# 昆虫 DNA 甲基化的研究进展*

陈 玮[1, 2, 3**] 徐雪娇[1, 2, 3] 陈楠菁[1, 2, 3] 何玮毅[1, 2, 3***] 尤民生[1, 2, 3***]

（1. 福建农林大学应用生态研究所，福州 350002；2. 闽台特色作物病虫生态防控协同创新中心，福州 350002；
3. 农业部闽台作物有害生物综合治理重点实验室，福州 350002）

**摘 要** DNA 甲基化是表观遗传学的一个分支学科，因其在调控基因表达和生物体许多生理生化过程具有重要的作用，近年来逐渐受到广泛关注。昆虫由于种类繁多，变态发育和表型复杂，研究 DNA 甲基化的功能具有重要的意义。昆虫 DNA 甲基化需要由 DNA 甲基化转移酶（Dnmts）参与完成，其数量和结构在不同物种中差异较大。大多数昆虫均具有维持 DNA 甲基化水平的 Dnmt1，缺乏行使从头 DNA 甲基化功能的 Dnmt3，Dnmt2（也称为 TRDMT1）虽保守存在但其 DNA 结合的能力极其微弱。昆虫 DNA 甲基化的总体水平较低，并且呈现不同龄期和组织的时空分布特异性。在昆虫基因组中，以外显子区的 DNA 甲基化水平最为显著，具有增强基因表达的功能，表现出在序列保守和广泛表达的基因中水平高、在特异表达的基因中水平低的进化特征。目前用于研究昆虫 DNA 甲基化的方法主要有生物信息学预测和甲基化特异限制性内切酶、甲基化敏感扩增多态性、基因组 DNA 甲基化测序等实验研究方法。本文就昆虫 DNA 甲基化转移酶的特性、DNA 甲基化的分布与进化及其研究方法进行综述，旨在深入了解昆虫 DNA 甲基化的研究现状及其重要作用，为促进该研究领域的发展提供新的思路和方法。

**关键词** 昆虫，DNA 甲基化，Dnmts，进化，研究方法

# Review of research on insect DNA methylation

CHEN Wei[1, 2, 3**] XU Xue-Jiao[1, 2, 3] CHEN Nan-Jing[1, 2, 3]
HE Wei-Yi[1, 2, 3***] YOU Min-Sheng[1, 2, 3***]

(1. Institute of Applied Ecology and Research Centre for Biodiversity and Eco-Safety, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Fujian-Taiwan Joint Centre for Ecological Control of Crop Pests, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Key Laboratory of Integrated Pest Management of Fujian and Taiwan, China Ministry of Agriculture, Fuzhou 350002, China)

**Abstract** DNA methylation is a branch of epigenetics that has been getting broad recognition and receiving extensive attention in recent years because of its important function in modulating gene expression and its association with many physiological and biochemical processes in living organisms. Their high species abundance, metamorphic development and complex phenotypes make the insects a useful group in which to explore the function of DNA methylation. DNA methylation in insects is mainly mediated by DNA methyltransferases (Dnmts), which vary greatly in different species. Most insects possess Dnmt1 but lack Dnmt3, which are responsible for maintenance and *de novo* DNA methylation, respectively. Dnmt2 (also termed TRDMT1) is ubiquitous among insects but its ability to bind DNA is weak. An overall low level, as well as spatio-temporal patterns of DNA methylation, are observed in insects. In insect genomes, DNA methylation is predominantly located in gene exons to functionally enhance gene expression, with higher methylation levels in evolutionarily conserved and extensively expressed genes, and lower levels in specifically expressed genes. The major methodologies currently used in the study of insect DNA methylation are summarized as bioinformatics-based prediction and experimentally-based techniques that

* 资助项目 Supported projects：国家自然科学基金国际合作重大项目（31320103922）；国家自然科学基金重点项目（31230061）；国家自然科学基金青年项目（31301677）

**第一作者 First author，E-mail：1169376024@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：msyou@iae.fjau.edu.cn; wy_he@126.com

收稿日期 Received：2015-06-16，接受日期 Accepted：2015-08-28

include methylation specific restriction enzyme assays (MSRE), methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) and genomic sequencing. This paper summarizes methyltransferases in insects, the distribution and evolution of DNA methylation, as well as available methodologies used in current studies. It provides a synthesis of important updates and potential applications, and novel ideas and technologies for further research in this area.

**Key words**　insect, DNA methylation, Dnmts, evolution, methodology

DNA 甲基化是一种不改变 DNA 碱基基本结构的化学修饰，需要 DNA 甲基化转移酶的参与，将 S-腺苷甲硫氨酸（S-adenosylmethionine，SAM）提供的甲基转移至胞嘧啶的 5 号位碳原子上，形成甲基胞嘧啶（Bestor，2000）。DNA 甲基化参与基因的表达调控和可变剪切，以及 DNA 损伤修复，涉及生物体许多重要的生理生化过程（Hare and Taylor，1985；Suzuki and Bird，2008）。

昆虫由于其明显的表型分化以及较小的基因组，逐渐成为研究 DNA 甲基化功能的重要生物学材料。近几年来，对于 DNA 甲基化的功能研究已经广泛开展。然而在昆虫中，DNA 甲基化及其功能是否保守、如何建立有效的研究系统评价 DNA 甲基化的作用，一直存在争议（Field *et al.*，2004）。本文就昆虫 DNA 甲基化转移酶的特性、DNA 甲基化的分布与进化及其研究方法进行综述，以期为选择适宜的技术平台和方法，研究 DNA 甲基化在昆虫中的功能和作用，进一步拓展昆虫 DNA 甲基化的研究领域提供新的思路和参考。

# 1　昆虫 DNA 甲基化转移酶（Dnmts）

对哺乳动物甲基化转移酶的经典研究认为，DNA 甲基化转移酶（DNA methyltransferases，Dnmts）根据结合底物的不同可分为 3 种类型，分别是 Dnmt1、Dnmt2 和 Dnmt3。Dnmt1 的结合底物为半甲基化 DNA，该酶具有维持甲基化的作用（Bestor and Verdine，1994），其 N 端具有 DNA 甲基化相关蛋白（DNA methylation associated protein 1，DMAP1）结合位点（Rountree *et al.*，2000），DMAP1 能够增强 Dnmt1 活性甚至使其具有从头甲基化的功能（Lee *et al.*，2010）；Dnmt2 的结合底物为 tRNA，参加转录水平的修饰，虽然有报道称其具有极其微弱的 DNA 结合能力（Bestor，2000），但越来越多的研究表明 tRNA 的甲基修饰与 Dnmt2 密切相关，Dnmt2 也因此被称为天冬氨酸 tRNA 甲基转移酶 1（tRNA aspartic acid methyltransferase 1，TRDMT1）（Dabe *et al.*，2015）。Dnmt3 则具有 3 个成员，分别是 Dnmt3a、Dnmt3b 和 Dnmt3l。Dnmt3a 和 Dnmt3b 偏好结合未甲基化的双链，在细胞分裂初期行使从头甲基化的功能；Dnmt3l 参与亲本基因印记的遗传，能够以一种剂量依赖的方式使 Dnmt3a 和 Dnmt3b 的甲基化活性增强（王志刚和吴建新，2009），但自身不具有催化活性（Ko *et al.*，2005）。在昆虫中，无论何种 Dnmts，它们行使的功能与哺乳动物一致。

