

植物DNA甲基化研究进展

陈子涵,任建国,王俊丽

(贵州医科大学公共卫生与健康学院,环境污染与疾病监控教育部重点实验室,贵阳 550025)

摘要: DNA甲基化是一种重要的表观遗传修饰,能够有效调控基因组稳定性。为了了解DNA甲基化对植物生长发育的影响,本文归纳了近年来植物DNA甲基化的模式,总结了植物DNA甲基化的生物学功能,概括了DNA甲基化的研究方法,最后总结了植物DNA甲基化研究中存在的问题,并指明了研究方向,为后续植物基因组研究提供理论依据。

关键词: 植物;DNA甲基化;表观遗传;修饰;生长发育;逆境胁迫;基因组;稳定性

中图分类号:S184

文献标志码:A

论文编号:cjas2020-0152

Research Advances on Plant DNA Methylation

Chen Zihan, Ren Jianguo, Wang Junli

(School of Public Health, the key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control,

Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract: DNA methylation is an important epigenetic modification that can effectively regulate genome stability. In order to understand the impact of DNA methylation on plant growth and development, this article summarizes plant DNA methylation patterns, concludes the physiological functions of plant DNA methylation, and reviews the research methods of DNA methylation. At last, this article sums up the problems in the study of plant DNA methylation and points out the research directions in the future, providing a theoretical basis for subsequent plant genome research.

Keywords: Plants; DNA methylation; Epigenetic; Modification; Growth and Development; Adversity Stress; genome; stability

0 引言

DNA甲基化(DNA methylation)是目前表观遗传学研究较为清晰的机制之一,广泛存在于生物界中,是真核细胞中最为常见的一种基因组修饰方式,它在调节基因组功能的同时不改变DNA的碱基序列。在植物中DNA甲基化主要包括从头甲基化和维持甲基化两类。植物基因组主要通过甲基化酶(CMT)和甲基化转移酶(DRM)来催化和维持DNA甲基化。研究发现DNA甲基化水平与部分疾病的发生、发展有关^[1],能够影响动植物生长发育、改变植物的花期^[2-3],帮助植物抵抗逆境胁迫,有效调控基因和保证基因组的稳定性。

对于植物而言,面对生长环境的改变,表观遗传的

变异会改变植物DNA的构象,从而改变染色质和蛋白质的结构,达到调节基因组的作用。研究发现,当植物面临生物胁迫和非生物胁迫时,植物基因组中DNA甲基化会发生改变,并且这些改变会遗传给后代。综上所述,DNA甲基化的改变能够丰富植物物种的多样性,加强植物的环境适应性,为此,本研究整理了近年来植物DNA甲基化的模式、生物学功能以及研究方法,以期深入了解DNA甲基化对植物的影响,为植物基因组的深入研究提供一定的理论依据。

1 植物DNA甲基化模式

植物DNA甲基化是从头甲基化、维持甲基化和活性去甲基化的动态调节结果,这些活动由不同的酶催

基金项目: 国家自然科学基金“艾纳香DNA甲基化和miRNA对镉胁迫积累的生理响应”(31960265)。

第一作者简介: 陈子涵,女,1996年出生,河南驻马店人,在读硕士,主要从事环境与健康方向的研究。通信地址:550025 贵州省贵阳市花溪区贵州医科大学, E-mail: 577908271@qq.com。

通讯作者: 王俊丽,女,1976年出生,内蒙古包头人,副教授,博士,主要从事环境生物学方面的研究。通信地址:550025 贵州省贵阳市花溪区贵州医科大学, E-mail: 411395583@qq.com。

收稿日期: 2020-07-30, **修回日期:** 2020-10-19。

化,通过不同的途径作用于特定的基因组区域。植物发生DNA甲基化的胞嘧啶序列有:CG,CHG和CHH(H代表A,T或C)^[6-7]。目前已知植物DNA甲基化的方式主要有两种,一种是从头甲基化,另一种是维持甲基化。

1.1 从头甲基化

从头甲基化(*De novo* methylation)是通过不同的DNA甲基转移酶对DNA进行催化,使2条未甲基化的DNA被甲基化。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,从头甲基化是通过RNA介导的DNA甲基化(RdDM)途径实现的,该途径涉及支架RNA(scaffold RNA)、小干扰RNA(siRNA)和一系列的蛋白质,主要内容见图1。在RdDM途径中,通过RNA聚合酶IV(POL IV)的参与募集转座子和相关结构域元件后形成非编码RNA(P4 RNA),在RNA聚合酶2(RDR2)介导下合成双链RNA(dsRNA),被DICER- LIKE PROTEIN 3(DCL3),DCL2和DCL4切割,产生24个核苷酸的小干扰RNA(siRNAs)^[8]。随后,siRNAs与ARGONAUTE 4(AGO4)或AGO6结合,与RNA聚合酶V(POL V)转录的互补支架RNA配对,AGO4与DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2(DRM2)相互作用,DRM2能够使DNA从头甲基化。

SHH1(SAWADEEHOMEODOMAINHOMOLOGUE 1)是POL IV产生siRNA时所必需的^[10],SHH1在RdDM途径中发挥上游作用,募集POL IV以促进siRNA的生物合成。同时,SHH1 SWADEE域能采用独特的串联Tudor-折叠与组蛋白H3K9me2结合,SHH1中的

DTF1 转录因子能够与SNF2 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN CLASSY 1(CLSY)互作用,协助POL IV参与RdDM途径中CHH甲基化^[9-10]。POL II通过DCL3切割产生24nt siRNAs^[11],或者通过RDR6识别POL II衍生的TE mRNA转录物,产生21nt/22nt siRNAs参与从头甲基化,触发和建立TE甲基化^[12]。POL V生成支架RNA需要DDR复合物参与,该复合物是由DEFECTIVE IN RNADIRECTED DNA METHYLATION 1 (DRD1)、DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3 (DMS3)和RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1 (RDM1)共同形成,能够与SUPPRESSOR OF VARIATION 3-9 HOMOLOGUEPROTEIN 2 (SUVH2)和SUVH9结合,从而募集POL V发挥DNA甲基化作用^[13-14]。RNA结合蛋白RRP6-LIKE 1(RRP6L1)和INVOLVED IN DE NOVO 2 (IDN2)-IDN2 PARALOGUE (IDP)复合物(IDN2-IDP complex)可以帮助将POL V转录的RNA在保留在染色上,并与SWI/SNF染色质重塑复合物(SWITCH/SUCROSE NONFERMENTING chromatin-remodeling complex, SWI/SNF)相互作用,通过改变核小体的结构来参与POL V介导的DNA甲基化^[15-18]。

