

王 津, 韩 榕. DNA 甲基转移酶赋予拟南芥盐胁迫耐受性[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(5): 1028-1031.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.05.004

## DNA 甲基转移酶赋予拟南芥盐胁迫耐受性

王 津<sup>1</sup>, 韩 榕<sup>2</sup>

(1. 山西师范大学生命科学学院, 山西 临汾 041004; 2. 植物分子与环境胁迫响应山西省高等学校重点实验室, 山西 临汾 041004)

**摘要:** 为了探究 DNA 甲基化修饰在植物响应盐胁迫过程中的作用, 对 DNA 甲基转移酶的突变体在盐胁迫下的表型进行观察, 发现 *drm1drm2cmt3* 三重突变体相较于野生型对盐胁迫更加敏感, 而 *drm1drm2* 双重突变体和 *cmt3* 单突变体相较于野生型对盐胁迫的应答没有明显差异。定量 PCR 结果表明纤维素合成酶 *ATCSLA1* 和 *ATCSLA10* 在野生型中受盐胁迫诱导表达, 而这种诱导表达在三重突变体中明显减弱。以上结果表明, DNA 甲基转移酶可能间接促进纤维素合成酶的表达进而调控纤维素合成的水平, 最终赋予拟南芥盐胁迫的耐受性。

**关键词:** DNA 甲基转移酶; 盐胁迫耐受性; 拟南芥

**中图分类号:** S311 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)05-1028-04

## DNA methyltransferases confer salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*

WANG Jin<sup>1</sup>, HAN Rong<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China; 2. Higher Education Key Laboratory of Plant Molecular and Environmental Stress Response, Linfen 041004, China)

**Abstract:** In order to explore the function of DNA methylation in the process of plant response to salt stress, the phenotype of DNA methyltransferase mutants was observed under salt stress. It was found that *drm1drm2cmt3* triple mutant was more sensitive to salt stress when compared with wild-type, while the *drm1drm2* double mutant and *cmt3* single mutant showed no significant difference. Quantitative PCR results showed that cellulose synthase *ATCSLA1* and *ATCSLA10* were induced by salt stress in wild-type, but the induced expression was weakened visibly in the triple mutant. The above results indicate that DNA methyltransferase may indirectly up-regulate the expression of cellulose synthase, thus regulate the level of cellulose synthesis, and finally confer plant salt stress tolerance.

**Key words:** DNA methyltransferase; salt stress tolerance; *Arabidopsis thaliana*

盐胁迫是影响植物生长和作物产量的主要环境因子之一<sup>[1-2]</sup>。土壤中高浓度盐分对植物的影响具体表现在渗透胁迫、离子毒害、营养失调、氧化应激胁迫、代谢进程改变、细胞膜破坏、基因毒性等方面<sup>[1-6]</sup>。盐胁迫抑制植物生长发育, 降低作物产量,

严重情况下会引起植物的死亡<sup>[7]</sup>。为了抵御盐胁迫和适应周围的环境, 植物通过调控基因表达形成了一系列抵御盐胁迫的应答机制<sup>[8]</sup>。对植物应答盐胁迫机制的研究是改善植物对盐胁迫耐受性的重要环节, 是耐盐作物培育的基础, 具有重要意义。

植物 DNA 甲基化修饰主要发生在 DNA 分子的胞嘧啶上, 可分为 CG 甲基化、CHG 和 CHH 甲基化<sup>[9]</sup>。DNA 甲基转移酶 *MET1*、*DRM1*、*DRM2* 和 *CMT3* 负责将甲基基团转移到 DNA 的胞嘧啶上形成 5-甲基胞嘧啶。其中, *MET1* 主要负责 CG 甲基化修饰<sup>[10-11]</sup>, *CMT3* 主要负责 CHG 甲基化修饰<sup>[12]</sup>,

收稿日期: 2018-12-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671061); 山西省自然科学基金项目(2014011028-5)