## 1.1　昆虫不同物种的 Dnmts

据报道（Glastad *et al.*，2011），Dnmts 广泛存在于很多昆虫物种中（仅有 Dnmt3l 未见报道），但其类型及数量又因物种不同而有差异。目前以膜翅目昆虫 Dnmts 的研究最为深入，其它如鞘翅目、鳞翅目和双翅目昆虫的研究起步相对较迟。在膜翅目中，意大利蜜蜂 *Apis mellifera* Linnaeus 具有一整套完整的甲基化转移酶（Wang *et al.*，2006；Schaefer and Lyko，2007），其中 Dnmt1 具有 2 份拷贝；金小蜂 *Nasonia vitripenneis* Walker、红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren 以及收获蚁 *Pogonomyrmex barbatus* Smith 中也都存在 Dnmts（Werren *et al.*，2010；Smith *et al.*，2011）。然而，许多昆虫并不存在成套的 Dnmts 系统（表 1）。

Dnmt1 在昆虫中广泛存在，是昆虫产生可检测甲基化水平的关键。例如，家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 虽然缺乏 Dnmt3，但仍存在全基因组低丰度的 DNA 甲基化（Xiang *et al.*，2010），说明 Dnmt1 对维持甲基化功能起到了重要作用（Mitsudome *et al.*，2015）。昆虫 Dnmt3 主要存在膜翅目昆虫，通过 RNAi 沉默意大利蜜蜂

表 1 昆虫不同物种 DNA 甲基化转移酶（Dnmts）的类型及其数量
**Table 1 Types and numbers of DNA methyltransferases (Dnmts) in different insect species**

| 物种 Species | Dnmt1 | Dnmt2 | Dnmt3 | 参考文献 Reference |
|---|---|---|---|---|
| **膜翅目 Hymenoptera** | | | | |
| 意大利蜜蜂 *Apis mellifera* Linnaeus | 2 | 1 | 1 | Glastad *et al.*，2011 |
| 吉氏金小蜂 *Nasonia giraulti* Darling | 1 | 1 | 1 | Kronforst *et al.*，2008 |
| 红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren | 1 | 1 | 1 | Glastad *et al.*，2011 |
| 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* Walker | 3 | 1 | 1 | Glastad *et al.*，2011 |
| 收获蚁 *Pogonomyrmex barbatus* Smith | 1 | 1 | 0 | Smith *et al.*，2011 |
| **半翅目 Hemiptera** | | | | |
| 豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* Harris | 2 | 1 | 2 | Glastad *et al.*，2011 |
| 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål | 2 | 1 | 2 | Zhang *et al.*，2015 |
| **鳞翅目 Lepidoptera** | | | | |
| 家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus | 1 | 1 | 0 | Xiang *et al.*，2010 |
| 小菜蛾 *Plutella xylostella* Linnaeus | 1 | 1 | 0 | You *et al.*，2013 |
| **鞘翅目 Coleoptera** | | | | |
| 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* Herbst | 1 | 1 | 0 | Glastad *et al.*，2011 |
| **双翅目 Diptera** | | | | |
| 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen | 0 | 1 | 0 | Glastad *et al.*，2011 |
| 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* Giles | 0 | 1 | 0 | Glastad *et al.*，2011 |

Dnmt3 的低龄幼虫发现 Dnmt3 的缺失会导致幼虫转变成蜂王而非工蜂的概率大大增加（Kucharski *et al.*，2008）。但是对于同时缺乏 Dnmt1 和 Dnmt3 的物种，则无法检测到 CpG 位点甲基化，如模式昆虫果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen（Glastad *et al.*，2014）。

### 1.2 昆虫 Dnmts 的结构及其特点

早期对人类和小鼠的研究发现，Dnmt1 的 N-末端参与细胞内定位及催化活性的调节，包括用于结合 DNA 甲基化相关蛋白（DMAP1）的带电结构域、核定位信号（Nuclear localization signal，NLS）、增殖细胞核抗原（Proliferating cell nuclear antigen，PCNA）结合位点、复制焦点靶向区域（Replication focus targeting sequence，RFTS）、锌离子结合域 CXXC、以及 2 个涉及运送 Dnmt1 至复制叉的 Polybromo 结构域 BAH（Fatemi *et al.*，2001；Lee and Skalnik，2005；Young *et al.*，2006；Spada *et al.*，2007；Song *et al.*，2012）。C-末端为典型的催化结构，具有 6 个保守的 DNA 结合活性基序（motif Ⅰ、motif Ⅳ、motif Ⅵ、motif Ⅷ、motif Ⅸ、motif Ⅹ）。motif Ⅰ和 motif Ⅹ折叠在一起，形成 SAM 的结合位点；motif Ⅳ中的脯氨酸和半胱氨酸，为 C-端催化结构提供甲醇基（王志刚和吴建新，2009；Walsh *et al.*，2010）。

最近对家蚕和蜜蜂 Dnmt1 的研究发现，昆虫与人类的甲基化转移酶存在 C-端结构保守、N-端结构不同的特点（Mitsudome *et al.*，2015），缺乏 DMAP1 结合位点、PCNA 结合位点和核定位信号，说明 Dnmt1 在昆虫中的作用模式可能与人类不同。昆虫中 Dnmt1 的结构大致相近，但在金小蜂 Dnmt1c 以及豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* Harris 的 Dnmt1a 和 Dnmt1b 中却搜索不到锌离子结合域（图 1：A）。Pradhan 等（2008）利用人类细胞构建敲除锌离子结合域的 Dnmt1