1.2 维持甲基化

维持DNA甲基化是指DNA双链中一条链已发生甲基化,另一条未甲基化的链被甲基化。植物DNA甲基化的维持依赖于胞嘧啶序列,并由不同调控机制的DNA甲基转移酶催化(见图2)^[27]。

染色质甲基化酶(CMT)是植物特有的DNA甲基

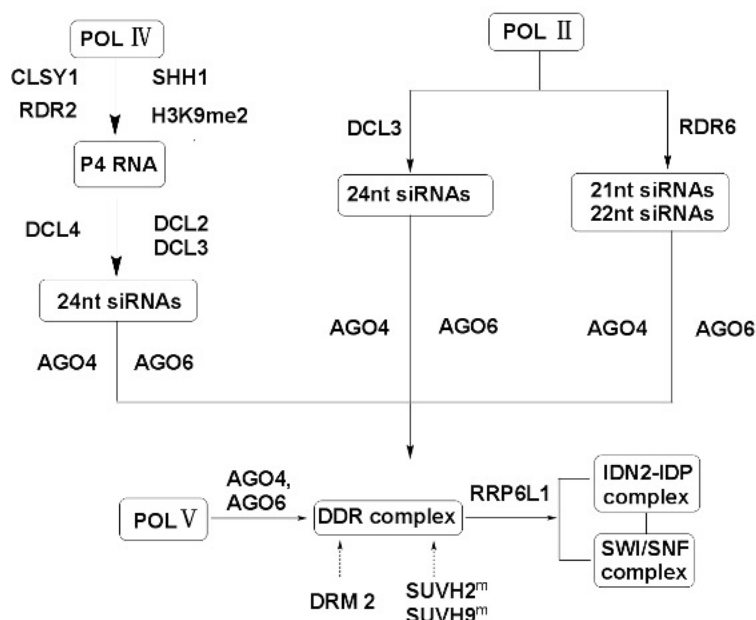


图1 拟南芥中RNA介导的DNA甲基化途径的模型

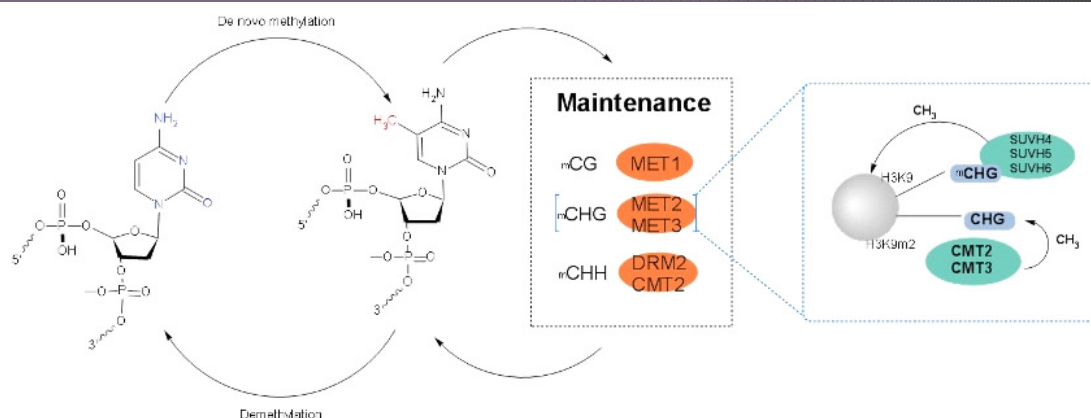


图2 植物DNA甲基化的动态调节

转移酶^[9]。它与小鼠Dnmt1、MET1结构相似,与MET1不同之处在于,CMT能够修饰异染色质DNA。在拟南芥中已经识别了3个CMT基因^[24],其中CMT1在拟南芥各器官中表达水平很低,被认为是没有功能的^[19],CMT3和CMT2主要依赖于组蛋白H3K9去甲基,维持拟南芥CHG甲基化^[20]。与H3K9me2复合的玉米CMT3同源物ZMET2晶体结构表明,ZMET2通过BAH结构域(bromo-adjacent homology, BAH)与组蛋白H3K9me2结合^[21]。拟南芥H3K9特异性甲基转移酶SUVH4(SUPPRESSOR OF VARIEGATION 3- 9 HOMOLOGUE PROTEIN 4)及其旁系SUVH5和SUVH6的突变消除了H3K9me2形成,并大大降低了CHG甲基化水平^[22]。

MET甲基转移酶家族(MET1)由Finnegan等^[24]从拟南芥中分离出,是最早发现的植物甲基转移酶,它是小鼠Dnmt1甲基转移酶的同源物,二者结构域有50%的同源性。它的主要作用是在重复和单拷贝DNA序列中维持CG二核苷酸胞嘧啶甲基化。具体功能是将酶引向细胞核,识别未甲基化或半甲基化的胞嘧啶,使酶移向复制叉,并使其在S期对半甲基化模板具有高度选择性^[25]。Kankel等^[26]通过反义转基因或错义突变使拟南芥MET1功能受损,发现其CpG位点的甲基化水平降低,植物的生长发育也受到了一定的影响。

植物域重排甲基转移酶(DRM)家族包括Zmet2、DRM1和DRM2,在玉米和拟南芥中发现其与哺乳动物从头甲基转移酶(Dnmt 3)结构相似,只在催化结构域模体排列顺序不同^[28]。DRM是在RNA的指导下,维持非CpG位点的胞嘧啶甲基化和催化胞嘧啶从头甲基化^[25]。CHH甲基化由具体的基因组区域所决定,通过RdDM途径,DRM2可以在RdDM目标区域维持CHH甲基化,RdDM目标区域优先位于年轻的转座子和短转座子以及长转座子的边缘,通常位于异染色

