

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2021.50515

李永红, 齐美艳, 方圆, 付安, 王晓琴, 何亦鲲. 小立碗藓 *PpAux/IAA2* 基因在原生质体再生过程中的功能分析 [J]. 植物科学学报, 2021, 39(5): 515~525Li YH, Qi MY, Fang Y, Fu A, Wang XQ, He YK. Functional analysis of *PpAux/IAA2* in *Physcomitrella patens* (Hedw.) Mitt. during protoplast regeneration [J]. Plant Science Journal, 2021, 39(5): 515~525

小立碗藓 *PpAux/IAA2* 基因在原生质体再生过程中的功能分析

李永红^{1, 2}, 齐美艳³, 方圆¹, 付安¹, 王晓琴^{1*}, 何亦鲲³

(1. 北京农学院林木分子设计育种高精尖创新中心, 北京 102206; 2. 北京北农企业管理有限公司, 北京 102206; 3. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘要: 以小立碗藓 (*Physcomitrella patens* (Hedw.) Mitt.) 野生型及抗生长素的突变体 *Ppia2-87* 为实验材料, 分析了生长素早期应答基因 *PpAux/IAA2* 在原生质体再生过程中的调控机制。分别采用 qRT-PCR、FDA 染色、DNA 倍性分析、DAPI 染色、甲基化敏感扩增多态性分析等方法, 对原生质体再生过程的相关基因表达、存活率、细胞周期进程、染色体重塑及 DNA 甲基化进行了分析。结果显示: *PpAux/IAA* 的 3 个同源基因在野生型 0 h 原生质体中的表达量较原丝体、48 h 和 96 h 原生质体均明显升高; 随着培养时间的延长, *Ppia2-87* 原生质体的存活率明显下降; 原生质体进入 S 期受到抑制; 部分 0 h 原生质体的染色质未发生重塑, 且染色质重塑复合体 SWI/SNF 蛋白家族 4 个基因的表达水平在 0 h 原生质体中较原丝体下降; *Ppia2-87* 的 0 h 原生质体甲基化程度偏高。研究结果说明, *PpAux/IAA2* 调控的生长素信号通路在小立碗藓原生质体再生过程中具有重要作用, 该基因的突变影响了原生质体 DNA 甲基化及染色质重塑等细胞重新编程过程, 导致原生质体不能获得多能性而死亡。

关键词: 小立碗藓; 生长素; Aux/IAA; 原生质体再生

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2021)05-0515-11

Functional analysis of *PpAux/IAA2* in *Physcomitrella patens* (Hedw.) Mitt. during protoplast regeneration

Li Yong-Hong^{1, 2}, Qi Mei-Yan³, Fang Yuan¹, Fu An¹, Wang Xiao-Qin^{1*}, He Yi-Kun³

(1. Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. Beijing Bei Nong Enterprise Management Co., Ltd., Beijing 102206, China; 3. College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: We used wild-type (WT) and auxin-resistant mutant *Ppia2-87* strains of *Physcomitrella patens* to explore the regulation mechanism of the early auxin-response gene *PpAux/IAA2* in protoplast regeneration. Gene expression, survival rate, cell cycle progression, chromosome remodeling, and DNA methylation during protoplast regeneration were analyzed separately using quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR), fluorescein diacetate (FDA) staining, flow cytometry of DNA ploidy, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, and methylation-sensitive amplified polymorphism analysis. Results showed that the expression levels of three *PpAux/IAA* homologous genes in 0-h protoplasts were significantly higher than that in protonemata, 48-h, and 96-h protoplasts; survival rate of *Ppia2-87* protoplasts decreased significantly with culture time; entry into the S phase of

收稿日期: 2021-05-17, 修回日期: 2021-06-30。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871235; 31371243)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31871235, 31371243)。

作者简介: 李永红(1987-), 女, 博士, 研究方向为植物发育生物学(E-mail: yonghong922@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: wangxq@bua.edu.cn)。

Ppiaa2-87 protoplasts was inhibited; chromosomes of some *Ppiaa2-87* 0-h protoplasts were not remodeled; expression of four genes in the SWI/SNF protein family in the chromatin remodeling complex decreased in 0-h protoplasts compared with that in protonemata; and methylation of *Ppiaa2-87* 0-h protoplasts was higher than that of WT protoplasts. This study indicates that the *PpAux/IAA2*-related auxin signaling pathway plays an important role in protoplast regeneration. Mutation of the *PpAux/IAA2* gene affects protoplast DNA methylation and chromatin remodeling, which is involved in cell development reprogramming, leading to protoplast death due to lack of pluripotency.