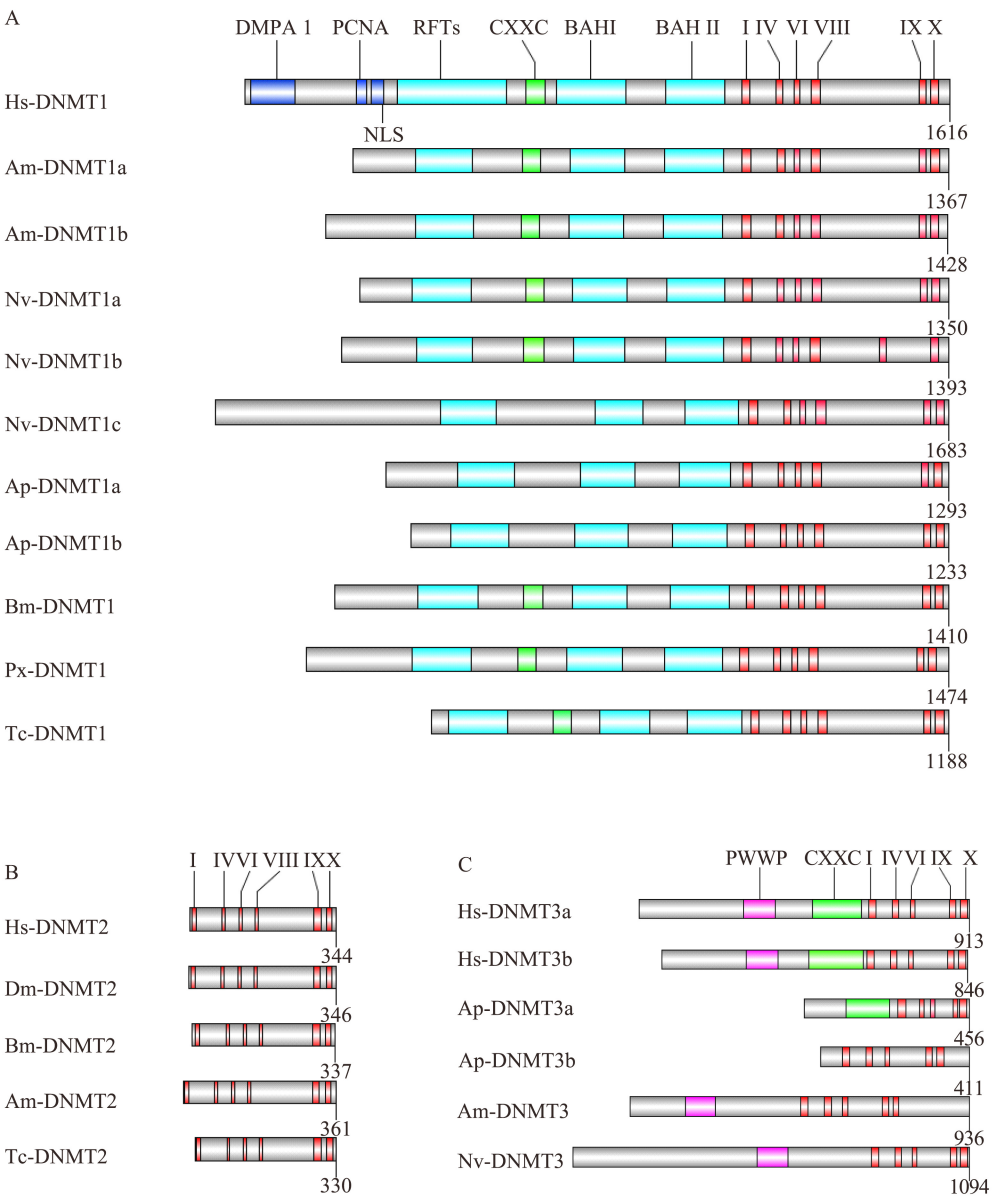


**图 1　昆虫不同物种及人类 DNA 甲基化转移酶（Dnmts）的结构比较**

**Fig. 1　Structural comparison of the DNA methyltransferases (Dnmts) in different insect species and human**

A. Dnmt1；B. Dnmt2；C. Dnmt3.

Hs：人类 *Homo sapiens*；Am：意大利蜜蜂 *Apis mellifera*；Dm：果蝇 *Drosophila melanogaster*；Nv：丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*；Bm：家蚕 *Bombyx mori*；Ap：豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*；Tc：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*.

发现，缺乏该结构域会导致 Dnmt1 催化活性下降。金小蜂和豌豆蚜的 Dnmt1 存在多拷贝，可能就是由于缺乏锌离子结构域会导致其催化活性下降，而进化出的类似基因剂量补偿的效应。

Dnmt2 与 Dnmt1 相比缺乏 N-末端的可变结构区域，但其 C-末端的催化区域的保守结构在不同物种中都存在。在昆虫中，果蝇的 Dnmt2 无论在氨基酸长度还是结构分布位置与人类最为接近（图 1：B），但在 motif VIII 的位置缺乏一个能够结合 DNA 和 SAM 的 40 个氨基酸延伸结构（Borsatti and Mandrioli，2004）。

有关昆虫 Dnmt3 蛋白结构的研究报道较少，但通过将不同昆虫物种 Dnmt3 氨基酸序列与人类中的进行对比发现，相比于其他家族，该家族

在不同昆虫物种中差异较大，仅在 C-端的催化区域较为保守。人类 Dnmt3a 和 Dnmt3b 的典型结构包括能够与 DNA 非特异结合的脯氨酸-色氨酸-色氨酸-脯氨酸结构域（PWWP）以及锌离子结合域（Stec *et al.*，2000），我们通过分析目前能够获得的豌豆蚜 Dnmt3a 和 Dnmt3b 氨基酸序列（Walsh *et al.*，2010），发现仅 Dnmt3a 存在锌离子结合域。但对于绝大多数单拷贝的 Dnmt3 而言，如意大利蜜蜂和金小蜂，仅存在 PWWP 而不具有锌离子结合域（图 1：C）。

## 2 昆虫 DNA 甲基化的分布与进化

### 2.1 昆虫 DNA 甲基化的时空分布

自 1992 年在昆虫中首次发现 DNA 甲基化现象（Sarkar *et al.*，1992），目前发现 DNA 甲基化至少存在于 10 个不同昆虫目中（Hunt *et al.*，2013）。在通过实验证实存在甲基化的昆虫中，甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* Linnaeus 甲基胞嘧啶的含量最高，接近 10%（Mandrioli，2003），模式昆虫果蝇中则检测不到 CpG 位点的甲基化情况（Glastad *et al.*，2014），但绝大多数昆虫的甲基化水平远远低于脊椎动物，通常不超过 3%（Mandrioli and Volpi，2003）。造成这种差异的原因，主要在于昆虫 CpG 含量少于脊椎动物，且发生甲基化的位置限制在基因区（Genebody）（Jeltsch，2010）。

有报道指出，CpG 和非 CpG 位点甲基化在模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana*（L.）Heynh 中扮演不同的角色（Feng *et al.*，2010），在脊椎动物中也有相关的论述（Ramsahoye *et al.*，2000），尤其在人类基因组中甚至有 25%的 DNA 甲基化位于非 CpG 位点上（Lister *et al.*，2009）。而在昆虫中，蜜蜂和家蚕通过全基因组 DNA 甲基化测序后证实，基本不存在非 CpG 的甲基化（Wang *et al.*，2006；Lyko *et al.*，2010；Xiang *et al.*，2010），仅果蝇存在极低的非 CpG 甲基化含量（Borsatti and Mandrioli，2004）。这种非 CpG 位点的甲基化在植物中被认为是防止转座子随意跳跃的有效机制（Kato *et al.*，2003），但在昆虫中的作用仍需要进一步研究。

昆虫的 DNA 甲基化存在“时空”差异，即在不同的组织和发育阶段其甲基化水平不同。Boerjan 等（2011）利用超高效液相色谱-质谱联用法（LC-MS）分析了东亚飞蝗的脑、后胸神经节和前胸腺体 3 个组织，发现各自的甲基化水平为 1.6%、1.9%和 1.3%，说明不同的组织器官中 DNA 甲基化的水平不尽相同。Feliciello 等（2013）分析了模式昆虫赤拟谷盗的 DNA 甲基化的情况，发现根据不同的发育阶段该物种呈现卵期高甲基化，其它时期低甲基化的模式。同时，DNA 甲基化还可能在昆虫发育过程中受限于特定的级型。膜翅目昆虫的级型分化一直是研究热点，其级型差异与 DNA 甲基化紧密联系。对熊蜂的研究发现，DNA 甲基化模式在繁殖蜂和普通工蜂中存在差异（Amarasinghe *et al.*，2014）；意大利蜜蜂中蜂王较工蜂呈现更高的甲基化水平（Rasmussen and Amdam，2015）。

