

• 农业生物技术 •

蒺藜苜蓿离体再生过程中 *MtSERK1* 的组蛋白修饰状态分析

董蔚, 邬培祥, 刘锡江, 高天雪, 杨宁, 宋玉光

曲阜师范大学 生命科学学院, 山东 曲阜 273165

董蔚, 邬培祥, 刘锡江, 等. 蒺藜苜蓿离体再生过程中 *MtSERK1* 的组蛋白修饰状态分析. 生物工程学报, 2018, 34(11): 1831–1839.

Dong W, Wu PX, Liu XJ, et al. Analysis of histone modification of *MtSERK1* during *in vitro* regeneration in *Medicago truncatula*. Chin J Biotech, 2018, 34(11): 1831–1839.

摘 要: 表观遗传修饰尤其是组蛋白修饰在维持植物基因组稳定、调控基因表达、促进离体再生等方面发挥了重要作用。*MtSERK1* 基因是蒺藜苜蓿离体再生过程中胚性愈伤组织建立的重要标记基因。为了解该过程中组蛋白修饰与 *MtSERK1* 表达的动态调控关系, 通过实时定量 PCR 方法分析了 *MtSERK1* 的表达变化并利用染色质免疫沉淀 (ChIP) 技术分析了其启动子区和不同基因结构区 H3K9me2、H3K4me3 和 H3K9ac 修饰状态。发现 *MtSERK1* 在蒺藜苜蓿离体再生过程中的表达激活与其 5'末端和 3'末端区的组蛋白 H3K4me3 和 H3K9ac 修饰的动态变化相关。该研究将为深入了解 *MtSERK1* 参与蒺藜苜蓿离体再生的表达调控机制及其高效遗传转化体系的建立提供重要的理论指导。

关键词: 蒺藜苜蓿, 组蛋白修饰, *MtSERK1*, 愈伤组织, 离体器官再生

Analysis of histone modification of *MtSERK1* during *in vitro* regeneration in *Medicago truncatula*

Wei Dong, Peixiang Wu, Xijiang Liu, Tianxue Gao, Ning Yang, and Yuguang Song

College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu 273165, Shandong, China

Abstract: Epigenetic modification, especially histone modification, plays an important role in maintaining plant genome stability, regulating gene expression and promoting regeneration *in vitro*. *MtSERK1* is an important marker gene involved in establishing of embryogenic callus during *in vitro* regeneration of *Medicago truncatula*. In order to understand the regulation

Received: June 21, 2018; **Accepted:** August 14, 2018

Supported by: Natural Science Foundation of Shandong Province, China (No. ZR2015JL012), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31300220, 31501328), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2014M550366), Scientific Research Fund of Qufu Normal University (No. XKJ201320).

Corresponding author: Yuguang Song. E-mail: SYG-0423@163.com

山东省自然科学基金 (No. ZR2015JL012), 国家自然科学基金 (Nos. 31300220, 31501328), 中国博士后基金 (No. 2014M550366), 曲阜师范大学科研基金 (No. XKJ201320) 资助。

网络出版时间: 2018-08-28

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180827.0959.002.html>

relationship between dynamic histone modification and *MtSERK1*s expression during the processes of *in vitro* organogenesis, the expression of *MtSERK1* was analyzed by qRT-PCR, and the modification status of H3K9me2, H3K4me3 and H3K9ac in the promoter region and different regions included in the gene body was analyzed by chromatin immunoprecipitation (ChIP). We found expression activation of *MtSERK1* was related to the dynamic changes of histone H3K4me3 and H3K9ac in the 5' and 3' regions. This study will provide important theoretical guidance for understanding of the regulatory mechanism of *MtSERK1* and also for establishing efficient genetic transformation system of *Medicago truncatula*.

Keywords: *Medicago truncatula*, histone modification, *MtSERK1*, callus, *in vitro* organogenesis

生物工程是以生物学（特别是其中的分子生物学、微生物学、遗传学、生物化学和细胞学）的理论和技術，定向地改造生物或其功能，创造出新物种的一门技术。在诸多生物工程技术中，利用基因工程的方式对植物进行遗传改造是获得优良性状转基因植物的一条重要途径。目前诸如烟草、番茄、小麦、棉花等植物的基因工程改造均是通过农杆菌介导的植株再生（器官发生、体细胞胚发生）方式。植物离体再生是指植物外植体（包括根、下胚轴、子叶及种子等）在适宜的离体培养环境中经脱分化、再分化等过程重新诱导出离体苗的生物学过程。通常该过程包括愈伤组织诱导、体细胞胚胎的建立以及离体器官的分化等途径^[1]。植物离体再生效率是植物基因工程改造的重要限制因素。对于多数植物来说，其离体再生过程均具有周期长、效率低等特点。因此，探究植物离体再生的调控因素及机制对于提高转基因效率等方面具有重要的意义。近年来，随着研究的不断深入，多个植物离体再生关键基因逐步被发掘，如：*WUSCHEL* (*WUS*)、*REDIFFERENTIATION DEFECTIVE* (*SRD*)、*SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*)、*CUP-SHAPED COTYLEDON 1* (*CUC1*)、*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* (*SERK1*)等，它们的功能缺失或异常表达均会引起植物离体再生能力的改变^[2-5]。*SERK* 基因是一个富含亮氨酸的受体样蛋白激酶 (LRR-RLK)。从1997年在胡萝卜中首次发现 *SERK* 基因 *DcSERK* 至今，该基因在诸如拟南芥、玉米及水稻等多个物种逐步被发现且其功能亦得到证实^[6]。研究表