Key words: *Physcomitrella patens*; Auxin; Aux/IAA; Protoplast regeneration

生长素在植物从受精卵到胚胎、细胞形态、器官发育和生殖的整个生命周期中起着至关重要的作用，并影响着包括分化、分裂和增大等细胞过程^[1, 2]。生长素信号从生长素感知到相关基因的激活有几个核心组成部分，包括 SCF(SKP1-Cullin1-F-box) E3 复合物、生长素/吲哚-3-乙酸(Aux/IAA)家族、生长素响应因子(ARF)家族、生长素响应 Gretchen Hagen3(GH3)家族等^[1, 3]。生长素介导的转录调控主要依赖于 Aux/IAA 的功能^[4]。Aux/IAAs 多为短寿命转录抑制因子，半衰期为 6 ~ 80 min，多数家族成员在生长素的诱导下快速(< 15 min)表达^[5]。典型的 Aux/IAA 蛋白有 4 个保守结构域(I ~ IV)，结构域Ⅱ即降解(degron)结构域，具有保守的“GWPPV”序列，其作为 F-Box 蛋白家族 TIR1/AFB (Transport Inhibitor Response and auxin F-Box protein) 受体的识别信号，维持 Aux/IAA 与 SCF^{TIR1/AFB} E3 泛素连接酶的稳定结合，介导 Aux/IAA 的泛素化降解并释放出 ARF，导致基因表达的改变，从而调控植物的生长发育^[3, 6]。不同的 Aux/IAA-TIR1/AFB 蛋白组合通常具有不同的生长素结合亲和力，导致生长素水平在不同组织和发育阶段的变化可以精细地转化为基因重新编程信号，从而精确地调控植物生长发育过程^[7]。Aux/IAA 的 degron 区域的单点突变都能降低 Aux/IAA 和 TIR1/AFB 蛋白的结合能力，阻碍 Aux/IAA 蛋白的降解，导致植物生长发育表型的改变^[1, 8]。拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)中过表达 degron 区域 Pro-75 残基转变为 Ser 残基的 IAA15 的获得型突变体 IAA15^{P75S} OX 植株的侧根数量减少，IAA15^{P75S} 蛋白通过抑制多聚泛素化，抑制蛋白酶体介导的蛋白降解，从而抑制生长素应答基因的转录^[9]。目前，从许多高等植

物中鉴定了大量的 Aux/IAA 基因，这些基因具有一定的功能冗余性，如从拟南芥中鉴定了 29 个 Aux/IAA 基因。而小立碗藓(*Physcomitrella patens* (Hedw.) Mitt.)只有 3 个 Aux/IAA 基因，分别是 Aux/IAA1A、Aux/IAA1B 和 Aux/IAA2^[10]，PpIAA1A 和 PpIAA1B 的同源性均为 93%，而这两种蛋白与 PpIAA2 的同源性为 69%，3 个成员也具有冗余功能，但冗余度降低，使其成为研究生长素信号转导的理想系统^[11]。生长素依赖的基因调控小立碗藓的细胞分化和发育过渡，包括绿丝体到轴丝体及配子体向假根的过渡^[8]。小立碗藓 3 个 Aux/IAA 基因的缺失会导致植物对生长素完全不敏感，并使超过 1/3 的已知苔藓基因活性发生改变，说明 Aux/IAA 蛋白在调节基因活动中发挥重大作用。同时，小立碗藓 Aux/IAA degron 区域的两个 Pro 残基的突变会导致严重的轴丝体和配子体发育抑制的表型，Gly 残基的突变表型相对较弱。*Ppiaa2-87* 突变体是第一个 Pro 残基突变为 Ser 残基，使其不能形成配子体^[11]。

生长素诱导的愈伤组织的形成是植物离体再生过程中一个重要的细胞重新编程的过程，即一些已经分化的细胞或分化状态相对较低的细胞被转换为多能细胞或全能细胞，这种细胞命运的重新编程通常是再生一个新的器官或整个植物体所必需的^[12-14]。烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、拟南芥、水稻(*Oryza sativa* L.)等植物的叶肉细胞经细胞壁裂解酶处理后，也会形成大量的具有多能性的原生质体，在植物激素生长素和细胞分裂素处理后可以重新进入细胞周期并增殖，但不施加外源植物激素，原生质体将面临染色质浓缩/去浓缩和死亡的命运^[15]。生长素信号通路在高等植物获得多能性后的原生质体再生过程中也起着重要作用。然而，

