

## 盐胁迫下蒺藜苜蓿*MtMYBS1*的DNA甲基化和组蛋白修饰状态分析

董蔚, 刘锡江, 高天雪, 宋玉光\*

曲阜师范大学生命科学学院, 山东曲阜273165

**摘要:** 表观遗传修饰尤其是DNA甲基化和组蛋白修饰在基因表达调控中起重要“开关”作用。前期研究证实蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) *MtMYBS1*是参与植物盐胁迫应答的重要功能基因。本文采用反转录PCR (RT-PCR)、重亚硫酸盐测序PCR (BSP)和染色质免疫沉淀(ChIP)等技术分析了*MtMYBS1*在盐胁迫过程中的表达、DNA甲基化及组蛋白修饰状态。盐胁迫下伴随着*MtMYBS1*的上调表达, 其启动子区及3'末端区的DNA甲基化修饰水平逐渐降低, 而启动子区及翻译起始位点附近组蛋白H3K9ac修饰水平逐渐升高。进一步相关性分析发现, 盐胁迫下*MtMYBS1*的表达与其DNA甲基化修饰水平呈负相关, 而与组蛋白H3K9ac的修饰呈正相关。该研究为深入了解*MtMYBS1*参与蒺藜苜蓿盐胁迫应答过程中的表达调控提供理论参考。

**关键词:** 蒺藜苜蓿; DNA甲基化; 组蛋白修饰; *MtMYBS1*; 盐胁迫

土壤盐渍化已成为全球性问题。有数据表明目前世界总盐渍化土地面积约为3.8亿 $\text{hm}^2$ , 约占陆地总面积的10%, 分布于全球103个国家和地区。中国盐渍化土壤分布也较广, 目前我国有高达3 328万 $\text{hm}^2$ 的土地已经盐碱化, 约占农业总土地面积的4.91% (Meng等2017)。虽然有些植物对盐碱胁迫具有一定的耐受性, 但多数作物均属于甜土植物, 盐碱胁迫下, 其正常的生长发育和产量均受到明显影响。高盐胁迫首先会对其产生离子平衡的破坏、渗透胁迫和矿质营养的缺失等原初伤害, 而后进一步造成过氧化胁迫、离子毒害、光合作用效率降低和代谢发生紊乱等次生伤害, 最终衰老加速, 导致植物死亡(张金林等2015)。

表观遗传修饰, 尤其是DNA甲基化和组蛋白修饰在植物非生物胁迫应答中发挥着重要的调控作用(Grativol等2012)。植物体内的DNA甲基化主要存在5-甲基胞嘧啶和少量的 $N^6$ -甲基腺嘌呤这两种形式, 其中 $N^6$ -甲基腺嘌呤主要存在于线粒体中(Vanyushin 2006)。植物基因组中存在CG、CHG和CHH (H代表A、T或C碱基)三种类型的甲基化修饰, 它们的分布和比例存在较大差异, 例如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)全基因组中约有24%的CG、6.7%的CHG和1.7%的CHH在胞嘧啶(C)位点发生了DNA甲基化修饰。通常CG位点的甲基化与基因的表达调控相关, 但有时CHG和CHH位点的甲基化同样也很重要(郑小国等2013; 陈小强等2007)。组蛋白修饰主要包括组蛋白甲基化、乙酰化、糖基化、磷酸化等类型, 这些不同的修饰相

互协调共同起着对基因的表达调控作用, 例如组蛋白乙酰化、磷酸化修饰通常与基因的表达激活相关, 而组蛋白甲基化和部分乙酰化与基因的转录抑制有关(Peterson和Laniel 2004; Pfluger和Wagner 2007)。植物中组蛋白甲基化主要发生在H3的第4、9、27和36位赖氨酸(Lys, K)和第17位精氨酸(Arg, R)残基上, 在H4上主要为第20位Lys和第3位Arg残基。组蛋白乙酰化主要发生在组蛋白H3 Lys的9、10和23, 以及H4 Lys的5、8、12等位点。通常情况下H3K4me3、H3K9me3和H3K9ace常分布在常染色质区域, 与基因的转录激活相关; 而H3K9me1、H3K9me2、H3K27me1、H3K27me3等则主要位于异染色质区域, 参与抑制基因的表达(Turck等2007; Zhang等2009; Zhou等2010)。植物在长期的进化过程中可以通过基因重组获得对外界环境的适应能力, 但是DNA序列改变的速度是异常缓慢的, 而且是不可逆的。在面对突然发生的环境变化时, DNA甲基化等表观遗传修饰方式迅速且多样化(王敏和王一峰2013)。当植物暴露于胁迫环境时, 植物可通过DNA甲基化和去甲基化作用来调控相关基因的表达以抵御或适应不良环境。同一植物在不同的发育阶段或不同植物在不同强度的外界环境胁迫的刺激下, DNA甲基