明，无论在合子胚发育不同时期还是在离体胚胎再生过程中 *SERK* 均特异性地在胚性细胞中表达，已成为确定胚性细胞的重要标记基因^[6-9]。

在真核生物基因组中，147 bp 大小的核 DNA 与组蛋白 (H1、H2A、H2B、H3 和 H4) 相互缠绕而形成核小体。多个核小体相互串联形成蛋白质的一级结构，最后经过不断地折叠包装形成染色质。伸向核小体外侧的不同组蛋白亚单位的 N 端尾部，经过甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化等修饰后，决定了常染色质或异染色质的形态，影响着转录调控，因此称它们为“组蛋白密码”^[10]。在植物中主要存在 3 种类型的组蛋白甲基化修饰 (me1、me2、me3)，通常都是发生在组蛋白 H3 或 H4 的赖氨酸 (Lys, K) 和精氨酸 (Arg, R) 残基上，主要包括 H3K4、K9、K27、K36、K79、R2、R17、R26 以及 H4K20、R3 等位点。通常情况下，H3K9、H3K27、H4K20 的甲基化多分布于异染色质区域，与基因的转录沉默相关^[10]，例如在小鼠中 H3K9me3、H3K27me1 和 H4K20me3 是组成型异染色质的标志^[11]。组蛋白乙酰化是除甲基化修饰以外的另一种重要的表观遗传修饰，其在稳定染色质的结构、募集转录调控因子等过程中发挥重要作用。与组蛋白甲基化修饰相比，乙酰化修饰位点更为广泛，通常发生在组蛋白 H3 第 9、14、18、23 位和 H4 第 5、8、12、16、20 位的 Lys 残基上，甚至偶尔发生在 H2A 和 H2B 上^[11]。在转录比较活跃的常染色质区域，通常会伴随着高水平的组蛋白乙酰化修饰的发生，而异染色质区域则经常发生去乙酰化修饰^[12-13]。

研究发现,植物细胞在离体再生过程中均会发生大规模的染色质重编程过程,通过开启或关闭一些基因的表达来保持其不同的分化潜能。近期研究发现,在拟南芥离体再生过程中,多个干细胞维持和分化关键基因的表达受到了组蛋白修饰的调控,例如:*WUS* 的表达与其启动子区及 3' 末端的 DNA 甲基化和组蛋白修饰相关^[14]; *SCARECROW (SCR)* 的正常表达与其组蛋白乙酰化修饰相关^[15]; *STM*、*BP/KNAT1* 和 *KNAT2* 的表达均受到了 H3K27 甲基化的影响^[16];在离体器官发生过程中 *ASYMMETRIC LEAVE (ASI)* 和 *CUC1* 的表达受到了 H3K4 乙酰化水平的调控^[17-18]。这些结果说明,在植物离体再生过程中,染色质或部分关键基因组蛋白修饰的改变是细胞重获全能性并向不同方向分化的一条重要途径。

蒺藜苜蓿是豆科苜蓿属一年生或多年生草本植物,由于其倍性小 ($2n=16$)、基因组小 (454–526 Mb)、自花受粉、有大量突变体和多种生态型、具有较高的生物多样性以及可进行遗传转化等特点,成为豆科分子生物学和基因组学研究的模式植物^[19]。和其他作物相似,在对其基因工程改造过程中,同样也存在离体再生效率较低、受生态型制约等缺点,因此,了解其离体再生过程的调控机制亦是亟待解决的问题。前期研究发现,在蒺藜苜蓿体细胞胚胎发生过程中,与拟南芥 *AtSERK1* 高度同源的 *MtSERK1* 基因的表达明显受到诱导,推测其参与了蒺藜苜蓿体细胞胚胎发生过程并扮演重要角色^[9]。在蒺藜苜蓿的离体再生过程中,该基因表达激活是否和拟南芥中一些离体再生关键基因一样也受到了组蛋白修饰的调控?其存在哪种类型的组蛋白修饰?这些修饰与其表达的相互作用关系是什么?为解决这些问题,本研究采用实时定量 PCR 分析了 *MtSERK1* 在离体再生过程中的表达变化并利用染色质免疫沉淀 (ChIP) 技术分析了其启动子区和基因结构区不

同区域、不同类型的组蛋白修饰状态。在离体再生过程中 *MtSERK1* 的表达与其基因 5' 端及 3' 末端的组蛋白 H3K9ac、H3K4me3 修饰的动态变化相关。本研究为深入了解 *MtSERK1* 参与蒺藜苜蓿离体再生过程中的表达调控机制以及为其高效基因工程遗传转化体系的建立等方面提供重要的理论指导。

