

不同水陆环境中喜旱莲子草甲基化调控因子表达水平和差异表达基因启动子区甲基化状态分析

邓莹¹, 高乐旋^{1,2}, 朱珠¹, 杨继^{1*}

(1. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433; 2. 上海辰山植物园, 上海 201602)

摘要: DNA 甲基化是一种重要的表观遗传调控方式, 参与对植物生长发育的调控, 并在植物逆境胁迫响应中发挥作用。DNA 甲基化的建立和维持是胞嘧啶甲基转移酶、染色质重塑酶、组蛋白修饰因子和去甲基化因子等协同作用的结果, 环境胁迫能诱导植物体内 DNA 甲基化状态改变, 进而改变基因表达水平和式样, 影响植物的适应性。喜旱莲子草是一种恶性入侵植物, 种内遗传多样性很低, 主要依靠极强的表型可塑性侵占不同水陆生境。对克隆繁殖的喜旱莲子草个体进行不同时间的淹水处理, 并用定量 PCR 方法检测 16 个 DNA 甲基化调控基因在不同处理条件下的表达水平和变化趋势, 发现其中 13 个基因在不同处理时间点的表达水平有明显变化, 且在淹水植株中多数基因在处理前期被强烈诱导上调表达。运用亚硫酸氢钠测序技术对两个在不同水陆条件下明显差异表达基因 (*Contig942* 和 *Contig23336*) 的上游启动子区甲基化动态进行分析, 发现启动子区多个胞嘧啶位点的甲基化修饰状态在不同水陆条件下及淹水处理的不同时期呈现快速且可逆的动态变化, 可能影响这些基因在不同环境条件下的表达水平。本研究结果能帮助了解喜旱莲子草表型可塑性变异和适应性发生的分子机理。

关键词: 喜旱莲子草; 表型可塑性; 甲基化调控因子

中图分类号: Q344⁺.13

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2014)05-0475-12

Differential Expression of DNA Methylation Regulating Factors and Dynamic Methylation Patterns of *Alternanthera philoxeroides* under Different Water Treatments

DENG Ying¹, GAO Le-Xuan^{1,2}, ZHU Zhu¹, YANG Ji^{1*}

(1. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China;
2. Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai 201602, China)

Abstract: DNA methylation functions as an important epigenetic mechanism involved in various biological processes. Different enzymes participate in the dynamic regulation of DNA methylation status. Changes in DNA methylation can be induced by environmental factors and can result in phenotypic variations by altering gene expression and eventually ontogenetic trajectory. *Alternanthera philoxeroides* is an invasive species that grows in a variety of habitats, showing high phenotypic plasticity. To investigate the effects of epigenetic modulation on phenotypically variation of *A. philoxeroides*, the gene expression patterns of 16 DNA methylation regulating factors were measured at different time points of water treatment using quantitative RT-PCR. Thirteen genes responsible for DNA and histone methylation were differentially expressed under different water treatments, with most up-regulated in the early stages of water treatment. Bisulfite sequencing was employed to detect the methylation status

收稿日期: 2014-04-08, 退修日期: 2014-05-14。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070201); 系统与进化植物学国家重点实验室开放课题资助项目(LSEB2011-08)。

作者简介: 邓莹(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物系统和进化研究(E-mail: yysummer55@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: jiyang@fudan.edu.cn)。

of CpG islands within the promoter regions of two genes, *Contig942* and *Contig23336*, which were differentially expressed in response to different water treatments. Some cytosines, especially at asymmetric CHH sites, experienced fast and reversible changes in methylation status during water treatment. These changes in promoter methylation were probably responsible for the altered expression of these genes in different environments.

Key words: *Alternanthera philoxeroides*; Phenotypic plasticity; DNA methylation regulating factor

喜旱莲子草 (*Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb.) 是苋科 (Amaranthaceae) 莲子草属多年生宿根草本植物, 原产南美洲。由于对不同水陆环境有很强的适应性, 并能通过克隆生长进行快速繁殖, 喜旱莲子草自引入中国后迅速扩散, 广泛分布于河流、湿地、农田和公共绿地等多种生境中, 成为一种恶性入侵植物。大量研究明确了入侵中国的喜旱莲子草种内遗传多样性较低, 主要依靠极强的表型可塑性侵占不同生境^[1]。

表型可塑性 (phenotypic plasticity) 是指同一基因型对不同环境应答而产生不同表型的特性^[2]。对表型可塑性变异机制的研究已初步表明, 可塑性变异的发生与发育调控基因在不同环境条件下的选择性表达密切相关; DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA 等表观遗传调控因子在改变基因表达式样、介导生物对环境的应答反应中发挥重要作用^[3-9]。

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传调控方式^[10], 通常会抑制基因表达, 目前有许多研究证明转录沉默基因的启动子区常伴随胞嘧啶甲基化^[11,12]。植物体内胞嘧啶甲基化可发生在对称位点 (CG 和 CNG, N 为任意碱基), 也可发生在非对称位点 (CHH, H 为 A、C 或 T)^[13,14]。甲基化状态由一系列 DNA 甲基化及去甲基化因子动态调控^[13]。植物体内至少含有三类具有不同结构和功能的胞嘧啶甲基转移酶, 参与 DNA 甲基化的建立和维持^[15]。第一类胞嘧啶甲基转移酶是甲基转移酶 (Methyltransferase, MET), 主要维持 CG 位点的甲基化, 是维持正常甲基化式样的关键酶, 其中 *MET1* 编码一个与动物甲基转移酶 Dnmt1 结构相似的蛋白; 第二类为染色质域甲基转移酶 (Chromomethylase, CMT), 主要保持 CNG 位点的甲基化; 第三类为域重排甲基转移酶 (Domains

Rearranged Methyltransferase, DRM), 与哺乳动物从头甲基转移酶家族的 Dnmt3 同源^[16]。植物 DNA 去甲基化因子包括 DME 家族的 DEMETER (DME)、DML2、DML3 以及沉默抑制因子 (Repressor of Silencing 1, ROS1), 其中 *ROS1* 编码一个 DNA 转葡糖基酶蛋白, 并在所有植物组织中广泛表达, 可通过碱基切除修复机制完成去甲基化^[17,18]; *ROS3* 同样参与调控 DNA 去甲基化, 它具有一个 RNA 识别结合域, 可能作用于小 RNA 介导的 DNA 甲基化及 *ROS1* 介导的 DNA 去甲基化^[19]。此外, 染色质重塑酶 DDM1 和组蛋白去乙酰化酶 HDA6 等在维持 CG DNA 甲基化过程中也具有十分重要的作用^[20,21]。