苔藓植物的营养细胞不添加外源植物激素就可以重新编程成为干细胞, 表明苔藓植物可能存在一种内在的植物激素调控机制^[16], 小立碗藓的离体叶片伤口边缘的细胞及原生质体不添加植物激素可以重新编程获得多能性, 通过分裂和分化形成原丝体和配子体^[17~19]。对植物原生质体的研究发现, 分化细胞重新进入细胞周期需经过获得多能性和重新进入细胞周期两个不同的阶段。多能性的获得伴随着DNA甲基化模式的改变、转录本的激活和特殊染色体区域的重塑^[15, 20]。拟南芥中, 染色质在原生质体形成过程中发生大规模的重组, 会迅速和逐渐的去浓缩^[21]。大多数与细胞脱分化相关的生化研究集中于细胞周期过程, 即G1期向S期的转变^[20]。原生质体不能长期保持在类似干细胞的状态, 必须做出发育决定, 否则就会死亡^[15, 22], 原生质体的存活率直接反映了细胞是否获得了多能性并进入细胞周期。小立碗藓的原生质体酶解去除细胞壁代表细胞去分化阶段, 随着培养时间增长会进行分化, 重建细胞壁, 细胞周期再次被启动, 分裂成绿丝体。原生质体重新编程成为干细胞发生在48 h内, 在48 h可以观察到部分细胞的极性膨胀, 96 h可以观察到不对称细胞分裂, 反映了细胞的再分化过程^[23]。

生长素的调控途径是一个复杂、精细的过程, 人们对Aux/IAA调控生长素信号转导和生长素降解的机制的了解越来越多, 但对其在苔藓植物原生质体再生过程中的作用还未有详细研究。与高等植物相比, 小立碗藓原生质体获取比较容易, 且其再生过程没有愈伤组织阶段, 是研究IAA信号通路作用于原生质体再生机制的优异材料。本研究通过对小立碗藓野生型(WT)及抗生长素NAA/IAA突变体*Ppiaa2-87*原生质体的存活率、细胞周期进程、染色体重塑及甲基化进行分析, 以期为解析生长素信号途径中Aux/IAA基因对细胞再生的调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小立碗藓野生型为Gransden 2004株系。突变体*Ppiaa2-87*由加州大学Mark Estelle馈赠^[11]。小立碗藓原丝体及茎叶体分别采用BCDA、BCD培养基^[24], 在25℃, 40~70 μmol·m⁻²·s⁻¹连

续白光下培养。萘乙酸(NAA)处理是在固体培养基中加入1 μmol/L或20 μmol/L的NAA。

1.2 实验方法

1.2.1 原生质体的制备及培养

在BCDA固体培养基上生长7 d的原丝体, 用8%甘露醇配置的0.8%崩溃酶(Sigma D9515)酶解30~45 min, 以去除细胞壁。酶解液用300目筛子过滤后, 200 g离心, 再用8%甘露醇清洗并离心两遍, 作为0 h的原生质体。将此原生质体转入含有8%甘露醇的BCDA液体培养基, 避光培养24 h后, 再转入正常的小立碗藓培养条件下进行培养, 并适时地轻微摇晃, 防止原生质体沉淀凝聚, 分别培养48 h和96 h后离心收样或进行处理观察^[23]。

1.2.2 RNA的提取和RT-PCR分析

用RNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)试剂盒提取原丝体和原生质体中的总RNA。使用随机引物反转录试剂盒(全式金), 取1 μg总RNA进行逆转录。以*PpACT*基因为参照, 对样本进行定量调整, 使cDNA含量均一化。所用引物见表1^[11], PCR扩增28个循环。

表1 RT-PCR所用引物
Table 1 Primers used for RT-PCR

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Sequence (5'-3') |
|---------------------|--------------------------|
| PpACT-RT-sense | CGGAGAGGAAGTACAGTGTGTG |
| PpACT-RT-anti | ACCAGCCGTTAGAATTGAGCC |
| PpIAA1A-RT-sense | ATCCGGGAGTCCGAGCTT |
| PpIAA1A- RT-anti | CAGGCCTGTTCATCTTGTG |
| PpIAA1B-RT-sense | TCAGAACGGTCAGCTTGG |
| PpIAA1B- RT-anti | CAGGCCTGTTCATCTTGTG |
| PpIAA2- RT-sense | CGAAGAACAAATGGGGTCAA |
| PpIAA2-RT-anti | GCCAACCCACTGTCTGATT |

1.2.3 qRT-PCR分析

以上述cDNA为模板, 用TB Green™ Premix Ex Taq™(Takara)试剂进行qRT-PCR扩增, 采集荧光信号, 获取Cq值, 并进行基因相对表达量的计算。所用引物见表2。