1 材料与方法

1.1 植物材料的培养

选取饱满均一的蒺藜苜蓿 (生态型为 R108) 种子,进行一侧种皮打磨处理,散铺于两层滤纸培养皿中,用蒸馏水浸润,置于 4 °C 冰箱中催芽,待胚根长至 1 cm 左右时,将其转移至 10 cm×10 cm 的培养钵中 (培养基质与蛭石比例为 3 : 1)。期间用 1/2 Hoagland 营养液浇灌,培养条件为光照培养 16 h,暗培养 8 h,光强为 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 饱和光,昼夜温度为 25 °C/20 °C,相对湿度为 55%。

1.2 愈伤组织诱导及离体器官再生

愈伤组织的诱导及离体器官的再生主要参考 Cosson 等的方法和步骤^[20]。简要描述为:剪取刚要开花的上述植物叶片 (选取舒展、厚实、色泽鲜绿、健壮的叶片),用新配置的灭菌混合液 (在无菌去离子水中加入 0.1% 的 TW-20 和 10% 的 NaClO 溶液) 和叶片一起置于大离心管中,轻轻摇晃试管并上下翻转,时间约 5–6 min,为保证灭菌效果,清洗叶片 2 次。然后用无菌去离子水清除叶片表面残留的灭菌混合液。用刀片将叶子切成正方形,使其四周均有伤口,将切为正方形的叶片转到含有 4 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L BAP 的 SH3a 培养基上暗培养进行愈伤组织诱导^[20],期间每 2 周更换一次培养基,5–6 周便会形成大量愈伤组织。选取胚性好的材料转移到不含任何激素的 SH9a 培养基上^[20],在光下进行离体器官的诱导,4–6 周后便产生大量的离体苗。

1.3 qRT-PCR 分析

选取上述 (1:2) 中诱导不同时间的培养物, 未经诱导培养的叶外植体命名为 Mock; SH3a 诱导 1、3、6 周的培养物分别命名为 SH3-W1、SH3-W3、SH3-W6; SH9a 分化诱导 1、3、6 周的培养物分别命名为 SH9-W1、SH9-W3、SH9-W6。将这些材料平均分成 2 份, 一份用于 RNA 的提取, 另一份用于后续的染色质免疫沉淀 (ChIP) 分析。用于 RNA 提取的材料经液氮冷冻后, 利用植物组织 RNA 提取及反转录试剂盒 (Invitrogen) 提取 RNA 并进行 cDNA 的合成, 以反转录后的 cDNA 为模板, 葵藜苜蓿 *ACTIN2* 基因作内参, 通过 qRT-PCR 检测 *MtSERK* 在愈伤组织诱导及离体器官再生过程中的表达情况 (引物序列见表 1)。qPCR 反应体系 (10 μ L): ddH₂O 3 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 反向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 模板 cDNA 1.0 μ L, ChamQ SYBR Color QPCR Master Mix (2 \times) 5 μ L (Vazyme, Code: Q411-00)。反应条件为两步法 PCR, 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s; 60 $^{\circ}$ C 退火加延伸 30 s, 延伸完成后收集荧光信号; 2–3 步循环 40 次; 60–95 $^{\circ}$ C, 每隔 0.5 $^{\circ}$ C 作溶解曲线。利用比较 Ct 方法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法) 分析表达量^[21]。实验设置 3 个生物学重复, 采用 SPSS 单因子方差分析程序分

析实时荧光定量结果。

1.4 染色质免疫沉淀 (ChIP) 分析

用于检测 *MtSERK1* 组蛋白修饰状态的 ChIP 方法主要参考文献[22]。简要步骤为: 取上述 (1.3) 中与 RNA 提取同一批的培养物 1 g, 用含有 1% 甲醛的 1 \times PBS 缓冲液真空固定, 加入甘氨酸溶液, 真空渗透处理, 终止交联, PBS 清洗后, 液氮速冻后于 -80 $^{\circ}$ C 保存。液氮研磨样品后分离染色质并进行超声破碎使打断的染色质片段长度为 200–1 000 bp。分别利用 H3K9ac、H3K9me2 和 H3K4me3 抗体 (Millipore cat. 07-392、05-768R 和 07-473) 过夜进行免疫沉淀反应, 然后加入 Protein G 玻璃珠, 4 $^{\circ}$ C 缓慢旋转孵育 4 h。加入洗脱液, 65 $^{\circ}$ C 烘箱中孵育 30 min, 将蛋白/DNA 复合物从玻璃珠中分离; 加 5 mol/L NaCl 至 Input 和 ChIP 样品中, 65 $^{\circ}$ C 烘箱过夜解交联后加入 RNase A, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 利用 PCR 产物纯化回收试剂盒 (Qiagen, cat. 28104) 对沉淀下的 DNA 进行回收, 用于后续的 qPCR 检测。每个样品分别取 1 μ L 免疫沉淀纯化 DNA 产物 (ChIP-DNA), 稀释 10 000 倍的基因组 DNA (Input) 及与免疫沉淀反应同步进行未加抗体的纯化产物 (No-Ab) 进行 qPCR 检测, 针对每一个样品同时用组蛋白 H3 抗体进行平行实验, 以对不同样品的免疫沉淀

