

两个推测的染色质重塑腺苷三磷酸酶基因功能冗余地调控拟南芥种子和胚胎发育

李从从, 赵军锋, 高英杰, 崔素娟*

河北师范大学生命科学院分子细胞生物学实验室, 石家庄050024

摘要: 种子及胚胎发育是被子植物个体发育的重要起始阶段, 相关调控基因的阐明将有助于认识种子及胚胎发育的分子机制。预测同源基因 *CHR12* 和 *CHR23* 编码拟南芥依赖于 ATP 的染色质重塑核心组分——腺苷三磷酸酶。T-DNA 插入缺失突变体鉴定、遗传杂交及转基因实验表明, 两个基因同时缺失阻滞种子的正常发育; 胚胎发育进程显微观察表明, 与野生型及各自单缺失突变体相比, 双重缺失突变体的胚胎发育停滞到了心形胚后期或鱼雷胚早期。这表明 *CHR12* 和 *CHR23* 在拟南芥种子及胚胎发育过程中功能冗余地发挥着重要调控作用。

关键词: 拟南芥; *CHR12/23*; 种子和胚胎发育

Two Putative Chromatin-Remodeling ATPases Play Redundant Roles in Seed and Embryo Development of *Arabidopsis*

LI Cong-Cong, ZHAO Jun-Feng, GAO Ying-Jie, CUI Su-Juan*

Institute of Molecular Cell Biology, College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China

Abstract: The research on the key regulating genes will help to detect the molecular mechanism in development of seed and embryo, the first stage of angiosperm ontogeny. Two highly homologous genes, *CHR12* and *CHR23*, were predicted to code chromatin-remodeling core ATPase in *Arabidopsis*. The data, from T-DNA inserted mutants, genetic cross and transgenic rescue experiments, indicated that *chr12chr23*, double loss-of-function mutants of *CHR12* and *CHR23*, resulted in seed defect. Further microscopical observation about the process of embryo development showed that the embryo of *chr12chr23* only develop into heart-stage and early torpedo-stage. All these data suggest *CHR12* and *CHR23* play redundant roles in the developmental process of *Arabidopsis* seed and embryo.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *CHR12/23*; seed and embryo development

开花植物生活史中种子占有重要地位, 而胚胎是种子发育的关键。双子叶模式植物拟南芥胚胎的发育主要包括双受精到原胚阶段、球形胚到心形胚的转换阶段及器官的生长和成熟阶段 (Bowman和Floyd 2008; Zhang和Ogas 2009)。前两个阶段主要是胚胎形态发生, 大多数的细胞处于高度分裂分化的状态, 形成子叶原基、下胚轴、根和芽的顶端分生组织; 在器官生长和成熟阶段, 主要通过细胞扩张来形成成熟的弯曲子叶胚。已有研究报道, 植物激素、众多的转录因子及转录辅调节因子, 如依赖于 ATP 的染色质重塑复合体组分等, 在胚胎及种子的发育过程中发挥着重要作用 (Zhang和Ogas 2009; Agarwal等2011)。

依赖于 ATP 的染色质重塑复合体是利用 ATP 水解释放的能量来改变 DNA 和组蛋白间联系的一

类复合体, 参与了信号通路和以染色质为基础控制的转录、复制、修复和重组等基本生命过程 (Klochender-Yeivin等2002; Martens和Winston 2003; Roberts和Orkin 2004; Smith和Peterson 2005)。拟南芥基因组中分析推测至少有42个基因编码 SNF2-like ATPase 亚基, 据已有研究及同源分析比对, 它们可能作为转录辅因子或表观调控因子参与植物众多的发育过程 (Mlynarova等2007; Wagner 2003)。

拟南芥基因组中分析预测的 SWI2/SNF2 类

收稿 2012-10-26 修定 2012-11-01

资助 国家自然科学基金项目(31171170)和河北省科技厅重点基础研究项目(10960121D)。

* 通讯作者(E-mail: cuisujuan@mail.hebtu.edu.cn; Tel: 0311-80787535)。

ATPase的编码基因包括*BRM*、*SPLAYED (SYD)*、*CHR12*和*CHR23*四个成员, 其中已有研究报道*BRM*、*SYD*各自的功能缺失突变体具有多种发育表型(Farrona等2004; Hurtado等2006; Kwon等2006; Su等2006; Wagner和Meyerowitz 2002), 二者可分别单独或共同调控发育关键基因的表达(Kwon等2005, 2006; Kwon和Wagner 2007; Bezhani等2007)。*CHR12*或*CHR23*单缺失突变体在正常培养条件下, 并没有明显的发育表型, 但*CHR12*参与植物逆境条件下生长停滞的调节(Mlynarova等2007)。本文借助T-DNA插入突变体及转基因研究表明*CHR12*及*CHR23*在拟南芥种子及胚胎发育过程中冗余地发挥作用。

