

拟南芥离体器官再生过程中 *CUC1* 的DNA甲基化修饰状态分析

宋玉光, 马宗琪, 邱念伟, 董蔚*

曲阜师范大学生命科学学院, 山东曲阜273165

摘要: 在植物的生长发育过程中, DNA甲基化修饰是影响基因表达的重要调控因子。*CUP-SHAPED COTYLEDON 1* (*CUC1*)是拟南芥离体器官再生的关键基因。本研究采用实时定量PCR (qRT-PCR)和亚硫酸氢盐测序PCR (BSP)技术检测了拟南芥离体器官再生过程中*CUC1*的表达与其DNA甲基化修饰的动态调控关系,发现*CUC1*的表达与其启动子区和3'端的DNA甲基化修饰水平呈明显负相关性。本研究为深入了解*CUC1*参与拟南芥离体器官再生的可能调控机制提供参考。

关键词: 拟南芥; DNA甲基化; *CUC1*; 离体器官再生

植物的离体器官发生是指离体组织或细胞在组织培养的条件下形成不定芽、根和花芽等器官的过程(谷瑞升等1999)。一般认为离体器官再生存在直接和间接两种途径,前者不经过愈伤组织阶段,而后者需要先形成愈伤组织,然后产生离体器官。植物在离体器官发生过程中主要经历以下3个阶段:(1)细胞对外源激素作出识别,脱分化,获得器官发育潜能;(2)脱分化的细胞在激素的作用下向特定器官发育;(3)器官的形态发生阶段,此过程已不再需要激素诱导(余茂云等2015;叶兴国等2012;关春梅和张宪省2006;Sugiyama 1999)。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)根外植体是研究离体器官再生最为常用的材料。通常情况下,根外植体经富含生长素的愈伤组织诱导培养基(callus induction medium, CIM)预培养,再转移至富含细胞分裂素的芽诱导培养基(shoot induction medium, SIM)后,完成离体器官的再生。但是该过程非常复杂,需要多个基因的协同参与和精准调控(Duclercq等2011;Motte等2014)。随着研究的不断深入,*WUSCHEL* (*WUS*)、*SHOOT REDIFFERENTIATION DEFECTIVE* (*SRD*)、*SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*)、*CUP-SHAPED COTYLEDON 1* (*CUC1*)等离体苗再生关键基因逐步被证实,它们的功能缺失或异常表达均会引起拟南芥离体器官再生能力的改变(Cheng等2013;Chatfield等2013;Gordon等2007;Gallois等2004)。*CUC1*编码一个NAC基因家族的转录因子(Aida等1997),该基因在植物茎顶端分生组织的建立、器官的分化及花器官发育中均起重要的作用(Vroemen等2003)。此外,*CUC1*可通过调控*STM*的表达来决定分生组织中心的建立,体外条件下该基因的异常表达或缺失突变均会使苗端分生组织不能正常形成(Daimon等2003)。

表观遗传是指DNA序列没有发生变化,但基因的表达却发生了可遗传的改变。植物中表观遗传修饰相关的研究主要集中在两个方面:一类是对基因转录前的调控,主要包括DNA甲基化和组蛋白修饰,这些修饰主要通过调控基因的转录活性来影响其表达;另一类为基因的转录后修饰,主要包含siRNA、lncRNA、miRNA等一些非编码RNA的调控,这些非编码RNA可以通过诱导mRNA的降解调节基因的翻译表达(Liu等2010)。DNA甲基化是最主要的一种表观遗传修饰形式,是调控基因表达的重要手段,其对基因的表达调控主要通过以下3种途径:一是基因发生DNA甲基化修饰以后,会使一些转录因子无法正确地识别相应的DNA结合元件进而影响其转录的正常进行;另一种是DNA甲基化修饰可将转录因子的DNA识别序列转变为抑制因子识别序列,从而抑制基因的转录;第三种是DNA甲基化可通过招募染色质重塑因子发生染色质重塑,从而导致基因失活(郑小国等2013)。在植物的生长发育过程中,DNA甲基化参与调控了植物的开花时间、基因组织特异性表达、生物和非生物胁迫响应、细胞分化和重编程等多个过程(Finnegan等2000),例如:低温处理可通过影响拟南芥开花相关基因*FLOWERING LOCUS C* (*FLC*)的DNA甲基化修饰状态而促进其开花(Finnegan等1998);番茄(*Solanum lycopersicum*)