表 1 qRT-PCR 及 ChIP-PCR 引物

Table 1 Primers for qRT-PCR and ChIP-PCR

Primer name	Forward (5'–3')	Reverse (5'–3')
qRT-PCR		
<i>MtSERK1-RT</i>	CGTCCTCCACATCAAGAACCACT	ATCCCCCACAACAGCCTCAAACCT
<i>Mt-Actin</i>	CAAAAGATGGCAGATGCTGAGGAT	CATGACACCAGTATGACGAGGTCG
ChIP-PCR		
<i>MtSERK1</i> -ChIP- I	GCAAATGCAATGCTAGATGGC	GACTGAAAGATGGAGAGGGGGG
<i>MtSERK1</i> -ChIP- II	ATCTGAGGATGGAGGAGACAAA	CCAACAACAACCAAAAAAACA
<i>MtSERK1</i> -ChIP- III	AATGCTTTCTTGCTTGCTATCT	TCATCTTTAATTGCAGCCTTAA
<i>MtSERK1</i> -ChIP- IV	GAACCTTTACAGCAATAACATCAC	TTCTTTTCTCAAACACGCCAACA
<i>MtSERK1</i> -ChIP- V	AGGCTCTCCTCCATTTTCTCC	CCTCCAGCTATTGCTCCAGTT
<i>MtSERK1</i> -ChIP- VI	ATCCCGATCTTAAACCAACTA	GCCTTCAAGCATTCTCACTACA

产物进行均一化处理，以 *MtACTIN2* 作为内参。用于检测不同区域的 qPCR 引物见表 1，qRT-PCR 程序同上。每个样品组蛋白修饰水平均以免疫沉淀后该样品 DNA 丰度占 Input 的百分比来表示^[23]，实验设置 3 次生物学重复。

2 结果与分析

2.1 蒺藜苜蓿愈伤组织诱导及离体器官再生

将灭菌后的叶片外植体置于含有 4 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L BAP 的 SH3a 培养基上 (图 1A)，暗培养诱导 1 周后，叶片逐渐膨胀且玻璃化 (图 1B)，培养 3 周后逐渐诱导出肉质薄壁、微微呈浅绿的愈伤组织 (图 1C)，期间将外植体转移到新的 SH3a 培养基中，继续诱导至 6 周，愈伤组织颜色发生变化，绿色渐渐消失，变为浅白色，有大量的颗粒状的胚状结构产生 (图 1D)。挑选胚性较好愈伤组织，将其转移到 SH9a 分化培养基上，光下培养进一步诱导离体器官的再生。在 SH9a 培养基上 1 周后，愈伤组织又逐渐变成浅绿色 (图 1E)，继续培养 3 周后，在愈伤组织不同部位出现了大量的绿点状结构 (图 1F，箭头所示)，这些绿点状结构即

为新建立的干细胞组织中心，将来分化出不同的器官，6 周后愈伤组织上出现大量的丛生芽 (图 1G)。

2.2 蒺藜苜蓿离体再生过程中 *MtSERK1* 的表达分析

为了解 *MtSERK1* 在蒺藜苜蓿离体再生过程中的表达情况，利用 qRT-PCR 的方法分析了 *MtSERK1* 在上述不同诱导条件和时间培养物中的表达，结果表明：在对照 (Mock) 中 *MtSERK1* 的表达水平很低 (图 2)，当 SH3a 诱导培养 1 周后，*MtSERK1* 的表达明显受到诱导 (图 2)，随着培养时间的延长，在 SH3a 诱导培养 3 周到 6 周后，该基因的表达水平亦逐步升高，分别上调 3.4 和 5.3 倍 (图 2)。继续在 SH9a 分化培养基培养 1 周后，该基因的表达水平与 SH3a 诱导培养 6 周的培养物相比并没有显著变化，且这种表达水平一直维持到 SH9a 分化培养 3 周以后，然而当在 SH9a 培养基上分化培养 6 周后，*MtSERK1* 的表达显著下降 (图 2)。上述结果表明，*MtSERK1* 可能主要参与了蒺藜苜蓿愈伤组织诱导过程中的体细胞胚胎的发生或胚性细胞的建立，而在离体器官再生作用中并不显著。