1.2.4 FDA染色

用荧光素二乙酸(FDA)对原生质体进行染色检测^[25]。将WT和突变体培养0、48、96 h的原生质体稀释至一致浓度, 加入FDA染色液(2 mg FDA/mL丙酮, 稀释50倍)。在冰上放置30 min, 然后在黑暗中用荧光显微镜检测及拍照, 存活原生质体可以被FDA染色并发出黄绿色荧光。

表2 qRT-PCR 所用引物
Table 2 Primers used for qRT-PCR

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence (5'-3') |
|---------------------|---------------------------------|
| Phypa_172564-F | TGTGGATGAACAGCCACTGACG |
| Phypa_172564-R | TCGAAGACCGCTTAGCTGATACTC |
| Phypa_172248-F | TCGGTGTGTTCTCGTGATGAG |
| Phypa_172248-R | ACGCTCTTAGATCCAGCGAAACC |
| Phypa_216086-F | AGCTTGAGACAGGACCCAAAGTG |
| Phypa_216086-R | TCTTGATAGGCGCAGGGAAC |
| Phypa_216975-F | TGGGCTAACTCGCCAGGAATAG |
| Phypa_216975-R | TGCTCAGCCCTGTACCTATTG |
| PpACT-F | CAGCCTTGGTGCAGCAA |
| PpACT-R | ACATACGCGTCCTCTGTCC |

1.2.5 DNA 倍性分析

7 d 的原丝体、0 h 的原生质体、培养 48 h 和 96 h 的原生质体中分别加入 500 μL 的 chopping buffer (45 mmol/L MgCl₂ · 6H₂O、30 mmol/L 柠檬酸钠、20 mmol/L MOPS、0.1% Triton X-100, NaOH 调节 pH7.0)，用刀片在玻璃培养皿中切碎，悬浮液用 30 μm 孔径的筛子过滤两次。过滤后加入 DAPI (Sigma-Aldrich, USA) 至终浓度为 2 μg/mL，在黑暗中放置 5 min 使细胞核染色。使用 Becton Dickinson FACSsort 系统 (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) 进行流式细胞分析，使用 Quanta SC 软件检测分析 10 000 多个核的 DNA 含量。

1.2.6 DNA 甲基化敏感扩增多态性 (MSAP) 检测

MSAP 借鉴 Avivi 等^[20]的实验方法，提取野生型和突变体 7 d 原丝体和 0 h 原生质体的 DNA (CTAB 法)，用 EcoRI/Hpa II 及 EcoRI/Msp I 限制性内切酶组合进行酶切，Hpa II 和 Msp I 均能识别 CCGG 序列，Hpa II 除了外部的胞嘧啶半甲基化外，对任何一个胞嘧啶的甲基化都是敏感的，而 Msp I 对外部的胞嘧啶发生甲基化不能识别酶切，其他情况则均可以。DNA 胞嘧啶的甲基化形式不同，就会酶切产生不同的片段。将接头引物变性后，用 T4 连接酶 (Takara) 连接到酶解的 DNA 片段上，产物用 LA Taq 聚合酶 (Takara) 以预扩增引物进行 PCR 扩增，产物稀释后，再用选择性扩增引物进行扩增 (表 3)。最后，用 6% 聚丙烯酰胺凝胶对二次扩增的产物进行条带分离，用硝酸银进行染色、拍照。

表3 MSAP 所用引物
Table 3 Primers used for methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP)

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence (5'-3') |
|--|---|
| 接头引物 Adapter primer | |
| HM-adapter-sense | GATCATGAGTCCTGCT |
| HM-adapter-anti | CGAGCAGGACTCATGA |
| EcoRI -adapter-sense | CTCGTAGACTGCGTAC |
| EcoRI -adapter-anti | AATTGGTACGCAGTCTAC |
| 预扩增引物 Pre-amplification primer | |
| HM pre-amplification primer | HMO: ATCATGAGTCCTGCTCGG |
| EcoRI pre-amplification primer | E0: GACTGCGTACCAATTCA |
| 选择性扩增引物 Selective amplification primer | |
| HM selective amplification primer | HM1: HMO-TCAA; HM2: HMO-TCAG |
| EcoRI selective amplification primer | E1: E0-CA; E2: E0-CT; E3: E0-AC E4: E0-CC E5: E0-GC E6: E0-AG E7: E0-GG E8: E0-CG |