材料与方法

1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Columbia-0 (Col-0)野生型种子和*chr12* (*salk_015562*)、*chr23-1* (*salk_057856*)及*chr23-2* (*salk_139883*)突变体种子从ABRC种子库(<http://www.arabidopsis.org>)订购。农杆菌GV3101菌种为本实验室保存, p1300 35S::

*MH*双元载体由孙颖教授惠赠。

引物合成(表1)及DNA测序由上海生工(<http://www.sangon.com>)完成。

2 方法

2.1 拟南芥种子消毒及种植

拟南芥种子在75%酒精中消毒处理1 min, 无菌水洗3次, 置于4 °C暗中低温处理2 d, 之后播种到MS固体培养基上, 于光照培养箱22 °C, 16/8 h光周期(L/D), 130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下培养。6~7 d后, 移栽到营养土和蛭石(1:1)混合的培养土中, 相同温度和光照条件的培养室中继续培养。

2.2 DNA提取及T-DNA插入的PCR鉴定

以拟南芥1~2片新鲜叶片为材料, 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)方法提取基因组DNA (Murray和Thompson 1980)。根据<http://signal.salk.edu>网站提供的突变体中T-DNA插入位置, 设计PCR正向及反向引物FP和RP (表1), 一般采用2对引物FP和RP、RP和LBb1.3分别进行PCR反应, 产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离, 仅FP和RP引物对扩出目的条带的为野生型, 2对引物均可扩出目的条带的为杂合体, 仅RP和LBb1.3引物对扩出目的条带的为

表1 文中所用的引物

Table 1 Primers used in this paper

基因或突变体	引物序列(5'→3')	引物用途
<i>CHR23 CDS</i>	GGACTAGTATGGTGAAGCAGCTACAAG; GGACTAGTGTTCGTTTACTTCCTTTTGAG	<i>CHR23</i> 编码序列扩增, 转基因回复载体构建
<i>CHR23 promoter</i>	CGAGCTCATGGTGAAGCAGCTACAAG; CCCAAGCTTCCTCAGTTTCGTTTACTTCCTTTTG	<i>CHR23</i> 启动子序列扩增, 转基因回复载体构建
Salk_057856 (<i>chr23-1</i>)	FP: TTGTTAGATCCGATACACCCTC; RP: TTCCTGCAAATCTTCACCTC; LBb1.3: ATTTTGCCGATTTCGGAAC	T-DNA插入 <i>CHR23</i> 纯杂合鉴定
Salk_139883 (<i>chr23-2</i>)	FP: GGATCTTAGTTCACACCTTG; RP: ATGGGGTTGGAGATTCTTTTG LBb1.3: ATTTTGCCGATTTCGGAAC	T-DNA插入 <i>CHR23</i> 纯杂合鉴定
Salk_015562 (<i>chr12</i>)	FP: ATATCCAACGCCGCTTATC; RP: TCCTCTTGGCAGTTTCAATC; LBb1.3: ATTTTGCCGATTTCGGAAC	T-DNA插入 <i>CHR12</i> 纯杂合鉴定
<i>CHR12</i>	P1: ATGGTGGCTCAGCAGCTCCAAG; P2: CCTCAACTTTTCAGCACGGGTAGC	T-DNA插入突变体中 <i>CHR12</i> 转录本的鉴定
<i>CHR23</i>	P3: GCAACAGCGATAGAGAGATTGG; P4: GGATCTTAGTTCACACCTTG	T-DNA插入突变体中 <i>CHR23</i> 转录本的鉴定
<i>CHR23-MH</i>	P5: GGATCCATTGAAGAAGTAATA; NOST-R: AGACCGGCAACAGGATTC	转基因回复株系的鉴定
<i>ACTIN2</i>	F: AGGCACCTCTTAACCCTAAAGC; R: GGACAACGGAATCTCTCAGC	模板量参照基因