收稿 2018-06-14 修定 2018-09-20

资助 山东省自然科学基金(ZR2015JL012)、国家自然科学基金(31300220和31501328)和中国博士后基金面上项目(2014M550366)。

\* 通讯作者(SYG-0423@163.com)。

化及组蛋白修饰水平均会发生不同程度的下降或增加(王淑妍等2016)。目前,大量研究已经证实表观遗传修饰在植物非生物胁迫应答中的重要作用,例如:在盐胁迫下水稻(*Oryza sativa*)基因组表现出超甲基化的特征(Sudan等2018);盐和除草剂处理下烟草(*Nicotiana tabacum*) *NtGPDL*的基因编码区会发生明显的去甲基化(Choi和Sano 2007)。干旱胁迫下,拟南芥胁迫应答关键基因*RD29A*、*RD29B*、*RD20*和*RAP2.4*的H3K4Me3和H3K9Ac修饰水平均明显升高且它们的表达受到诱导(Kim等2008)。Wang等(2011)通过对干旱胁迫下水稻基因组DNA甲基化水平的分析,发现经干旱胁迫处理后,水稻叶和根中的DNA甲基化水平分别下降了1.49%和0.4%,提出基因的去甲基化是水稻响应盐胁迫的一种重要的表观遗传机制。水稻幼苗经水浸淹以后,其体内乙醇脱氢酶1 (*ethanoldehydrogenase 1*, *ADHI*)和丙酮酸脱羧化酶1 (*pyruvate decarboxylase 1*, *PDC1*)基因的H3K4me3和H3K9ac的修饰水平均显著升高且这些组蛋白修饰与*ADHI*和*PDC1*的表达量升高相关,但这些修饰是暂时的,一旦除去胁迫因素,染色质又恢复到正常状态,因此表现出动态调控的特点(Tsuji等2006)。Tang等(2014)在黑麦草(*Lolium perenne*)的研究中发现干旱胁迫可导致其基因组DNA甲基化水平下降,与对照相比,黑麦草的总DNA甲基化水平下降了10.28%。Liang等(2014)发现胡杨(*Populus euphratica*)经干旱胁迫处理后,部分基因转录起始位点上游2 kb处的胞嘧啶甲基化水平增加,同时发现转录起始位点上游10 bp处的DNA甲基化抑制基因的表达。以上均表明,表观遗传修饰在植物逆境胁迫应答中发挥重要作用。

蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)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具有较高的遗传转化效率等特点,成为豆科分子生物学和基因组学研究的模式植物(Kang等2016)。近来,通过对蒺藜苜蓿全基因组甲基化修饰模式分析发现:在盐胁迫下,蒺藜苜蓿基因组中有超过5 000万个胞嘧啶碱基呈现出甲基化修饰水平的差异,其中CHH、CHG和CG位点分别占77%、9.1%和13.9%。与对照相比,盐胁迫使得其基因组整体

甲基化水平略微降低,推测DNA甲基化可能在蒺藜苜蓿盐胁迫应答反应中起重要作用(Yaish等2018)。前期研究中,我们首次从蒺藜苜蓿中分离了MYB家族转录因子基因*MtMYBS1*。盐胁迫下该基因的表达受到诱导,且过表达后明显提高转基因拟南芥的耐盐性(Dong等2017),但该基因在盐胁迫响应过程中是否受到表观遗传修饰的调控,受哪种类型调控等问题并不清楚。本文拟通过反转录PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)、重亚硫酸盐测序PCR (bisulfite sequencing PCR, BSP)及染色质免疫沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)技术对盐胁迫过程中*MtMYBS1*的表达及DNA甲基化、组蛋白修饰的动态变化进行分析。研究结果对了解该基因的表达调控机制以及在作物遗传育种的应用等方面提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

选取饱满均一的蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula* Gaertn.;生态型为R108,曲阜师范大学种质资源中心保存)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的盆中水培。所用营养液为改良的1/2Hoagland营养液,每天更换一次。培养条件为光照培养16 h、暗培养8 h,光强为300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的饱和光,昼/夜温度25°C/20°C,相对湿度55%。14 d后,将上述材料分成两组,一组设置为对照,另一组培养液中添加NaCl使其终浓度为200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分别选取对照及盐胁迫处理1、6、12、24、48和72 h植物材料的根,液氮冷冻后,-80°C保存备用。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 基因表达分析

将上述-80°C保存的材料加液氮充分研磨后,根据植物基因组DNA (TaKaRa)及RNA提取试剂盒(TaKaRa)的操作方法分别提取基因组DNA和RNA。采用反转录试剂盒(Invitrogen)对RNA样品进行反转录合成cDNA,以反转录后的cDNA为模板,蒺藜苜蓿*ACTIN2*基因(GenBank登记号: JQ028730)作内参,对目标基因的表达情况进行RT-PCR分析(引物序列见表1)。PCR反应体系(15  $\mu\text{L}$ ): 双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)

表1 BSP及ChIP引物

Table 1 Primers for BSP and ChIP

引物名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
BSP-I	AATTAATAATATTTGTTATTAATA	CTACACTTATATCTCCTACA
BSP-II	TAGTGATTATGTTAGAATTATAT	AATTTACCCATCAACCAATAA
BSP-III	AATATTGAAATGGATAGGGATAT	ATCTATCTTCTCTATTACAC
BSP-IV	TTTATATGTTTTTGTATTAGAT	CAATTATATTATTACTACCTCTT
ChIP-I	ACGGATTTTTATCGAGTTTGAG	CGGTGAGTTAACGTGATTCTGA
ChIP-II	TGAAAATTACGGTGAGTCATCG	ATCATTCTTTCATGGGTAGCCTAGT
ChIP-III	AAACACTGAAATGGATAGGGACAT	GAAAGAAATATCTAAAGTTGGAAC
ChIP-IV	CACGGGTTAATGCTTCTAGTTG	GTGTGTGTGCTGCCTCTTGAA
ACTIN2	CAAAAGATGGCAGATGCTGAGGAT	CATGACACCAGTATGACGAGGTCG