收稿 2016-03-03 修定 2016-05-15

资助 国家自然科学基金青年基金(31300220和31501328)、山东省自然科学基金(2015ZRB01APV和ZR2014CP013)、中国博士后基金面上项目(2015M572000和2014M550366)和曲阜师范大学精品实验及实验室开放基金(SK201501和Jp2015018)。

* 通讯作者(E-mail: Dongwei0207@163.com)。

*COLORLESS NON-RIPENING (CNR)*基因的启动子发生DNA超甲基化时会延迟其果实的成熟并伴随多种表型变异(Manning等2006); 玉米(*Zea mays*)根发育关键基因*GLYCINE-RICH PROTEIN 3 (ZmGRP3)*的组织特异性表达受其启动子区的DNA甲基化修饰影响(Song和Dong 2015); 盐胁迫可使烟草(*Nicotiana tabacum*) *GLYCEROPHOSPHODIESTERASE-LIKE PROTEIN (NtGPD)*发生DNA去甲基化并诱导其表达(Choi和Sano 2007); 玉米分化的细胞中细胞周期相关基因*CYCLIN D4 (CYCD4)*和*ANAPHASE PROMOTING COMPLEX 10 (APC10)*的表达均受DNA甲基化修饰的调控(Candaele等2014)。此外, 已有研究证实在拟南芥离体器官再生过程中干细胞维持分化关键基因*WUS*的表达受DNA甲基化修饰的调控(Li等2011), 而在此过程中*CUC1*是否也受到了DNA甲基化修饰的调控并不清楚。本文通过对拟南芥离体器官再生过程中*CUC1*的表达及DNA甲基化修饰状态进行系统分析, 以期探求两者的相关性, 为深入了解该基因在离体器官再生过程中的表达调控机制提供参考。

材料与方 法

1 植物材料和培养条件

选取饱满的野生型拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]种子(生态型为Col-0)经75%乙醇消毒灭菌后, 点种在MS培养基上(Murashige和Skoog 1962), 4°C春化3 d后放置于组织培养室中进行垂直培养, 培养条件为: 光照培养16 h、暗培养8 h, 光强为3 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的饱和光, 昼/夜温度(25/20)°C, 相对湿度55%。

2 实验方法

2.1 根外植体的诱导及离体苗的获得

将在第1节所述条件下生长7 d的拟南芥小苗根外植体沿下胚轴剪下, 一部分作为对照, 另一部分放置于CIM培养基{B5+0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-(*N*-吗啉)乙磺酸[2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, MES]+2.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)+0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 激动素(kinetin, KT)+0.8% (*m/V*)琼脂粉}上, 培养4 d后, 再转移到SIM培养基[MS+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-异戊烯腺嘌呤(2-isopentenyladenine, 2-IP)+0.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 吲哚-3-乙酸(in-

dole-3-acetic acid, IAA)+0.8% (*m/V*)琼脂粉]上分别继续诱导培养4、7和10 d。

2.2 基因表达分析

选取第2.1节所述在MS培养基上生长7 d的拟南芥根外植体(命名为Mock)、CIM培养基诱导4 d的培养物(命名为CIM4)以及CIM预诱导4 d后SIM培养基继续诱导4、7和10 d的培养物(分别命名为SIM4、SIM7和SIM10), 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并进行反转录cDNA的合成。以反转录后的cDNA为模板, 拟南芥*TUBLIN2*作内参, 通过实时定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测*CUC1*基因的表达情况(引物见表1)。PCR反应体