为了解在不同水陆生境中喜旱莲子草的表型可塑性变异是否伴随着甲基化调控因子表达水平以及甲基化修饰状态的动态改变, 我们在水生同质园中对克隆繁殖的喜旱莲子草个体进行不同时间的淹水处理, 并用定量 PCR 方法检测 16 个 DNA 甲基化调控基因在不同处理条件下的表达水平和变化趋势; 与此同时, 基于本实验室前期研究结果选取了两个在不同水陆条件下明显差异表达的基因 (*Contig942* 和 *Contig23336*), 以检测甲基化调控基因表达水平的改变是否伴随着发育调控基因甲基化修饰状态和表达式样的改变。其中, *Contig942* 在喜旱莲子草淹水处理 1 h 时迅速上调表达, 并在 3 h 时达到峰值, 其后持续下调表达, 呈现“updown”的表达模式。该基因是拟南芥 *ESK1* (*Eskimo1*) 的同源基因, 隶属 TBL 基因家族, 该家族成员具有保守的 DUF231 (Domain of Unknown Function) 及 TBL (Trichome Birefringence-Like) 结构域, 参与植物细胞次生壁形态建成过程^[22-24]。基因 *Contig23336* 在淹水处理 1~12 h 时表达上调, 根据序列特征判断该基因为 AP2 (Apetala 2) 基因家族

ERF (Ethylene Response Factor) 亚家族成员, 主要参与淹水处理相关的乙烯信号通路和可塑性生长调控过程^[25]。运用亚硫酸氢钠测序技术对这两个基因上游启动子区在淹水处理过程中甲基化修饰状态进行分析, 了解与不同水陆处理诱导的甲基化调控因子差异表达水平及喜旱莲子草表型变异式样的联系, 能为揭示与可塑性变异相关的表观遗传信息形成和维持机制、解析喜旱莲子草表型可塑性变异发生的分子机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及同质园移栽实验

将采自野外并在复旦大学试验田中种植的喜旱莲子草 (*Alternanthera philoxeroides*) 植株切成长约 4 cm 的茎段 (每茎段均带有 1~2 个不定芽) 后, 斜插入土壤基质 (泥炭: 蛭石: 河沙 = 1: 1: 1) 中培育; 待幼苗长至约 5 cm 高时, 移栽到盛有洗净的河沙的花盆 (口径 15 cm, 高 15 cm) 中养护。

1.2 不同水陆条件设置及淹水处理

在复旦大学 (31° 14' N, 121° 29' E) 试验田中建立两个可人工控制水分条件的同质园, 模拟喜旱莲子草的两种野生生境, 即“水生”和“陆生”。水生同质园由一个长 7 m、宽 7 m、深 0.5 m 的人工池塘组成, 池塘中灌注自来水; 陆生同质园是一块地势较高且排水良好的陆地 (长 10 m、宽 5 m), 两个同质园彼此相邻。取 30 盆喜旱莲子草置于水生同质园人工池塘中进行完全淹水处理, 保持水面高于土面 10 cm 以上, 另取 30 盆置于陆生同质园陆地上作为对照。在淹水处理 0、1、3、6、9、12、24、48、120、288 h 时, 分别收集淹水处理和陆生对照植株的茎节间材料, 每一处理时间点及对照样品各取 10 个重复。其中 5 份样品用 RNA-later (Ambion) 固定以提取总 RNA, 另外 5 份样品用液氮冻存以提取基因组 DNA。

1.3 甲基化调控基因表达水平检测

1.3.1 总 RNA 提取

分别取淹水处理 0、1、3、6、12、24、48、120、288 h 时喜旱莲子草的茎节间样品 (每一处理时间点取 3 个重复样品), 用 TRIzol Reagent (Invitrogen) 提取 RNA, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测

RNA 质量, 用 NanoDrop2000C (Thermo Scientific) 检测 RNA 浓度, 并通过 OD_{260}/OD_{280} 比值评价 RNA 纯度。

1.3.2 cDNA 合成

使用 PrimeScript RT Master Mix (TAKARA, DALIAN) 将 RNA 反转录成 cDNA。10 μ L 反应体系中含: 5 \times PrimeScript Buffer (for Real Time) 2 μ L, 总 RNA 2 μ L (约 300 ng)。反应条件: 37°C 温育 15 min, 85°C 变性 5 s。cDNA 在 -20°C 下保存。

1.3.3 引物设计和荧光定量 PCR 分析

根据文献资料^[15-19]筛选出 16 个与 DNA 甲基化调控相关的基因作为检测对象 (表 1), 并依据本实验室通过 RNA-Seq 分析获得的喜旱莲子草相关基因序列信息 (未发表) 设计荧光定量 PCR 引物 (表 1), 引物由上海生工公司合成。以组成型表达基因 *Contig25640* (泛素连接酶基因 *UBC10*) 作为内参, 参照 TaKaRa 公司荧光定量试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 说明书, 运用 Applied Biosystems 7300 实时荧光定量 PCR 仪检测相关基因在不同植物样品中的表达水平, 每个样品设置 3 次技术重复。荧光定量 PCR 反应体系: cDNA 模板 2 μ L, 2 \times SYBR Premix Ex Taq[™] 10 μ L, 正反引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L, 50 \times ROX Reference Dye 0.4 μ L, ddH₂O 6 μ L。采用两步法标准程序: 95°C 30 s, 95°C 5 s, 52~60°C 31 s, 40 个循环。

荧光定量 PCR 反应完成后, 采集各个反应的 CT 值 (扩增产物达到设定阈值所经历的循环数), 运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法比较不同处理样品以及不同处理时间点目标转录本表达量的相对变化^[26,27]。以未经淹水处理的陆生同质园样品为参照因子 (calibrator), 计算不同处理时间点目标基因在淹水处理下相对于陆生对照样品的表达量差异。具体步骤: 首先计算各样品中目标基因 (target gene) 相对于内参基因 (internal control) 的 CT 值差异, $\Delta CT = CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{internal control}}$; 然后计算淹水处理 (pond) 样本中目标基因相对于对照样本 (upland) 的 ΔCT 差异, $\Delta\Delta CT = (CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{internal control}})_{\text{pond}} - (CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{internal control}})_{\text{upland}}$; 最后通过内均一化处理, 用目标基因在淹水处理样品中相对于对照的表达倍数 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 来表示淹水处理 (pond) 相

表 1 表观遗传调控基因及定量 PCR 扩增引物
Table 1 Analyzed genes and primers used in real-time PCR analysis

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')		
	正向引物 Forward primers (F)	反向引物 Reverse primers (R)	
DNA 甲基化 DNA methylation	<i>DRM1</i>	TGATGATTCTGGTCCTCAGATTAT	CCATTGCTATTGAGACTTCCTCCTTA
	<i>DRM2</i>	TCCATCGTCTGGGCATACCTC	GCTGCTCTAACCTATCATTCTGCA
	<i>MET1</i>	CCAGATTGTTACAGGAGGAAGAGG	TAGGTTTGTAGTAAGCAGGGAGGG
	<i>VIM1</i>	GATAGCAAATACGAGCGACGAGTT	AAATGGGTGGGTCAAGGGAAG
	<i>CMT3</i>	TAATCACAAGCACAAACACCCAT	GCCAACGCACCTTCAAGTAAA
	<i>DCL2</i>	TTCCGTTTGAAGAATTACCTGC	GATATGGGAGACATTATGACAAGACA
	<i>HOG1</i>	CAGAAGGGAAGGGACGGTGTT	TGCGGACTAACCATCTTATTCAAAC
	<i>ROS1</i>	GTTCTCTTCAACCCCTACC	GAACATTTTACAGTGTCTTTTGG
	<i>ROS3</i>	AAGGGTGCTCTTGAGTTGTGGA	GGAAACTGAAGATAGAAAAGGCGAA
染色质重塑 Chromatin remodeling	<i>DDM1</i>	CATACGACCCTCAACAGATAGTGC	TCTTTATGACAGTGATTGGAACCC
组蛋白分子伴侣 Histone chaperone	<i>FKBP53</i>	TCAAGACCAACATCCCAACCC	GGAAAAGAGCATCTCGTGGAAG
组蛋白修饰 Histone modification	<i>KYP</i>	AACTATTGCCAGTCTAATTTTCGCTT	GTTTTGCCATGTTTCTGCCGT
	<i>XR6</i>	GTTGAAAAGCCAATGCCAGATAC	GCTCGTTGCTAAACTCAGTCCCT
	<i>HDA6</i>	GTGTTGGGTGGAGGAGGGTATA	TCTTTGCGCGAGTTCTGGTTT
	<i>HDT1</i>	GTCATCCATCTTTCTCAGGCTACTC	TTCCTCGTGAATACCAAATCAA
	<i>HAG2</i>	GCTGCTCAATCACATTGCCATA	GGAAGAAACTGAGAACTTGCGTC