质^[29-31]。相比之下,CMT2则在RdDM途径催化CHH甲基化。

2 植物DNA甲基化的生物学功能

DNA甲基化是重要的表观遗传修饰之一,广泛分布于常染色质的转座子区、转录不活跃基因的启动子区以及异染色质区,进而影响遗传信息的可获得性。

2.1 DNA甲基化对植物生长发育的调控

在生长和发育期间以及整个植物的生命周期中,不同组织或细胞类型中的DNA甲基化水平受到严格控制,这表明DNA甲基化在植物生理中发挥重要作用。

研究发现,DNA甲基化表达水平的高低,会影响植物的生长发育。在对马哈利樱桃(*Prunus mahaleb*)进行研究时发现其基因组甲基化水平矮化组甲基化水平高于半矮化组^[32]。刘琼瑶等^[33]通过对矮生观赏杉木(*Dwarf Ornamental*)DNA甲基化的水平进行研究发现,矮生观赏杉木DNA甲基化水平和野生杉木叶片DNA甲基化水平差异呈现极显著水平。李际红等^[34]发现叶籽银杏(*Ginkgo biloba* var. *epiphylla*)的甲基化水平高于银杏,并且二者之间甲基化程度和(或)模式均存在广泛的变异,提示DNA甲基化水平及模式与植物生长发育特性有关。

多个研究证明在植物自主开花和春化作用中,DNA甲基化起着重要的作用^[1,35-37]。DNA甲基化表达水平的降低能够促进植物花期提前,通过对小麦进行一定浓度的5-氮杂胞苷的干预,发现处理组的小麦抽穗和开花较非处理组早1天以上,并且其余农艺性状基本保持一致。同时还发现,适量降低DNA甲基化水平能够在一定程度上增加小麦的产量^[3]。新的研究中发现,DNA甲基化不仅在在动物发育过程中被广泛的重新编程,且在开花植物中也能够进行编程,并有助于开花植物的果实成熟^[38]。

DNA 甲基化也参与了植物的果实成熟过程。番茄作为呼吸跃变型果实,经研究发现DNA低甲基化和DNA去甲基化酶的上调参与调控了番茄果实的成熟^[39]。草莓是非呼吸跃变型果实,Cheng等^[40]发现在草莓成熟期将DNA甲基化水平下调能够明显诱导草莓提前成熟,并发现这种下调是由于RdDM通路活性降低引起。但目前除番茄和草莓外,其他的植物果实发育过程是否与DNA甲基化表达水平有关,以及其能否调控果实成熟的具体机制尚不清楚,还需要进行深入研究。

2.2 DNA 甲基化在植物生物胁迫中的作用

生物胁迫是指对植物生存与发育不利的各种生物因素的总称。植物为了抵御病原菌的生长,通过改变植物细胞中DNA甲基化的表达水平,以抵御病原体的感染和共生微生物的定殖。

病毒侵袭导致百合DNA甲基化水平整体下降^[41]。烟草被烟草花叶病毒(TMV)感染后,烟草的DNA甲基化水平下降,胁迫响应基因*NtAtlix1*上调^[42]。蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中的根瘤需要脱甲基酶基因DEMETER(DME)的作用,在结瘤形成过程中,数百个基因组区域被甲基化,包括一小部分结瘤特异性共生基因^[45],另一个方面结瘤特异性基因的表达与染色质的倍性依赖开放有关,在一部分被测基因中,H3K27me3水平降低,而H3K9ac水平升高^[44]。

在被囊线虫(*Heterodera glycine*, SCN)感染的大豆和拟南芥根中观察到DNA甲基化水平降低^[45-46]。灰斑病菌(*Cercospora sojina*)侵袭大豆,使其感染灰斑病,影响到大豆的品质和产量,通过研究灰斑病菌胁迫下大豆基因组的DNA甲基化水平发现,其DNA甲基化表达水平下降明显,DNA且甲基化模式以去甲基化为主^[47]。由此可见,抗病相关基因的低甲基化,将有利于植物抗病基因的表达,或者得到抗病基因,提高自身抗病性。

丁香假单胞菌番茄致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, Pst DC3000)侵袭拟南芥叶片会引起轻度但广泛的差异DNA甲基化。差异甲基化的胞嘧啶主要存在于CG和CHH基因富集区域,特别是在蛋白质编码基因的5'和3'末端。此外,Pst DC3000响应的拟南芥DNA甲基化与整个基因组邻近基因的表达水平呈负相关^[48]。REPRESSOR OF SILENCING1(ROS1)的DNA脱甲基酶阻遏物及其同系物转录激活剂样(DME)-LIKE 2(DML2)和DML3后通过去除邻近DNA甲基化,共同调节许多生物胁迫响应基因^[49]。这表明植物可以动态调节DNA甲基化,从而调节防御基

因的表达。

2.3 DNA 甲基化在植物非生物胁迫中的作用

随着温度的变化,植物通过DNA甲基化和去甲基化的可逆动态变化维持自身稳定性。在秋末低温条件下,西洋参芦头的DNA甲基化水平升高,春初升温时DNA甲基化水平下降,在春初至秋末整个苗期,西洋参毛根中的DNA甲基化水平呈现上升趋势。研究后发现,只有经历足够的自然低温,西洋参幼苗在春季气温回升时DNA甲基化水平才能显著下降,同时开花基因*PqFT*在开花期和皂苷合成基因*PqDDS*在绿果期才能出现特定的高表达,从而增加皂苷的产量,提高西洋参的药用质量^[50]。番茄果实的成熟与DNA甲基化的改变密切相关,Zhang等^[51]在研究后发现,在低温状态下,DNA脱甲基酶DML2被抑制,导致DNA甲基化过度,显著延迟了果实成熟和风味挥发物的生成,这也解释了为什么成熟番茄果实冷藏后会大大降低风味品质。

