2 gene and DNA methylation of 19-kDa α -zeins in maize (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Hangzhou: Zhejiang University, 2015 [王瑞娴. 玉米转录因子Opaque2基因的转录调控与19-kDa α -醇溶蛋白基因的DNA甲基化研究. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2015]
- 20 Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, 2006, 126: 1189–1201
- 21 Martin A, Troadec C, Boualem A, et al. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature*, 2009, 461: 1135–1138
- 22 Sheldon C C, Burn J E, Perez P P, et al. The *FLF* MADS box gene: A repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell*, 1999, 11: 445–458
- 23 Zhong S, Fei Z, Chen Y R, et al. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 154–159
- 24 Finke A, Rozhon W, Pecinka A. Analysis of DNA methylation content and patterns in plants. In: Alcázar R, Tiburcio A, eds. Polyamines. Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press, 2018. 277–298
- 25 Baurens F C, Nicolleau J, Legavre T, et al. Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker. *Tree Physiol*, 2004, 24: 401–407
- 26 Li X, Yuan J, Dong Y, et al. Optimization of an HPLC method for determining the genomic methylation levels of *Taxus* Cells. *J Chromatogr Sci*, 2015, 54: 200–205
- 27 Song Y, Ci D, Tian M, et al. Stable methylation of a non-coding RNA gene regulates gene expression in response to abiotic stress in *Populus simonii*. *J Exp Bot*, 2016, 67: 1477–1492
- 28 Ma K, Sun L, Cheng T, et al. Epigenetic variance, performing cooperative structure with genetics, is associated with leaf shape traits in widely distributed populations of ornamental tree *Prunus mume*. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 41
- 29 Li Q, Hermanson P J, Springer N M. Detection of DNA methylation by whole-genome bisulfite sequencing. In: Lagrimini L, ed. Maize. Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press, 2018. 185–196
- 30 Ausin I, Feng S, Yu C, et al. DNA methylome of the 20-gigabase Norway spruce genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E8106–E8113
- 31 Baubec T, Akalin A. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns by high-throughput sequencing. In: Aransay A, Lavín Trueba J, eds. Field Guidelines for Genetic Experimental Designs in High-throughput Sequencing. Heidelberg: Springer, 2016. 197–221
- 32 Schmidt M, Van Bel M, Woloszyńska M, et al. Plant-RRBS, a bisulfite and next-generation sequencing-based methylome profiling method enriching for coverage of cytosine positions. *BMC Plant Biol*, 2017, 17: 115
- 33 Xing X, Zhang B, Li D, et al. Comprehensive whole DNA methylome analysis by integrating MeDIP-seq and MRE-seq. In: Tost J, ed. DNA