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

### 1.2.2 DNA甲基化水平分析

取上述2.1中提取的对照和盐胁迫处理不同时间样品的基因组DNA, 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  $\mu\text{L}$ 作为模板, 利用检测*MtMYBS1*不同基因结构区域甲基化修饰水平的特异性引物(引物序列见表1)分别对亚硫酸氢盐处理后的样本进行PCR扩增, 将产物连接到pMD-18T (TaKaRa)载体, 然后转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*), 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(C)将转变成胸腺嘧啶(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。实验设置3次生物学重复。

### 1.2.3 组蛋白修饰水平分析

组蛋白修饰状态的ChIP方法主要参考Johnson等(2002)。简要步骤为: 选取对照和盐胁迫处理不

同时间的根1 g, 用含有1%甲醛的1 $\times$ 磷酸盐缓冲液(PBS)真空固定, 加入甘氨酸溶液, 真空渗透处理, 终止交联, PBS清洗, 液氮速冻后于-80 $^{\circ}\text{C}$ 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和H3K9me2抗体(Millipore产品目录号: 07-392和05-768R)过夜进行免疫沉淀反应, 然后加入G蛋白磁珠(beads), 4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢旋转孵育4 h; 加入洗脱液, 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中孵育30 min, 将蛋白/DNA复合物从吸附磁珠中分离; 加5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl至Input和ChIP样品中, 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱过夜解交联后加入RNaseA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 利用PCR产物纯化回收试剂盒(QIAGEN产品目录号: 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  $\mu\text{L}$ 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(*MtACTIN2*作为参照), 用于检测不同区域的qPCR引物(表1), 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。实验设置3次生物学重复, 数据分析参照López-Galiano等(2017)。

## 2 实验结果

### 2.1 盐胁迫下*MtMYBS1*的表达模式分析

利用RT-PCR对*MtMYBS1*在对照(0 h)及200  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl下处理不同时间下的表达模式进行了分析, 结果表明: 盐胁迫条件下*MtMYBS1*的表达明显受到诱导, 盐胁迫处理1和6 h后其表达水平分别上调约1.3和约2.7倍, 12 h后上调约6.2倍, 随后在24



和48 h其表达不再继续升高而是稳定在12 h水平(图1)。这与我们前期的结果是一致的(Dong等2017), 表明*MtMYBS1*的表达受到了盐胁迫的显著诱导。

## 2.2 盐胁迫下*MtMYBS1*的DNA甲基化修饰水平分析

为了解盐胁迫条件下*MtMYBS1*的DNA甲基化修饰状态, 首先我们通过甲基化修饰位点在线分析软件MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)对*MtMYBS1*的启动子区(ATG上游2 000 bp)以及基因结构区的CG位点的丰度及分布进行了分析, 发现该基因存在3个CG富集区(图2)。进一步对该序列的基因结构分析发现, 上述3个CG富集区中2个分别位于翻译起始位点(ATG)上游的启动子区, 1个位于ATG下游的3'末端区, 覆盖了第2个外显子的部分、第2个内含子的全部及第3个外显子的部分序列(图2)。

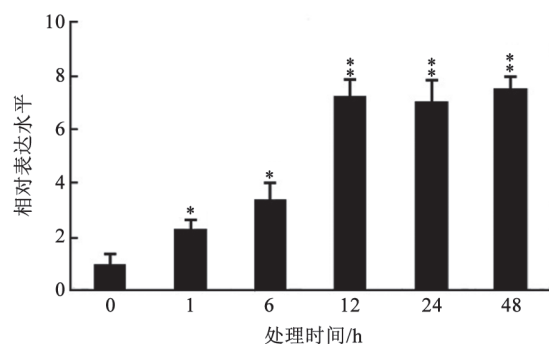


图1 盐胁迫下蕹菜苜蓿*MtMYBS1*的表达水平

Fig.1 Expression levels of *MtMYBS1* under salinity stresses  
\*和\*\*分别代表数据与对照间差异显著( $P < 0.05$ )和极显著( $P < 0.01$ )。

根据预测结果, 利用MethPrimer软件分别对该基因CG富集的启动子区(命名为检测区I和II)、翻译起始位点附近(检测区III)以及基因3'末端区(检测区IV) 4个区域(图2)设计特异性引物并对亚硫酸盐处理后的样品进行PCR扩增, 分析它们的DNA甲基化修饰状态。结果表明, 在对照及盐处理下, 检测区I和III中所有的胞嘧啶(C)位点几乎都没有发生DNA甲基化修饰, 且在盐胁迫处理过程中与对照相比没有明显变化(表2)。而检测区II在对照及盐胁迫处理1和6 h的样品中具有相似的DNA甲基化修饰水平, 均为约30%左右。然而随着盐胁迫时间的延长, 该区域的DNA甲基化修饰水平逐渐降低, 盐胁迫12 h后为16.2%, 48 h后为10.36%。检测区IV与检测区II具有相似的甲基化水平变化模式, 但在对照中检测区IV的整体甲基化水平明显低于检测区II且从时间上看前者DNA去甲基化更早于后者, 在盐胁迫6 h后便逐渐发生DNA去甲基化(表2)。以上结果说明, *MtMYBS1*启动子区及基因3'末端区存在不同水平的DNA甲基化修饰且在盐胁迫处理过程中部分区域发生去甲基化。