中国常用的中药材半夏(*Pinellia ternate*),在高温胁迫状态下,基因组DNA甲基化水平显著降低,同时发现,DNA甲基化水平不会随胁迫时间增加而明显改变,这说明半夏对于高温胁迫能够迅速适应。对甲基化的变异类型进行分析后可以发现,DNA甲基化和DNA去甲基化均被诱导发生^[52]。对棉花进行高温胁迫,发现其基因组DNA甲基化和去甲基化能够同时发生,但呈现出明显的品种差异性,甲基化主要发生在耐高温品种,去甲基化则发生在高温敏感品种^[53]。曾子入等^[54]利用甲基化敏感扩增多态性技术(MSAP)分析发现,高温胁迫下萝卜肉质根的DNA甲基化发生明显改变,耐热材料部位主要发生去甲基化,不耐热材料部位发生超甲基化。综上所述,植物能够通过DNA甲基化改变来维持基因组稳定,从而抵御高温胁迫,同时提示植物DNA甲基化水平和状态与品种的耐热性有关,为深入研究植物耐热品种的进化提供了一定参考。

光照是植物生长必不可少的条件之一,但光照量超过光合系统的需求量时,会出现“光抑制现象”,导致活性氧自由基(ROS)的积累,抑制植物的生长^[55]。施江等^[56]对半夏进行遮荫处理后发现,遮荫显著提升半夏基因组DNA甲基化水平,同时在遮荫条件下,DNA甲基化率高于DNA去甲基化率(32.51%>16.25%),提示遮荫调控部分基因的表达可能通过DNA甲基化修饰实现。

通过对蒙古黄芪(*Mongolia Astragalus*)进行干旱胁迫后,经过MSAP分析,发现其DNA甲基化程度随着干旱程度的增加呈现下降趋势,与胁迫呈显著负相

关^[57],提示了DNA甲基化与植物抗干旱之间存在一定 的关联性,但其应对干旱的调控机制尚不清楚,需要进 行进一步研究。潘雅姣等^[58]研究发现,水稻基因组在 干旱胁迫状态下,基因组CCGG位点发生了DNA甲基 化,且表达的平均水平明显增加,根部增幅最为明显, 认为DNA甲基化有一定时空特异性和品种特异性,与 品种抗旱性反应密切相关。Xu^[59]在单碱基分辨率水 平上绘制了胞嘧啶甲基化的图谱,并分析了干旱敏感 和耐旱品种在干旱胁迫下的基因表达变化,发现启动 子非甲基化的基因显示出比启动子甲基化的基因更高 的表达水平。编码转录因子(transcription factors, TFs) 和转座因子(transposable elements, TEs)基因的甲基化 与苹果抗逆机制有关。该研究在全基因组上揭示了干 旱胁迫导致苹果甲基化组变化的特点,将有助于研究 响应非生物胁迫的甲基化调节作用。

在逆境胁迫状态下,植物的DNA去甲基化主要依 靠去甲基化酶基因介导的Ros1(Repressor of Silencing 1)切除5-meC的游离碱基实现的^[60]。Ros1具有DNA 糖苷酶活性和AP核酸内切酶活性,能够切断N-糖苷 键和裂解脱碱基位点,之后通过碱基切除修复机制 (Base excision repair, BER)以及DNA聚合酶、DNA连 接酶一同修复完成DNA去甲基化进程。在盐胁迫状 态,观察盐穗木(*Halostachys caspica*)的DNA甲基化水 平和Ros1的表达程度,发现DNA甲基化水平与Ros1 的表达量呈明显负相关,盐胁迫状态下Ros1的表达增 加,DNA甲基化水平降低,从而提高了盐穗木的耐盐 性^[61]。在前期研究中,董蔚等^[62-63]首次从蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)中分离了MYB家族转录因子基 因*MtMYBS1*,证实其是参与植物盐胁迫的重要功能基 因,盐胁迫下*MtMYBS1*的表达与DNA甲基化水平呈 负相关,与蛋白H3K9ac修饰水平呈正相关。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。

不同浓度的Cd、Cu胁迫会导致拟南芥幼苗基因 组DNA甲基化水平整体提高^[64]。萝卜基因组在Pb胁 迫下DNA全甲基化率上升,主要是重新甲基化^[65]。不

同浓度Cd胁迫下,孔雀草(*Tagetes patula*)基因组DNA 全甲基化率随着Cd浓度的增加逐渐上升,其主要的甲 基化模式为重新甲基化^[66]。中华水韭重金属Pb和Cd 的胁迫下,基因组DNA甲基化的总体水平变化不大, 但全甲基化水平略有降低,半甲基化水平略有上升^[67]。研究发现,大豆在镉胁迫下基因组DNA甲基化 的整体水平升高,同时甲基化多态性也有所提升,且与 镉处理浓度呈正相关,其中甲基化模式的改变主要以 去甲基化为主^[68]。相关研究发现,重金属胁迫下,植物 DNA甲基化水平与重金属的浓度有关,小麦幼苗根系 的DNA甲基化水平随着Cd的浓度的增加呈现出先上 升后下降的趋势^[69]。上述研究报道提示重金属胁迫对 植物甲基化水平的影响存在着多种反应机制,但是针 对重金属胁迫的研究主要是针对植物DNA甲基化水 平,而对特定基因位点参与DNA甲基化的研究较少。

3 植物DNA甲基化的研究方法

DNA甲基化的检测最早开始于1980年,Kuo^[70]采 用高效液相色谱柱(HPLC)对基因组DNA甲基化进行 了测定。近年来,DNA甲基化研究在模式植物和作物 中取得了重要发展,检测方法也不断更新。一般来说, 植物DNA甲基化的检测过程分为待检测样品的前期 处理、特定位点定位和甲基化状态的检测。现将用于 植物DNA甲基化检测方法归纳(表1)如下。

HPLC是一种出现较早的DNA甲基化检测技术, 广泛用于检测植物的全基因组DNA甲基化水平,包括 棉花、茶树、相思树、红豆杉等^[76-79]。Gao^[80]等通过优化 的HPLC技术对茶树(*Camellia sinensis* L.)组织,品种和 生长期进行了DNA甲基化水平的测定,发现DNA甲 基化水平在各个组织各有不同,在不同的生长期甲基 化水平的模式则形成了一个鞍形曲线。该方法的优点 是在不需要参考基因组的条件下,就能对植物进行全 基因组DNA甲基化水平的测定,缺点是操作体系较为 复杂^[81]。