- Methylation Protocols. *Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 2018. 209–246
- 34 Chatterjee A, Rodger E J, Morison I M, et al. Tools and strategies for analysis of genome-wide and gene-specific DNA methylation patterns. In: Seymour G, Cullinan M, Heng N, eds. *Oral Biology. Methods in Molecular Biology Oral Biology*. New York: Humana Press, 2017. 249–277
 - 35 Su C. Shotgun bisulfite sequencing of the betula platyphylla genome reveals the tree's DNA methylation patterning (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Harbin: Northeast Forestry University, 2015 [苏畅. 基于白桦全基因组重亚硫酸盐测序(bisulfite-sequencing)的甲基化图谱分析. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北林业的大学, 2015]
 - 36 Monteuiis O, Baurens F C, Goh D K S, et al. DNA methylation in *Acacia mangium* *in vitro* and *ex-vitro* buds, in relation to their within-shoot position, age and leaf morphology of the shoots. *Silvae Geneta*, 2009, 58: 287–292
 - 37 Vining K, Pomraning K R, Wilhelm L J, et al. Methylome reorganization during *in vitro* dedifferentiation and regeneration of *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 92
 - 38 Ci D, Song Y, Du Q, et al. Variation in genomic methylation in natural populations of *Populus simonii* is associated with leaf shape and photosynthetic traits. *J Exp Bot*, 2015, 67: 723–737
 - 39 Bräutigam K, Soolanayakanahally R, Champigny M, et al. Sexual epigenetics: Gender-specific methylation of a gene in the sex determining region of *Populus balsamifera*. *Sci Rep*, 2017, 7: 45388
 - 40 Diao S. The epigenetics effects of DNA methylation on growth and wood properties of *Larix kaempferi* (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2017 [刁姝. DNA甲基化在日本落叶松生长和材质性状中的表现遗传效应分析. 博士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院, 2017]
 - 41 Huang D, Wang X, Tang Z, et al. Subfunctionalization of the *Ruby2-Ruby1* gene cluster during the domestication of citrus. *Nat Plants*, 2018, 4: 930–941
 - 42 Huang L C, Hsiao L J, Pu S Y, et al. DNA methylation and genome rearrangement characteristics of phase change in cultured shoots of *Sequoia sempervirens*. *Physiol Planta*, 2012, 145: 360–368
 - 43 Hasbún R, Iturra C, Bravo S, et al. Differential methylation of genomic regions associated with heteroblasty detected by M M algorithm in the nonmodel species *Eucalyptus globulus* Labill. *Int J Genomics*, 2016, 2016: 1–7
 - 44 Gugger P F, Fitz-Gibbon S, PellEgrini M, et al. Species-wide patterns of DNA methylation variation in *Quercus lobata* and their association with climate gradients. *Mol Ecol*, 2016, 25: 1665–1680
 - 45 Le Gac A L, Lafon-Placette C, Chauveau D, et al. Winter-dormant shoot apical meristem in poplar trees shows environmental epigenetic memory. *J Exp Bot*, 2018, 69: 4821–4837
 - 46 Ding C J, Liang L X, Diao S, et al. Genome-wide analysis of day/night DNA methylation differences in *Populus nigra*. *PLoS ONE*, 2018, 13: e0190299
 - 47 Sow M D, Segura V, Chamaillard S, et al. Narrow-sense heritability and P_{ST} estimates of DNA methylation in three *Populus nigra* L. populations under contrasting water availability. *Tree Genets Genomes*, 2018, 14: 78
 - 48 Jablonka E, Oborny B, Molnár I, et al. The adaptive advantage of phenotypic memory in changing environments. *Phil Trans R Soc Lond B*, 1995, 350: 133–141
 - 49 Pál C, Miklós I. Epigenetic inheritance, genetic assimilation and speciation. *J Theor Biol*, 1999, 200: 19–37
 - 50 Angers B, Castonguay E, Massicotte R. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Mol Ecol*, 2010, 19: 1283–1295
 - 51 Mirouze M, Paszkowski J. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 14: 267–274
 - 52 Kooke R, Johannes F, Wardenaar R, et al. Epigenetic basis of morphological variation and phenotypic plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2015, 27: 337–348
 - 53 Yakovlev I A, Carneros E, Lee Y K, et al. Transcriptional profiling of epigenetic regulators in somatic embryos during temperature induced formation of an epigenetic memory in Norway spruce. *Planta*, 2016, 243: 1237–1249
 - 54 Richards C L, Alonso C, Becker C, et al. Ecological plant epigenetics: Evidence from model and non-model species, and the way forward. *Ecol Lett*, 2017, 20: 1576–1590
 - 55 Allen C D, Macalady A K, Chenchouni H, et al. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For Ecol Manag*, 2010, 259: 660–684
 - 56 Raj S, Bräutigam K, Hamanishi E T, et al. Clone history shapes *Populus* drought responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 12521–12526