## 2.3 盐胁迫下*MtMYBS1*的DNA甲基化模式分析

通过上述DNA甲基化修饰水平分析发现: *MtMYBS1*的DNA甲基化主要发生在检测区II和IV, 因此我们对这两个区域的DNA甲基化模式进行进一步分析。在对照中*MtMYBS1*检测区II中CG、CHG和CHH位点的甲基化水平分别为6.62%、19.2%和6.78%, 在盐胁迫处理1~48 h过程中CG位点的甲基化水平变化并不显著, 均约为6% (表3)。CHG位点

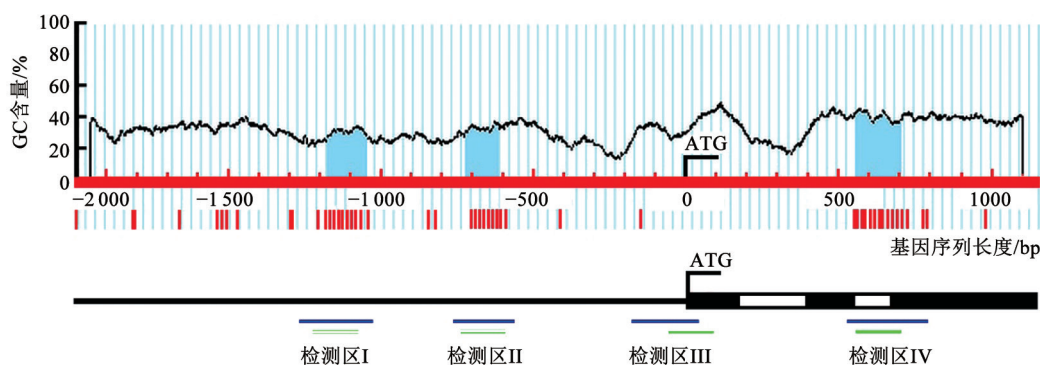


图2 *MtMYBS1*基因结构、CG富集区及DNA甲基化和组蛋白修饰检测区

Fig.2 Structure and regions of CG enrichment, DNA methylation and histone modification of *MtMYBS1* gene  
红色短竖线: CG位点; 蓝色区域: CG富集区(200 bp序列内C+G含量>50%, 且CG观测值/预测值>40%); 黑色细线: 启动子区序列; 黑色粗线: 外显子; 白色粗线: 内含子; ATG: 翻译起始位点; 蓝色线: DNA甲基化修饰检测区; 绿色线: 组蛋白修饰水平检测区。

表2 盐胁迫处理下蒺藜苜蓿*MtMYBS1*的DNA甲基化水平Table 2 DNA methylation level of *MtMYBS1* under salinity stresses in *M. truncatula*

样品处理方式	胞嘧啶(C)甲基化水平/%			
	检测区I	检测区II	检测区III	检测区IV
NaCl, 0 h	1.36±0.38 <sup>e</sup>	32.60±4.07 <sup>a</sup>	0.76±0.14 <sup>e</sup>	13.75±3.52 <sup>b</sup>
NaCl, 1 h	2.01±0.33 <sup>de</sup>	29.70±2.33 <sup>a</sup>	1.34±0.43 <sup>e</sup>	10.66±2.24 <sup>b</sup>
NaCl, 6 h	0.78±0.60 <sup>e</sup>	29.00±3.53 <sup>a</sup>	1.09±0.24 <sup>e</sup>	5.73±1.70 <sup>e</sup>
NaCl, 12 h	1.36±1.01 <sup>de</sup>	16.20±3.66 <sup>b</sup>	2.01±0.62 <sup>de</sup>	5.44±2.31 <sup>de</sup>
NaCl, 24 h	2.43±0.54 <sup>d</sup>	12.55±1.97 <sup>b</sup>	1.62±1.20 <sup>de</sup>	3.54±1.21 <sup>de</sup>
NaCl, 48 h	1.88±0.92 <sup>de</sup>	10.36±2.59 <sup>b</sup>	0.98±0.50 <sup>e</sup>	4.66±0.81 <sup>e</sup>

胞嘧啶(C)甲基化水平指各检测区中甲基化的C占有所有C的百分比,不同小写字母表示数据间差异显著( $P<0.05$ )。

表3 盐胁迫处理下蒺藜苜蓿*MtMYBS1*的DNA甲基化模式分析Table 3 The DNA methylation pattern of *MtMYBS1* under salinity stresses in *M. truncatula*

样品处理方式	C位点甲基化水平/%					
	检测区II			检测区IV		
	CG	CHG	CHH	CG	CHG	CHH
NaCl, 0 h	6.62±1.40 <sup>bc</sup>	19.20±3.35 <sup>a</sup>	6.78±1.51 <sup>a</sup>	10.73±1.75 <sup>a</sup>	2.35±0.36 <sup>c</sup>	0.67±0.40 <sup>c</sup>
NaCl, 1 h	6.01±1.08 <sup>bc</sup>	18.34±2.36 <sup>a</sup>	5.35±0.94 <sup>a</sup>	7.47±1.35 <sup>b</sup>	1.78±1.20 <sup>c</sup>	1.41±0.25 <sup>bc</sup>
NaCl, 6 h	5.38±1.20 <sup>bc</sup>	18.73±2.44 <sup>a</sup>	4.89±0.83 <sup>a</sup>	2.62±0.46 <sup>d</sup>	2.33±1.02 <sup>c</sup>	0.78±0.37 <sup>c</sup>
NaCl, 12 h	5.50±0.84 <sup>bc</sup>	8.52±1.08 <sup>b</sup>	2.18±0.50 <sup>b</sup>	3.97±0.80 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>e</sup>	1.47±0.32 <sup>bc</sup>
NaCl, 24 h	5.09±0.46 <sup>c</sup>	5.84±1.33 <sup>b</sup>	1.62±0.31 <sup>bc</sup>	3.06±0.50 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>e</sup>	0.48±0.46 <sup>c</sup>
NaCl, 48 h	5.87±1.05 <sup>bc</sup>	3.37±1.13 <sup>c</sup>	1.12±0.51 <sup>bc</sup>	2.84±0.36 <sup>d</sup>	1.12±0.70 <sup>d</sup>	0.7±0.55 <sup>c</sup>