### 2.2 昆虫基因组中的 DNA 甲基化

Xiang 等（2010）通过单碱基精度的 DNA 甲基化测序技术分析家蚕基因组中的 DNA 甲基化情况，发现在 3 种甲基化类型中（mCG、mCHG 和 mCHH，H 代表非鸟嘌呤的其他碱基），mCG 比例达到 99.2%。结合其他昆虫物种的研究发现，昆虫 DNA 甲基化广泛存在于基因区的 CpG 位点上（Lyko and Maleszka，2011），且靠近基因 5′端的外显子区域甲基化水平高于 3′端，外显子区高于内含子区，内含子区又高于内含子和外显子的交界区域（Glastad *et al.*，2014）。Rasmussen 和 Amdam（2015）通过分析意大利蜜蜂基因组，并没有得出内含子甲基化高于交界区域这一结果，但同样认为昆虫基因区中外显子甲基化水平高于内含子区域，这种差异可能是由于对交界区域的长度定义不同所造成。在意大利蜜蜂和家蚕中的启动子区、转座子和其它重复序列中都极少发现甲基化的踪影（Wang *et al.*，2006；Foret *et al.*，2009；Lyko *et al.*，2010；Xiang *et al.*，2010）。总体而言，昆虫 DNA 甲基化偏好发生在基因外显子区，这与哺乳动物 DNA 甲

基化分布模式显著不同（Elango and Yi，2008；Jones，2012）。

昆虫基因组中“差异化”基因的 DNA 甲基化水平往往较低。这些基因不仅在表达水平呈现表型和组织的特异性，同时在长度上也长于看家基因。对不同级型意大利蜜蜂基因组 DNA 甲基化的生物信息学预测发现，不同级型中越是特异表达的基因，其基因区甲基化程度越低（Elango *et al.*，2009）。Glastad 等（2013）利用白蚁 *Reticulitermes flavipes* Kollar 的 6 个 EST 数据集联合分析也同样发现，相比那些在级型或者发育阶段特异表达的基因，广泛表达的基因其基因区更可能发生 DNA 甲基化。

在红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren 的 DNA 甲基化谱中，低甲基化的基因与非甲基化基因的平均长度接近（Glastad *et al.*，2014）。进一步研究发现，昆虫中高甲基化的基因长度又比低甲基化的短。意大利蜜蜂和家蚕的全基因组甲基化图谱揭示，高甲基化的基因长度都在 5 kb 左右，但低甲基化的基因都远大于 10 kb。因此，高甲基化偏好存在短基因中，且这类基因与“看家”功能息息相关（Sarda *et al.*，2012）。

### 2.3　昆虫 DNA 甲基化的进化

越来越多的研究表明，昆虫中 DNA 甲基化参与了众多的生物学过程（梁士可等，2014），不仅包括一些普遍的发育生物学问题如胚胎发育（Wang *et al.*，2013）和翅型分化（周晓穗等，2013）等，还包括一些物种所特有或特殊的生物学特性如级型分化（Lyko *et al.*，2010； Bonasio *et al.*，2012；Weiner *et al.*，2013）和农药抗性（Field *et al.*，1989；Hick *et al.*，1996）等。

在哺乳动物中，DNA 甲基化被认为是稳定其基因组的策略（Jones and Gonzalgo，1997），而对于昆虫而言，基因组极其分散的低甲基化水平和基因区较高密度的甲基化，说明 DNA 甲基化并非是一种稳定基因组的机制，而可能是一种偏好发生在基因区增强基因表达的机制。研究发现，昆虫中 DNA 甲基化偏好发生在持续表达的看家基因、序列保守基因以及具有编码细胞功能的基因中（Sarda *et al.*，2012；Wang *et al.*，2014b），呈现出一种“广泛表达的基因甲基化水平高，但特异性表达的基因甲基化水平低”的规律，这也被认为是昆虫 DNA 甲基化功能上保守的证据之一。

从发生的先后顺序来看，DNA 甲基化现象先于昆虫纲形成的时期，有些昆虫可能在逐渐进化的过程中丢失 DNA 甲基化，有些昆虫的 DNA 甲基化则得以稳定保留（Glastad *et al.*，2011）。对于后者而言，随着时间的流逝，甲基化的胞嘧啶（C）理论上会减少并转变为胸腺嘧啶（T），造成胞嘧啶损耗，增加甲基化位点的突变率（Suzuki *et al.*，2007）。而实际上，在昆虫进化过程中，高甲基化基因的甲基化状态更容易得到维持，比低甲基化或未甲基化基因的序列更加保守，尤其是氨基酸序列，这也被认为是昆虫基因组进化过程中的共有特征（Sarda *et al.*，2012）。存在这种现象的原因可能是由于：①进化上保守的基因更容易发生甲基化（Glastad *et al.*，2011）；②甲基化基因上非 CpG 位点的突变受到了抑制（Takuno and Gaut，2012）；③高甲基化基因的 CpG 位点数少于低甲基化基因（Park *et al.*，2011）；④甲基化基因更容易获得如 DNA 包裹（DNA packaging）和损伤修复机制等的保护（Park *et al.*，2011）。

## 3　昆虫 DNA 甲基化研究方法

### 3.1　生物信息学预测

CpG O/E 值即标准化的 CpG 含量，用于度量 DNA 序列中主要的甲基化位点 CpG 的损耗程度（Bird，1980），可以通过计算选定 DNA 序列中 CpG 频率（$P_{CpG}$）与 C 和 G 频率乘积（$P_C \times P_G$）的比值获知（Elango and Yi，2008）。若将物种基因组中所有基因的 CpG O/E 值进行聚类并绘制密度图（Fraley and Raftery，2003），则可以根据峰图的类型预测该物种基因组 DNA 甲基化的情况（Walsh *et al.*，2010；Park *et al.*，2011；Sarda *et al.*，2012）。

目前，CpG O/E 密度图已成为预测昆虫物种是否存在 DNA 甲基化的主要依据，可分为单峰、

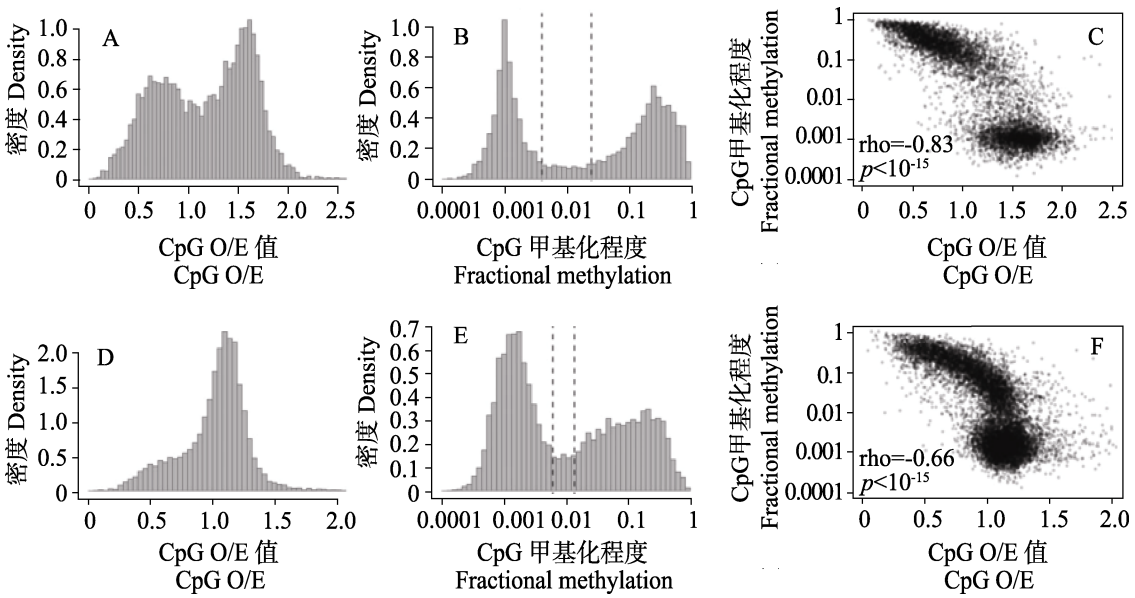


**图 2　意大利蜜蜂和家蚕 CpG O/E 分布和实验测定的甲基化水平密度分布（Sarda *et al.*，2012）**

**Fig. 2　Distributions of CpG O/E and empirically measured methylation levels in *Apis mellifera* and *Bombyx mori***

图中 A 和 D 分别为意大利蜜蜂和家蚕的 CpG O/E 密度分布图，两者分别呈现明显的双峰（意大利蜜蜂）和不明显双峰（家蚕）模式；B 和 E 分别为意大利蜜蜂和家蚕全基因组 DNA 甲基化水平分布图，虚线两边分别代表 DNA 甲基化水平较高和较低的区域；C 和 F 表示 CpG O/E 与 DNA 甲基化水平的相关性分析。