2 结果与分析

2.1 生长素信号通路在小立碗藓原生质体再生过程中被激活

本研究提取 7 d 原丝体、0、48 和 96 h 原生质体的 RNA，通过 RT-PCR 检测 Aux/IAAs 相关基因的表达水平。如图 1 所示，小立碗藓 3 个 Aux/IAAs 相关基因 *PpIAA1As*、*PpIAA1B* 和 *PpIAA2* 在 0 h 原生质体时期表达量较原丝体显著升高，在 48 h 和 96 h 阶段表达量下降到接近原丝体的水平。说明原生质体再生过程中去除细胞壁后生长素信号通路被激活，该通路可能参与再生过程的初期，即多能性获得阶段。

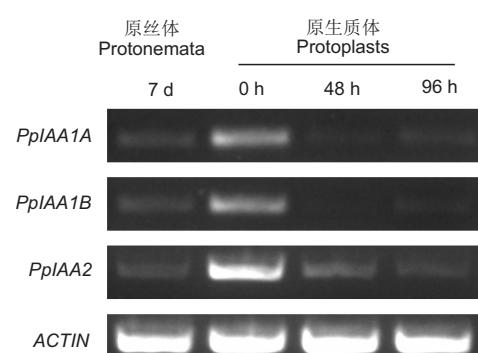


图 1 小立碗藓原生质体再生过程中 Aux/IAAs 相关基因的表达量

Fig. 1 Expression of Aux/IAA-related genes during protoplast regeneration in *Physcomitrella patens*

2.2 *Ppiaa2-87* 突变体对 NAA/IAA 信号不敏感

为确定 *Ppiaa2-87* 的 IAA 信号通路具有缺陷性, 对其表型进行了鉴定。取 7 d 的原丝体材料分别在正常培养基和含有不同浓度 NAA 的培养基中培养 3 周, WT 在 NAA 处理下大多数配子体转化为假根, 但 *Ppiaa2-87* 在正常培养和 NAA 处理情况下, 配子体和假根均不能形成(图 2), 表明 *Ppiaa2-87* 突变体对 NAA/IAA 信号不敏感。

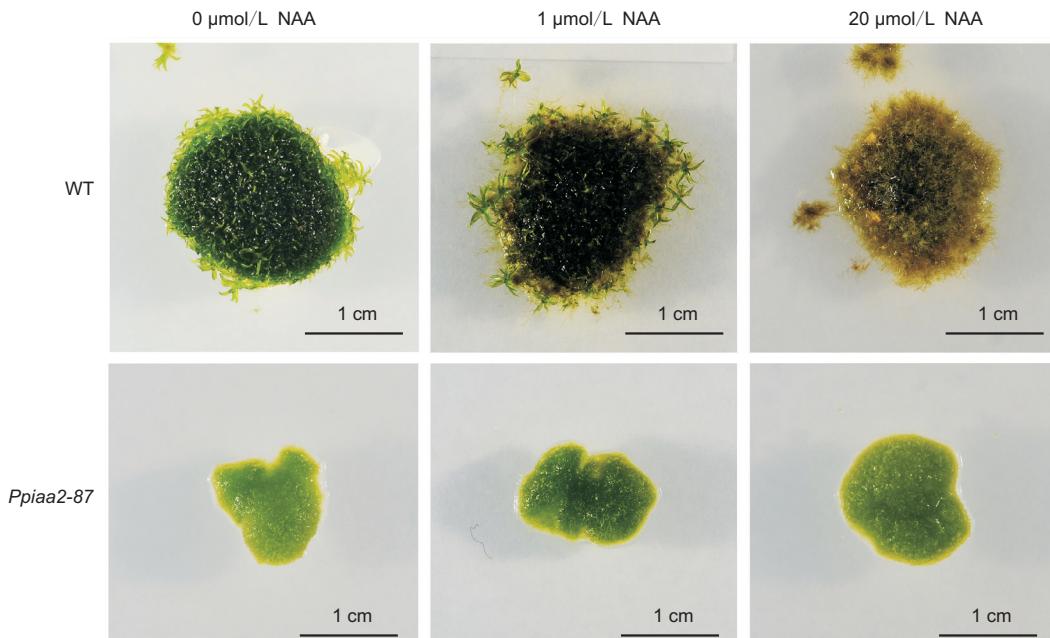


图 2 WT 和 *Ppiaa2-87* 经 NAA 处理的表型

Fig. 2 Phenotypes of WT and *Ppiaa2-87* mutant strains treated with naphthaleneacetic acid (NAA)