表1 分析*CUC1*表达及DNA甲基化状态对应引物

Table 1 Primers for analyzing the expression and DNA methylation status of *CUC1*

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>TUBLIN2</i> -F	TTTGTGCTCATCTTGCCACGGAAC
<i>TUBLIN2</i> -R	CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTACC
<i>CUC1</i> -qRT-F	CCTTGACGGCAAATTCTCTT
<i>CUC1</i> -qRT-R	GCCGCTTTTCAGACAAAACCTT
<i>CUC1</i> -BSP I-F	GAAAATGCCAAAAGAAAAACT
<i>CUC1</i> -BSP I-R	TCAAGAGATTTTTACAC
<i>CUC1</i> -BSP II-F	CTAATAAGTTTTGGATTAAATG
<i>CUC1</i> -BSP II-R	AGCATGCAATGCGGTGC
<i>CUC1</i> -BSP III-F	AACGGTTGGGGGAGGCCAAGATT
<i>CUC1</i> -BSP III-R	GTTTTTGAGTGCACTCTGTGA
<i>CUC1</i> -BSP IV-F	CATACCGATGCGAGCTTTCATACA
<i>CUC1</i> -BSP IV-R	TGACGGAGGAGGAGGAA

系(15 μL): 双蒸水(ddH₂O) 5.5 μL 、正向引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、反向引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、模板cDNA 1.0 μL 、SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] (2×) 7.5 μL 。反应条件: 95°C预变性1 min; 95°C变性10 s, 60°C退火15 s, 72°C延伸15 s, 80°C收集荧光值, 循环40次; 65~95°C, 每隔0.5°C做溶解曲线。利用比较C_t法(2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法)分析表达量(Liva和Schmittgen 2001)。做3次生物学重复, 采用SPSS单因素方差分析程序分析实时荧光定量结果, 用Tukey法进行多重比较(徐明飞等2015)。

2.3 甲基化水平检测

利用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法提取第2.1节所述

各培养物的基因组DNA, 各取5 μg 按照DNA重亚硫酸盐转化试剂盒(天根)的方法步骤对其进行处理。对于每个样品, 分别取重亚硫酸盐处理前、后的DNA 1 μL 作为模板, 利用相应的引物(表1)对目的基因的检测区域进行PCR扩增后, 将产物连接到pMD-18T载体(TaKaRa), 然后转化到大肠杆菌, 选取阳性克隆, 送测序公司测序。每个样品测序10个克隆, 利用DNAMAN软件对处理前后各检测区域的测序结果进行比对。测序后未甲基化的胞嘧啶(cytosine, C)将转变成胸腺嘧啶(thymine, T), 而甲基化的C将保持不变。利用这一原理, 通过分析检测区域中的CG、CHG和CHH位点的C变化情况来对其甲基化修饰状态进行分析。

实验结果

1 离体器官再生过程中*CUC1*的表达水平分析

qRT-PCR结果表明, 在MS培养基生长7 d的拟南芥根中, *CUC1*的表达水平较低, 在CIM培养基上诱导培养4 d后其表达上调1.5倍, 当转移到SIM培养基上分别培养4、7和10 d后, 与对照相比其表达分别上调2.7、3.6和3.3倍(图1), 表明在根外植体诱导的离体器官再生过程中, *CUC1*受到诱导明显上调表达。

2 离体器官再生过程中*CUC1*的DNA甲基化修饰状态分析

为了解拟南芥离体器官再生过程中*CUC1*的DNA甲基化修饰状态, 首先通过甲基化修饰位点分析软件MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>) (Li和Dahiva 2002)对*CUC1*的启动子