对于对照 (upland) 中目标基因的相对表达量差异。以淹水 0 h 为参照因子, 分析淹水处理不同时间点目标基因表达的相对量变化。

1.4 差异表达基因启动子区甲基化修饰动态分析

1.4.1 目标基因启动子区序列克隆

根据本实验室前期研究结果, 选取了两个在不同水陆条件下明显差异表达的基因 *Contig942* 和 *Contig23336* 作为目标基因。首先基于已知序列, 运用软件 Primer Premier 5.0 (PREMIER Biosoft) 设计 Tail PCR 引物, 以喜旱莲子草基因组 DNA 为模板, 采用 Genome Walking Kit (TAKARA, DALIAN) 进行巢式 PCR 扩增 5' 侧翼序列^[28,29]; 在 3' 端设计 RACE 引物, 以喜旱莲子草总 RNA 为模板, 用 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 (TAKARA, DALIAN) 进行巢式 PCR 扩增 3' 侧翼序列。将得到的扩增产物进行割胶回收后, 用 pMD18-T Vector (TAKARA, DALIAN) 试剂盒克隆, 并进行测序和拼接。运用 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 查找编码区起始及终止位点。利用植物启动子分析程序 TSSP (Plant Promoter Identification Program) (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter>) 预测启动子区

域; 用 ScanWM-PL (Softberry, Inc) 程序搜寻植物调控元件数据库, 查找序列中的保守元件; 用 MethPrimer 程序 (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 分析目标基因上游序列 CG 含量及分布^[30], 再利用 Primer Premier 5.0 程序设计亚硫酸氢钠测序引物 (表 2)。

表 2 亚硫酸氢钠测序引物
Table 2 Primers used in bisulfite sequencing

基因 Gene	引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	产物长度 Product length (bp)
<i>Contig 942</i>	P1-F	TGAGAGATTAAGATTAGGGGTGTGTAA	307
	P1-R	ATCCTAACCCCTRAATTTTCCATTCC	
	P2-F	GAATGGAAAATTYAGGGTTAGGAT	436
P2-R	TAAAAACRTCACAATCCATAAATTATTA		
<i>Contig 23336</i>	P3-F	ATAYTTTTATTTTAGTTGAAAAGYTGTT	462
	P3-R	AATTACTTTTATACCCTTAARAACATCAT	
	P4-F	TATTTAATTTTATGATGTTTTAAGGGTAT	471
	P4-R	TRATTTTCTCCACACATTTTACAA	

1.4.2 亚硫酸氢钠测序

分别取淹水处理 0、1、3、6、9、12 h 及陆生对照样品各 100 mg, 用 TGuide 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司) 提取 DNA, 每一处理取 4 个重复样品; 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 用 NanoDrop2000C

(Thermo Scientific)检测 DNA 浓度, 并通过 OD_{260} / OD_{280} 比值评价 DNA 纯度。

以亚硫酸氢钠转化试剂盒 Epiect Bisulfite kit (QIAGEN) 处理 DNA 后的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。扩增产物进行电泳鉴定后割胶回收, 用 pMD18-T Vector (TAKARA, DALIAN) 试剂盒克隆, 每个样品挑取 15 个白色菌落进行测序并统计所有胞嘧啶位点甲基化状况。胞嘧啶位点甲基化程度 = $C / C + T$ [31-33], 其中 C 为甲基化的胞嘧啶, T 为未甲基化的胞嘧啶。运用 Cymate (<http://www.cymate.org/>) 和 Kismeth (<http://katahdin.mssm.edu/kismeth/revpage.pl>) 程序对测序结果进行分析, 得到扩增区域所有胞嘧啶位点的甲基化数据 [34,35]。

2 结果与分析

2.1 不同水陆处理条件下 DNA 甲基化调控因子表达水平的动态变化

运用定量 PCR 方法对水陆处理不同时间的

DNA 甲基化调控因子表达水平进行检测, 结果显示大部分基因在不同处理时间点的淹水和陆生对照样品中的相对表达水平有所改变, 且多数基因在淹水处理前期被强烈诱导上调表达, 其中既包括对 DNA 甲基化建立和维持有重要作用的 *MET1*、*CMT3*、*VIM1*、*XR6*、*DDM1* 等, 也包括 DNA 去甲基化的关键调控因子 *ROS1* 和 *ROS3*; 淹水处理 12 h 时, 这些基因在淹水样品中的表达量相对于陆生对照有所下降, 尤其是 *CMT3*、*VIM1*、*XR6* 和 *DDM1* 等, 但随着淹水处理时间的延长又有所回升(表 3, 图 1)。与其它基因不同, 淹水处理导致 *HOG1* 和 *KYP* 的表达量相对于陆生对照明显降低, 尤其是在淹水前期阶段。而 *FKBP53* 和 *DRM2* 在不同淹水处理阶段的表达量与对照均没有显著差异。

2.2 不同水陆处理条件下 DNA 甲基化修饰的动态变化

2.2.1 测序区域胞嘧啶平均甲基化程度

通过巢式 PCR 扩增得到 *Contig942* 基因全长序列(1425 bp)和翻译起始密码子(ATG)上游约

表 3 不同水陆处理条件下 DNA 甲基化调控基因差异表达倍数

Table 3 Expression fold change of DNA methylation regulating factors under pond/upland treatments