A and D illustrate density distributions of CpG O/E in the *A. mellifera* and *B. mori*, respectively; B and E show distributions of empirically measured methylation levels in the *A. mellifera* and *B. mori*, respectively, with one peak of high level and another peak of low level of methylation; C and F denote the correlation between CpG O/E and empirically measured methylation levels.

双峰和不明显双峰 3 种类型。单峰型其最高峰对应的 CpG O/E 值接近 1，对应的昆虫基因组不存在 CpG 位点甲基化，如果蝇和冈比亚按蚊（Elango *et al.*，2009）；双峰型存在两个明显的峰、且双峰对应的 CpG O/E 值偏离 1，对应的昆虫基因组其 DNA 甲基化水平较高，如意大利蜜蜂（图 2：A）；不明显双峰型无法直观判定，但可以通过特定的数学模型拟合后得以明确、且双峰对应的 CpG O/E 值同样偏离 1，对应的昆虫基因组存在较低水平的 DNA 甲基化，如家蚕（图 2：D）。通过对意大利蜜蜂和家蚕进行全基因组 DNA 甲基化测序（图 2：B，E），与其各自对应的 CpG O/E 值进行关联分析，发现二者呈现极显著的负相关性（图 2：C，F），表明 CpG O/E 值可以预测昆虫基因组不同区域的 DNA 甲基化程度。

### 3.2　实验研究方法

从宏观角度对基因组整体 DNA 甲基化水平进行研究，限制性内切酶酶切往往是研究的第一步。对于高甲基化的物种，可以根据限制性内切酶对 DNA 甲基化的敏感性不同，选择一对合适的同裂酶，根据产生的酶切图谱，从而分析全基因组 DNA 甲基化的水平。同时，针对 CpG 位点的研究还可分为定性和定量的方法（Plongthongkum *et al.*，2014）。越来越多的研究不再仅仅依靠单一的方法去获知 DNA 甲基化情况，并逐渐深入研究 DNA 甲基化所涉及的生物学功能（表 2）。

**3.2.1　甲基化特异限制性内切酶法**　甲基化特异限制性内切酶法（Methylation specific restriction enzyme assays，MSRE）通过使用对 DNA 甲基化敏感性不同的限制性内切酶进行酶切从而初步判断物种 DNA 甲基化程度，酶切之后的产物同样可以用于其他后续实验（Melnikov *et al.*，2005）。一些甲基化敏感的酶包括 *Mcr*BC、*Hpa*II、*Hin*6I 和 *Aci*I，这些酶对于酶切位点中的甲基化胞嘧啶敏感，因而无法切割。而甲基化不敏感酶，如 *Mspj*I（Horton *et al.*，2014），则可

表 2　昆虫 DNA 甲基化研究方法及其应用
Table 2　Methodologies used in the study on insect DNA methylation

| 昆虫物种 Insect species | 研究技术 Methodology | 使用样品 Samples used | 研究焦点 Research focus | 参考文献 Reference |
|---|---|---|---|---|
| 东亚飞蝗 *Locusta migratoria* Linnaeus | 甲基化特异限制性内切酶法 | 卵 | 基因组 DNA 甲基化程度 | Robinson *et al.*，2011 |
| 东亚飞蝗 *L.migratoria* | 简化代表性亚硫酸盐测序法 | 群居性和散居型成虫脑组织 | 两相中 DNA 甲基化差异基因 | Wang *et al.*，2014a |
| 足节虫 *Medauroidea extradentata* von Wattenwyl | 甲基化特异限制性内切酶法、甲基化特异性 PCR | 肠道 | DNA 甲基化的功能和基因中分布 | Krauss *et al.*，2009 |
| 意大利蜜蜂 *Apis mellifera* Linnaeus | 全基因组甲基化测序 | 无丝腺的成虫脑组织 | 蜂王和工蜂的甲基化差异 | Lyko *et al.*，2010 |
| 弗罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus* Buckley | 全基因组甲基化测序 | 全部发育阶段 | DNA 甲基化与表型多样性 | Bonasio *et al.*，2012 |
| 家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus | 全基因组甲基化测序 | 幼虫丝腺 | DNA 甲基化与丝腺相关基因的表达调控 | Xiang *et al.*，2010 |
| 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* Herbst | 甲基化特异限制性内切酶法、蛋白印记法 | 全部发育阶段 | 基因组 DNA 甲基化及其受温度的影响 | Feliciello *et al.*，2013 |
| 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* Walker | 全基因组甲基化测序 | 雄成虫 | DNA 甲基化在非社会性昆虫的角色 | Beeler *et al.*，2014 |
| 家白蚁 *Coptotermes lacteus* Froggatt | 甲基化敏感扩增多态性 | 蚁后、兵蚁和工蚁 | 不同级型甲基化模式 | Lo *et al.*，2012 |
| 白背飞虱 *Sogatella furcifera* Horváth | 甲基化敏感扩增多态性 | 雌雄成虫 | 雌雄甲基化模式差异 | Zhang *et al.*，2014 |
| 粪金龟 *Onthophagus gazelle* Fabricius | 甲基化敏感扩增多态性 | 成虫及不同组织 | 不同时代、环境甲基化差异 | Snell-Rood *et al.*，2013 |
| 熊峰 *Bombus impatiens* Cresson | 甲基化敏感扩增多态性 | 蛹和成虫 | 甲基化与社会性 | Weiner *et al.*，2013 |
| 胡峰 *Polistes dominula* Christ | 甲基化敏感扩增多态性 | 蛹和成虫 | 甲基化与社会性 | Weiner *et al.*，2013 |
| 斑长黄胡蜂 *Dolichovespula maculate* Linnaeus | 甲基化敏感扩增多态性 | 蛹和成虫 | 甲基化与社会性 | Weiner *et al.*，2013 |
| 沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* Forskal | 高效液相色谱法、甲基化特异性 PCR | 若虫和成虫的 3 种腺体 | 不同腺体 DNA 甲基化水平差异 | Boerjan *et al.*，2011 |
| 豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* Harris | 高效液相色谱法 | 有性生殖后代和无性生殖后代 | DNA 甲基化的功能 | Walsh *et al.*，2010 |

以特异酶切含有甲基化的片段。该方法最大的优势就是并不需要明确靶 DNA 的序列，但由于受限酶切位点，因此无法提供全基因组 DNA 的甲基化信息，同时需要>5 μg DNA 样本量。对于大多数昆虫而言，酶切方法更加适用于高 DNA 甲基化的物种，或者与其它方法联用，如甲基化特异性 PCR（Methylation specific PCR，MS-PCR）等（Hughes and Jones，2007）。