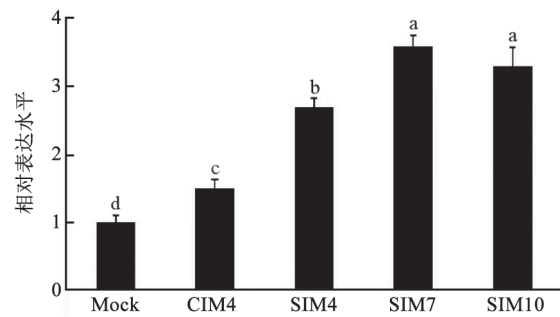


图1 拟南芥离体器官再生过程中*CUC1*的表达分析
Fig.1 The expression of *CUC1* during *A. thaliana* in vitro organogenesis

各柱形上用不同小写字母标识表示差异显著($P < 0.05$)。

区(ATG上游1 500 bp)以及基因序列区的CG位点的含量和分布进行分析, 发现了3个CG富集区(图2-A); 又对上述序列所对应的基因结构进行分析, 发现这些CG富集区分别位于其启动子区及3'末端区域(图2-B)。

根据上述分析结果, 分别对其启动子区(检测区I和II)、基因5'端(检测区III)和3'端(检测区IV) 4个区域(图2-B) CG、CHG和CHH位点的DNA甲基化修饰状态进行了亚硫酸氢盐测序PCR (bisulfite sequencing PCR, BSP)分析。结果(表2)表明, 位于其启动子区的检测区I在对照中C甲基化水平为23.90%, 而在CIM4、SIM4、SIM7和SIM10中其甲基化水平则显著降至11.00%、10.70%、10.70%和10.80%; 检测区II在所有的培养物中均只有极少数的甲基化修饰; 基因5'端的检测区III在对照中有4.17%的C发生了甲基化修饰, 而在CIM4、SIM4、SIM7和SIM10中甲基化水平与对照相比并没有显

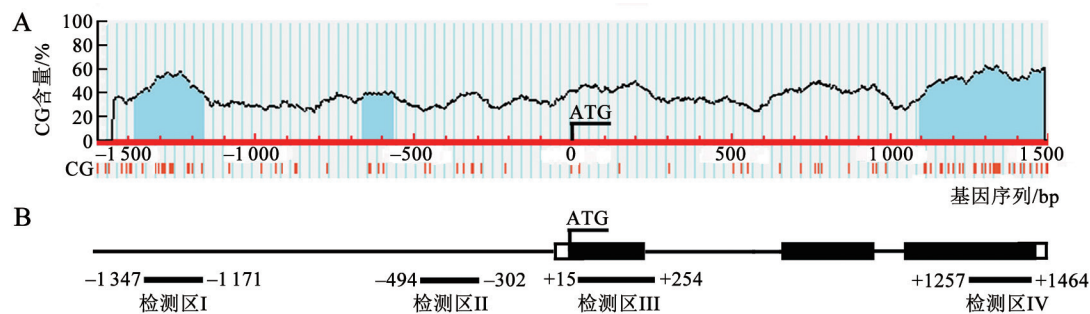


图2 *CUC1*的CG位点分布、基因结构和DNA甲基化检测区域分析

Fig.2 CG site location, gene structure and the DNA methylation-detected regions of *CUC1*

A: 红色短竖线为CG位点, 蓝色区域为CG富集区(200 bp序列内C+G含量>50%, CG观测值/预测值>40%); B: 黑色细线为启动子及内含子序列, 黑色粗线为编码区, 白色粗线为5'或3'端非编码区, ATG为翻译起始位点。

表2 拟南芥离体器官再生过程中*CUC1*的DNA甲基化水平Table 2 The DNA methylation level of *CUC1* during *in vitro* organogenesis in *A. thaliana*

样品名称	C甲基化水平/%			
	检测区I	检测区II	检测区III	检测区IV
Mock	23.90±2.36 ^a	2.77±0.23 ^a	4.17±0.35 ^a	16.25±2.03 ^a
CIM4	11.00±1.28 ^b	2.96±0.11 ^a	4.05±0.49 ^a	15.60±0.34 ^a
SIM4	10.70±1.06 ^b	2.90±0.11 ^a	3.90±1.34 ^a	9.26±0.85 ^b
SIM7	10.70±1.13 ^b	2.74±0.14 ^a	4.01±0.66 ^a	9.20±1.36 ^b
SIM10	10.80±1.21 ^b	2.74±0.28 ^a	4.14±1.04 ^a	8.10±0.91 ^c