T-DNA插入的纯合体。

2.3 RNA的提取及RT-PCR

以拟南芥幼苗或花序组织为材料,按照Takara公司RNAiso说明书提取总RNA;参照Progema公司RNase-Free DNase说明书进一步去除残余的基因组DNA,参照Takara RNA LA PCR Kit说明书步骤将RNA反转录成cDNA,以cDNA为模板,以基因特异的正向及反向引物进行PCR反应,产物经琼脂糖凝胶电泳分离。

2.4 转基因恢复载体构建及拟南芥的遗传转化

以拟南芥基因组DNA为模板,利用带有*Pst*I和*Xba*I酶切位点的特异引物(见表1)扩增*CHR23*启动子区1 931 bp的序列,将*CHR23*自身启动子置换p1300 35S::MH中的35S启动子得到中间载体p1300 *CHR23*::MH。以拟南芥花序组织cDNA为模板,通过特异引物对(表1) PCR扩增*CHR23*阅读框序列,利用*Spe*I及其同尾酶*Xba*I进行酶切并连接入中间载体p1300 *CHR23*::MH,得到目标双元载体p1300 *CHR23*::*CHR23*-MH。

将目标双元载体及空载体对照转入农杆菌GV3101,采用浸花法转化拟南芥(Clough和Bent 1998),利用含有50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 潮霉素的MS平板筛选抗性苗,根据抗性苗分离比及分子水平鉴定,确定转入基因的拷贝数及内外源基因的表达情况。

2.5 蛋白免疫印迹

取适量的植物材料液氮中充分研磨至粉末,溶于聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)样品缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 加热5~10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 15 000 \times g离心5 min,取上清进行8%分离胶的非连续SDS-PAGE,采用半干电转移方式将胶上的蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。将PVDF膜放入磷酸盐缓冲液PBS (3.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 、0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 、1.3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 、135 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl , pH 7.4)配置的5%脱脂奶粉中,4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。之后在含5%脱脂奶粉稀释5 000倍的一抗中孵育,37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h, PBS洗膜至少3次,10 000倍稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗中孵育1 h, PBST (PBS缓冲液加0.05% Tween 20, pH 7.4)洗膜3次,发光显色液(supersignal west dura extended duration substrate)中显色, X-光胶片曝光,洗片。图片用Adobe Photoshop CS软件整理。

2.6 胚胎透明化处理及显微观察

将不同时期的野生型和突变体的角果剖开,取出种子分别用透明液(水合氯醛:水:甘油=8 g:2 mL:1 mL)黑暗处理3~24 h,然后在Nikon光学相差(DIC)显微镜下观察并采用数码成像系统进行显微照相,图像采用Adobe Photoshop CS进行整理。

实验结果

1 *CHR12*和*CHR23*的T-DNA插入缺失突变体鉴定及表型观察

首先,我们对ABRC突变体库(<http://abrc.osu.edu/>)订购的*CHR12* (*At3g06010*)和*CHR23* (*At5g19310*)的T-DNA插入种子进行了基因型及转录本的鉴定(图1-A~C),分别得到了全长转录本缺失的突变体*chr12* (salk_015562)、*chr23-1* (salk_057856)和*chr23-2* (salk_139883)。其中*chr12* T-DNA插入到*CHR12*基因的第4个外显子上(图1-A); *chr23-1* T-DNA插入到*CHR23*基因的第1个外显子上;