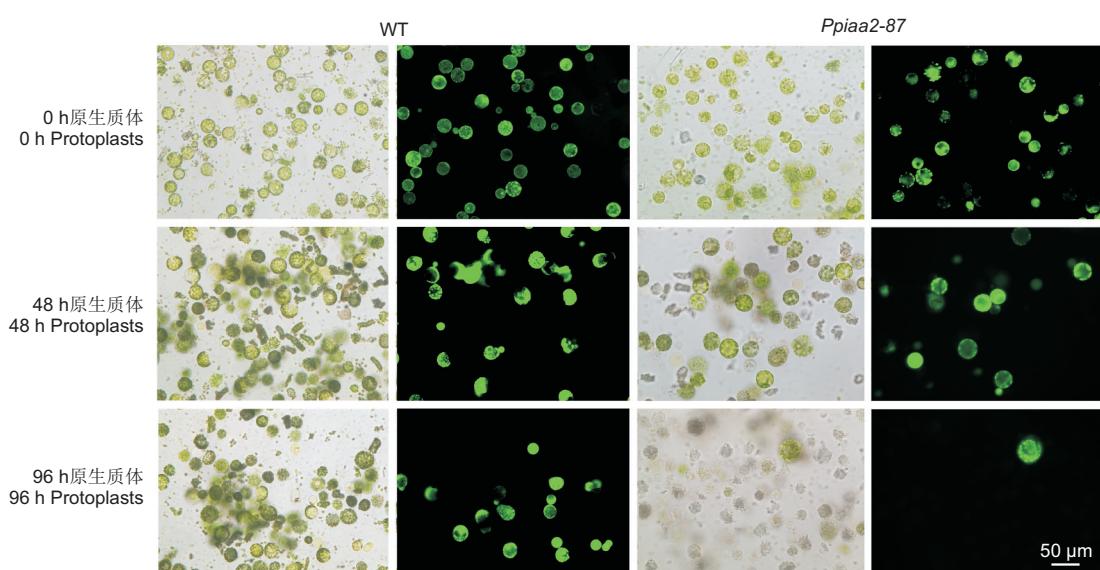


图 3 WT 和 *Ppiaa2-87* 在原生质体再生过程中细胞存活率分析

Fig. 3 Analysis of cell viability during protoplast regeneration in WT and *Ppiaa2-87* mutant strains

2.4 *Ppia2-87* 突变体原生质体再生过程中进入S期受到抑制

为检测 *Ppia2-87* 原生质体重新编程为干细胞的时间进程, 用流式细胞仪检测了原生质体细胞核的DNA倍性。将7 d原丝体的细胞核作为对照, 确定原生质体的细胞周期阶段, 此时的核呈双峰, 分别对应G1和G2/M期DNA倍性(图4)。WT和*Ppia2-87*的0 h原生质体的细胞核仅检测到G1期的峰值, 表明细胞去除细胞壁后实现了同步化。随着培养时间的延长, 部分WT 48 h的原生质体细胞进入S期, 在G2/M的峰值处可以检测到部分细胞核, 至96 h, 在G2/M期的细胞核逐渐增多; 而*Ppia2-87*原生质体在48 h时仍只有一个G1峰值, 在96 h时由于大多数原生质体死亡而无法检测。此结果表明, 部分WT的原生质体培养48 h后能够重编程成为干细胞, 并进入细胞周期, 而*Ppia2-87*原生质体进入S期受到抑制。

2.5 *Ppia2-87*突变体原生质体染色质重塑发生改变

对小立碗藓WT和*Ppia2-87*突变体7 d的原丝体和0 h的原生质体的细胞核进行DAPI染色, 发现WT和*Ppia2-87*中7 d原丝体未分化细胞的细胞核均出现清晰的凝集现象; WT 0 h的原生质体细胞核区域DAPI染色不均匀, 呈分散状态, 具有明显的染色质重组现象, 而*Ppia2-87*突变体0 h的部分原生质体的细胞核仍呈现出清晰的凝集

现象(图5)。说明*Ppia2-87*突变体0 h原生质体可能未发生染色质的重塑现象, 细胞多能性的获得受到影响。进一步通过qRT-PCR检测了染色质重塑复合体中SWI/SNF蛋白家族的部分同源基因(*Phypa172564*、*Phypa172248*、*Phypa216086*和*Phypa216975*)在7 d原丝体和0 h原生质体的表达水平。发现在WT 0 h原生质体中, 除*Phypa216086*外, 其余3个基因的表达较自身原丝体都有上升趋势, 但在*Ppia2-87*突变体0 h原生质体中, 4个基因的表达较自身原丝体均呈下降趋势, 说明IAA调控通路的缺失引起下游相关基因表达量发生改变, 进而导致多能性获得发生改变, 染色质的重塑受阻。