作者简介: 王 津(1989-), 女, 河北衡水人, 硕士研究生, 研究方向为植物生理学。(E-mail) jinwang2008@126.com

通讯作者: 韩 榕, (E-mail) hhwsrsl@163.com

*DRM1* 和 *DRM2* 主要负责 CHH 甲基化修饰<sup>[13-14]</sup>。在植物中存在一条经典的介导 DNA 甲基化的调控通路,即 RNA 介导 DNA 甲基化(RdDM)通路。RdDM 通路中 Pol IV、RDR2、DCL3 在 siRNA 合成过程中发挥作用,siRNA 结合 AGO4 并且与 Pol V 形成复合体,进而引导 *DRM2* 对与 siRNA 同源的 DNA 区域进行甲基化修饰,甲基化的 DNA 又可以引导组蛋白修饰酶进行组蛋白修饰,从而导致该区域异染色质化,抑制基因表达<sup>[15-16]</sup>。目前的研究结果表明,植物基因启动子位置的 DNA 甲基化可以通过 RdDM 通路产生<sup>[17]</sup>,对抑制基因表达起重要作用。拟南芥中 *DRM1* 是 *DRM2* 的同源蛋白,*DRM1* 和 *DRM2* 共同负责 CHH 甲基化的修饰。*CMT3* 是植物中特有的 DNA 甲基转移酶<sup>[16]</sup>,除了负责 CHG 甲基化修饰,也负责一些基因位点的 CHH 甲基化<sup>[12,14]</sup>。

已有研究结果表明盐胁迫可以改变基因组范围的 DNA 甲基化水平,暗示植物可能通过调节 DNA 甲基化的水平进而调控基因表达,对盐胁迫环境进行响应<sup>[18-19]</sup>。本研究对拟南芥 DNA 甲基转移酶突变体在盐胁迫下的表型进行分析,探究 DNA 甲基化修饰在植物响应盐胁迫过程中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料和试剂

拟南芥野生型种子和突变体 *ddc* (*drm1drm2cmt3*)、*drm1drm2* 和 *cmt3* 的种子背景均为哥伦比亚生态型(Col-0),*ddc* (CS16384)、*drm1drm2* (CS16383) 和 *cmt3* (CS16392) 购自 Arabidopsis Biological Resource Center。植物培养所用 MS 培养基、NaCl、Phytigel 购自 Sigma 公司, RNA 提取试剂和定量 PCR 所用试剂购自 TaKaRa 公司, RNase-free DNase 购自 Promega 公司,反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 盐胁迫下拟南芥相对鲜质量的测定 将种子用 75% 的乙醇消毒 2 min,用灭菌水洗 3 次,4 ℃ 处理 3 d,然后将种子垂直于 1/2 MS 培养基上,在长日照培养箱(22 ℃,16 h 光照;18 ℃,8 h 黑暗)培养 5 d。将拟南芥幼苗分别转移到 1/2 MS 培养基和含有不同 NaCl 浓度的 1/2 MS 培养基上。在长日照培养箱生长 10 d 后测量植株鲜质量,以不含 NaCl 的培养基上生长的野生型和突变体的鲜质量分别作为

100%,含 NaCl 的培养基上生长的野生型和突变体的鲜质量分别与其进行比较。

1.2.2 盐胁迫下拟南芥存活率的测定 将消毒后的拟南芥种子 4 ℃ 处理 3 d 后,将种子垂直于 1/2 MS 培养基上,在长日照培养箱培养 5 d,然后将拟南芥幼苗分别转移到 1/2 MS 培养基和含有不同 NaCl 浓度的 1/2 MS 培养基上。在长日照培养箱生长 10 d 后统计存活率,当植株的叶片全部黄化时,视为已经死亡。

1.2.3 盐胁迫下基因表达水平的测定 将 11 d 垂直生长的幼苗分别用 1/2 MS 的液体培养基和包含 200 mmol/L NaCl 的液体培养基处理 4 h,收集材料进行 RNA 提取。将 RNA 进行 DNA 酶消化,之后反转录成 cDNA,以 *Actin* 作为内参进行定量 PCR,引物序列见表 1。