检测区II和IV中同一位点(CG、CHG和CHH)中的数据用不同小写字母标识表示差异显著( $P<0.05$ )。

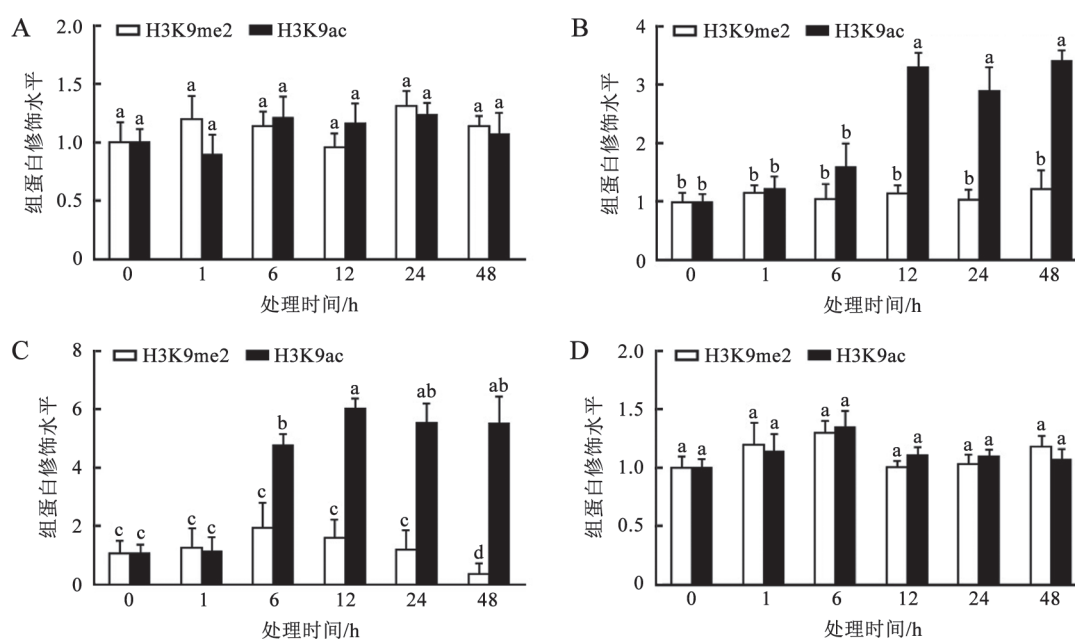
在对照和盐处理的早期阶段(1~6 h)甲基化修饰水平变化并不显著,均约为18%,然而随着盐胁迫时间的延长,其DNA甲基化修饰水平逐渐降低,从18.73% (6 h)降至3.37% (48 h) (表3)。CHH位点的甲基化模式的变化与CHG位点相似,在对照中为6.78%,盐处理12 h后开始显著下降,48 h后降至1.12% (表3)。

通过对检测区IV的DNA甲基化模式分析发现,在对照及盐胁迫下,该区域的DNA甲基化水平的变化主要发生在CG位点。在对照中该区域CG位点的DNA甲基化修饰水平为10.73%,在盐胁迫下其修饰水平则从7.47% (1 h)降至2.84% (48 h) (表3)。相对于CG位点,CHG及CHH位点的变化并不显著且无规律性(表3)。综合上述分析结果,盐胁迫下*MtMYBS1*启动子区发生了CHG和CHH位点的DNA去甲基化,基因3'末端区则发生了CG位点去甲基化。

#### 2.4 盐胁迫下*MtMYBS1*组蛋白修饰状态分析

除DNA甲基化修饰以外,组蛋白修饰同样在

基因表达调控中起重要作用。研究表明CG位点的去甲基化可引起H3K9me2修饰状态的改变,H3K9me2甲基化修饰则可以引导新的非CG甲基化的发生(Jackson等2002; Mathieu等2005)。因此,为确定盐胁迫下*MtMYBS1*的表达是否受到组蛋白修饰的影响,以及组蛋白修饰与DNA甲基化是否存在相互关系,我们又利用ChIP-qPCR方法对该基因的上述4个DNA甲基化检测区在对照及盐胁迫处理下的组蛋白H3K9me2及H3K9ac修饰水平进行了分析。结果表明:无论对照还是盐胁迫不同时间样品中,*MtMYBS1*启动子区的检测区I以及3'末端的检测区IV中均没有检测到H3K9me2及H3K9ac修饰水平的显著变化(图3-A和D)。启动子区的检测区II在盐胁迫6、12、24及48 h样品中H3K9ac修饰水平分别比对照提高了0.8、2.3、1.8及2.4倍,而H3K9me2修饰水平没有显著变化(图3-B)。此外,在翻译起始位点ATG附近的检测区III中同样也检测到了H3K9ac修饰水平在盐胁迫处理6、12、24和48 h后分别提高了3.9、5.2、4.9和4.8倍,而