2.6 *Ppia2-87*突变体的甲基化发生改变

为明确7 d的原丝体到0 h的原生质体的转变过程中甲基化模式是否发生改变, 提取DNA进行MSAP实验。对扩增条带比较清晰的6对引物的扩增结果进行比较和分析, 发现WT和*Ppia2-87*在7 d的原丝体和0 h的原生质体总体甲基化水平所占的比例较低, 且甲基化的位点也有所差异(图6)。对扩增清晰的条带进行统计, 发现相对WT而言, *Ppia2-87*在0 h的原生质体中甲基化的比例较高, 达到了9.44%(表4), 表明*PpAux/IAA2*基因的突变影响了原生质体去分化中DNA甲基化的变化。

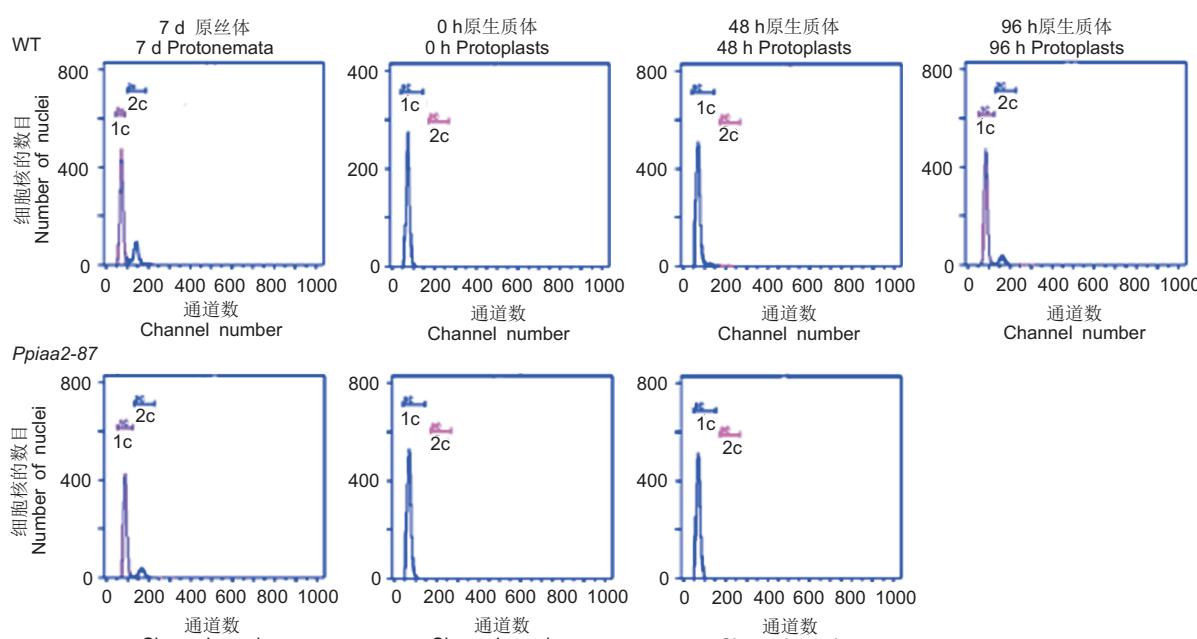
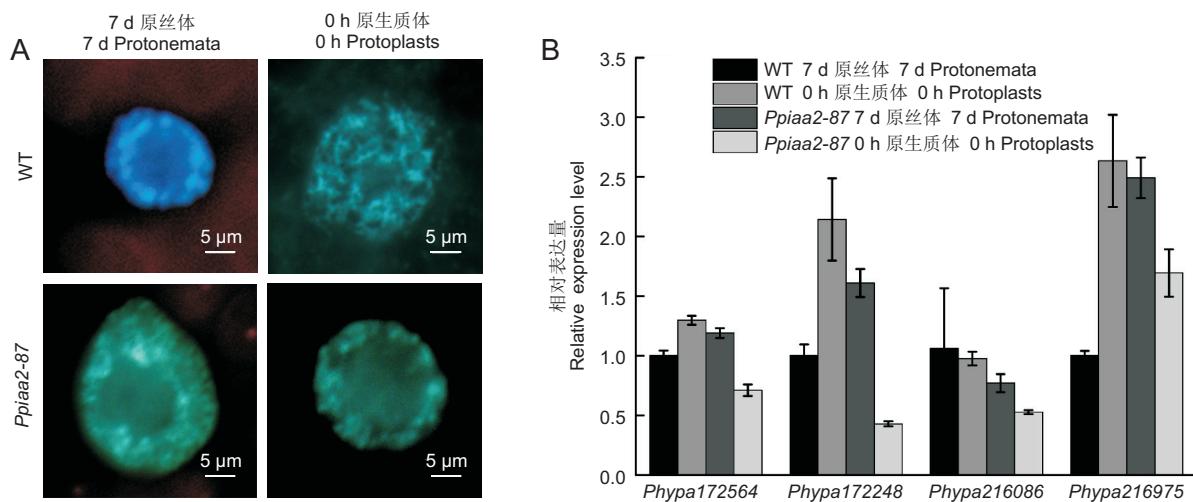