表 1 定量 PCR 引物序列

Table 1 Sequence of primers for quantitative PCR

引物名称	引物序列
<i>Actin</i> -F	5'-GGTGTTCATGGTTGGTATGGGTC-3'
<i>Actin</i> -R	5'-CCTCTGTGAGTAGAACTGGGTGC-3'
<i>RD29A</i> -F	5'-AGCAGCACCCAGAAGAAGTTG-3'
<i>RD29A</i> -R	5'-GTTCTAGCTCGTCATCATCATCATC-3'
<i>COR47</i> -F	5'-AAGTGAAACCTCAAGAGACAACGA-3'
<i>COR47</i> -R	5'-CAGCTAACTCCGGTTCAGAGATC-3'
<i>ATCSLA1</i> -F	5'-TTGAAGGAGGAAGACTAAACGAATG-3'
<i>ATCSLA1</i> -R	5'-CCCATAGATCAGGCCATAGAGTG-3'
<i>ATCSLA10</i> -F	5'-GATTTCATGCTCTGCCTTCCTCTC-3'
<i>ATCSLA10</i> -R	5'-CCACCAAACACTTGAATAAGGG-3'

## 2 结果与分析

### 2.1 拟南芥 *ddc* 突变体对盐胁迫的敏感性

为了探究 DNA 甲基化修饰在植物响应盐胁迫过程中的作用,对 DNA 甲基转移酶的三重突变体 *ddc* 在盐胁迫下的表型进行观察。在含有 80 mmol/L 和 100 mmol/L NaCl 培养基上,相较于野生型,*ddc* 突变体的相对鲜质量显著降低;在 1/2 MS 培养基上野生型和 *ddc* 突变体的存活率没有明显差异,在 120 mmol/L 和 150 mmol/L NaCl 浓度下 *ddc* 突变体的存活率明显低于野生型(图 1)。以上结果表明 *ddc* 突变体是一个对盐胁迫敏感的突变体,表明 DNA 的甲基化修饰参与植物盐胁迫应答过程,并

正向调节植物对盐胁迫的耐受性。

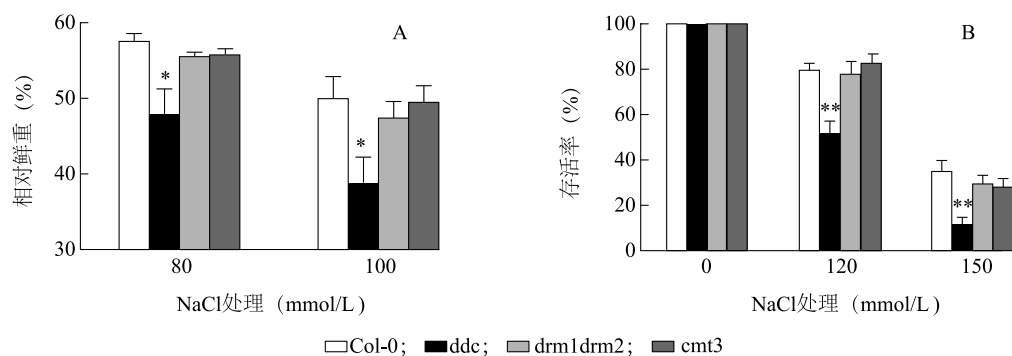
## 2.2 DRM1、DRM2 和 CMT3 对植物盐胁迫应答的调控

为了进一步研究拟南芥 *ddc* 三重突变体中引起盐胁迫敏感表型的缺失基因,对拟南芥 *drm1drm2* 双重突变体和 *cmt3* 单突变体进行了盐胁迫下的表型分析。在一系列盐浓度 (80 mmol/L、100 mmol/L、120 mmol/L 和 150 mmol/L NaCl) 胁迫下, *drm1drm2* 和 *cmt3* 突变体的相对鲜质量和存活率相较于野生型没有明显差异 (图 1), 说明 *DRM1*、*DRM2* 和 *CMT3* 共同参与了植物响应盐胁迫应答的