图3 蕹菜苜蓿 *MtMYBS1* 组蛋白修饰水平分析Fig.3 Analysis of histone modification levels in *MtMYBS1* in *M. truncatula*

A~D分别代表检测区I、II、III和IV。同一图中的数据用不同小写字母标识表示差异显著( $P < 0.05$ )。0 h: 对照; 1~48 h: 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫处理1、6、12、24和48 h的蕹菜苜蓿。

H3K9me2的修饰水平除在盐处理48 h的样品中显著降低以外, 在对照和其他胁迫时间下变化并不显著(图3-C)。

### 2.5 *MtMYBS1*的表达与DNA甲基化、组蛋白修饰状态的关系

在对照中, *MtMYBS1*的表达水平低, 其启动子区(检测区II)及基因结构区3'末端(检测区IV)发生DNA超甲基化, 而在盐胁迫处理下 *MtMYBS1*的表达受到诱导, 上述两个区域的DNA甲基化修饰水平显著降低, 且伴随着基因翻译起始位点ATG附近(检测区III)以及基因3'末端区域(检测区IV) H3K-9ac修饰水平的升高(表2和图3)。相关性分析发现, 盐胁迫下 *MtMYBS1*的表达与其启动子区(检测区II)及基因结构区3'末端(检测区IV)的DNA甲基化修饰水平呈明显负相关(相关系数 $R$ 分别为-0.97和-0.89); 与启动子区的检测区II和翻译起始位点ATG附近检测区III的H3K9ac修饰水平呈明显正相关( $R$ 分别为0.99和0.91)(表4)。以上结果表明在盐胁迫处理过程中, 蕹菜苜蓿 *MtMYBS1*的表达可能受到了启动子区及基因3'末端区域的DNA甲基化和H3K9ac修饰的影响。

表4 盐胁迫下 *MtMYBS1* 的表达与其DNA甲基化、组蛋白修饰水平相关性分析Table 4 Correlation analysis between *MtMYBS1* expression and DNA methylation or histone modification

各检测区DNA甲基化或组蛋白修饰水平	表达水平相关系数( $R$ )
检测区I, 甲基化	0.27
检测区II, 甲基化	-0.97
检测区III, 甲基化	0.58
检测区IV, 甲基化	-0.89
检测区I, H3K9me2	-0.027
检测区II, H3K9me2	0.36
检测区III, H3K9me2	-0.16
检测区IV, H3K9me2	-0.24
检测区I, H3K9ac	0.37
检测区II, H3K9ac	0.99
检测区III, H3K9ac	0.91
检测区IV, H3K9ac	-0.15

### 3 讨论

转录因子在植物逆境胁迫应答信号网络中起着核心调控作用。已有研究证实, 胁迫条件下, 多种植物的逆境应答关键转录因子基因均受到了DNA甲基化或/和组蛋白修饰的调控(Sudan等2018)。在



前期的研究中,我们首次从蒺藜苜蓿中分离到了盐胁迫诱导相关转录因子基因*MtMYBS1*并确定了其耐盐功能(Dong等2017)。本实验通过对*MtMYBS1*在对照及盐胁迫下的表达及DNA甲基化、组蛋白修饰状态分析发现该基因的表达明显受到盐诱导,且伴随着启动子区、翻译起始位点附近及基因结构区3'末端的DNA去甲基化或组蛋白修饰水平的改变,这种现象在水稻、大豆(*Glycine max*)等植物中均有发现,例如:Zhu等(2015)发现,盐胁迫下水稻*OsMYB91*基因的诱导表达与其启动子区DNA去甲基化及组蛋白修饰的改变有关;盐胁迫下多个大豆转录因子的表达受到诱导且与其启动子区或基因不同结构区的DNA甲基化、组蛋白修饰存在相关性(Song等2012)。

基因启动子区及3'末端区域的DNA超甲基化修饰通常与基因的表达抑制有关(Zilberman和Henikoff 2007)。在本研究中,通过对盐胁迫处理下*MtMYBS1*启动子区(检测区I和II)、翻译起始位点附近(检测区III)及3'末端区域(检测区IV)的DNA甲基化修饰状态分析,发现盐胁迫下,仅该基因启动子区(检测区II)和3'末端区域(检测区IV)存在DNA甲基化修饰并随着盐胁迫处理发生了去甲基化修饰,其他区域(检测区I和III)并未检测到DNA甲基化修饰状态的改变(表2)。组蛋白H3K9me<sub>2</sub>及H3K9ac的修饰特征与DNA甲基化不同。在对照及盐胁迫处理下,检测区I和IV中均未检测到组蛋白H3K9me<sub>2</sub>及H3K9ac修饰水平的变化,而在检测区II和III中均发现伴随着盐胁迫处理H3K9ac修饰水平明显升高(图3),表明*MtMYBS1*基因DNA甲基化和组蛋白修饰的改变具有区域特异性。这种区域特异性的修饰调控特征在烟草、胡萝卜(*Daucus carota*)及拟南芥等多个物种中均有发现,例如:在高盐胁迫和冷胁迫下,烟草*NtGDPL* (*glycero-phosphodiesterase-like protein*)基因的上调表达与其编码序列区DNA甲基化水平降低有关,而与启动子及其他区域的变化无关(Wada等2004);盐胁迫下拟南芥*AtMYB74*的诱导表达与小干扰RNA (siRNA)介导的启动子区DNA甲基化修饰水平降低有关(Xu等2015)。Shibukawa等(2009)通过对胡萝卜离体胚胎发生关键基因*C-LECI*的表达与DNA甲基化修饰状态间的相互关系的分析发现,离体再生过程中