基因 Gene	处理时间 Time (h)								
	1	3	6	12	24	48	120	288	
DNA 甲基化 DNA methylation	<i>DRM1</i>	0.51 ± 0.24	1.32 ± 0.27	4.16 ± 0.73	3.08 ± 0.80	0.88 ± 0.23	1.15 ± 0.13	1.86 ± 0.81	7.21 ± 2.15
	<i>DRM2</i>	1.12 ± 0.43	1.26 ± 0.37	1.33 ± 0.47	0.81 ± 0.19	0.67 ± 0.18	0.84 ± 0.01	1.31 ± 0.45	0.92 ± 0.11
	<i>MET1</i>	1.19 ± 0.29	5.72 ± 1.18	3.35 ± 1.21	1.91 ± 0.75	1.98 ± 0.50	0.93 ± 0.20	0.54 ± 0.14	0.99 ± 0.25
	<i>VIM1</i>	2.18 ± 0.87	3.73 ± 0.86	5.09 ± 2.32	0.90 ± 0.19	1.59 ± 0.44	1.65 ± 0.18	0.99 ± 0.38	1.41 ± 0.52
	<i>CMT3</i>	0.54 ± 0.07	4.59 ± 1.40	4.69 ± 1.03	0.29 ± 0.11	2.90 ± 1.21	3.19 ± 1.18	2.15 ± 1.01	7.23 ± 3.10
	<i>DCL2</i>	1.05 ± 0.28	3.02 ± 1.33	3.81 ± 1.68	0.46 ± 0.30	2.23 ± 0.49	1.44 ± 0.59	1.34 ± 0.51	1.21 ± 0.38
	<i>HOG1</i>	0.60 ± 0.16	0.42 ± 0.21	0.94 ± 0.43	0.62 ± 0.15	1.69 ± 0.81	1.43 ± 0.42	0.45 ± 0.11	0.96 ± 0.29
	<i>ROS1</i>	3.11 ± 0.18	2.21 ± 0.03	5.12 ± 1.39	1.29 ± 0.61	1.80 ± 0.31	2.04 ± 0.19	1.91 ± 0.39	4.03 ± 1.16
	<i>ROS3</i>	1.28 ± 0.16	3.32 ± 0.82	4.79 ± 0.44	1.95 ± 0.30	2.33 ± 0.26	2.55 ± 0.45	1.61 ± 0.49	2.80 ± 0.58
染色质重塑 Chromatin remodeling	<i>DDM1</i>	1.22 ± 0.15	2.35 ± 0.67	4.27 ± 1.75	0.62 ± 0.10	1.91 ± 0.54	3.77 ± 0.67	1.46 ± 0.58	2.66 ± 0.63
组蛋白分子伴侣 Histone chaperone	<i>FKBP53</i>	1.43 ± 0.14	1.23 ± 0.00	1.84 ± 0.67	12.6 ± 1.29	0.77 ± 0.14	1.40 ± 0.14	0.61 ± 0.21	0.89 ± 0.12
组蛋白修饰 Histone modification	<i>KYP</i>	0.59 ± 0.25	1.12 ± 0.04	0.62 ± 0.20	0.28 ± 0.04	0.98 ± 0.24	1.26 ± 0.13	1.11 ± 0.29	1.03 ± 0.31
	<i>XR6</i>	1.36 ± 0.36	2.60 ± 0.71	6.31 ± 1.21	0.28 ± 0.01	10.55 ± 4.73	5.36 ± 2.55	1.08 ± 0.59	2.76 ± 0.99
	<i>HDA6</i>	0.81 ± 0.20	2.62 ± 0.37	14.15 ± 1.00	8.15 ± 2.30	2.14 ± 0.36	1.89 ± 0.20	1.15 ± 0.08	0.55 ± 0.00
	<i>HDT1</i>	0.75 ± 0.10	4.89 ± 0.76	2.36 ± 0.82	1.56 ± 0.57	2.72 ± 1.24	2.59 ± 0.29	1.65 ± 0.37	1.27 ± 0.41
	<i>HAG2</i>	0.54 ± 0.12	1.98 ± 0.17	1.59 ± 0.22	1.68 ± 0.76	2.24 ± 0.86	1.86 ± 0.13	0.82 ± 0.24	1.74 ± 0.36

注: 淹水处理/陆生处理基因表达变化倍数 = $avg. 2^{-\Delta\Delta CT} \pm s.d.$, 其中 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 代表目标基因的相对表达量差异, s.d. 代表重复样品之间的标准差, avg. 代表平均值。

Notes: Pond/upland expression fold change = $avg. 2^{-\Delta\Delta CT} \pm s.d.$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ indicates fold change in expression of target genes, s.d. indicates standard error of experiments performed in triplicate, avg. means average.

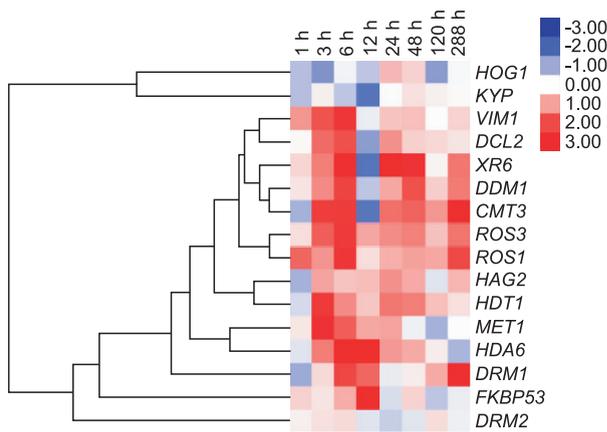


图1 不同水陆处理条件下16个DNA甲基化调控基因的差异表达式样

Fig. 1 Differential expression of DNA methylation regulating factors under pond/upland treatments