调控。

## 2.3 *ddc* 突变体中纤维素合成酶的盐诱导表达变化

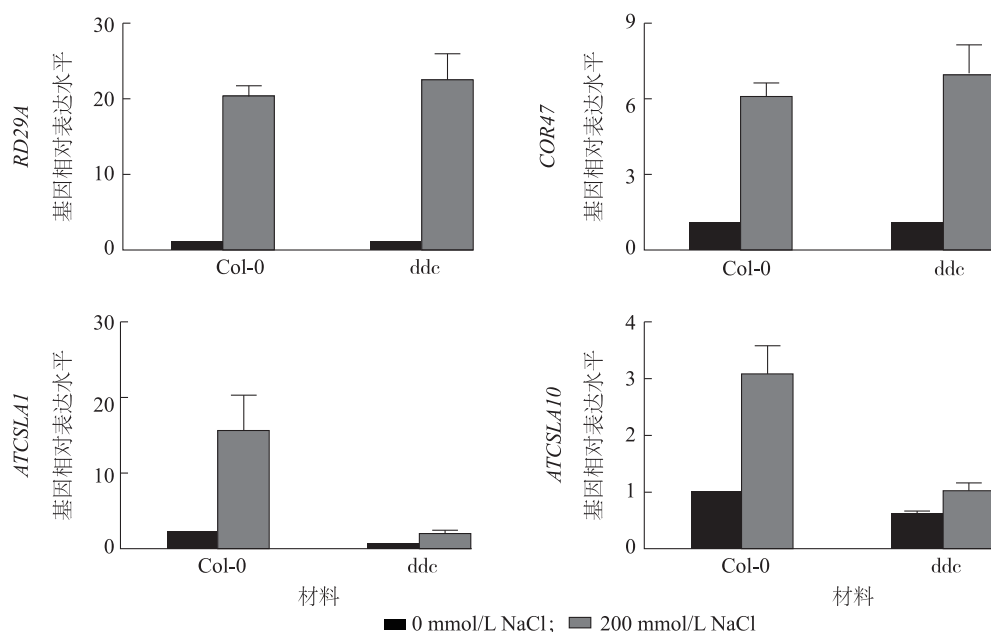
纤维素是细胞壁的主要成分,对于维持细胞形态和抵御外界胁迫具有重要作用。通过定量 PCR 发现,纤维素合成酶 *ATCSLA1* 和 *ATCSLA10* 在野生型中受盐胁迫诱导表达,这种诱导表达在 *ddc* 突变体中明显减弱,而盐胁迫诱导表达基因 *RD29A* 和 *COR47* 在野生型和 *ddc* 突变体中的表达没有明显差异 (图 2)。以上结果暗示 DNA 甲基转移酶可能通过间接促进纤维素合成酶的表达进而调控纤维素合成的水平,最终赋予拟南芥盐胁迫的耐受性。



A: 相对鲜质量; B: 存活率。Col-0: 哥伦比亚生态型; *ddc*: 三重突变体 (*drm1drm2cmt3*); *drm1drm2*: 双重突变体; *cmt3*: 单突变体。

图 1 拟南芥 *ddc*、*drm1drm2* 和 *cmt3* 突变体盐胁迫下的表型分析

Fig.1 Phenotype analysis of *ddc*, *drm1drm2* and *cmt3* mutants of *Arabidopsis thaliana* under salt stress



Col-0: 哥伦比亚生态型; *ddc*: 三重突变体 (*drm1drm2cmt3*)。

图 2 拟南芥野生型和 *ddc* 突变体中盐胁迫诱导基因的表达

Fig.2 Expression of salt stress induced genes in wild-type and *ddc* mutant of *Arabidopsis thaliana*

### 3 讨 论

本研究通过对 DNA 甲基转移酶突变体在盐胁迫下的表型分析发现, *DRM1*、*DRM2* 和 *CMT3* 共同参与植物应答盐胁迫的调控,并赋予植物盐胁迫的耐受性。已有研究结果表明,盐胁迫可以改变基因组范围的 DNA 甲基化修饰水平<sup>[18-19]</sup>。同时,RdDM 通路中 *AGO4* 基因和 Pol IV 的亚基 *NRPD2* 基因的突变导致拟南芥对热胁迫耐受性的降低,暗示热胁迫下基因转录水平的调控依赖于 RdDM 通路的完整性<sup>[20]</sup>。拟南芥 *MYB74* 转录因子,在盐胁迫下的转录水平受到 RdDM 通路的调节,盐胁迫可以降低 24-nt siRNAs 的丰度,进而降低 *MYB74* 基因启动子位置 CHH 甲基化修饰水平,最终导致 *MYB74* 表达水平的升高,过表达 *MYB74* 的株系相较于野生型对盐胁迫更加敏感<sup>[21]</sup>。以上结果表明,植物通过 DNA 甲基化水平的变化进而调控基因表达,是响应和适应胁迫环境的重要途径。