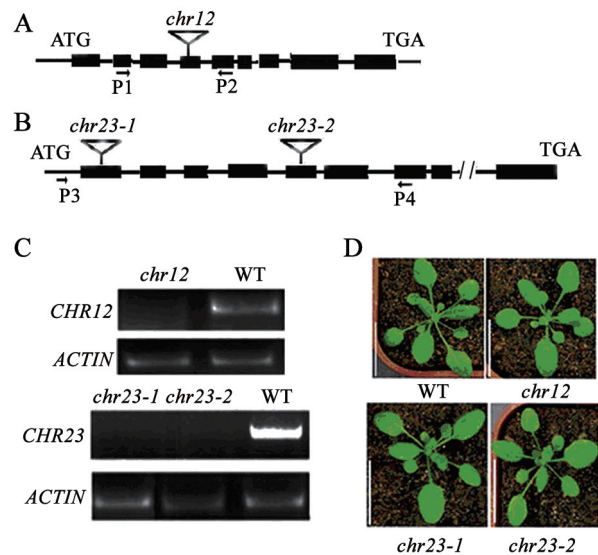


图1 *chr12*和*chr23*单缺失突变体的鉴定

Fig.1 Identification of *chr12* or *chr23* single mutant

A~B: *CHR12*和*CHR23*基因结构及T-DNA插入位点示意图,三角代表*chr12*或*chr23-1/2* T-DNA的插入位置,黑框代表外显子,中间连接的直线代表内含子,两头的直线代表非翻译区, P1~P2和P3~P4分别为鉴定*CHR12*和*CHR23*转录本所用的特异引物, ATG及TGA分别代表翻译起始及终止密码子; C: RT-PCR检测*chr12*、*chr23-1*、*chr23-2*突变体及野生型WT中*CHR12*或*CHR23*转录本, *ACTIN*为模板量对照; D: 野生型WT、*chr12*、*chr23-1/2*突变体小苗移至土里生长21 d时的表型。标尺为2 cm。

chr23-2 T-DNA插入到*CHR23*基因的第5个外显子上(图1-B)。DNA水平鉴定表明,得到了*chr12*、*chr23-1*及*chr23-2*的纯合插入突变体;为了检测T-DNA插入是否影响了*CHR12*、*CHR23*的转录表达,我们分别利用T-DNA插入位点两侧的外显子上的特异引物(P1-P2和P3-P4),借助RT-PCR对转录本进行了鉴定(图1-C),结果表明T-DNA插入影响了*CHR12/23*基因的正常表达。同时对3个单突变体分别进行了表型观察(图1-D),在相同的长日照培养条件(16 h光照, 8 h黑暗)下, *chr12*和*chr23-1/2*均未显示出和野生型明显不同的表型。

2 *chr12*与*chr23-1/2*遗传杂交后代的DNA水平鉴定

正常培养条件下, *chr12*和*chr23-1/2*各自的单突与野生型相比没有明显的表型(图1)。分析推测*CHR12*与*CHR2*编码蛋白的氨基酸序列的同源性超过60%,二者可能存在功能冗余。因此以*chr12*和*chr23-1*或等位突变体*chr23-2*互为父母本分别进行了遗传学杂交, DNA水平鉴定杂交F₁代均为2个基因的杂合体,表明杂交成功,但在F₁自交多达453株F₂代植株中, DNA水平鉴定各基因型植株数比值为*CHR12*_ *CHR23*_ : *CHR12*_ *chr23**chr23*: *chr12chr12* *CHR23*_ : *chr12chr12* *chr23chr23*=(47+61+52+116):(36+54):(46+41):0=276:90:87:0≈9:3:3:0,其中没有检测到*chr12chr12 chr23-1chr23-1*或*chr12chr12 chr23-2chr23-2*双重纯合突变体植株,但其他基因型植株数目比值符合孟德尔分离及自由组合遗传定律。遗传杂交实验表明*chr12chr23-1/2*双重纯合突变体可能在发育早期致死。

3 *CHR23*转基因恢复*chr12chr23-1*双纯合突变体植株

构建*CHR23*自身启动子驱动的*CHR23*编码序列与标签6MYC7HIS融合的双元载体p1300 *CHR23*::*CHR23-MH* (图2-A), 将其转化农杆菌GV3101, 通过浸花法转化拟南芥*chr12chr12 chr23-1+*基因型背景植株, 潮霉素抗性筛选以及DNA水平的鉴定表明, 转入单拷贝*CHR23*::*CHR23-MH*基因的至少3株T₂代幼苗具有*chr12chr23-1*双重纯合体背景(图2-B)。我们分别选取3个不同的转基因株系6-7、17-23和22-8进行了RNA、蛋白水平的检测, RT-PCR结果显示*CHR12*转录本是完全缺失的;内外源*CHR23*均可扩增的引物及仅扩增外源转入