C甲基化水平指各检测区中甲基化的C占所有C的百分比。同列数据用不同小写字母标识表示差异显著($P<0.05$), 下表同。

著差异; 3'端的检测区IV在对照和CIM4中C的甲基化水平约为16%, 而在SIM4、SIM7和SIM10中则约为9%。以上结果说明, 在拟南芥离体器官再生过程中, *CUC1*的启动子区(检测区I)及3'端区域发生明显的去甲基化。

3 离体器官再生过程中*CUC1*的DNA甲基化模式分析

分别对*CUC1*基因上述4个检测区域的DNA甲基化模式分析发现, 在对照中检测区域I的CG、CHG和CHH位点的甲基化水平分别为17.70%、2.40%和3.80%, 在CIM4中分别为5.10%、2.30%和3.60%, SIM4中为4.86%、2.30%和3.54%, SIM7中为4.96%、2.16%和3.58%, SIM10中则为4.90%、

2.30%和3.60% (表3), 表明在离体器官再生过程中, *CUC1*检测区I的DNA甲基化修饰水平的降低主要是由于CG位点甲基化水平降低造成的, 而与CHG和CHH位点无关。检测区II和III在CIM4、SIM4、SIM7和SIM10中的甲基化模式均与对照相似(表3和4)。检测区IV在对照和CIM4中的CG、CHG和CHH位点修饰水平相似, 分别约为2.40%、13.00%和0.85%, 而在SIM4、SIM7和SIM10中CG和CHH位点甲基化水平变化并不明显, CHG位点的甲基化修饰水平在CIM4中略有下降而在SIM4、SIM7和SIM10中则明显降低至约6%, 表明检测区IV的甲基化修饰水平的变化主要发生在CHG位点(表4)。

表3 拟南芥离体器官再生过程中*CUC1*启动子区DNA甲基化模式分析Table 3 The DNA methylation pattern of *CUC1* promoter during *in vitro* organogenesis in *A. thaliana*

样品名称	检测区I各C位点甲基化水平/%			检测区II各C位点甲基化水平/%		
	CG	CHG	CHH	CG	CHG	CHH
Mock	17.70±2.40 ^a	2.40±0.21 ^a	3.80±0.23 ^a	0.85±0.35 ^a	0.65±0.25 ^a	1.27±0.60 ^c
CIM4	5.10±1.10 ^b	2.30±0.21 ^a	3.60±0.24 ^a	0.66±0.15 ^a	0.70±0.00 ^a	1.60±0.10 ^b
SIM4	4.86±0.60 ^b	2.30±0.14 ^a	3.54±0.23 ^a	0.60±0.18 ^a	0.60±0.12 ^a	1.70±0.22 ^b
SIM7	4.96±0.35 ^b	2.16±0.16 ^a	3.58±0.30 ^a	0.34±0.30 ^b	0±0 ^b	2.40±0.52 ^a
SIM10	4.90±0.66 ^b	2.30±0.27 ^a	3.60±0.41 ^a	0.34±0.30 ^b	0±0 ^b	2.40±0.46 ^a

表4 拟南芥离体器官再生过程中*CUC1*基因5'和3'端DNA甲基化模式分析Table 4 DNA methylation pattern in the 5' and 3' regions of *CUC1* during *in vitro* organogenesis in *A. thaliana*