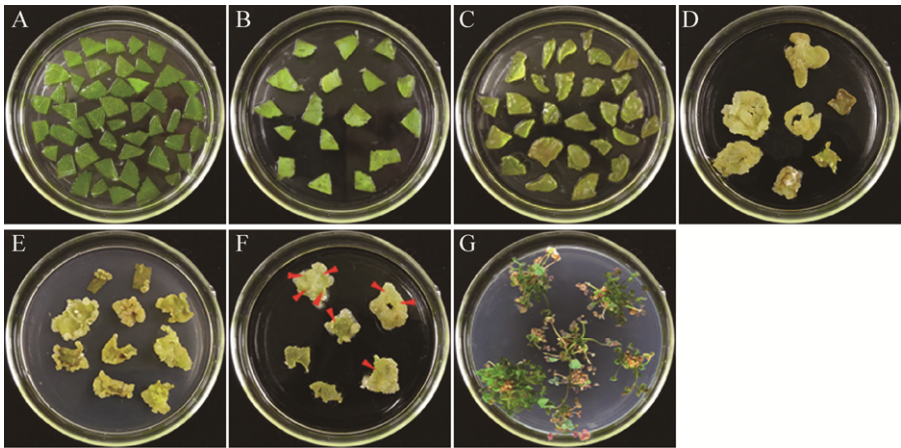


图 1 蒺藜苜蓿愈伤组织诱导及离体器官再生过程
Fig. 1 The *in vitro* callus induction and organogenesis of *Medicago truncatula*. (A) Mock: leaf explants. (B–D) Leaf explants cultured on SH3a for one week (B), three weeks (C) and six weeks (D). (E–G) Calli cultured on SH9a for one week (E) and three weeks (F); (G) Shoots formed from the calli cultured on SH9a for six weeks. The red arrow shows the newly established center of stem cell tissue.

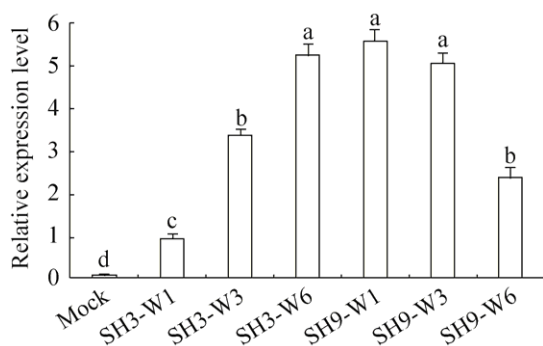


图2 蒺藜苜蓿离体再生过程中 *MtSERK1* 的表达分析
Fig. 2 Expression of *MtSERK1* during *in vitro* callus induction and organogenesis of *Medicago truncatula*. Mock: leaf explants; SH3-W1, SH3-W3, SH3-W6: leaf explants cultured on SH3a for one week, three weeks and six weeks; SH9-W1, SH9-W3, SH9-W6: Calli cultured on SH9a for one week, three weeks and six weeks. Different letters represent the significant differences between different samples at $P < 0.05$.

2.3 蒺藜苜蓿离体再生过程中 *MtSERK1* 的组蛋白修饰状态分析

组蛋白修饰类型非常丰富,当然不同类型的修饰对染色体结构以及基因表达的影响也不尽相同。通常情况下 H3K9me2 甲基化与基因的转录抑制有关,相反 H3K4me3 及 H3K9ac 修饰则调控了基因的转录激活^[24]。通过对 *MtSERK1* 的基因序列分析发现,该基因存在 11 个外显子、10 个内含子 (图 3A)。因此,我们利用 ChIP-qPCR 方法对 *MtSERK1* 在蒺藜苜蓿体细胞胚胎发生以及离体器官再生过程中其启动子区 (检测区 I: ATG 上游-713 bp--607 bp); 基因 5'端 (检测区 II: ATG 上游-8 bp-ATG 下游 184 bp, 检测区 III: ATG 下游 445 bp-664 bp); 基因中部区域 (检测区 IV: ATG 下游 1 643 bp-1 933 bp, 检测区 V: ATG 下游 2 377 bp-2 571 bp); 基因的 3'末端区域 (检测区 VI: ATG 下游 3 753 bp-3 880 bp) 这 6 个区域的组蛋白 H3K9me2、H3K4me3 和 H3K9ac 修饰水平进行了检测。从组蛋白修饰类型分析: 在所有的 6 个检测区中均没有发现 H3K9me2 修饰的明

显变化。在含有 4 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L BAP 的 SH3a 培养基上诱导培养 1 周的培养物 SH3-W1 中,位于该基因 5'端的检测区 II 中 H3K4me3 修饰水平明显升高 (与对照相比升高 2.4 倍) (图 3C),继续诱导培养至 3 周后,在 SH3-W3 中检测区 III 和检测区 III 中的 H3K4me3 修饰水平相比对照分别升高 2.8 和 3.1 倍 (图 3C, D),并且随着诱导培养时间的延长以及培养条件的改变,这两个区域的 H3K4me3 修饰水平并没有显著变化 (图 3C, D)。另外在该基因的 3'末端区域,在 SH3a 诱导培养 3 周的培养物 SH3-W3 中,均检测到 H3K4me3 和 H3K9ac 修饰水平的明显升高,在 SH3a 诱导培养 6 周的培养物 SH3-W6 中达到最高,继而在 SH9a 分化培养条件下修饰水平逐渐降低 (图 3G)。从组蛋白修饰区域分析,位于启动子区的检测区 I 以及位于基因中部的检测区 IV 和 V 中均没有发现任何上述 3 种组蛋白修饰的改变 (图 3B、E、F); 位于基因 5'端的检测区 II 和 III,无论在愈伤组织诱导阶段还是在离体器官再生阶段均发生了高水平的 H3K4me3 修饰 (图 3C, D); 位于基因 3'端的检测区 VI 在 SH3a 诱导培养 3 周以后均发生了高水平的 H3K4me3 和 H3K9ac 修饰,且诱导培养 6 周后修饰水平达到最高,继续在 SH9a 培养基上分化培养后其 H3K4me3 和 H3K9ac 修饰水平则均逐渐降低 (图 3G)。