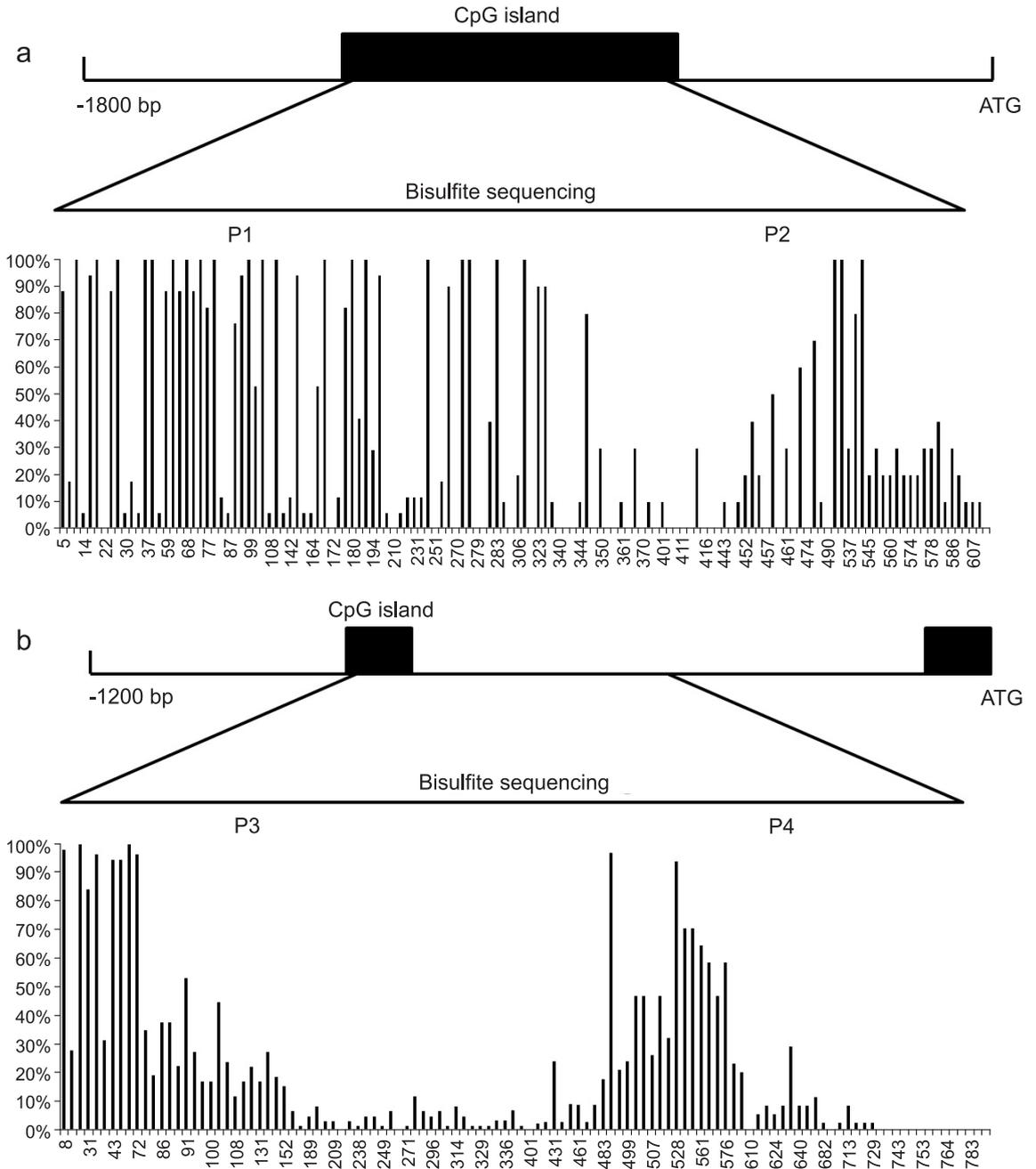
1800 bp 的侧翼序列。该基因序列上存在两个 CpG 富集区域, 分别位于 ATG 上游-1300~-700 bp 和 ATG 下游 2200~2300 bp。利用 ScanWM-PL 程序在 *Contig942* 基因上游侧翼序列中鉴定了 27 个该基因与其直系同源基因共有的保守元件, 其中一些为已知转录调控因子 (如 Myelocytomatosis (MYC)、WRKY) 的结合位点; 有些元件位于 CpG 富集区, 如在转录起始位点上游 100~300 bp 间有一个 MYB (Myeloblastosis) 家族转录因子的结合元件 SMRE (Secondary wall MYB-Responsive Element), 其识别位点为 [T/C]ACC[A/T]A[A/C][T/C]^[36]。在 *Contig942* 基因上游侧翼序列还发现一个次生壁相关 NAC 转录因子 SND1 (secondary wall-associated NAC domain protein1) 的作用位点, 即 SNBE (Secondary wall NAC binding element) 元件^[37]。亚硫酸氢钠测序范围为 ATG 上游-1298~-577 bp (图 2: a), 分成两段 (P1 和 P2) 进行测序。根据扩增得到的启动子序列推测在喜旱莲子草基因组中至少存在 3 个 *Contig942* 同源基因 (942-A、942-B、942-C), 其启动子序列相似性大于 94%, 并含有相同的保守元件, 但胞嘧啶甲基化修饰状态不完全一致。在 P1 区域, 942-A/B/C 胞嘧啶甲基化程度较为一致, 其中 CG 98.4%~98.6%, CNG 72.5%~75.1%, CHH 7.4%~9.9%; 淹水处理 1~12 h, 942-A/B/C P1 区域的甲基化程度未表现出明显变化。但 P2 区域不同拷

贝甲基化修饰状态有较明显差异。在陆生对照样品中, 942-A 的 CG 和 CNG 位点平均甲基化水平 (CG 93.8%, CNG 67.1%) 高于 942-B/C (CG 67.9%~75.8%, CNG 46.4%~54.6%), 942-C 的 CHH 位点甲基化水平 (30.5%) 显著高于 942-A/B (13.1%~14.8%)。淹水处理条件下, 942-A/B/C P2 区域也呈现出不同的变化趋势 (图 3)。淹水处理 1 h, 942-A/B/C 的 CG/CNG/CHH 位点平均甲基化程度均升高 (最大上升幅度约 20%); 淹水处理 3 h, 942-B 的 CNG/CHH 位点甲基化程度降低 (下降幅度约 16%), 而 942-A/C 的 CNG/CHH 位点甲基化程度仍维持升高 (最大上升幅度约 28%); 淹水处理 6 h, 仅 942-B/C 的 CHH 位点甲基化程度呈现上升 (最大上升幅度约 15%); 淹水处理 9 h, 942-A 的 CG/CHH 位点出现甲基化程度降低; 淹水处理 12 h, 942-A 的 CG/CNG/CHH 位点甲基化程度又明显升高 (最大上升幅度约 46%)。总体上看, 淹水处理条件下发生甲基化改变的位点主要是 CHG/CHH 位点。

Contig23336 基因编码区 mRNA 全长 984 bp, 扩增得到该基因起始密码子上游 1187 bp 的侧翼序列。*Contig23336* 基因上游存在两个 CpG 富集区域, 分别位于 ATG 上游约-800~-700 bp 以及-100~-5 bp 处。启动子位于 ATG 上游-80 bp 处, TATA 框位于-115 bp 处。利用 ScanWM-PL 程序在 *Contig23336* 基因上游侧翼序列中查找到 22 个该基因与其直系同源基因共有的保守元件。亚硫酸氢钠测序范围为 ATG 上游-873~+19 bp, 共 892 bp (图 2: b), 分成两段 (P3 和 P4) 进行测序。P3 区域平均甲基化水平为 CG 97.7%、CNG 62.4%、CHH 13%, 淹水处理 1~12 h 该区域甲基化程度未见明显变化。P4 区域平均甲基化水平较低, 其中 CG 29.3%, CNG 15%, CHH 17.1%, CG 和 CNG 位点甲基化水平显著低于 P3 区域。淹水处理过程中, 仅 6 h 时 P4 区域 CNG 位点甲基化水平出现约 10% 下降, 12 h 时 CG 位点出现约 12% 上升外, 总体而言甲基化水平变化不显著 (图 3)。