样品名称	检测区III各C位点甲基化水平/%			检测区IV各C位点甲基化水平/%		
	CG	CHG	CHH	CG	CHG	CHH
Mock	0.62±0.21 ^c	1.35±0.41 ^a	2.20±0.55 ^a	2.40±0.12 ^a	13.00±0.7 ^a	0.85±0.10 ^a
CIM4	0.88±0.22 ^b	1.20±0.19 ^a	1.97±0.31 ^a	2.30±0.15 ^a	12.40±1.32 ^a	0.90±0.14 ^a
SIM4	0.47±0.16 ^d	1.23±0.26 ^a	2.20±0.43 ^a	2.37±0.20 ^a	6.10±1.04 ^b	0.79±0.23 ^a
SIM7	0.65±0.25 ^c	1.30±0.44 ^a	2.06±0.25 ^a	2.26±0.35 ^a	6.04±0.80 ^b	0.90±0.24 ^a
SIM10	1.14±0.20 ^a	0.80±0.17 ^b	2.20±0.62 ^a	1.55±0.14 ^b	5.65±0.72 ^b	0.90±0.18 ^a

4 *CUC1*的表达与DNA甲基化修饰的关系

在对照中, *CUC1*的表达水平低, 其启动子区(检测区I)及基因3'端(检测区IV)均发生明显的DNA甲基化修饰, 而伴随其在CIM4、SIM4、SIM7和SIM10中上调表达, 上述两个区域的DNA甲基化修饰水平明显降低(图1和表2), 表明在离体苗再生过程中, *CUC1*的表达可能受到了启动子区及基因3'端区域的DNA甲基化修饰的影响。

讨 论

在拟南芥顶端分生组织中, *CUC1*对于分生组织中心的建立和器官原基的形成起着关键的调控作用, 在体外培养条件下它也是离体器官发生的重要调控因子。前期的研究表明, 来源于拟南芥根外植体的离体器官再生过程中, 一系列基因如*WUS*、*CUC1/2*、*CLV3*、*STM*等被激活表达从而调控建立新的组织中心, 进而分化出离体器官或离体苗(Heisler等2005; Mayer等1998)。在本实验中, MS培养基生长7 d的拟南芥根中, *CUC1*的表达水平较低, 而在SIM培养基诱导培养的根外植体中其表达明显上调, 这与其在体外离体器官再生中的调控作用是一致的。Zhang等(2006)通过对拟南芥全基因组的DNA甲基化修饰状态分析发现, 在基因不同部位其DNA甲基化修饰存在很大差异, 这可能与基因的表达调控及正常结构的维持相关。本研究对*CUC1*的DNA甲基化修饰状态进行检测的4个区中, 其启动子区(检测区I)及基因3'端区域存在DNA甲基化修饰, 而在检测区II和III中该修饰水平非常低, 表明DNA甲基化对*CUC1*的修饰也同样存在区域特异性。

在整个离体器官再生过程中, 随着*CUC1*在SIM培养物中的上调表达(图1), 其启动子区(检测区I)和3'端区域的DNA甲基化水平均明显降低(表2), 且与其表达变化呈现明显的负相关特征, 表明上述两个区域的DNA甲基化修饰可能对其表达起着关键性的调控作用。虽然在*CUC1*启动子区的另一个区域(检测区II)和基因5'端也发现存在DNA甲基化修饰, 但其修饰水平非常低(表2), 且在离体器官再生过程中并没有明显变化, 因此推测这两个区域的DNA甲基化修饰可能并不参与其表达的调控。Li等(2011)研究发现, 在拟南芥离体器官再

生过程中, 随着*WUS*的上调表达, 其启动子区发生明显的DNA去甲基化, 这与*CUC1*基因相似, 表明在离体器官再生过程中两者的表达可能均受到了启动子DNA甲基化修饰的调控。另外, 在离体器官再生过程中*CUC1*的3'端区域也发生了明显的DNA去甲基化, 但在*WUS*的3'端并没有检测到DNA甲基化修饰状态的改变, 因此推测DNA甲基化对两者的修饰调控亦具有差异性。