3 讨论

植物的离体再生是指离体的组织或细胞在体外培养条件下重新形成新器官或个体的过程,是对植物进行生物工程改造的重要途径^[25]。一般认为植物离体再生存在直接和间接两种途径,前者不经过愈伤组织阶段,而后者需要先脱分化形成愈伤组织,然后经过体细胞胚胎发生,最后产生离体器官或个体。通常情况下,植物离体再生过程主要经历以下 3 个阶段: 1) 细胞对外源激素作

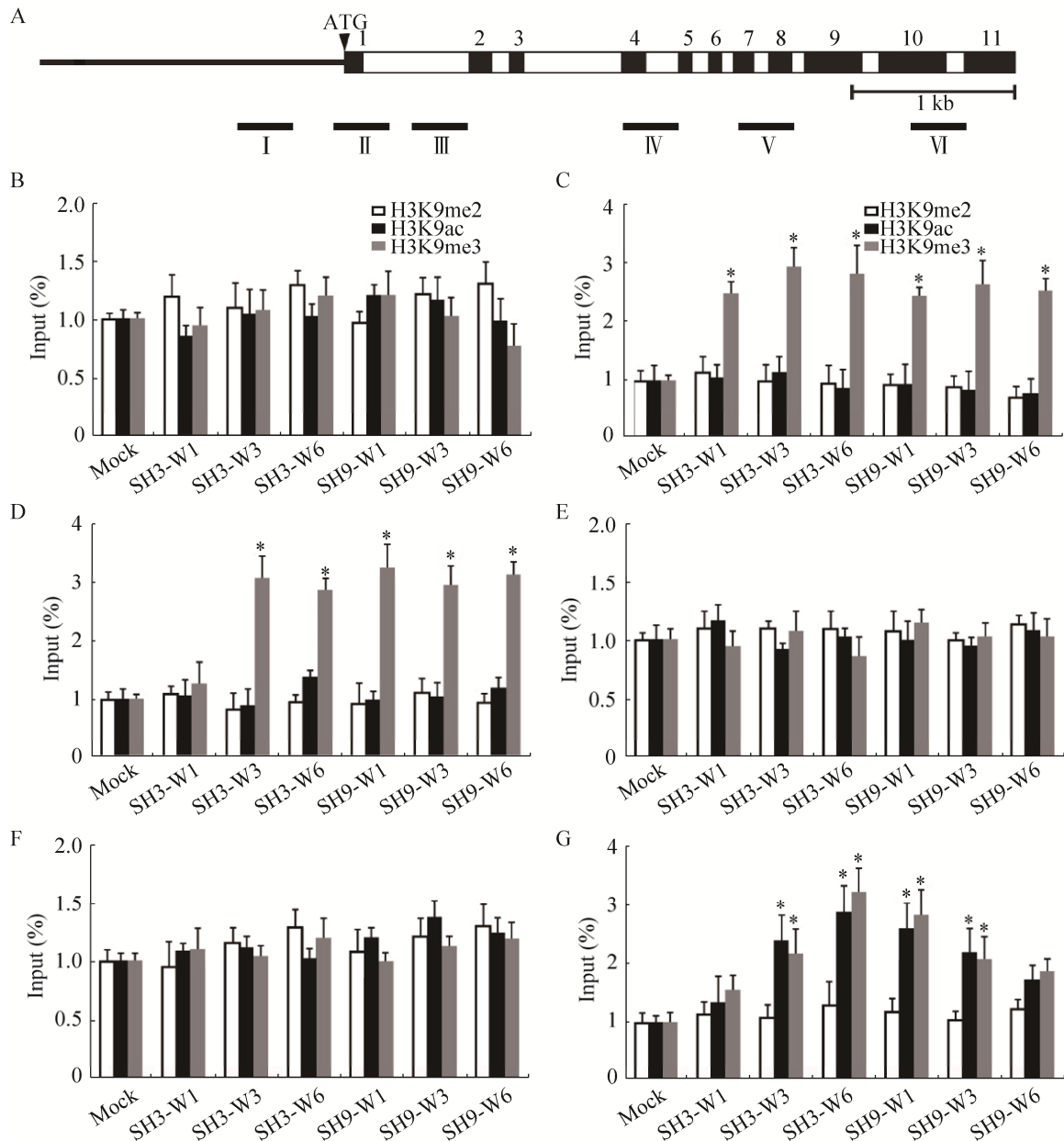


图3 蒺藜苜蓿离体再生过程中 *MtSERK1* 的组蛋白修饰状态分析

Fig. 3 Analysis of histone modification in *MtSERK1* during *Medicago truncatula* organogenesis *in vitro*. (A) The structure of *MtSERK1*, the black frame shows the exons, the white frame shows the introns, the black line shows the promoter, the short thick line shows the detected area of histone modification. (B–G) The histone modification level of *MtSERK1* in region I (B), II (C), III (D), IV (E), V (F) and VI (G). Mock: Leaf explants; SH3-W1, SH3-W3, SH3-W6: Leaf explants cultured on SH3a for one week, three weeks and six weeks; SH9-W1, SH9-W3, SH9-W6: Calli cultured on SH9a for one week, three weeks and six weeks. * Represent the significant differences between different samples at $P < 0.05$.