2.2.2 不同位点甲基化水平变化式样

对 *Contig942-A/B/C* 序列中所涉及的转录调控



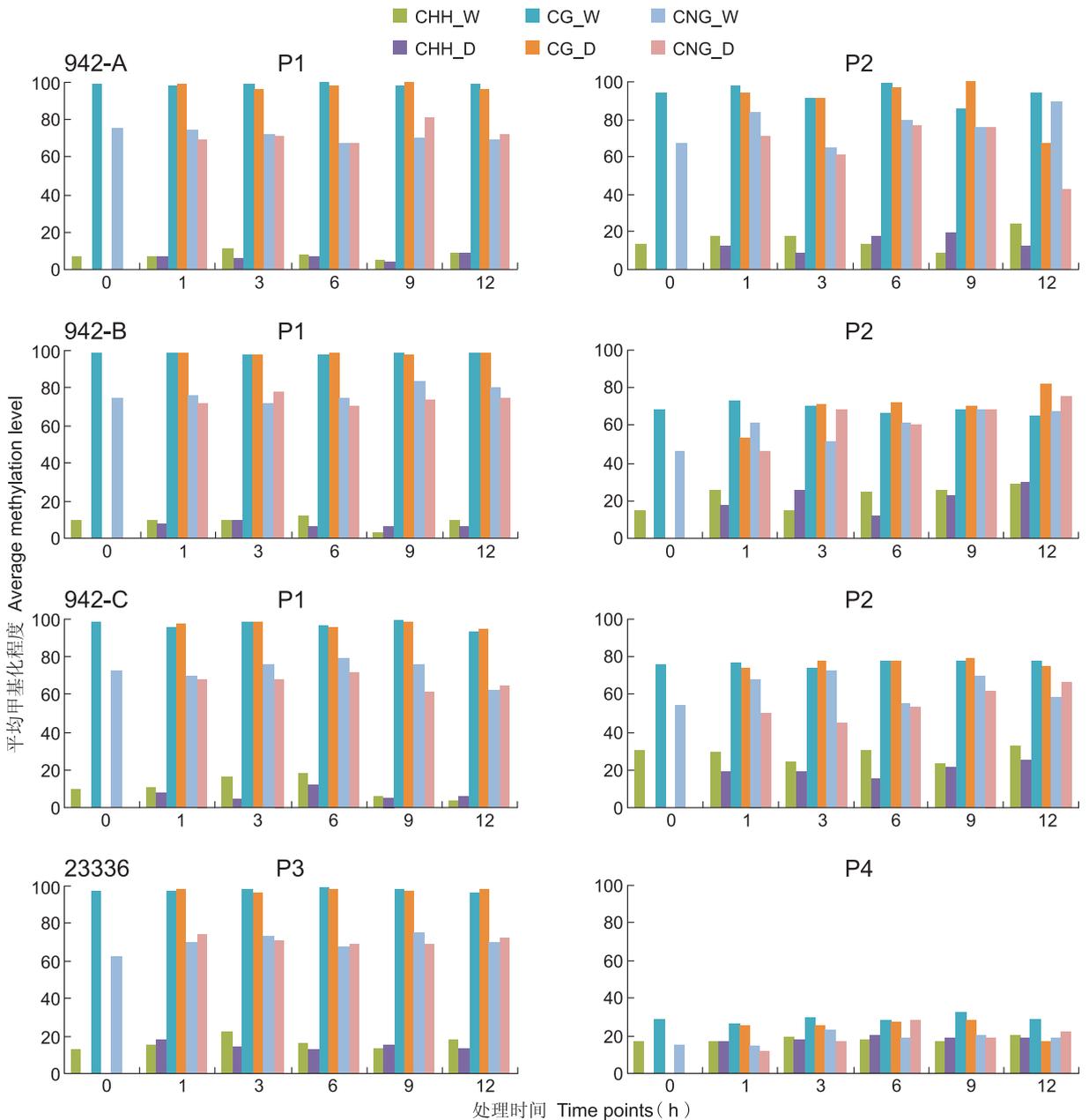
a: *Contig942* (722 bp); b: *Contig23336* (892 bp). 柱状图为陆生对照样品亚硫酸氢钠测序结果, Y 轴代表各胞嘧啶位点甲基化的克隆数占总克隆数的比例。

a: *Contig942* (722 bp); b: *Contig23336* (892 bp). Bar graphs show results of bisulfite sequencing of control samples. Vertical axis shows percentage methylation of each site.

图 2 目标基因启动子序列 CG 含量分布及亚硫酸氢钠测序范围
Fig. 2 CG distribution and regions for bisulfite sequencing

元件胞嘧啶甲基化水平分别进行统计, 发现有 8 个保守元件的胞嘧啶甲基化水平在淹水处理不同时间点发生改变(表 4), 其中有些元件在所测片段中有多个拷贝, 但甲基化变异状态不完全一致。如变化位点数较多的 GGTC 序列, 在淹水处理过程

中, 部分位点出现甲基化水平上升, 部分位点出现甲基化水平下降。该序列对应植物中已知的 I-box 元件, 与之结合的转录因子未知。*Contig942-A/B/C* 的 Box C 及 CRE 元件也都发生了甲基化式样变异, MYB46/MYB83 等转录因子的结合元件 SMRE



W: 淹水处理; D: 陆生对照; CG、CNG、CHH: 三种类型的胞嘧啶。
W: Treated samples; D: Control samples; CG, CNG, CHH: Types of cytosines.

图 3 测序区域平均甲基化程度

Fig. 3 Average methylation level of each fragment at different time points of water treatment

上多个胞嘧啶位点甲基化程度则在淹水处理 9~12 h 出现明显降低,但在 *Contig23336* 的保守元件上未检测到明显的甲基化式样变异。

除了保守元件之外, *Contig942-A/B/C* P2 区域多个连续 CHH 位点在淹水处理不同时间点出现胞嘧啶甲基化程度上调的现象,而在淹水处理 3 h, *Contig942-B* P2 区域有 13 个 CHH 位点出现甲基

化程度下调,这 13 个连续的 CHH 位点位于基因 5'端 CpG 富集区下游,且紧邻 CpG 富集区,在这些位点上含一个转录因子结合元件 CAATTTATC (RE: CRE/BF: unknown) (图 4)。在 *Contig23336* 启动子区域同样检测到连续 CHH 位点胞嘧啶甲基化程度发生上调的现象,这些位点都与 CpG 富集区域相重叠。

表 4 不同水陆处理条件下 *Contig942* 启动子区保守元件甲基化修饰状态
Table 4 Dynamic methylation patterns of conserved motifs of *Contig942*

保守元件(RE: 调控元件, BF: 结合因子) Conserved elements (RE: Regulate element, BF: Binding factor)	序列 Sequence	位置 Site	区域 Region	处理时间 Time (h)				
				1	3	6	9	12
RE: I-box / BF: unknown	GGT <u>C</u> C	72	A_P1			▲		
	GGT <u>C</u> C	164	A_P1					▽
	GGT <u>C</u> C	173	A_P1				▽	
	GGT <u>C</u> C	113	B_P1				▲	
	GGT <u>C</u> C	103	C_P1	▲				
	GGT <u>C</u> C	163	C_P1		▲			
	GGT <u>C</u> C	15	C_P2		▲			
RE: CARGCW8GAT/BF: plant MADS domain protein AGL15	<u>C</u> TAA ATTATG	157	A_P2			▲		
	<u>C</u> TAA ATTATG	157	C_P2			▲		
RE: CURECORECR (copper; oxygen; hypoxic; Oxygen deficiency responsive gene)	<u>G</u> TAC	189	A_P2					▽
	<u>G</u> TAC	189	C_P2			▲		
RE: Box C /BF: unknown	<u>C</u> TCCCAC	194/198	A_P2	▲ ¹			▽ ²	▲ ¹ ▲ ²
	<u>C</u> TCCCAC	197/198	C_P2			▲ ¹	▽ ²	
RE: SMRE element /BF: MYB46; MYB83	[<u>T</u> /C]ACC[<u>A</u> /T]A[<u>A</u> /C][<u>T</u> /C]	198/201	A_P2				▽ ¹	▲ ¹ ▽ ²
	[<u>T</u> /C]ACC[<u>A</u> /T]A[<u>A</u> /C][<u>T</u> /C]	198	C_P2				▽	
RE: CRE, consensus /BF: unknown	<u>C</u> AATTTATC	336/345	A_P2	▲ ²				▲ ¹
	<u>C</u> AATTTATC	338/347	B_P2		▽ ¹	▲ ²	▲ ¹	▽ ²
	<u>C</u> AATTTATC	347	C_P2		▽	▲		
RE: RY /BF: ABI3	<u>C</u> ATGCA	28	B_P2					▽
	<u>C</u> ATGCA	32	C_P2			▲		
RE: RY2 /BF: unknown	<u>C</u> ATGCAA	28	B_P2					▽
	<u>C</u> ATGCAA	32	C_P2			▲		