甲基化敏感扩增多态性法(MSAP)是一种以AFLP 技术为原理检测DNA甲基化的PCR技术,通过限制 性内切酶Msp I和Hpa II识别CCGG序列上胞嘧啶甲

表1 常用植物DNA甲基化检测技术

方法	基本原理	主要覆盖范围	是否需要参考基因	参考文献
高效液相色谱	水解、紫外检测	全基因组	否	[71]
甲基化敏感扩增多态性	限制性内切酶	高CG区域	否	[72]
全基因组亚硫酸盐测序	亚硫酸盐处理	全基因组	是	[73]
简并代表性亚硫酸氢盐测序技术	亚硫酸盐处理+限制性内切酶	启动子和CpG岛	是	[74]
甲基化DNA免疫共沉淀测序技术	抗体富集	高CG区域	是	[75]

基化,这两种酶对特定的胞嘧啶甲基化具有不同的敏感性,其中 Hpa II 只能识别^mCCGG 即单链 DNA 外侧甲基化位点;Msp I 能够识别 C^mCGG 即双链或者单链 DNA 的内侧甲基化位点。将相同的 DNA 序列扩增出不同的谱带以判断 5'-CCGG 位点的胞嘧啶甲基化水平^[82-83]。目前该技术大量使用于紫罗兰、拟南芥、马铃薯、丹参等植物的甲基化模式和水平检测上^[84-87]。MSAP 技术的优势^[88]在于经济效益高,成本低,能够研究缺少基因组测序的非模式生物,还能够批量筛选所研究基因组中的突变和分化。同时该技术也有一定的局限性,因限制性内切酶具有一定的选择性,所以可能会遗漏一些甲基化状态。

全基因组亚硫酸盐测序(WGBS)技术是将新兴的高通量测序技术与亚硫酸盐转化方法相结合,能够对动植物的 DNA 甲基化进行单碱基解析和全基因组分布分析,可以识别可能受到 DNA 甲基化和脱甲基化动态变化控制的基因,是目前甲基化测序的金标准^[89]。Sun 等^[90]利用 WGBS 技术构建了西瓜(*Citrullus lanatus*)的全基因组 DNA 甲基化谱,结合 RdDM 通路基因的下调表明,被黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber Green Mottle Mosaic Virus*, CGMMV)感染的西瓜, RdDM 导向的 CHH 甲基化降低在西瓜抗病毒防御中发挥重要作用。这与之前对挪威云杉(*Norway spruce*)的检测结果相符合^[91]。WGBS 也有一定的局限性,由于其价格昂贵,目前多用于具有高质量参考基因组的物种应用,不能够广泛应用于大型实验设计,特别是中型至大型植物基因组。

简并代表性亚硫酸氢盐测序技术(RRBS)作为一种经济有效的体外方法,可用于没有参考基因组的生物,并且比以前的基于标记的方法具有更高的分辨率,通过使用限制性内切酶对基因组进行酶切,用高通量进行测序,对基因组甲基化水平进行测序。该技术最初是为哺乳动物研究开发的,所以主要集中于富含 GC 的区域(CpG 岛)的甲基化。Matin 等^[92]使用优化的双限制性核酸内切酶消化,片段末端修复,衔接子连接,亚硫酸氢盐转化,PCR 扩增和新一代测序(NGS),建立了一种有效的植物甲基化基因组分析方法(Plant-RRBS),该方法主要检测水稻中假定的启动子区域和未注释区域的胞嘧啶甲基化。Plant-RRBS 通过使用优化的核酸内切酶组合从可重复覆盖的基因组片段中获得有效读取数来提供高通量、广泛的、基因组分散的甲基化检测,从而促进了多样本研究的比较分析,以分析实验材料和植物中的胞嘧啶甲基化和跨代稳定性繁殖种群。

甲基化 DNA 免疫共沉淀测序技术(MeDIP-seq)是通过免疫共沉淀法预处理 DNA,使用抗甲基胞嘧啶核苷抗体富集甲基化的 DNA 片段,通过对 CpG 密集的甲基化区域进行高通量测序,快速准确的检测全基因组的甲基化状态和分布特征^[93-94]。相较于 MeDIP-chip,该方法灵敏度更高,更适合用于大样本量的研究,Vining^[95]对毛果杨(*Populus trichocarpa*)7 种不同组织类型进行了 DNA 甲基化变异性及其与基因表达关系的研究中就使用了该方法。

目前新兴的第三代测序技术是分子测序,主要包括单分子实时测序技术(SMRT)和牛津纳米孔测序技术(Oxford Nanopore Nechnologies),能够直接检测甲基化的 DNA 序列,如 PacBio SMRT 技术是利用在测序过程中碱基修饰时 DNA 聚合酶的合成速度减慢,出现信号延迟的时间来检测甲基修饰情况^[96],但这一代技术价格较为昂贵,目前较难进行广泛的应用。

PaciMeDIP-chip 利用 5-甲基胞嘧啶的单克隆抗体,通过免疫沉淀法富集甲基化片段,经荧光探针标记,与 CG 岛芯片进行杂交,对杂交信号进行分析,每个点信号的强度对应甲基化状态。该方法以在拟南芥^[97]和水稻^[98]的 DNA 甲基化检测上得到应用。

随着对植物表观遗传修饰的深入研究和高通量测序技术的进一步发展,DNA 甲基化的检测技术将会不断完善,应用于难以测序的区域,能够有效提高植物 DNA 甲基化数据的挖掘和处理,获得更多的生物信息。

4 展望

DNA 甲基化是一种表观遗传方式,具有可逆性。DNA 甲基化在高等真核生物中的主要作用是在逆境状态下保护基因组内源 DNA,在植物的生长发育、作物产量以及逆境胁迫等方面发挥了重要作用,特定区域的 DNA 甲基化能够稳定遗传给后代,起到抗逆保护的作用,帮助植物有效抵御外界威胁。近年来人们虽然已经对植物 DNA 甲基化的研究有了一定进展,但针对植物 DNA 甲基化的作用机制还不明确,亟待解决的问题有以下几点:(1)植物 DNA 甲基化所涉及的信号传递与转导机制尚不明确。现有的研究多以植物 DNA 甲基化表达水平作为研究目标,对其具体的机制研究较少,因此有必要对其如何控制复制起始进行进一步的研究;(2)DNA 甲基化调控植物生长发育的机制尚不明确,植物面对逆境胁迫时 DNA 甲基化的特定位点和具体响应机制也不够深入;(3)已有大部分针对 5-mC 的研究,但对 N6-mA 在植物中的作用功能的研究国内较为少见。因此,今后的研究可从分子和细胞