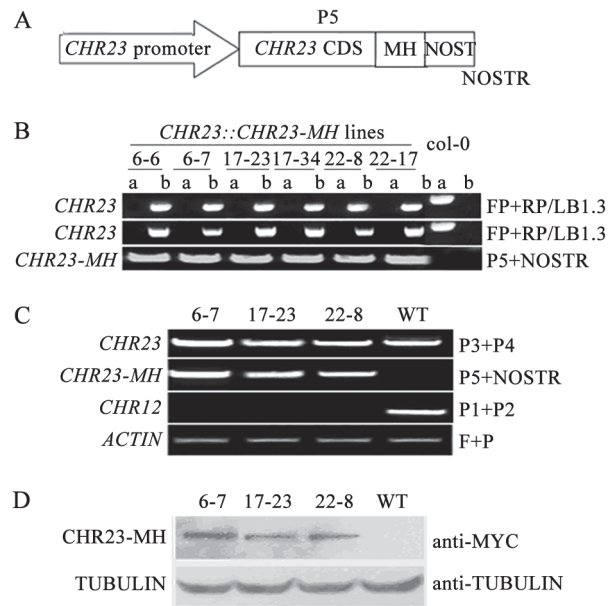


图2 转基因回复株系的分子水平鉴定

Fig.2 Identification of transgenic rescue lines in molecular level

A: p1300 *CHR23*::*CHR23-MH*载体示意图, 其中箭头表示1 931 bp的*CHR23*启动子序列, 方框分别为*CHR23*编码序列、MH融合标签序列和NOSTR终止子序列。P5和NOSTR示检测外源*CHR23-MH*转录本所用的引物位置; B: DNA水平检测转基因株系的基因型。泳道a所用的引物是*CHR23*或*CHR12*的FP和RP, 泳道b所用的引物是RP和LBb1.3。P5和NOSTR扩增外源转入的*CHR23-MH*融合基因; C: RT-PCR鉴定野生型WT及3个不同转基因株系中内源*CHR12*和*CHR23*及外源转入的*CHR23-MH*的转录本, 引物P1~P4见图1-A~B, F+R引物用于模板量对照基因*ACTIN2*扩增; D: 蛋白免疫印迹检测野生型WT及3个转基因株系中*CHR23-MH*融合蛋白的表达, anti-MYC单抗为一抗, anti-TUBULIN检测各泳道蛋白载样量。

的*CHR23-MH*引物的RT-PCR扩增产物量基本相当, 表明所检测的转基因阳性苗中仅存在外源转入的*CHR23-MH*转录本(图2-C), 同时免疫印迹检测也表明, 外源转入的*CHR23-MH*蛋白确实表达了(图2-D)。转基因恢复实验进一步表明*chr12chr23-1*双重纯合突变体致死是由于*AtCHR12*和*AtCHR23*两个基因功能的同时缺失造成的。

4 *chr12chr23*双纯合突变体种子存在缺陷

由于得不到*chr12chr23-1/2*双重纯合缺失突变体的植株, 我们分别观察了野生型、*chr12chr12 chr23-1/2+*或*chr23-1/2chr23-1/2 chr12+*一纯一杂突变体植株的单角果所收获的成熟干种子及其萌发情况(图3和表2)。与野生型(Col-0)植株所收获

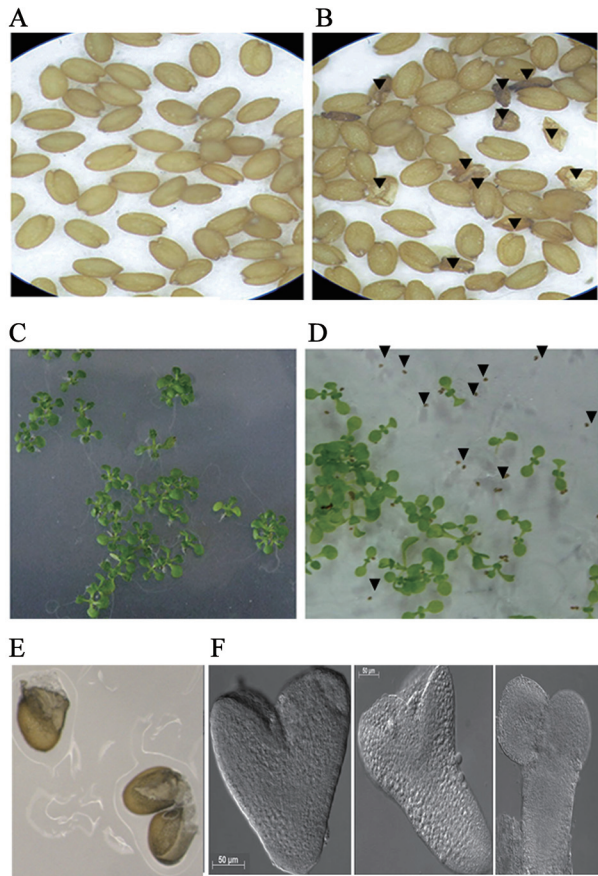


图3 双重突变体种子形态及萌发情况

Fig.3 The morphology and germination of double mutant

A: 野生型Col-0植株所收获的成熟种子; B: *chr12chr23+*成熟种子; C: 野生型种子萌发后13 d小苗; D: *chr12chr23+*种子萌发后13 d小苗及未萌发种子, 图中黑三角指示缺陷种子; E: D中不萌发种子的放大; F: 推测的成熟的*chr12chr23*种子的胚胎。标尺为50 μm 。