注: 甲基化变化胞嘧啶位点用下划线标示; 甲基化修饰状态变化: ▲上调, ▽下调, 上标 1 和 2 分别代表序列中第 1 和第 2 个胞嘧啶。
Notes: Cytosine sites with changed methylation status are underlined; ▲, Increased cytosine methylation; ▽, Decreased cytosine methylation; Superscripts 1 and 2 denote first and the second cytosine, respectively.

3 讨论

采用定量 PCR 方法对不同水陆处理条件下喜旱莲子草 DNA 甲基化调控基因的表达水平进行检测, 结果显示除 *HOG1*、*KYP* 和 *DRM2* 三个基因外, 其余 13 个基因均在淹水处理不同时间点被诱导上调表达(差异表达倍数大于 2), 且在水淹 3~6 h 期间被强烈诱导上调表达, 此后有些基因持续上调, 另一些基因则维持相对稳定的表达水平, 少量基因下调表达。这说明喜旱莲子草对淹水胁迫的响应及表型可塑性变异与不同 DNA 甲基化调控因子介导的表观遗传调控作用有一定关联, 且不同 DNA 甲基化调控因子的活动既有相关性, 也有其独立性。

对 *Contig942* 和 *Contig23336* 两个基因启动子区胞嘧啶甲基化修饰状态进行测序分析, 揭示了淹水处理导致部分位点甲基化程度改变, 其中既包括

保守调控元件的胞嘧啶位点, 也包括一些连续的非对称甲基化位点。保守元件甲基化状态的改变可能影响相关基因的表达调控。例如, 目前已知与 SMRE 相结合的 MYB46, 它是次生壁发育调控通路的“开关”, 并调控多个转录因子及次生壁合成相关基因, *Contig942* 基因启动子区域中 SMRE 元件甲基化修饰状态的改变有可能影响 MYB46 的结合, 进而影响该基因在不同水陆处理条件下特殊的差异表达式样。本研究结果表明, *Contig942* 基因启动子 P2 区域对淹水处理较为敏感, 该区域多个胞嘧啶位点甲基化程度在不同处理时间点出现特异变化; 三个同源基因 *Contig942-A/B/C* 的 P2 区域在淹水处理条件下呈现出不完全一致的变化动态, 表明 *Contig942* 的三个不同拷贝在功能上已有所分化。其中 *Contig942-B* P2 区域与 CpG 富集区相邻的多个胞嘧啶位点在淹水处理 3 h 时甲基化程度呈现一致下调, 结合该基因在淹水处理下“updown”

*Contig942_P2**Contig942-A* 1 CAGATTAATC CGATCTGGCC TCCGAATCAT ACAATTTGAT AATTTTCATAT*Contig942-B* 1 CAGATTAATC CGGCCTGGTC TCCGATTCAT GCAATTTGAT GATTTTCATAT*Contig942-C* 1 CAGATTAATC CGGTCCGATA TCCAATTCAT GCAATTTGAT GATTTTCATAT

51 TTTTCGATCTA ATCGGTTTTG GACTGTGCAC ACCCCTAGCC AAGACAAATC

51 TTTCAATCTA ATCGGTTTTG GACCGTGCAC ACCCCTAGCC AAGACAAATC

51 TTTTCGATCGA ATCGGTTTTG GACCGTGCAC ACCTCTAGCC AAGACAAACC

101 CAACTCAAAC AAGATAAGAA GAAACTTATT AAAAAAACA CCAAAAAACT

101 CAACTCAAAAT AAGATAAGAA GAAACTTATT AAAAAAACA CCAAAAAACT

101 CAATTCAAAT AAGATTAGTA GAAACTTATT TAAAAAACA CCAAAAAACT

151 CCCATCCTAA ATTATGAAAG ATACTAGATA TACTAGTACC ACTCTCCCAC

151 CCCATCCTAA ATTATGAAAG ATATTAGATA TACTAGTACC ACTCTCCCAC

151 CCCATCCTAA ATTATGAAAG ATATTAGATA TACTAGTACC ACTCTCCCAC

201 CAACTTCGTA GTTCCAGGTC AAATTGTTAC AAAGGAAATG ATAACGGATG

201 CAACTTCGTA GTTCCAGGTC AAATTGTTAC AAAGGAAATG ATAACGGATG

201 CAACTTCGTA GTTCCAGGTC AAATTGTTAC AAAGGAAATG ATAACGGATG

251 AAATAGTGTA ATACGATAAA GTATTTCTTC CGTTCCATTA TATTTGCTAC

251 AAATAGTGTA ATACTATAAA GTATTTCTTC CGTTTCATTA TATTTGCTAC

251 AAATAGTGTA ATACTATAAA GTATTTCTTC CGTTTACTA TATTTGCTAC

301 ATTTTTFAC ACACACCCCA ATACACTTGT TTAATCAATT TTATCTCAAG

301 ATTCCTTTTT ACACACACCC CAATACACTT GTTTAATCAA TTTTATCTCA

301 ATTCCTTTTT ACACACACCC CAATACATTT GTTTAATCAA TTTTATCTCA

RE: CRE, consensus /BF: unknown

351 TTCTATAATT AAAAAAATTC TAAAAATTA ATAT

351 AGTTGTATAA TTAATAAAGT TCTAAAAATT AAATAT

351 AGTTGTATAA TTAATAAAT TCTAAAAATT AAATAT

虚线标示 CpG 富集区; 实线标示调控元件; 黑体标示甲基化修饰程度出现特异下调的胞嘧啶位点。

Dashed underline: CpG island; Real underline: Transcriptional regulatory motif; Bold letter: Demethylated site.