水平阐明DNA甲基化的分子调控机制,探寻基因层面的植物抗逆机制,为植物新品种的培育和改良提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 牛亚丹,林伊荷,张汉清,等.DNA甲基化与骨代谢调节及骨质疏松症研究进展[J]. 生命科学,2020,32(2):162-169.
- [2] 汪炳良,李水凤,曾广文,等.5-azaC对萝卜茎尖DNA甲基化和开花的影响[J]. 核农学报,2005,19(4):265-268.
- [3] 陈芳,王子成.5-氮杂胞苷对小麦生长发育及DNA甲基化的影响[J]. 河南大学学报:自然科学版,2011,41(01):61-66.
- [4] 袁媛,魏渊,于军,等.表观遗传与药材地道性研究探讨[J]. 中国中药杂志,2015,40(13):2679-2683.
- [5] 申燕红.表观遗传改良棉——纤维培育新突破[J]. 中国纤检,2017(7):140-141.
- [6] Zhang X Y, Junshi Y, Ambka S, et al. Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis [J]. Cell,2006,126(6):1189-1201.
- [7] Ryan L, Ronan C. O'M, Julian T F, et al. Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in Arabidopsis[J]. Cell,2008,133(3):523-526.
- [8] Marjori A M, Rebecca A M. RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity[J]. Nature Reviews. Genetics,2014,15(6):394-408.
- [9] Julie A L, Jiamu D, Christopher J, et al. Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1[J]. Nature: International weekly journal of science,2013,498(7454):385-389.
- [10] Zhang H, Ma Z Y, Zeng L, et al. DTF1 is a core component of RNA-directed DNA methylation and may assist in the recruitment of Pol IV [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,2013,110(20): 8290-8295.
- [11] Zheng B L, Wang Z M, Li S B, et al. Intergenic transcription by RNA polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional gene silencing in Arabidopsis[J]. Genes and Development: a Journal Devoted to the Molecular Analysis of Gene Expression in Eukaryotes, Prokaryotes, and Viruses,2009,23(24): 2850-2860.
- [12] Saicageethi N, Andrea D M, Kaushik P, et al. The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21 - 22 nucleotide small interfering RNAs[J]. Plant Physiology,2013,162:116-31.
- [13] Zhong X, Hale C J, Law J A, et al. DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons[J]. Nature Structural & Molecular Biology,2012,19(9):870-875.
- [14] Law J A, Ausin I, Johnson L M, et al. A protein complex required for polymerase V transcripts and RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis[J]. Current Biology,2010,20(10):951-956.
- [15] Ausin I, Todd C M, Joanne C, et al. IDN1 and IDN2 are required for de novo DNA methylation in Arabidopsis thaliana[J]. Nature Structural & Molecular Biology,2009,16(12):1325-1327.
- [16] Ausin I, Maxin V.C.G, Dharendra K. S, et al. INVOLVED IN DE NOVO 2- containing complex involved in RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2012,109(22):8374-8381.
- [17] Zhu Y M, Jordan R, Gudrun B, et al. A SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing[J]. Molecular Cell,2013,49(2):298-309.
- [18] Zhang H, Tang K, Qian W, et al. An Rrp6-like protein positively regulates noncoding RNA levels and DNA methylation in Arabidopsis [J]. Molecular Cell,2014,54(3):418-430.
- [19] Henikoff S, Comai L. A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in Arabidopsis [J]. Genetics,1998,149:307-318.
- [20] Stroud H, Do T, Du J, et al. Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in Arabidopsis[J]. Nature structural & molecular biology,2013,21(1):64-72.
- [21] Jiamu D, Zhong X H, Yana V, et al. Dual Binding of Chromomethylase Domains to H3K9me2-Containing Nucleosomes Directs DNA Methylation in Plants[J]. Cell,2012,151(1):167-180.
- [22] James P J, Lianna J, Zuzana J, et al. Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in Arabidopsis thaliana[J]. Chromosoma,2004,112:308-315.
- [23] Barteel L, Bende J, Ebbs M L. H3 lysine 9 methylation is maintained on a transcribed inverted repeat by combined action of SUVH6 and SUVH4 methyltransferases[J]. Molecular and Cellular Biology,2005, 25(23):10507-10515.
- [24] Finnegan, E J, Dennis, E S. Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from Arabidopsis thaliana[J]. Nucleic Acids Research,1993,21(10):2383-2388.
- [25] 陈欣,王子成.植物DNA甲基转移酶[J]. 生命的化学,2009,29(4): 534-538.
- [26] Mark W K, Douglas E R, Trevor L S, et al. Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants[J]. Genetics,2003,163(3):1109-1122.
- [27] Lang Z B, Zhang H M, Zhu J K. Dynamics and function of DNA methylation in plants[J]. Nature reviews: molecular cell biology,2018, 19(8):489-506.
- [28] Caszymo X, Soringer N M, Muszynsk M G, et al. Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2000,97(9):4979-4984.
- [29] Liu Z W, Shao C R, Zhang C J, et al. The SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for Pol V occupancy at RNA-directed DNA methylation loci[J]. PLoS genetics,2014,10(1): e1003948.