- 57 Bräutigam K, Vining K J, Lafon-Placette C, et al. Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecol Evol*, 2013, 3: 399–415
- 58 Schönberger B, Chen X, Mager S, et al. Site-dependent differences in DNA methylation and their impact on plant establishment and phosphorus nutrition in *Populus trichocarpa*. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0168623
- 59 Johnsen Ø, Kvaalen H, Yakovlev I A, et al. An epigenetic memory from time of embryo development affects climatic adaptation in Norway spruce. In: Gusta L V, Wisniewski M E, Tanino K K, eds. *Plant Cold Hardiness. From the Laboratory to the Field*. Wallingford: CABI, 2009. 99–107
- 60 Yakovlev I A, Fossdal C G, Johnsen Ø. MicroRNAs, the epigenetic memory and climatic adaptation in Norway spruce. *New Phytol*, 2010, 187: 1154–1169
- 61 Yakovlev I A, Asante D K A, Fossdal C G, et al. Differential gene expression related to an epigenetic memory affecting climatic adaptation in Norway spruce. *Plant Sci*, 2011, 180: 132–139
- 62 Yakovlev I A, Fossdal C G. In silico analysis of small RNAs suggest roles for novel and conserved miRNAs in the formation of epigenetic memory in somatic embryos of Norway spruce. *Front Physiol*, 2017, 8: 674
- 63 Yakovlev I, Fossdal C G, Skrøppa T, et al. An adaptive epigenetic memory in conifers with important implications for seed production. *Seed Sci Res*, 2012, 22: 63–76
- 64 Carneros E, Yakovlev I, Viejo M, et al. The epigenetic memory of temperature during embryogenesis modifies the expression of bud burst-related genes in Norway spruce epitypes. *Planta*, 2017, 246: 553–566
- 65 Inácio V, Barros P M, Costa A, et al. Differential DNA methylation patterns are related to phellogen origin and quality of *Quercus suber* cork. *PLoS ONE*, 2017, e0169018
- 66 El-Sharkawy I, Liang D, Xu K. Transcriptome analysis of an apple (*Malus × domestica*) yellow fruit somatic mutation identifies a gene network module highly associated with anthocyanin and epigenetic regulation. *J Exp Bot*, 2015, 66: 7359–7376
- 67 Telias A, Lin-Wang K, Stevenson D E, et al. Apple skin patterning is associated with differential expression of *MYB10*. *BMC Plant Biol*, 2011, 11: 93
- 68 An J P, Wang X F, Li Y Y, et al. EIN3-LIKE1, MYB1, and ETHYLENE RESPONSE FACTOR3 act in a regulatory loop that synergistically modulates ethylene biosynthesis and anthocyanin accumulation. *Plant Physiol*, 2018, 178: 808–823
- 69 Huang H, Liu R, Niu Q, et al. Global increase in DNA methylation during orange fruit development and ripening. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 1430–1436
- 70 Liu R, How-Kit A, Stammiti L, et al. A DEMETER-like DNA demethylase governs tomato fruit ripening. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 10804–10809
- 71 Lang Z, Wang Y, Tang K, et al. Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E4511–E4519
- 72 Cheng J, Niu Q, Zhang B, et al. Downregulation of RdDM during strawberry fruit ripening. *Genom Biol*, 2018, 19: 212
- 73 Vining K J, Pomraning K R, Wilhelm L J, et al. Dynamic DNA cytosine methylation in the *Populus trichocarpa* genome: Tissue-level variation and relationship to gene expression. *BMC Genomics*, 2012, 13: 27
- 74 Ma K F. Epigenetic variation in genome DNA methylation and the epigenetic effects in *Populus tomentosa* (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Beijing : Beijing Forestry University, 2013 [马开峰. 毛白杨基因组DNA甲基化遗传变异及遗传效应. 博士学位论文. 北京: 北京林业大学, 2013]
- 75 Eichten S R, Briskine R, Song J, et al. Epigenetic and genetic influences on DNA methylation variation in maize populations. *Plant Cell*, 2013, 25: 2783–2797
- 76 Kawakatsu T, Huang S S C, Jupe F, et al. Epigenomic diversity in a global collection of *Arabidopsis thaliana* accessions. *Cell*, 2016, 166: 492–505
- 77 Dapp M, Reinders J, Bédée A, et al. Heterosis and inbreeding depression of epigenetic *Arabidopsis* hybrids. *Nat Plants*, 2015, 1: 15092
- 78 Lauss K, Wardenaar R, Oka R, et al. Parental DNA methylation states are associated with heterosis in epigenetic hybrids. *Plant Physiol*, 2018, 176: 1627–1645
- 79 Becker C, Hagmann J, Müller J, et al. Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome. *Nature*, 2011, 480: 245–249
- 80 Rakyan V K, Down T A, Balding D J, et al. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet*, 2011, 12: 529–541