**3.2.2　甲基化敏感扩增多态性**　甲基化敏感扩增多态性（Methylation sensitive amplified polymorphism，MSAP）技术，是从经典的扩增片段长度多态性（Amplified fragment length

polymorphism，AFLP）技术衍生而来。这种方法首先利用 *Hpa*II + *EcoR*I 和 *Msp*I + *EcoR*I 两组酶同时对基因组 DNA 进行双酶切。由于 *Msp*I 和 *Hpa*II 具有相同的酶切位点但对甲基化的敏感性不同，因此可将该位点的甲基化信息转化为不同的酶切情况，连接相应的接头，在经过两轮 PCR 即可获得条带多态性，从而判断基因组 DNA 甲基化的情况。该方法优势在于无需知晓物种的基因组信息，可用于不同种群、不同处理、不同发育阶段甲基化模式的研究，且费用和设备要求均较低，但工作量大、步骤繁琐，且无法完全反映全基因组 DNA 甲基化的程度。近年在该方法基础上，进行了 F-MSAP 的改进，即在第二轮扩增（选择性扩增）的下游引物上添加如 FAM 等的荧光基团使得该扩增得到的产物具有荧光特性从而可被测序仪器检测（Xu *et al.*，2005）。该方法大大减少聚丙烯酰胺胶电泳的工作量，且提高了对条带判断的精度。

**3.2.3** 基因组 DNA 甲基化测序　根据目的序列的不同，大致可以将测序分为 CpG 富集和非富集两种处理，之后通过重亚硫酸盐转化后进行测序。重亚硫酸盐能够将甲基化的胞嘧啶保留，而未甲基化的胞嘧啶转化成胸腺嘧啶，基于转化得到的测序信息与基因组序列信息进行匹配，从而获得胞嘧啶甲基化的情况。以人类为例，人类中 CpG 二核苷酸低于其他类型二核苷酸，因此在测序之前富集 CpG 位点的甲基化片段会降低至少十倍的测序量（Plongthongkum *et al.*，2014）。富集的方法可以利用甲基化敏感的限制性内切酶如，*Msp*I 和 *ApeK*I 酶切，也可以利用甲基化 DNA 免疫沉淀来实现。方法包括简化代表性亚硫酸盐测序法（Reduced representation bisulphite sequencing，RRBS）（Meissner *et al.*，2005）、甲基化 DNA 免疫共沉淀测序（Methylation DNA immunoprecipitation sequencing，MeDIP-seq）（Jacinto *et al.*，2008；Ruike *et al.*，2010）和甲基化 CG 结合蛋白测序法（methyl-CpG-binding domain protein sequencing，MBD-seq）（Harris *et al.*，2010）。虽然这种富集处理能够降低成本，但无法反映低甲基化区域的信息。因此，在已有的昆虫 DNA 甲基化研究中，仍然选择全基因组甲基化测序（Whole genome bisulphite sequencing，WGBS）。全基因组 DNA 甲基化测序能够提供 90%以上的 DNA 甲基化信息，所需要的样品量为 10 ng 左右（Plongthongkum *et al.*，2014）。近年来，科学家开发了一项名为 T-WGBS（或 Tn5mC-seq）的新技术，这种基于转座子为 WGBS 构建文库的改进方法能够使构建文库的 DNA 量减少至 1 ng（Adey and Shendure，2012）。利用这项技术对于一些较为珍贵的昆虫及其组织样本进行 DNA 测序，可以降低样本收集的难度同时获得全基因组 DNA 甲基化的信息。

## 4 总结与展望

昆虫被认为是研究 DNA 甲基化的良好材料，除了其基因组大小适中和 DNA 甲基化模式多样化以外（Glastad *et al.*，2011），随着越来越多昆虫细胞系的培育，昆虫 DNA 甲基化研究的可操作性大大提升。有学者将 DNA 甲基化状态的改变视为应对外界环境的响应机制（Szyf *et al.*，2008），昆虫可能由于所处生活环境的复杂性，其 DNA 甲基化模式产生差异（梁士可等，2014），从而在表型分化、繁殖力和适应性等方面大不相同，使其能够适应多样化的寄主和环境条件，甚至在极端环境下都能够生存繁衍。

Dnmts 在 DNA 甲基化的过程中起到关键作用，同时需要相关蛋白的参与（Walsh *et al.*，2010），如 DMAP1 具有增强 Dnmt1 维持 DNA 甲基化甚至使其从头甲基化的功能（Lee *et al.*，2010）。然而，虽然昆虫中普遍存在 DMAP1，但其 Dnmt1 却不具有 DMAP1 结合位点。因此，对于那些具有 Dnmt1 但却缺乏 Dnmt3 的昆虫，Dnmt1 行使怎样的功能，以及 DMAP1 是否同样能够与 Dnmt1 结合并发挥相应的作用，值得进一步深入研究。鉴于昆虫基因区的 DNA 甲基化能够普遍提高基因的表达并参与了众多的生物学过程，如果能够通过干扰昆虫 Dnmts 或甲基化相关蛋白基因的表达，影响基因组 DNA 甲基化的正常水平及其所调控基因的表达，则有可能成为研究农业害虫控制策略的一种新方向。

对于研究 DNA 甲基化的方法而言，主要根据实验室条件、科学问题和研究目的进行选择。从 CpG O/E 值计算、传统的甲基化敏感限制性内切酶和 MSAP 实验，都能够不同程度的体现昆虫基因组 DNA 甲基化的信息。随着越来越多昆虫的基因组测序完成，人们已经将关注点从基因序列分析的层面转移到表观组遗传修饰上，希望通过基于全基因组 DNA 甲基化测序，从单碱基精度的水平搜寻到更多关键位点，以指导后续 DNA 甲基化功能组学的研究，进一步探明 DNA 甲基化对一些昆虫重要生物学性状的发展和形成所起的作用。

## 参考文献 (References)


Adey A, Shendure J, 2012. Ultra-low-input, tagmentation-based whole-genome bisulfite sequencing. *Genome Res.,* 22(6): 1139–1143.

Amarasinghe HE, Clayton CI, Mallon EB, 2014. Methylation and worker reproduction in the bumble-bee (*Bombus terrestris*). *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 281(1780): 2502.

Beeler SM, Wong GT, Zheng JM, Bush EC, Remnant EJ, Oldroyd BP, Drewell RA, 2014. Whole-genome DNA methylation profile of the jewel wasp (*Nasonia vitripennis*). *G3-Genes Genom. Genet.*, 4(3): 383–388.

Bestor TH, 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.*, 9(16): 2395–2402.

Bestor TH, Verdine GL, 1994. DNA methyltransferases. *Curr. Opin. Cell Biol.,* 6(3): 380–389.

Bird AP, 1980. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res.,* 8(7): 1499–1504.

Boerjan B, Sas F, Ernst UR, Tobback J, Lemière F, Vandegehuchte MB, Janssen CR, Badisco L, Marchal E, Verlinden H, 2011. Locust phase polyphenism: Does epigenetic precede endocrine regulation? *Gen. Comp. Endocr.,* 173(1): 120–128.

Bonasio R, Li Q, Lian J, Mutti NS, Jin L, Zhao H, Zhang P, Wen P, Xiang H, Ding Y, 2012. Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Curr. Biol.,* 22(19): 1755–1764.