CG位点的甲基化通常与基因的表达调控相关, 而有时CHG或CHH位点的甲基化也同样至关重要(郑小国等2013)。通过对*CUC1*不同检测区域的DNA甲基化模式分析发现, 在离体器官再生过程中, 其启动子区(检测区I) CG位点的DNA甲基化水平在对照中为17.70%, 在CIM4、SIM4、SIM7和SIM10中则明显下降, 而CHG和CHH位点的DNA甲基化水平并没有明显变化(表3); 其3'端区CHG的DNA甲基化水平在对照中为13.00%, 在CIM4、SIM4、SIM7和SIM10中则依次降低, 而CG和CHH位点的DNA甲基化水平并没有明显变化(表4), 因此推测, 在离体器官再生过程中*CUC1*的表达变化可能是通过其启动子区CG位点和3'端区CHG的甲基化修饰状态的改变来调控的。

参考文献

- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell*, 9 (6): 841–857
- Candaele J, Demuyneck K, Mosoti D, Beemster GTS, Inzé D, Nelissen H (2014). Differential methylation during maize leaf growth targets developmentally regulated genes. *Plant Physiol*, 164 (3): 1350–1364
- Chatfield SP, Capron R, Severino A, Penttila PA, Alfred S, Nahal H, Provart NJ (2013). Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: using a systems approach to probe early events in *WUS-CHEL*-dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. *Plant J*, 73 (5): 798–813
- Cheng ZJ, Wang L, Sun W, Zhang Y, Zhou C, Su YH, Li W, Sun TT, Zhao XY, Li XG, et al (2013). Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant Physiol*, 161 (1): 240–251
- Choi CS, Sano H (2007). Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol Genet Genomics*, 277 (5): 589–600
- Daimon Y, Takabe K, Tasaka M (2003). The *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes promote adventitious shoot formation on calli.