出识别、经脱分化逐渐形成胚性愈伤组织；2) 胚性愈伤组织在激素的作用下形成体细胞胚；3) 体细胞胚进行再分化形成不同的器官^[1]。本研究中，蒺藜苜蓿叶外植体经含有 4 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L

BAP 的 SH3a 诱导培养 1 周后叶片明显膨胀且玻璃化 (图 1B)，随着诱导时间延长至 3 到 6 周后，产生大量胚性细胞团 (图 1C, D)，在此过程中 *MtSERK1* 的表达明显上调，且在 SH9a 诱导 1 周

的培养物中表达水平达到最高 (图 2)。当 SH3a 诱导 6 周的愈伤组织转移到不含激素的分化培养基 SH9a 上 3 周后,愈伤组织逐渐形成大量新的干细胞组织中心 (图 1F),继续分化培养 6 周后出现大量的丛生芽 (图 1G),而在此过程 *MtSERK1* 的表达则逐渐下降 (图 2)。上述结果表明 *MtSERK1* 的确与离体条件下胚性愈伤组织的建立有关,这与前期的研究结论是一致的^[9]。Nolan 等研究表明,*MtSERK1* 的表达受生长素和细胞分裂素的诱导^[9]。文中在含有生长素和细胞分裂素的 SH3a 培养基上的胚性愈伤组织诱导阶段,*MtSERK1* 表达明显受到诱导;在不含激素的 SH9a 培养基上进行分化培养时 *MtSERK1* 表达水平则逐渐下降。因此我们推测 *MtSERK1* 参与离体胚性愈伤组织的建立可能与生长素和细胞分裂素的响应有关,但这需要进一步的验证。

多项研究证实组蛋白修饰参与了植物离体组织或器官的再生过程^[14-18]。本研究对蒺藜苜蓿离体再生过程中 *MtSERK1* 启动子区及基因的 5'端和 3'端等不同区域的组蛋白 H3K9me2、H3K4me3 和 H3K9ac 修饰水平进行了分析。离体再生过程中,*MtSERK1* 在 SH3a 诱导 1 周的培养物中表达开始上调,随着培养时间延长至 6 周,表达水平继续升高,在 SH9a 分化培养基培养 1 周后表达水平达到最高 (图 2)。在此过程中,伴随着 *MtSERK1* 的诱导表达,其 5'端的两个检测区域 (II 和 III) H3K4me3 以及 3'端 H3K4me3 和 H3K9ac 修饰水平均有不同程度升高 (图 3),因此推测 *MtSERK1* 的 5'端及 3'端组蛋白 H3K4me3 和 H3K9ac 修饰水平的变化可能与该基因的转录激活存在相关性。随着在分化培养基 SH9a 上培养时间的延长 (3-6 周),胚性愈伤组织逐渐减少,离体再生器官逐渐出现,*MtSERK1* 的表达逐渐下调,在该过程中 *MtSERK1* 的 5'端两个检测区域 H3K4me3 的修饰水平并没有显著降低,而 3'端组蛋白 H3K4me3 和 H3K9ac 修饰水平则逐渐下降。

推测 *MtSERK1* 的表达调控可能主要受到了其 3'端组蛋白 H3K4me3 和 H3K9ac 修饰的影响,但还要作进一步研究。除上述两个区域外,在其启动子区以及基因的中间序列区并没有检测到上述 3 类组蛋白修饰的变化,表明组蛋白对该基因的修饰具有区域特异性,这种现象与 *WUS* 和 *STM* 在拟南芥离体再生中的组蛋白修饰模式是相似的^[14,16]。综合上述分析,推测 *MtSERK1* 在蒺藜苜蓿离体再生过程胚性愈伤组织的建立中起着关键作用,且其表达激活受到了其特定区域的组蛋白 H3K4me3 和 H3K9ac 修饰的影响。