的成熟种子相比, 一纯一杂突变体植株所收获的种子中有皱缩、不饱满的缺陷种子出现, 且统计分析表明正常饱满的种子和缺陷种子数目比例接近于3:1 (图3-A~B, 表2)。当将这些种子分别在MS培养基平板上萌发时, 观察到野生型种子几乎全部能够萌发, 但是一纯一杂突变体所收获的种子近25%的种子不能萌发(图3-C~D)。进一步将培养13 d后仍不能萌发的种子放大(图3-E), 虽然种子已经吸水膨胀, 种皮涨破, 但胚根并没有长出, 人为去除涨破的种皮, 可观察到停滞在心形胚期或鱼雷胚期的胚胎(图3-F)。而*chr12chr23*双纯合突变体背景下的转基因恢复株系所收获种子中没有观察到不正常的种子。这表明, 一纯一杂突变体后

代中皱缩、不饱满的种子是因为胚胎发育缺陷导致其不能形成正常有活性的种子, 进而得不到*chr12chr23*双纯合突变体植株。

为进一步探究*chr12chr23*双突种子发育出现缺陷的时期, 我们进一步观察了各种突变体、转基因恢复株系及野生型植株早期幼嫩角果中的种子发育情况(图4), 结果表明在野生型和各个单突*chr12*、*chr23-1/2*的不同发育阶段角果中, 受精后12 d以前的种子没有观察到明显发育异常, 但当观察受精后12 d的角果中的种子时, 观察到*chr12chr23/+*或*chr23 chr12/+*植株的角果中存在两种不同类型的种子, 一种和野生型角果中的种子一样, 形态及颜色看不出异常; 另一种呈现出白色的种子, 且经过统计发现呈现白色的种子和绿色种子的比例大约为1:3, 且在外源转入*CHR23*的转基因株系中不存在这种现象(表2)。

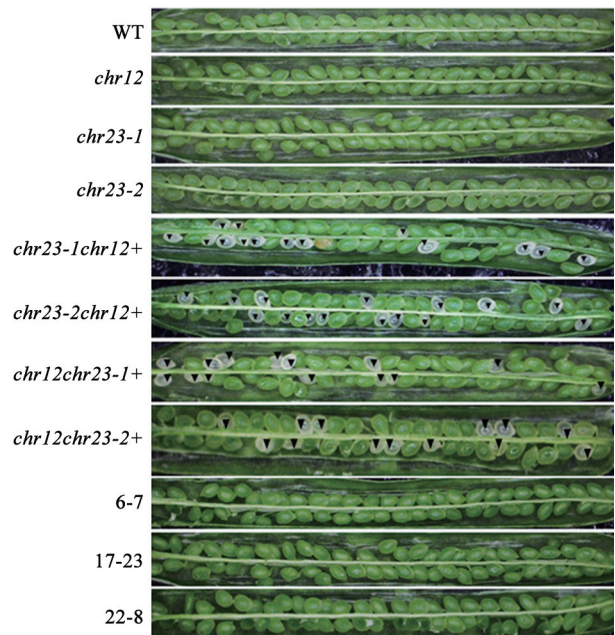


图4 不同基因型植株角果中种子的表型

Fig.4 Phenotype of developing seeds in silique of wild type and mutants

野生型WT、*chr12*和*chr23-1/2*单突及双突及3个转基因恢复株系6-7、17-23和22-8的受精后12 d角果中的种子, 黑三角指示白色异常种子。

5 *chr12chr23*双突胚胎发育存在缺陷

为了进一步研究*chr12chr23-1/2*的双重纯合突变体种子发育问题最早出现在哪个时期, 我们对

表2 不同基因型植株受精后12 d种子发育状况统计

Table 2 The statistics of different seeds in different genotypes plant at 12 DAF

基因型或株系	观察种子总数	正常种子数	异常种子数	异常种子频率	理论频率	χ^2	P值
WT	945	945	0	0	0		
<i>chr12</i>	926	926	0	0	0		
<i>chr23-1</i>	869	869	0	0	0		
<i>chr23-2</i>	918	918	0	0	0		
<i>chr12chr23-1/+</i>	1 044	791	243	0.233	0.250	1.65	>0.05
<i>chr12chr23-2/+</i>	2 020	1 540	480	0.237	0.250	1.64	>0.05
<i>chr23-1chr12/+</i>	717	542	175	0.244	0.250	0.12	>0.05
<i>chr23-2chr12/+</i>	1 165	885	280	0.240	0.250	0.55	>0.05
6-7	523	523	0	0	0		
17-23	519	519	0	0	0		
22-8	624	624	0	0	0		