- Plant Cell Physiol, 44 (2): 113–121
- Duclercq J, Sangwan-Norreel B, Catterou M, Sangwan RS (2011). *De novo* shoot organogenesis: from art to science. Trends Plant Sci, 16 (11): 597–606
- Finnegan EJ, Genger RK, Kovac K, Peacock WJ, Dennis ES (1998). DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. Proc Natl Acad Sci USA, 95 (10): 5824–5829
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (2000). DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. Curr Opin Genet Dev, 10 (2): 217–223
- Gallois JL, Nora FR, Mizukami Y, Sablowski R (2004). *WUSCHEL* induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. Genes Dev, 18 (4): 375–380
- Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P, Meyerowitz EM (2007). Pattern formation during *de novo* assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. Development, 134 (19): 3539–3548
- Gu RS, Jiang XN, Guo ZC (1999). Advances in the studies on the mechanism of plant organogenesis *in vitro*. Chin Bull Bot, 16 (3): 238–244 (in Chinese with English abstract) [谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛(1999). 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, 16 (3): 238–244]
- Guan CM, Zhang XS (2006). Advances in the molecular mechanism of *in vitro* plant organogenesis. Chin Bull Bot, 23 (5): 595–602 (in Chinese with English abstract) [关春梅, 张宪省(2006). 植物离体器官发生控制机理研究进展. 植物学通报, 23 (5): 595–602]
- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA, Meyerowitz EM (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. Curr Biol, 15 (21): 1899–1911
- Li LC, Dahiya R (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. Bioinformatics, 18 (11): 1427–1431
- Li W, Liu H, Cheng ZJ, Su YH, Han HN, Zhang Y, Zhang XS (2011). DNA methylation and histone modifications regulate *de novo* shoot regeneration in *Arabidopsis* by modulating *WUSCHEL* expression and auxin signaling. PLoS Genet, 7 (8): e1002243
- Liu C, Lu F, Cui X, Cao X (2010). Histone methylation in higher plants. Annu Rev Plant Biol, 61: 395–420
- Livak KL, Schmittgen TD (2011). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25 (4): 402–408
- Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. Nat Genet, 38 (8): 948–952
- Mayer KFX, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. Cell, 95 (6): 805–815
- Motte H, Vereecke D, Geelen D, Werbrouck S (2014). The molecular path to *in vitro* shoot regeneration. Biotechnol Adv, 32 (1): 107–121
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15 (3): 473–497
- She M, Yin G, Zhao P, Du L, Zhang P, Ye X (2015). Research progress on molecular mechanism of plant regeneration from cultured tissues *via* organogenesis. Sci Technol Rev, 33 (2): 91–98 (in Chinese with English abstract) [余茂云, 殷桂香, 赵佩, 杜丽璞, 张平治, 叶兴国(2015). 植物组织培养过程中器官发生途径再生植株分子机制研究进展. 科技导报, 33 (2): 91–98]
- Song YG, Dong W (2015). Possible involvement of DNA methylation in regulating *ZmGRP3* tissue-specific expression in maize. Biol Plant, 59 (4): 671–676
- Sugiyama M (1999). Organogenesis *in vitro*. Curr Opin Plant Biol, 2 (1): 61–64
- Vroemen CW, Mordhorst AP, Albrecht C, Kwaaitaal MACJ, de Vries SC (2003). The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. Plant Cell, 15 (7): 1563–1577
- Xu MF, Wu CX, Cang T, Chen LP, Chen LZ, Cai LM, Li G (2015). Twenty pesticides-induced transcription expression of three genes of *GH3* family in soybean. Plant Physiol J, 51 (12): 2188–2194 (in Chinese with English abstract) [徐明飞, 吴长兴, 苍涛, 陈丽萍, 陈列忠, 蔡磊明, 李岗(2015). 大豆*GH3*家族三个成员对20种农药的转录响应. 植物生理学报, 51 (12): 2188–2194]
- Ye XG, She MY, Wang K, Du LP, Xu HJ (2012). Identification, cloning, and potential application of genes related to somatic embryogenesis in plant tissue culture. Acta Agron Sin, 38 (2): 191–201 (in Chinese with English abstract) [叶兴国, 余茂云, 王轲, 杜丽璞, 徐惠君(2012). 植物组织培养再生相关基因鉴定、克隆和应用研究进展. 作物学报, 38 (2): 191–201]
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SWL, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE, et al (2006). Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. Cell, 126 (6): 1189–1201
- Zheng X, Chen L, Luo L (2013). Research progress in epigenetic modification and its function in plants. Chin Bull Bot, 48 (5): 561–572 (in Chinese with English abstract) [郑小国, 陈亮, 罗利军(2013). 植物中表观遗传修饰研究进展. 植物学报, 48 (5): 561–572]

DNA methylation modification status of *CUC1* during *in vitro* organogenesis in *Arabidopsis thaliana*

SONG Yu-Guang, MA Zong-Qi, QIU Nian-Wei, DONG Wei*

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

Abstract: DNA methylation is an important regulator of gene expression during plant development. *CUP-SHAPED COTYLEDON 1* (*CUC1*) is a key marker gene during *in vitro* organogenesis in *Arabidopsis thaliana*. In this study, the dynamic relation between *CUC1* expression and DNA methylation was analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and bisulfite sequencing PCR (BSP), respectively, during *in vitro* organogenesis. The expression of *CUC1* was negatively correlated with its DNA methylation level in the promoter and 3' region. This result provides references for further understanding of the possible regulation mechanism of *CUC1* in *A. thaliana in vitro*.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; DNA methylation; *CUC1*; *in vitro* organogenesis

Received 2016-03-03 Accepted 2016-05-15

This work was supported by the National Natural Science Foundation for the Youth of China (Grant Nos. 31300220 and 31501328), Shandong Provincial Natural Science Foundation (Grant Nos. 2015ZRB01APV and ZR2014CP013), China Postdoctoral Science Foundation (Grant Nos. 2015M572000 and 2014M550366), and the Open Labs and Excellent Experiment Funds of Qufu Normal University (Grant Nos. SK201501 and Jp2015018).

*Corresponding author (E-mail: Dongwei0207@163.com).