Borsatti F, Mandrioli M, 2004. The structure of insect DNA methyltransferase 2 (DNMT2) DNA binding domain is responsible for the non-CpG methylation in insect genomes. *Caryologia*, 57(3): 305–311.

Dabe EC, Sanford RS, Kohn AB, Bobkova Y, Moroz LL, 2015. DNA Methylation in Basal Metazoans: Insights from Ctenophores. *Integr. Comp. Biol.*, doi:10.1093/icb/icv086.

Elango N, Hunt BG, Goodisman MA, Yi SV, 2009. DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(27): 11206–11211.

Elango N, Yi SV, 2008. DNA methylation and structural and functional bimodality of vertebrate promoters. *Mol. Biol. Evol.*, 25(8): 1602–1608.

Fatemi M, Hermann A, Pradhan S, Jeltsch A, 2001. The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J. Mol. Biol.*, 309(5): 1189–1199.

Feliciello I, Parazajder J, Akrap I, Ugarković Đ, 2013. First evidence of DNA methylation in insect *Tribolium castaneum*: environmental regulation of DNA methylation within heterochromatin. *Epigenetics*, 8(5): 534–541.

Feng S, Cokus SJ, Zhang X, Chen PY, Bostick M, Goll MG, Hetzel J, Jain J, Strauss SH, Halpern ME, 2010. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(19): 8689–8694.

Field LM, Lyko F, Mandrioli M, Prantera G, 2004. DNA methylation in insects. *Insect Mol. Biol.*, 13(2): 109–115.

Field LM, Devonshire AL, Ffrench-Constant RH, Forde BG, 1989. Changes in DNA methylation are associated with loss of insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz. ). *FEBS Lett.*, 243(2): 323–327.

Foret S, Kucharski R, Pittelkow Y, Lockett GA, Maleszka R, 2009. Epigenetic regulation of the honey bee transcriptome: unravelling the nature of methylated genes. *BMC Genomics*, 10(1): 472.

Fraley C, Raftery AE, 2003. Enhanced software for model-based clustering, density estimation, and discriminant analysis: MCLUST. *J. Classification*, 20(2): 263–286.

Glastad KM, Hunt BG, Goodisman MAD, 2013. Evidence of a conserved functional role for DNA methylation in termites. *Insect Mol. Biol.*, 22(2): 143–154.

Glastad KM, Hunt BG, Yi SV, Goodisman MAD, 2011. DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era. *Insect Mol. Biol.*, 20(5): 553–565.

Glastad KM, Hunt BG, Goodisman MAD, 2014. Evolutionary insights into DNA methylation in insects. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 1: 25–30.

Glastad KM, Hunt BG, Yi SV, Goodisman MAD, 2014. Epigenetic inheritance and genome regulation: is DNA methylation linked to ploidy in haplodiploid insects? *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 281(1785): 917–936.

Hare JT, Taylor JH, 1985. One role for DNA methylation in vertebrate cells is strand discrimination in mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(21): 7350–7354.

Harris RA, Wang T, Coarfa C, Nagarajan RP, Hong C, Downey SL, Johnson BE, Fouse SD, Delaney A, Zhao Y, 2010. Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nat. Biotechnol.*, 28(10): 1097–1105.

Hick CA, Field LM, Devonshire AL, 1996. Changes in the methylation of amplified esterase DNA during loss and

reselection of insecticide resistance in peach-potato aphids, *Myzus persicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26(1): 41–47.

Horton JR, Wang H, Mabuchi MY, Zhang X, Roberts RJ, Zheng Y, Wilson GG, Cheng X, 2014. Modification-dependent restriction endonuclease, *MspJ*I, flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nucleic Acids Res.*, 42(19): 12092–12101.

Hughes S, Jones JL, 2007. The use of multiple displacement amplified DNA as a control for methylation specific PCR, pyrosequencing, bisulfite sequencing and methylation-sensitive restriction enzyme PCR. *BMC Mol. Biol.*, 8(1): 91.

Hunt BG, Glastad KM, Yi SV, Goodisman MAD, 2013. The function of intragenic DNA methylation: insights from insect epigenomes. *Integr. Comp. Biol.*, 53(2): 319–328.

Jacinto FV, Ballestar E, Esteller M, 2008. Methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP): hunting down the DNA methylome. *Biotechniques*, 44(1): 35.

Jeltsch A, 2010. Phylogeny of methylomes. *Science*, 328(5980): 837–838.

Jones PA, 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.*, 13(7): 484–492.

Jones PA, Gonzalgo ML, 1997. Altered DNA methylation and genome instability: A new pathway to cancer? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(6): 2103–2105.

Kato M, Miura A, Bender J, Jacobsen SE, Kakutani T, 2003. Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposons in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.*, 13(5): 421–426.

Ko YG, Nishino K, Hattori N, Arai Y, Tanaka S, Shiota K, 2005. Stage-by-stage change in DNA methylation status of *Dnmt1* locus during mouse early development. *J. Biol. Chem.,* 280(10): 9627–9634.

Krauss V, Eisenhardt C, Unger T, 2009. The genome of the stick insect *Medauroidea extradentata* is strongly methylated within genes and repetitive DNA. *PLoS ONE*, 4(9): e7223.

Kronforst MR, Gilley DC, Strassmann JE, Queller DC, 2008. DNA methylation is widespread across social Hymenoptera. *Curr. Biol.*, 18(7): R287–R288.

Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R, 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319(5871): 1827–1830.

Lee GE, Kim JH, Taylor M, Muller MT, 2010. DNA methyltransferase 1-associated protein (DMAP1) is a co-repressor that stimulates DNA methylation globally and locally at sites of double strand break repair. *J. Biol. Chem.,* 285(48): 37630–37640.

Lee JH, Skalnik DG, 2005. CpG-binding protein (CXXC finger protein 1) is a component of the mammalian Set1 histone H3-Lys4 methyltransferase complex, the analogue of the yeast Set1/COMPASS complex. *J. Biol. Chem.*, 280(50): 41725–41731.

Liang SK, Zhang M, Liang ZQ, Li GH, Wang FH, 2014. Characteristics and functions of DNA methylation in insects. *Acta Entomol. Sin.*, 57(12): 1439–1446. [梁士可, 张梅, 梁梓强, 李广宏, 王方海, 2014. 昆虫 DNA 甲基化的特点和功能. 昆虫学报, 57(12): 1439–1446.]

Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo Q-M, 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271): 315–322.

Lo N, Li B, Ujvari B, 2012. DNA methylation in the termite *Coptotermes lacteus*. *Insect. Soc.*, 59(2): 257–261.

Lyko F, Foret S, Kucharski R, Wolf S, Falckenhayn C, Maleszka R, 2010. The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol.*, 9(1): e1000506.

Lyko F, Maleszka R, 2011. Insects as innovative models for functional studies of DNA methylation. *Trends Genet.*, 27(4): 127–131.

Mandrioli M, 2003. Identification and molecular characterization of R1 transposable elements in the cabbage moth *Mamestra brassicae*. *Caryologia*, 56(2): 155–160.

Mandrioli M, Volpi N, 2003. The genome of the lepidopteran *Mamestra brassicae* has a vertebrate-like content of methyl-cytosine. *Genetica*, 119(2): 187–191.

Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES, Jaenisch R, 2005. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res.*, 33(18): 5868–5877.

Melnikov AA, Gartenhaus RB, Levenson AS, Motchoulskaia NA, Levenson VV, 2005. MSRE-PCR for analysis of gene-specific DNA methylation. *Nucleic Acids Res.*, 33(10): e93.