野生型、*chr12chr23-1/2*双重纯合突变体及转基因恢复株系胚胎的发育进程进行了显微观察(图5)。受精后3 d (3 DAF), 不同基因型背景的胚胎看不出明显的差别; 6 DAF时, 野生型胚胎发育到心形胚时期, 而此时*chr12chr23-1/2*胚胎还在球形胚时期; 8 DAF时, 野生型及转基因恢复株系胚胎发育到了拐棍胚时期, *chr12chr23-1/2*胚胎仅发育到了心形胚时期; 到 10 DAF时, 野生型及转基因恢复株系胚胎发育到了成熟的弯曲子叶胚时期, *chr12chr23-*

*1/2*胚胎大多数仍处于心形胚期少数处于鱼雷胚早期。而在转基因恢复植株6-7的种子中胚胎发育进程与野生型一致, 这说明*CHR12*和*CHR23*同时功能丧失会导致胚胎发育阻滞。

讨 论

*CHR12*与*CHR23*是拟南芥中两个同源性很高的推测的SWI/SNF染色质重塑核心酶, 文献报道(Mlynarova等2007)及我们的观察均表明正常生长条件下, *CHR12*和*CHR23*各自的T-DNA插入功能缺失突变体在营养阶段还是生殖阶段均没有观察到明显的表型, 两个基因分别位于3号和5号染色体上, 因此我们借助遗传杂交应该很容易获得双纯合缺失突变体, 但经过对大量杂交后代基因型的鉴定没有得到二者的双重纯合缺失突变体, 当将*CHR23::CHR23-MH*转入*chr12chr23-1/+*背景植株, 后代中筛选到了具有*chr12chr23-1*双纯合突变体背景的植株幼苗。种子、角果及胚胎发育进程的观察表明, *chr12chr23-1*或*chr12chr23-2*胚胎发育存在缺陷, 不能收获具有萌发活性的成熟种子, 这说明*CHR12*与*CHR23*功能冗余的调控着拟南芥胚胎的发育。另外, 刚刚在线发表的美籍宾西法尼亚大学Doris研究组的工作也报道了相似的结果(Sang等2012)。

序列同源分析推测, 与酵母、多细胞动物及人类中同源的拟南芥SWI/SNF染色质重塑ATPase包括*SYD*、*BRM*、*CHR12*和*CHR23*四个成员。研究表明, 当只缺失*SYD*或*BRM*时, 会导致拟南芥出

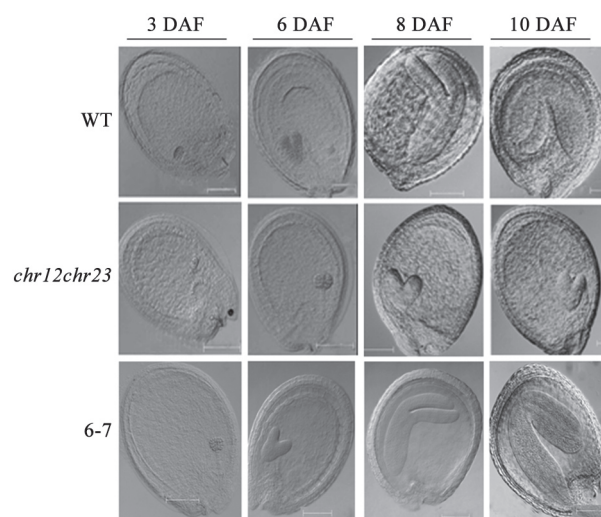


图5 不同基因型胚胎发育时间进程的显微图

Fig.5 Micrography of embryo in developing seeds of wild type and mutants

分别从野生型WT、*chr12chr23*或6-7转基因恢复株系受精后3~10 d (3~10 DAF)的角果中将种子分离出来, 经过透明液透明处理后, 光学相差显微镜观察数码照相。标尺为0.1 mm。