*C-LECI*的表达仅与其启动子区特定区域(ATG 上游-1 904~-1 272 bp)的DNA甲基化修饰有关。

在三种类型(CG、CHG及CHH)的DNA甲基化修饰中,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)。例如:胁迫条件下,大豆部分基因的CHG或CHH位点甲基化水平与对照相比分别降低了25%和37% (Hossain等2017);拟南芥经真菌感染后,多个基因的CHH位点的DNA甲基化修饰水平改变且受到诱导表达。Song等(2012)通过对盐胁迫不同时间大豆中多个转录因子的表达及DNA甲基化修饰状态分析发现,盐胁迫条件下这些基因的甲基化位点和模式呈现出多样化的特点,例如:盐胁迫下转录因子*Glyma11g02400*的表达与其启动子区CG、CNG和CNN位点的DNA甲基化修饰均有关,而*Glyma20g30840* *Glyma16g27950*仅与CG位点的甲基化修饰有关。本研究中,通过对*MtMYBS1*不同检测区域的DNA甲基化模式分析发现,在对照处理及盐胁迫处理过程中,检测区II的DNA甲基化水平的改变主要发生在CHG和CHH位点,而CG位点的甲基化水平并无显著变化;检测区IV的DNA甲基化修饰变化主要发生在CG位点,而CHG和CHH位点的变化不显著(表3)。因此根据已有证据推测,盐胁迫处理下,*MtMYBS1*的表达变化可能受到了其启动子区CHG和CHH位点以及3'末端区CG位点DNA甲基化修饰的调控。

通过对*MtMYBS1*在对照及盐胁迫处理下的表达、DNA甲基化及组蛋白修饰水平的分析发现,盐胁迫1 h后*MtMYBS1*的表达即开始上调(约1.3倍),12 h达到最高(约6.2倍)(图1)。然而,该基因检测区II和IV的DNA去甲基化分别在盐胁迫处理6 h和12 h后才检测到明显变化(表2)。组蛋白修饰水平的变化同样也具有相似的特点,盐胁迫处理6 h后才检测到组蛋白H3K9ac乙酰化修饰水平的升高(图3),表明盐胁迫下*MtMYBS1*的表达诱导与其DNA去甲基化和组蛋白H3K9ac修饰的积累具有时间差异性。Kim等(2008)在研究干旱胁迫下组蛋白修饰对拟南芥胁迫响应关键基因*RD29A*、*RD29B*和*RD20*的修饰调控机制时亦发现类似现象,他们发现干旱胁迫下*RD29A*的表达诱导与其H3K4me<sub>3</sub>和H3K9ac修饰的富集存在时间差异性。

## 参考文献(References)

- Chen XQ, Wang CG, Li XL, et al (2007). DNA Methylation in plants and its epigenetic function. *Chin J Cell Biol*, 29: 519–524 (in Chinese with English abstract) [陈小强, 王春国, 李秀兰等(2007). 植物DNA甲基化及其表观遗传作用. *细胞生物学杂志*, 29: 519–524]
- 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
- Dong W, Song Y, Zhao Z, et al (2017). The *Medicago truncatula* R2R3-MYB transcription factor gene *MtMYBS1* enhances salinity tolerance when constitutively expressed in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 490 (2): 225–230
- Grativol C, Hemerly AS, Ferreira PCG (2012). Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Biochim Biophys Acta*, 1819 (2): 176–185
- Hossain MS, Kawakatsu T, Kim KD, et al (2017). Divergent cytosine DNA methylation patterns in single-cell, soybean root hairs. *New Phytol*, 214: 808–819
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, et al (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 416: 556–560
- Johnson LM, Cao X, Jacobsen SE (2002). Interplay between two epigenetic marks: DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr Biol*, 12: 1360–1367
- Kang Y, Li M, Sinharoy S, et al (2016). A snapshot of functional genetic studies in *Medicago truncatula*. *Front Plant Sci*, 7: 1175
- Kim JM, To TK, Ishida J, et al (2008). Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 50: 1856–1864
- Liang D, Zhang Z, Wu H, et al (2014). Single-base-resolution methylomes of *Populus trichocarpa* reveal the association between DNA methylation and drought stress. *BMC Genet*, 15: S9
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- López-Galiano MJ, González-Hernández AI, Crespo-Salvador O, et al (2017). Epigenetic regulation of the expression of WRKY75 transcription factor in response to biotic and abiotic stresses in Solanaceae plants. *Plant Cell Rep*, 37: 167–176
- Mathieu O, Probst AV, Paszkowski J (2005). Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 24: 2783–2791
- Meng C, Quan TY, Li ZY, et al (2017). Transcriptome profiling reveals the genetic basis of alkalinity tolerance in wheat. *BMC Genomics*, 18: 24
- Peterson CL, Laniel MA (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol*, 14: R546–R551
- Pfluger J, Wagner D (2007). Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 10 (6): 645–652
- Shibukawa T, Yazawa K, Kikuchi A, et al (2009). Possible involvement of DNA methylation on expression regulation of carrot *LECI* gene in its 5'-upstream region. *Gene*, 437: 22–31
- Song Y, Ji D, Li S (2012). The dynamic changes of DNA methylation and histone modifications of salt responsive transcription factor genes in soybean. *PLoS ONE*, 7 (7): e41274
- Sudan J, Raina M, Singh R (2018). Plant epigenetic mechanisms: role in abiotic stress and their generational heritability. *3 Biotech*, 8 (3): 172
- Tang XM, Tao X, Wang Y, et al (2014). Analysis of DNA methylation of perennial ryegrass under drought using the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique. *Mol Genet Genomics*, 289: 1075–1084
- Tsuji H, Saika H, Tsutsumi N, et al (2006). Dynamic and reversible changes in histone H3-Lys4 methylation and H3 acetylation occurring at submergence-inducible genes in rice. *Plant Cell Physiol*, 47 (7): 995–1003
- Turck F, Roudier F, Farrona S, et al (2007). *Arabidopsis* TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genet*, 3 (6): e86
- Vanyushin BF (2006). DNA methylation in plants. In: Doerfler W, Böhm P (eds). *DNA Methylation: Basic Mechanisms*. Berlin: Springer Science & Business Media, 67–122
- Wada Y, Miyamoto K, Kusano T, et al (2004). Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants. *Mol Genet Genomics*, 271 (6): 658–666
- Wang M, Wang YF (2013). Role of epigenetic modifications in plant stress response. *Chin Bull Life Sci*, 25 (6): 575–579 (in Chinese with English abstract) [王敏, 王一峰(2013). 表观遗传修饰在植物逆境胁迫响应中的作用. *生命科学*, 25 (6): 575–579]
- Wang S, Guo J, Liu X, et al (2016). Research progress of abiotic stress induced epigenetic variation in plants. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 36 (3): 631–640 (in Chinese with English abstract) [王淑妍, 郭九峰, 刘晓婷等(2016). 非生物胁迫下植物表观遗传变异的研究进展. *西北植物学报*, 36 (3): 631–640]
- Wang WS, Pan YJ, Zhao XQ, et al (2011). Drought induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza Sativa* L.). *J Exp Bot*, 62