Mitsudome T, Mon H, Xu J, Li Z, Lee JM, Patil AA, Masuda A, Iiyama K, Morokuma D, Kusakabe T, 2015. Biochemical characterization of maintenance DNA methyltransferase DNMT-1 from silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol.*, 58: 55–65.

Park J, Peng Z, Zeng J, Elango N, Park T, Wheeler D, Werren JH, Yi SV, 2011. Comparative analyses of DNA methylation and sequence evolution using *Nasonia* genomes. *Mol. Biol. Evol.*, 28(12): 3345–3354.

Plongthongkum N, Diep DH, Zhang K, 2014. Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. *Nat. Rev. Genet.*, 15(10): 647–661.

Pradhan M, Esteve PO, Chin HG, Samaranayke M, Kim GD, Pradhan S, 2008. CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity. *Biochemistry*, 47(38): 10000–10009.

Ramsahoye BH, Biniszkiewicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R, 2000. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(10): 5237–5242.

Rasmussen E, Amdam G, 2015. Cytosine modifications in the honey bee (*Apis mellifera*) worker genome. *Front. Genet.*, 6: 8.

Robinson KL, Tohidi-Esfahani D, Lo N, Simpson SJ, Sword GA, 2011. Evidence for widespread genomic methylation in the migratory locust, *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *PloS ONE*, 6(12): e28167.

Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB, 2000. DNMT1 binds

HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat. Genet.*, 25(3): 269–277.

Ruike Y, Imanaka Y, Sato F, Shimizu K, Tsujimoto G, 2010. Genome-wide analysis of aberrant methylation in human breast cancer cells using methyl-DNA immunoprecipitation combined with high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, 11(1): 137.

Sarda S, Zeng J, Hunt BG, Yi SV, 2012. The evolution of invertebrate gene body methylation. *Mol. Biol. Evol.*, 29(8): 1907–1916.

Sarkar S, Rao S, Gupta V, Hendre R, 1992. 5-Methylcytosine content in *Gryllotalpa fossor* (Orthoptera). *Genome*, 35(1): 163–166.

Schaefer M, Lyko F, 2007. DNA methylation with a sting: an active DNA methylation system in the honeybee. *Bioessays*, 29(3): 208–211.

Smith CR, Smith CD, Robertson HM, Helmkampf M, Zimin A, Yandell M, Holt C, Hu H, Abouheif E, Benton R, 2011. Draft genome of the red harvester ant *Pogonomyrmex barbatus*. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(14): 5667–5672.

Snell-Rood EC, Troth A, Moczek AP, 2013. DNA methylation as a mechanism of nutritional plasticity: limited support from horned beetles. *J. Exp. Zool. Part. B.*, 320(1): 22–34.

Song J, Teplova M, Ishibe-Murakami S, Patel DJ, 2012. Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation. *Science*, 335(6069): 709–712.

Spada F, Haemmer A, Kuch D, Rothbauer U, Schermelleh L, Kremmer E, Carell T, Längst G, Leonhardt H, 2007. DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells. *J. Cell Biol.*, 176(5): 565–571.

Stec I, Nagl SB, van Ommen G-JB, den Dunnen JT, 2000. The PWWP domain: a potential protein–protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation? *FEBS Lett.*, 473(1): 1–5.

Suzuki MM, Bird A, 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.*, 9(6): 465–476.

Suzuki MM, Kerr AR, De Sousa D, Bird A, 2007. CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome. *Genome Res.*, 17(5): 625–631.

Szyf M, McGowan P, Meaney MJ, 2008. The social environment and the epigenome. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49(1): 46–60.

Takuno S, Gaut BS, 2012. Body-methylated genes in *Arabidopsis thaliana* are functionally important and evolve slowly. *Mol. Biol. Evol.*, 29(1): 219–227.

Walsh TK, Brisson JA, Robertson HM, Gordon K, Jaubert-Possamai S, Tagu D, Edwards O, 2010. A functional DNA methylation system in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Insect Mol. Biol.*, 19(S2): 215–228.

Wang X, Fang X, Yang P, Jiang X, Jiang F, Zhao D, Li B, Cui F, Wei J, Ma C, 2014a. The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight. *Nat. Commun.*, 5(1): 2957.

Wang X, Li Q, Lian J, Li L, Jin L, Cai H, Xu F, Qi H, Zhang L, Wu F, 2014b. Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* provide insight into the evolution of invertebrate CpG methylation. *BMC Genomics*, 15(1): 1119.

Wang X, Wheeler D, Avery A, Rago A, Choi JH, Colbourne JK, Clark AG, Werren JH, 2013. Function and evolution of DNA methylation in *Nasonia vitripennis*. *PLoS Genet.*, 9(10): e1003872.

Wang Y, Jorda M, Jones PL, Maleszka R, Ling X, Robertson HM, Mizzen CA, Peinado MA, Robinson GE, 2006. Functional CpG methylation system in a social insect. *Science*, 314(5799): 645–647.

Wang ZG, Wu JX, 2009. DNA methyltransferases: classification, functions and research progress. *Hereditas*, 31(9): 903–912. [王志刚, 吴建新, 2009. DNA 甲基转移酶分类, 功能及其研究进展. 遗传, 31(9): 903–912.]

Weiner SA, Galbraith DA, Adams DC, Valenzuela N, Noll FB, Grozinger CM, Toth AL, 2013. A survey of DNA methylation across social insect species, life stages and castes reveals abundant and caste-associated methylation in a primitively social wasp. *Naturwissenschaften*, 100(8): 795–799.

Werren JH, Richards S, Desjardins CA, Niehuis O, Gadau J, Colbourne JK, 2010. Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science*, 327(5963): 343–348.

Xiang H, Zhu J, Chen Q, Dai F, Li X, Li M, Zhang H, Zhang G, Li D, Dong Y, 2010. Single base-resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map. *Nat. Biotechnol.*, 28(5): 516–520.

Xu Q, Sun D, Zhang Y, 2005. F-MSAP: A practical system to detect methylation in chicken genome. *Chinese Sci. Bull.*, 50(18): 2039–2044.

You MS, Yue Z, He WY, Yang XH, Yang G, Xie M, Zhan DL, Baxter SW, Vasseur L, Gurr GM, 2013. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nat. Genet.*, 45(2): 220–225.

Young SR, Mumaw C, Marrs JA, Skalnik DG, 2006. Antisense targeting of CXXC finger protein 1 inhibits genomic cytosine methylation and primitive hematopoiesis in zebrafish. *J. Biol. Chem.*, 281(48): 37034–37044.

Zhang J, Xing YR, Li Y, Yin CL, Ge C, Li F, 2015. DNA methyltransferases have an essential role in female fecundity in brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 464(1): 83–88.

Zhang M, Chen JL, Zhou XS, Liang SK, Li GH, Wang FH, 2014. Different genomic DNA methylation patterns between male and female adults of white-backed planthoppers *Sogatella furcifera*. *J. Asia-Pac. Entomol.*, 17(4): 917–921.

Zhou XH, Chen JJ, Zhang M, Wang FH, 2013. The improvement of MS-RDA and its application in *Sogatella furcifera* (Horvath). *Acta Scientiarum Naturalium Univerrsitatis Sunyatseni*, 52(5): 118–122. [周晓穗, 陈佳林, 张梅, 王方海, 2013. MS-RDA 的改进及在白背飞虱的应用研究. 中山大学学报: 自然科学版, 52(5): 118–122.]