最近, Li 等通过连续组织培养、再生驯化策略开发了一种高遗传转化效率的棉花新种质 Jin668^[26]。进一步利用多组学研究手段解析了这一现象的表观遗传学基础,发现该棉花种质再生能力的提高与多个体细胞胚胎发生相关基因的低 (去) 甲基化修饰有关。外施 DNA 甲基化抑制剂增加了体细胞胚胎数量,激活了 *WOX11*、*CKX7*、*KNOX2* 等基因表达,促进了体细胞胚胎的发生^[26]。本研究中,我们证实了蒺藜苜蓿离体植株再生关键基因 *MtSERK1* 的组蛋白修饰调控基础,为提高蒺藜苜蓿植株再生效率提供了可行的策略,对于其他低再生效率豆科植物的基因工程改造途径的优化具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Guan CM, Zhang XS. Advances in the molecular mechanism of *in vitro* plant organogenesis. Chin Bull Bot, 2006, 23(5): 595-602 (in Chinese). 关春梅, 张宪省. 植物离体器官发生控制机理研究进展. 植物学通报, 2006, 23(5): 595-602.
- [2] Cheng ZJ, Wang L, Sun W, et al. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by *AUXIN RESPONSE FACTOR3*. Plant Physiol, 2013, 161(1): 240-251.
- [3] Chatfield SP, Capron R, Severino A, et al. Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: using a systems approach to probe early events in

- WUSCHEL*-dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. *Plant J*, 2013, 73(5): 798–813.
- [4] Gallois JL, Nora FR, Mizukami Y, et al. *WUSCHEL* induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes Dev*, 2004, 18(4): 375–380.
- [5] Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, et al. Pattern formation during *de novo* assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development*, 2007, 134(19): 3539–3548.
- [6] Lin QG, Cui BM, Peng M. Advanced study on *SERK* genes family. *Hereditas*, 2007, 29(6): 681–687 (in Chinese).
林庆光, 催百明, 彭明. *SERK* 基因家族的研究进展. *遗传*, 2007, 29(6): 681–687.
- [7] Somleva MN, Schmidt EDL, de Vries SC. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. *Plant Cell Rep*, 2000, 19(7): 718–726.
- [8] Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, et al. The *Arabidopsis Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol*, 2001, 127(3): 803–816.
- [9] Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ. Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root forming and embryogenic cultures. *Plant Physiol*, 2003, 133(1): 218–230.
- [10] Fuchs J, Demidov D, Houben A, et al. Chromosomal histone modification patterns-from conservation to diversity. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(4): 199–208.
- [11] Bode AM, Dong Z. Inducible covalent posttranslational modification of histone H3. *Sci STKE*, 2005, 2005(281): re4.
- [12] Reyes JC, Hennig L, Grissem W. Chromatin-remodeling and memory factors. New regulators of plant development. *Plant Physiol*, 2002, 130(3): 1090–2101.
- [13] Mathieu O, Probst AV, Paszkowski J. Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 2005, 24(15): 2783–2791.
- [14] Su YH, Liu YB, Zhang XS. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Mol Plant*, 2011, 4(4): 616–625.
- [15] Cui HC, Benfey PN. Interplay between *SCARECROW*, GA and Like Heterochromatin Protein 1 in ground tissue patterning in the *Arabidopsis* root. *Plant J*, 2009, 58(6): 1016–1027.
- [16] Schubert D, Primavesi L, Bishopp A, et al. Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *EMBO J*, 2006, 25(16): 4638–4649.
- [17] Chua YL, Channelière S, Mott E, et al. The bromodomain protein GTE6 controls leaf development in *Arabidopsis* by histone acetylation at *ASYMMETRIC LEAVES1*. *Genes Dev*, 2005, 19(18): 2245–2254.
- [18] Song YG, Liu YL, Qiu NW, et al. Involvement of histone modification in regulating *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes during shoot regeneration in *Arabidopsis*. *Biol Plantar*, 2017, 61(1): 197–200.
- [19] Kang Y, Li MY, Sinharoy S, et al. A snapshot of functional genetic studies in *Medicago truncatula*. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1175.
- [20] Cosson V, Eschstruth A, Ratet P. *Medicago truncatula* transformation using leaf explants//Wang K, Ed. *Agrobacterium Protocols*. New York, NY: Springer, 2015, 1223: 43–56.
- [21] Livak KL, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2011, 25(4): 402–408.
- [22] Johnson LM, Cao XF, Jacobsen SE. Interplay between two epigenetic marks: DNA methylation and histone H3 Lysine 9 methylation. *Curr Biol*, 2002, 12(16): 1360–1367.
- [23] López-Galiano MJ, González-Hernández AI, Crespo-Salvador O, et al. Epigenetic regulation of the expression of *WRKY75* transcription factor in response to biotic and abiotic stresses in Solanaceae plants. *Plant Cell Rep*, 2018, 37(1): 167–176.
- [24] Kim JM, To TK, Ishida J, et al. Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(10): 1580–1588.
- [25] Gu RS, Jiang XN, Chen GC. Advance in the studies on mechanism of plant organogenesis *in vitro*. *Chin Bull Bot*, 1999, 16(3): 238–244 (in Chinese).
谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛. 植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展. *植物学通报*, 1999, 16(3): 238–244.
- [26] Li JY, Wang MJ, Li YJ, et al. Multi-omics analyses reveal epigenomics basis for cotton somatic embryogenesis through successive regeneration acclimation (SRA) process. *Plant Biotechnol J*, 2018, doi: 10.1111/pbi.12988.

(本文责编 陈宏宇)