现一定比例发育不正常种子,但是各自都能得到纯合突变体,但*syd brm*双重缺失突变体是胚胎致死的,双突胚胎大多停滞在心形胚时期,也有一部分停滞在八细胞时期(Bezhani等2007);本文中我们也观察到*chr12chr23*双重缺失突变体是胚胎致死的,双突胚胎停滞在心形胚后期或鱼雷胚早期。由此说明,对于拟南芥胚胎的发育,4个ATPase缺少任何一个对胚胎的正常发育均不产生致命的影响,但当同时缺少SYD和BRM或CHR12和CHR23时都会导致胚胎致死,这预示着4个ATPase在胚胎发育的不同阶段冗余的发挥着作用,以确保胚胎发育这一个个发育重要阶段的正常进行。既然SYD和BRM或CHR12与CHR23功能冗余的调控着拟南芥胚胎的发育,那么他们是如何影响胚胎发育的呢?这需要进一步深入的研究,以便明确胚胎发育过程如何被SWI/SNF类染色质重塑活性所调控。

参考文献

- Agarwal P, Kapoor S, Tyagi AK (2011). Transcription factors regulating the progression of monocot and dicot seed development. *Bioessays*, 33 (3): 189~202
- Bezhani S, Winter C, Hershman S, Wagner JD, Kennedy JF, Kwon CS, Pfluger J, Su Y, Wagner D (2007). Unique, shared, and redundant roles for the *Arabidopsis* SWI/SNF chromatin remodeling ATPases BRAHMA and SPLAYED. *Plant Cell*, 19 (2): 403~416
- Bowman JL, Floyd SK (2008). Patterning and polarity in seed plant shoots. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 67~88
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16 (6): 735~743
- Farrona S, Hurtado L, Bowman JL, Reyes JC (2004). The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog AtBRM controls shoot development and flowering. *Development*, 131 (20): 4965~4975
- Hurtado L, Farrona S, Reyes JC (2006). The putative SWI/SNF complex subunit BRAHMA activates flower homeotic genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 62 (1-2): 291~304
- Klochender-Yeivin A, Muchardt C, Yaniv M (2002). SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 12 (1): 73~79
- Kwon CS, Chen C, Wagner D (2005). WUSCHEL is a primary target for transcriptional regulation by SPLAYED in dynamic control of stem cell fate in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 19 (8): 992~1003
- Kwon CS, Hibara K, Pfluger J, Bezhani S, Metha H, Aida M, Tasaka M, Wagner D (2006). A role for chromatin remodeling in regulation of CUC gene expression in the *Arabidopsis* cotyledon boundary. *Development*, 133 (16): 3223~3230
- Kwon CS, Wagner D (2007). Unwinding chromatin for development and growth: a few genes at a time. *Trends Genet*, 23 (8): 403~412
- Martens JA, Winston F (2003). Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev*, 13 (2): 136~142
- Mlynarova L, Nap JP, Bisseling T (2007). The SWI/SNF chromatin-remodeling gene AtCHR12 mediates temporary growth arrest in *Arabidopsis thaliana* upon perceiving environmental stress. *Plant J*, 51 (5): 874~885
- Murray MG, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 8 (19): 4321~4326
- Roberts CW, Orkin SH (2004). The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer*, 4 (2): 133~142
- Sang Y, Silva-Ortega CO, Wu S, Yamaguchi N, Wu M-F, Pfluger J, Gillmor CS, Gallagher KL, Wagner D (2012). Mutations in two non-canonical *Arabidopsis* SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases cause embryogenesis and stem cell maintenance defects. *Plant J*, doi: 10.1111/tpj.12009
- Smith CL, Peterson CL (2005). ATP-dependent chromatin remodeling. *Curr Top Dev Biol*, 65: 115~148
- Su Y, Kwon CS, Bezhani S, Huvermann B, Chen C, Peragine A, Kennedy JF, Wagner D (2006). The N-terminal ATPase AT-hook-containing region of the *Arabidopsis* chromatin-remodeling protein SPLAYED is sufficient for biological activity. *Plant J*, 46 (4): 685~699
- Wagner D (2003). Chromatin regulation of plant development. *Curr Opin Plant Biol*, 6 (1): 20~28
- Wagner D, Meyerowitz EM (2002). SPLAYED, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 12 (2): 85~94
- Zhang H, Ogas J (2009). An epigenetic perspective on developmental regulation of seed genes. *Mol Plant*, 2 (4): 610~627