已有报道表明,当植物暴露在盐胁迫环境下,纤维素合成酶伴侣的基因活性增加,进而维持胁迫状态下纤维素合成酶的活性,维持纤维素的合成,促进植物适应盐胁迫环境<sup>[22]</sup>。本研究中我们发现,纤维素合成酶 *ATCSLA1* 和 *ATCSLA10* 在野生型中受盐胁迫诱导表达,而这种诱导表达在 *ddc* 突变体中明显减弱。*ddc* 突变体相较于野生型对盐胁迫更加敏感的表现可能是由于 DNA 甲基转移酶的缺失,无法间接促进纤维素合成酶的表达,进而降低了纤维素合成的水平,最终表现为对盐胁迫更加敏感。因此,本研究结果为进一步探究 DNA 甲基化修饰参与环境胁迫响应奠定了基础,为培育耐盐作物新品种提供了新的参考和依据。

#### 参考文献:

- [1] 赵东晓,董亚茹,杜建勋,等. 盐碱胁迫对三个品种桑树种子萌发的影响[J]. 山东农业科学,2017,49(7):49-55.
- [2] 顾闽峰,王乃顶,王 军,等.盐胁迫对不同藜麦品种发芽率及幼苗生长的影响[J].江苏农业科学,2017,45(22):77-80.
- [3] HASEGAWA P M, BRESSAN R A, ZHU J K, et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2000, 51: 463-499.
- [4] MUNNS R. Comparative physiology of salt and water stress[J]. Plant, Cell & Environment, 2002, 25(2): 239-250.
- [5] ZHU J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53: 247-273.
- [6] 周丽霞,曹红星,刘艳菊. 海水胁迫对椰子幼苗生理特性的影响[J]. 南方农业学报, 2018, 49(10): 2013-2019.
- [7] MUNNS R, TESTER M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 651-681.
- [8] SAHU P P, PANDEY G, SHARMA N, et al. Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation[J]. Plant Cell Reports, 2013, 32(8): 1151-1159.
- [9] COKUS S J, FENG S, ZHANG X, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning[J]. Nature, 2008, 452(7184): 215-219.
- [10] KINOSHITA T, MIURA A, CHOI Y, et al. One-way control of *FWA* imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation[J]. Science, 2004, 303(5657): 521-523.
- [11] ZHANG X, JACOBSEN S E. Genetic analyses of DNA methyltransferases in *Arabidopsis thaliana*[J]. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2006, 71: 439-447.
- [12] LINDROTH A M, CAO X, JACKSON J P, et al. Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation[J]. Science, 2001, 292(5524): 2077-2080.
- [13] CAO X, JACOBSEN S E. Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing[J]. Current Biology, 2002, 12(13): 1138-1144.
- [14] CAO X, JACOBSEN S E. Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99 (Suppl 4): 16491-16498.
- [15] HAAG J R, PIKAARD C S. Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing[J]. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 2011, 12(8): 483-492.
- [16] LAW J A, JACOBSEN S E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals[J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(3): 204-220.
- [17] HE X J, CHEN T, ZHU J K. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals[J]. Cell Research, 2011, 21(3): 442-465.
- [18] FERREIRA L J, AZEVEDO V, MAROCO J, et al. Salt tolerant and sensitive rice varieties display differential methylome flexibility under salt stress[J]. PLoS ONE, 2015, 10(5): e0124060.
- [19] WANG M, QIN L, XIE C, et al. Induced and constitutive DNA methylation in a salinity-tolerant wheat introgression line[J]. Plant & Cell Physiology, 2014, 55(7): 1354-1365.
- [20] POPOVA O V, DINH H Q, AUFSATZ W, et al. The RdDM pathway is required for basal heat tolerance in *Arabidopsis*[J]. Molecular Plant, 2013, 6(2): 396-410.
- [21] XU R, WANG Y, ZHENG H, et al. Salt-induced transcription factor *MYB74* is regulated by the RNA-directed DNA methylation pathway in *Arabidopsis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(19): 5997-6008.
- [22] ENDLER A, KESTEN C, SCHNEIDER R, et al. A mechanism for sustained cellulose synthesis during salt stress[J]. Cell, 2015, 162(6): 1353-1364.

(责任编辑:张震林)