- [30] Bruno H, Tatsuo K, Lucia D, et al. Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in Arabidopsis[J]. The EMBO journal, 2006, 25(12): 2828-2836.
- [31] Assaf Z, M. Yvonne K, Hsieh P H, et al. The Arabidopsis Nucleosome Remodeler DDM1 Allows DNA Methyltransferases to Access H1-Containing Heterochromatin[J]. Cell, 2013, 153(1): 193-205.
- [32] 李向男, 蔡宇良. 马哈利樱桃矮化砧的DNA甲基化水平及模式分析[J]. 西北植物学报, 2017, 37(5): 864-871.
- [33] 刘琼瑶, 黄华宏, 冯惠平, 等. 矮生观赏杉木DNA甲基化的水平与模式分析[J]. 园艺学报, 2015, 42(10): 2015-2022.
- [34] 李际红, 邢世岩, 张倩, 等. 叶籽银杏DNA甲基化水平与模式变异的研究[J]. 园艺学报, 2014, 41(8): 1535-1544.
- [35] 朱芹芹, 李忠爱, 何艳霞, 等. 表观遗传与花期调控研究进展[J]. 园艺学报, 2013, 40(9): 1787-1794.
- [36] 高乐旋, 陈家宽, 杨继. 表型可塑性变异的生态-发育机制及其进化意义[J]. 植物分类学报, 2008, 46(4): 441-451.
- [37] Filomena D L, Pedro C, Alexandra M E J, et al. A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(44): 16831-16836.
- [38] James W, Gao H B, Zhang J Y, et al. Sexual-lineage-specific DNA methylation regulates meiosis in Arabidopsis[J]. Nature genetics, 2018, 50(1): 130-137.
- [39] Kit A H, Bernacchia G, Rolin D, et al. Tissue dependent variations of DNA methylation and endoreduplication levels during tomato fruit development and ripening[J]. Planta: An International Journal of Plant Biology, 2008, 228(3): 391-399.
- [40] Cheng J F, Niu Q F, Zhang B, et al. Downregulation of RdDM during strawberry fruit ripening[J]. Genome biology, 2018, 19(1): 212.
- [41] 许静静, 杨凯, 王文和, 等. 病毒侵染对西伯利亚百合DNA甲基化的影响[J]. 西北植物学报, 2011, 31(5): 935-941.
- [42] Wada Y, Kusano T, Sano H, et al. Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants[J]. Molecular biology reports, 2004, 271(6): 658-666.
- [43] Satge C, Moreau S, Sallet E, et al. Reprogramming of DNA methylation is critical for nodule development in *Medicago truncatula* [J]. Nature plants, 2016, 2(11): 16166.
- [44] Marianna N, Alaguraj L V, et al. Ploidy-dependent changes in the epigenome of symbiotic cells correlate with specific patterns of gene expression[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(17): 4543-4548.
- [45] Rambani A, Rice J H, Liu J Y, et al. The Methylome of Soybean Roots during the Compatible Interaction with the Soybean Cyst Nematode[J]. Plant physiology, 2015, 168(4): 1364-1377.
- [46] Hewezi T, Lane T, Piya S, et al. Cyst Nematode parasitism induces dynamic changes in the root epigenome[J]. Plant Physiol, 2017, 174(1): 405-420.
- [47] 徐妍. 灰斑病菌胁迫对大豆生理生化及DNA甲基化的影响[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2015.
- [48] Robert H.D, Mattia P J.S, et al. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(32): 2183-2191.
- [49] Tiwari S, Taylor J M, Wang M B, et al. DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in Arabidopsis[J]. Genome Biology, 2014, 15(9): 458.
- [50] 郝梦真. 低温胁迫下西洋参DNA甲基化与其品质形成的关系[D]. 青岛: 青岛大学, 2019.
- [51] Zhang B, Tieman D M, Jiao C, et al. Chilling-induced tomato flavor loss is associated with altered volatile synthesis and transient changes in DNA methylation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(44): 12580-12585.
- [52] 晁秋杰, 刘晓, 韩磊, 等. 高温胁迫诱导半夏基因组甲基化的变异分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(02): 341-346.
- [53] 任茂, 李博, 徐延浩, 等. 高温胁迫诱导棉花甲基化变化分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(3): 1069-1076.
- [54] 曾子入, 贺从安, 张小康, 等. 高温胁迫诱导萝卜基因组甲基化变异分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(07): 2094-2098.
- [55] Michael S, Navdeep S.C. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress[J]. Current Biology: CB, 2014, 24(10): R453-R462.
- [56] 施江, 熊雨婕, 张晗, 等. 遮荫影响半夏DNA甲基化的MSAP分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(06): 1311-1315.
- [57] 韩雅楠, 赵群鹏, 崔向军. 非生物胁迫蒙古黄芪基因组的MSAP分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(7): 3119-3125.
- [58] 潘雅姣, 傅彬英, 王迪, 等. 水稻干旱胁迫诱导DNA甲基化时空变化特征分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(9): 3009-3018.
- [59] Xu J D, Zhou S S, Gong X Q, et al. Single-base methylome analysis reveals dynamic epigenomic differences associated with water deficit in apple[J]. Plant biotechnology journal, 2018, 16(2): 672-687.
- [60] Rafael R A, Maria I P M, Aan P O G, et al. DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(18): 6853-6858.
- [61] 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[J]. 新疆农业科学, 2017, 54(5): 878-885.
- [62] 董蔚, 刘锡江, 高天雪, 等. 盐胁迫下蒺藜苜蓿MtMYBS1的DNA甲基化和组蛋白修饰状态分析[J]. 植物生理学报, 2018, 54(10): 1596-1604.
- [63] Dong W, Song Y G, Zhao Z, et al. The *Medicago truncatula* R2R3-MYB transcription factor gene MtMYBS1 enhances salinity tolerance when constitutively expressed in *Arabidopsis thaliana* [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2017, 490(2): 225-230.
- [64] 赵晓辉, 徐正进, 刘宛, 等. 镉、铜胁迫下拟南芥基因组DNA甲基化的MSAP分析[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(5): 1911-1915.