图 4 *Contig942 P2* 测序区域Fig. 4 P2 region of *Contig942*

的表达模式, 推测该现象与其在 1~3 h 表达上调之间存在相关性, 在该区域可能存在未知的转录调控元件; 同时, *Contig942-B P2* 区域连续的 CHH 位点在淹水处理过程中甲基化程度也发生一致的改变, 反映了这些连续胞嘧啶位点之间的功能相关性, 也可能是通过改变该区域 DNA 链空间结构影响与蛋白因子的互作, 进而影响相关基因的表达和喜旱莲子草对外界环境的响应。*Contig23336* 基因甲基化测序区域调控元件上未出现显著甲基化式样改变, 表明该基因在淹水处理条件下的持续上调表达与受检测区域甲基化式样无直接关联, 该基因的调控元件可能在检测区域以外, 远离转录起始位点, 或受到其它调控因素的影响。

表观遗传调控作用是研究生态-发育 (Eco-Devo) 和可塑性变异机制的重要环节, 涉及不同的调控策略和不同调控因子的活动, 包括 DNA 甲基化、组蛋白共价修饰、染色体重塑和非编码 RNA 调控等, 但目前对不同调控因素之间相互协调的关系以及在不同生物类群中的作用特点还缺乏深入的了解, 即使在人、酵母或拟南芥等模式生物中要将环境诱导因素、表观遗传变异式样与基因差异表达水平以及表型发育状态直接关联起来也有一定难度。喜旱莲子草是一种非模式生物, 目前尚无完整的基因组信息, 对该物种表观遗传调控因子的类型及其作用特点也还缺乏基本的了解。本研究揭示了喜旱莲子草响应不同水陆条件过程中 DNA 甲基化

相关调控因子的动态表达式样,初步证实了表观遗传变异与发育调控基因差异表达及表型可塑性变异的相关性,但基于目前的数据尚不能准确阐明喜旱莲子草表型可塑性变异和广泛适应不同水陆生境的分子机制,不能明确表观遗传调控因素与可塑性基因差异表达水平的对应关系,因为即使在同质园条件下对单一水分因子变动的响应也涉及大量基因的差异表达,涉及不同表观遗传调控因子的协调作用。要系统阐明喜旱莲子草适应水淹环境的表观遗传学基础,需要对不同环境条件下喜旱莲子草的表观基因组特点进行整体的比较分析,鉴定由环境因子导致的表观遗传转变,并寻找与基因表达式样、表型及生态适应性的关联特征,进而在整体水平阐明表观遗传调控体系在喜旱莲子草适应不同自然环境中的重要调节作用。

参考文献:

- [1] Geng YP, Pan XY, Xu CY, Zhang WJ, Li B, Chen JK, Lu BR, Song ZP. Phenotypic plasticity rather than locally adapted ecotypes allows the invasive alligator weed to colonize a wide range of habitats[J]. *Biol Invasions*, 2007, 9(3): 245-256.
- [2] Bradshaw AD. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants[J]. *Advan Genet*, 1965, 13: 115-155.
- [3] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals[J]. *Nat Genet*, 2003, 33: 245-254.
- [4] Bossdorf O, Richards CL, Pigliucci M. Epigenetics for ecologists[J]. *Ecol Lett*, 2008, 11(2): 106-115.
- [5] Chinnusamy V, Zhu JK. Epigenetic regulation of stress responses in plants[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12(2): 133-139.
- [6] Sultan SE. An emerging focus on plant ecological development[J]. *New Phytol*, 2005, 166(1): 1-5.
- [7] Schlichting CD, Smith H. Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes[J]. *Evol Ecol*, 2002, 16(3): 189-211.
- [8] Richards EJ. Inherited epigenetic variation — revisiting soft inheritance[J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(5): 395-401.
- [9] Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation[J]. *J Exp Biol*, 2006, 209(12): 2362-2367.
- [10] Grant-Downton RT, Dickinson HG. Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants[J]. *Ann Bot*, 2005, 96(7): 1143-1164.
- [11] Hinshelwood RA, Melki JR, Huschtscha LI, Paul C, Song JZ, Stirzaker C, Reddel RR, Clark SJ. Aberrant *de novo* methylation of the *p16^{INK4A}* CpG island is initiated post gene silencing in association with chromatin remodelling and mimics nucleosome positioning[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(16): 3098-3109.
- [12] Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription[J]. *Genes Dev*, 2011, 25(10): 1010-1022.
- [13] He XJ, Chen T, Zhu JK. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals[J]. *Cell Res*, 2011, 21(3): 442-465.
- [14] Chan SW, Henderson IR, Jacobsen SE. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(5): 351-360.
- [15] Finnegan EJ, Kovac KA. Plant DNA methyltransferases[J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 43(2-3): 189-201.
- [16] Xia H, Liu MQ, Yin WL, Lu CF, Xia XL. DNA methylation regulating factors in plants[J]. *Yi Chuan*, 2008, 30(4): 426-432.
- [17] Vanyushin BF, Ashapkin VV. DNA methylation in higher plants: past, present and future[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1809(8): 360-368.
- [18] Gong Z, Morales-Ruiz T, Ariza RR, Roldán-Arjona T, David L, Zhu JK. *ROS1*, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase[J]. *Cell*, 2002, 111(6): 803-814.
- [19] Zheng X, Pontes O, Zhu J, Miki D, Zhang F, Li WX, Iida K, Kapoor A, Pikaard CS, Zhu JK. *ROS3* is an RNA-binding protein required for DNA

- demethylation in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2008, 455(7217): 1259–1262.
- [20] Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2000, 10(2): 217–223.
- [21] Jeddeloh JA, Stokes TL, Richards EJ. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein [J]. *Nat Genet*, 1999, 22(1): 94–97.
- [22] Bischoff V, Selbig J, Scheible WR. Involvement of TBL/DUF231 proteins into cell wall biology [J]. *Plant Signal Behav*, 2010, 5(8): 1057–1059.
- [23] Bischoff V, Nita S, Neumetzler L, Schindelasch D, Urbain A, Eshed R, Persson S, Delmer D, Scheible WR. *TRICHOME BIREFRINGENCE* and its homolog *AT5G01360* encode plant-specific DUF231 proteins required for cellulose biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(2): 590–602.
- [24] Lefebvre V, Fortabat MN, Ducamp A, North HM, Maia-Grondard A, Trouverie J, Boursiac Y, Mouille G, Durand-Tardif M. *ESKIMO1* disruption in *Arabidopsis* alters vascular tissue and impairs water transport [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16645.
- [25] Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(2): 86–96.
- [26] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [27] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101–1108.
- [28] Zheng C, Zhang LP, Tang ZH, Zhao CP, Yuan SH. TAIL-PCR and its cloning in plant gene [J]. *Genom Appl Biol*, 2009, 28: 544–548.
- [29] Liu YG, Whittier RF. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking [J]. *Genomics*, 1995, 25(3): 674–681.
- [30] Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(11): 1427–1431.
- [31] Foerster AM, Mittelsten SO. Analysis of DNA methylation in plants by bisulfite sequencing [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 631: 1–11.
- [32] Henderson IR, Chan SR, Cao X, Johnson L, Jacobsen SE. Accurate sodium bisulfite sequencing in plants [J]. *Epigenetics*, 2010, 5(1): 47–49.
- [33] Warnecke PM, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki JR, Clark SJ. Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing [J]. *Methods*, 2002, 27(2): 101–107.
- [34] Gruntman E, Qi Y, Slotkin RK, Roeder T, Martienssen RA, Sachidanandam R. Kismeth: analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing [J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 371.
- [35] Foerster AM, Hetzl J, Mullner C, Mittelsten SO. Analysis of bisulfite sequencing data from plant DNA using CyMATE [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 631: 13–22.
- [36] Zhong R, Ye ZH. MYB46 and MYB83 bind to the SMRE sites and directly activate a suite of transcription factors and secondary wall biosynthetic genes [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(2): 368–380.
- [37] Zhong R, Lee C, Ye ZH. Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2010, 3(6): 1087–1103.