- 81 Demerath E W, Guan W, Grove M L, et al. Epigenome-wide association study (EWAS) of BMI, BMI change and waist circumference in African American adults identifies multiple replicated loci. [Hum Mol Genet](#), 2015, 24: 4464–4479
- 82 Orozco L D, Morselli M, Rubbi L, et al. Epigenome-wide association of liver methylation patterns and complex metabolic traits in mice. [Cell Metab](#), 2015, 21: 905–917
- 83 Ong-Abdullah M, Ordway J M, Jiang N, et al. Loss of Karma transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm. [Nature](#), 2015, 525: 533–537
- 84 Liu X S, Wu H, Ji X, et al. Editing DNA methylation in the mammalian genome. [Cell](#), 2016, 167: 233–247.e17
- 85 Lei Y, Zhang X, Su J, et al. Targeted DNA methylation *in vivo* using an engineered dCas9-MQ1 fusion protein. [Nat Commun](#), 2017, 8: 16026
- 86 Xiong T, Meister G E, Workman R E, et al. Targeted DNA methylation in human cells using engineered dCas9-methyltransferases. [Sci Rep](#), 2017, 7: 6732
- 87 Papikian A, Liu W, Gallego-Bartolomé J, et al. Site-specific manipulation of *Arabidopsis* loci using CRISPR-Cas9 SunTag systems. [Nat Commun](#), 2019, 10: 729
- 88 Bonder M J, Kasela S, Kals M, et al. Genetic and epigenetic regulation of gene expression in fetal and adult human livers. [BMC Genomics](#), 2014, 15: 860
- 89 Voisin S, Almén M S, Zheleznyakova G Y, et al. Many obesity-associated SNPs strongly associate with DNA methylation changes at proximal promoters and enhancers. [Genome Med](#), 2015, 7: 103
- 90 Millstein J, Zhang B, Zhu J, et al. Disentangling molecular relationships with a causal inference test. [BMC Genet](#), 2009, 10: 23
- 91 Zhou F, Shen C, Xu J, et al. Epigenome-wide association data implicates DNA methylation-mediated genetic risk in psoriasis. [Clin Epigenet](#), 2016, 8: 131
- 92 Volkov P, Olsson A H, Gillberg L, et al. A genome-wide mQTL analysis in human adipose tissue identifies genetic variants associated with DNA methylation, gene expression and metabolic traits. [PLoS ONE](#), 2016, 11: e0157776
- 93 Johannes F, Porcher E, Teixeira F K, et al. Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. [PLoS Genet](#), 2009, 5: e1000530
- 94 Li Q, Eichten S R, Hermanson P J, et al. Genetic perturbation of the maize methylome. [Plant Cell](#), 2014, 26: 4602–4616
- 95 Hu L, Li N, Xu C, et al. Mutation of a major CG methylase in rice causes genome-wide hypomethylation, dysregulated genome expression, and seedling lethality. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2014, 111: 10642–10647
- 96 Ji L, Jordan W T, Shi X, et al. TET-mediated epimutagenesis of the *Arabidopsis thaliana* methylome. [Nat Commun](#), 2018, 9: 895
- 97 Klosinska M, Picard C L, Gehring M. Conserved imprinting associated with unique epigenetic signatures in the *Arabidopsis* genus. [Nat Plants](#), 2016, 2: 16145

Research progress and prospect of DNA methylation in perennial woody plants

FANG YuanYuan^{1,2,3}, XIAO Liang^{1,2,3}, LU WenJie^{1,2,3}, YAO LiangChen^{1,2,3}, LI LianZheng^{1,2,3},
DU QingZhang^{1,2,3} & ZHANG DeQiang^{1,2,3}

1 Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2 Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

3 Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China.

DNA methylation is a pervasive feature of eukaryotic genomes, and an important epigenetic modification. Much attention has been focused on the regulatory role of DNA methylation underlying the growth and developmental processes, and the field garnered increased interests through the recent studies of functional potential in heritable epigenetic variation. In this review, we briefly summarized the relevant concepts and research methods for analyzing DNA methylation in perennial trees. Furthermore, we reviewed current research progress of DNA methylation in perennial woody plants, and provided integrated strategy of epigenome-wide association study (EWAS), CRISPR/dCas9 (deactivated CRISPR-associated protein 9) and epigenome sequencing technologies to systematically characterize the putative function of DNA methylation on development process. These system biological methods provide important insights to dissect the genetic regulatory mechanisms of DNA methylation underlying complex traits and decipher the function of DNA methylation in molecular breeding of forest trees.

forest trees, quantitative traits, DNA methylation, molecular breeding, EWAS

doi: [10.1360/SSV-2019-0135](https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2019-0135)