- [65] 何玲莉,沈虹,王燕,等. 铅胁迫下萝卜基因组DNA甲基化分析[J]. 核农学报,2015,29(7):1278-1284.
- [66] 张凯凯,陈兴银,杨鹏,等. 不同浓度镉胁迫对孔雀草DNA甲基化的影响[J]. 草业科学,2016,33(9):1673-1680.
- [67] 丁国华,郭丹蒂,关旻,等. 重金属铅镉对濒危植物中华水韭(*Isoetes sinensis*)DNA甲基化的影响[J]. 农业环境科学学报,2017,36(2):246-249.
- [68] 殷欣. 镉胁迫下大豆生理生化特性及DNA甲基化变异的研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨师范大学,2016.
- [69] 黑淑梅. 重金属铬对小麦根系DNA甲基化水平的影响[J]. 吉林农业科学,2012,37(2):14-15,26.
- [70] Kuo K C, Mccune R A, Gehrke C W, et al. Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA[J]. Nucleic acids research,1980,8(20):4763-4778.
- [71] Wagner I, Capesius I. Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography[J]. Biochimica et Biophysica Acta,1981,654(1):52-56.
- [72] Xiong L Z, XU C G, Maroof S M A. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. Molecular and General Genetics, 1999,261(3):439-446.
- [73] Hayatsu H. The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research[J]. Mutation Research: International Journal on Mutagenesis, Chromosome Breakage and Related Subjects,2008, 659(1/2):77-82.
- [74] Costello J F, Fouse S D, Nagarajan R P. Genome-scale DNA methylation analysis[J]. Epigenomics,2010,2(1):105-117.
- [75] Thorne N P, Rakyan V K, Johnson N, et al. A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis[J]. Nature biotechnology,2008,26(7):779-785.
- [76] Osabe K, Jenny D, Bedon, et al. Genetic and DNA methylation changes in cotton(*Gossypium*)genotypes and tissues[J]. PloS one,2014, 9(1):e86049.
- [77] Li L X, Jie Y, Dong Y S, et al. Optimization of an HPLC Method for Determining the Genomic Methylation Levels of Taxus Cells[J]. Journal of chromatographic science,2016,54(2):1-6.
- [78] Gao Y, Hao J L, Wang Z, et al. DNA methylation levels in different tissues in tea plant via an optimized HPLC method[J]. Horticulture, Environment, and Biotechnology,2019,60(6):967-974.
- [79] Baurens F C, Nicollet 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 [J]. Tree physiology,2004,24(4):401-407.
- [80] Gao Y, Hao J L, Wang Z, Song K J, et al. DNA methylation levels in different tissues in tea plant via an optimized HPLC method[J]. Horticulture, Environment, and Biotechnology,2019,60(6):967-974.
- [81] Finke A, Rozhon W, Pecinka A. Analysis of DNA Methylation Content and Patterns in Plants[J]. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.),2018,1694(24):277-298.
- [82] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research,1995,23(21):4407-4414.
- [83] Roberts R J, Vincze T, Posfai J, et al. REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes[J]. Nucleic Acids Research,2015,43(Database issue):D298-299.
- [84] Li A, Hu B Q, Xue Z Y, et al. DNA Methylation in Genomes of Several Annual Herbaceous and Woody Perennial Plants of Varying Ploidy as Detected by MSAP[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2011,29(4):784-793.
- [85] Herrera C M, Bazaga P. Untangling individual variation in natural populations: ecological, genetic and epigenetic correlates of long-term inequality in herbivory[J]. Molecular ecology,2011,20(8):1675-1688.
- [86] 陈瑞娟,何蕾,孙梨宗,等. 铜胁迫对拟南芥幼苗生长和基因组DNA甲基化的影响[J]. 生态学报,2015,34(9):2650-2657.
- [87] Xin C H, Hou R K, Wu F, et al. Analysis of cytosine methylation status in potato by methylation-sensitive amplified polymorphisms under low-temperature stress[J]. Journal of Plant Biology,2015,58(6): 383-390.
- [88] 龚治,张亚楠,周世豪,等. 甲基化敏感扩增多态性技术(MSAP)在生态学中的应用[J]. 生物安全学报,2016,25(1):7-12.
- [89] Baubec T, Akalin A. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns by high-throughput sequencing. In: Aransay A, Lavin Trueba J, eds. Field Guidelines for Genetic Experimental Designs in High-throughput Sequencing[M]. Heidelberg: Springer,2016,9:197-221.
- [90] Sun Y Y, Fan M, He Y J. DNA Methylation Analysis of the Citrullus lanatus Response to Cucumber Green Mottle Mosaic Virus Infection by Whole-Genome Bisulfite Sequencing[J]. Genes,2019,10(5):344.
- [91] Li Q, Peter J H, Nathan M.S. Detection of DNA Methylation by Whole- Genome Bisulfite Sequencing[J]. Methods in molecular biology(Clifton, N.J.),2018,1676:185-196.
- [92] Martin S, Michiel V B, Magdalena W, et al. Plant-RRBS, a bisulfite and next-generation sequencing-based methylome profiling method enriching for coverage of cytosine positions[J]. BMC Plant Biology, 2017,17(1):115.
- [93] Aniruddha C J R, Lan M M, Morison I M, et al. Tools and Strategies for Analysis of Genome-Wide and Gene-Specific DNA Methylation Patterns [J]. Methods in Molecular Biology,2017(1537):249-277.
- [94] Xing X Y, Zhang B, Li D F, et al. Comprehensive Whole DNA Methylome Analysis by Integrating MeDIP-seq and MRE-seq[J]. Methods in molecular biology(Clifton, N. J.),2018,1708(12):209-246.
- [95] Vinning 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[J]. BMC genomics,2012, 13:27.

- [96] 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[J]. 中国科学:生命科学,2020,50(2):154-166.
- [97] Daniel Z, Mary G, Robert T K, et al. Genome- wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription[J]. Nature genetics,2007,39(1): 61-69.
- [98] Li X Y, Wang X F, He K, et al. High-resolution mapping of epigenetic modifications of the rice genome uncovers interplay between DNA methylation, histone methylation, and gene expression[J]. The Plant cell,2008,20(2):259-276.

声 明

当前有个别网站及个人非法盗用《农学学报》杂志名义,以接收投稿为名收取审稿费、版面费,严重损害了作者的利益和本刊的声誉,造成不良的社会影响。本刊在此郑重声明:《农学学报》杂志的投稿不接收邮箱投稿,也从未授权任何机构和个人代理接收本刊稿件。本刊的投稿网址为:<http://nxxb.caass.org.cn/>,敬请广大作者注意甄别。

特此声明。

《农学学报》编辑部