- (6): 1951–1960
- Xu MF, Wu CX, Cang T, et al (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, 苍涛等 (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]
- Xu R, Wang Y, Zheng H, et al (2015). Salt-induced transcription factor *MYB74* is regulated by the RNA-directed DNA methylation pathway in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 66 (19): 5997–6008
- Yaish MW, Al-Lawati A, Al-Harrasi I, et al (2018). Genome-wide DNA methylation analysis in response to salinity in the model plant caliph medic (*Medicago truncatula*). *BMC Genomics*, 19: 78
- Zhang JL, Li HR, Guo SY, et al (2015). Research advances in higher plant adaptation to salt stress. *Acta Pratacult Sin*, 24 (12): 220–236 (in Chinese with English abstract) [张金林, 李惠茹, 郭姝媛等(2015). 高等植物适应盐逆境研究进展. *草业学报*, 24 (12): 220–236]
- Zhang X, Bernatavichute YV, Cokus S, et al (2009). Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol*, 10: R62
- 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]
- Zhou J, Wang X, He K, et al (2010). Genome-wide profiling of histone H3 lysine 9 acetylation and dimethylation in *Arabidopsis* reveals correlation between multiple histone marks and gene expression. *Plant Mol Biol*, 72: 585–595
- Zhu N, Cheng S, Liu X, et al (2015). The R2R3-type MYB gene *OsMYB91* has a function in coordinating plant growth and salt stress tolerance in rice. *Plant Sci*, 236: 146–156
- Zilberman D, Henikoff S (2007). Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development*, 134 (22): 3959–3965

## Analyses of DNA methylation and histone modification of *MtMYBS1* in *Medicago truncatula* under salinity stress

DONG Wei, LIU Xi-Jiang, GAO Tian-Xue, SONG Yu-Guang\*

*School of Life Science, Qufu Normal University, Qufu, Shandong 273165, China*

**Abstract:** Epigenetic modifications, especially DNA methylation and histone modification, play important “switch” role in regulating gene expression. Previous studies have confirmed that *Medicago truncatula MtMYBS1* was an essential functional gene involved in plant response to salinity stress. In this study, the expression, DNA methylation and histone modification of *MtMYBS1* under salinity stress were analysed by reverse transcription PCR (RT-PCR), bisulfite sequencing PCR (BSP) and chromatin immunoprecipitation (ChIP). Following the up-regulated expression of *MtMYBS1* under salinity stress, the DNA methylation of the promoter region and the 3' terminal region gradually decreased, while the histone H3K9ac modification in the promoter region and the translation initiation site gradually increased. Further correlation analysis found that *MtMYBS1* expression was negatively correlated with its DNA methylation modification, and positively correlated with histone H3K9ac modification under salinity stress. This study would provide critical theoretical guidance for further understanding of the expression and regulation of *MtMYBS1* in the response to salinity stress in *M. truncatula*.

**Key word:** *Medicago truncatula*; DNA methylation; histone modification; *MtMYBS1*; salinity stress

Received 2018-06-14 Accepted 2018-09-20

This work was supported by Shandong Province Natural Science Foundation (ZR2015JL012), the National Natural Science Foundation of China (31300220 and 31501328), and China Postdoctoral Science Foundation (2014M550366).

\*Corresponding author (SYG-0423@163.com).