图4 WT和*Ppia2-87*原生质体再生过程的DNA倍性分析

Fig. 4 DNA ploidy analysis of WT and *Ppia2-87* mutant strains during protoplast regeneration

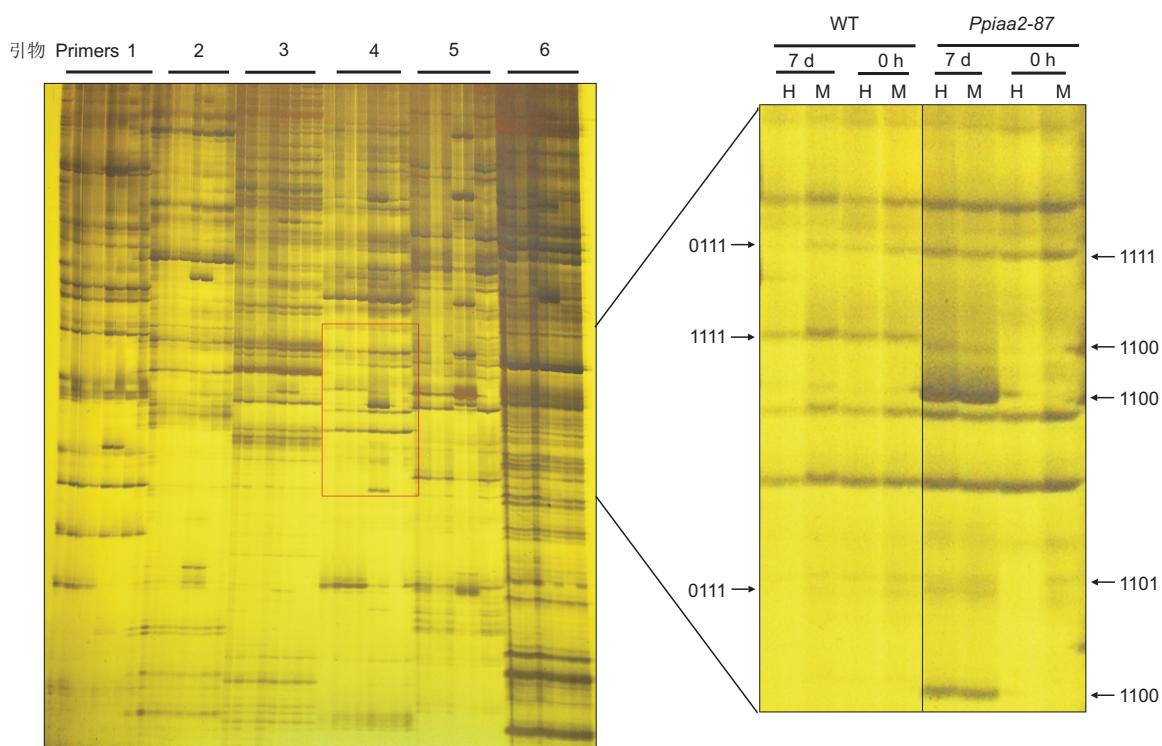


A: WT 和 *Ppiaa2-87* 在原丝体和 0 h 的原生质体的细胞核 DAPI 染色；B: SWI/SNF 蛋白家族部分基因的表达分析。

A: DAPI staining of WT and *PPiaa2-87* nuclei in protonemata and 0-h protoplasts; B: Expression analysis of genes in SWI/SNF protein family.

图 5 WT 和 *Ppiaa2-87* 突变体的染色质重塑分析

Fig. 5 Analysis of chromatin remodeling in WT and *Ppiaa2-87* mutant strains



H 代表 *EcoRI* 和 *HpaII* 的酶切组合, M 代表 *EcoRI* 和 *MspI* 的酶切组合, “1”和“0”分别代表条带的有无, 表明 DNA 去甲基化或 CCGG 位点甲基化。

H represents enzyme digestion combination of *EcoRI* and *HpaII*; M represents enzyme digestion combination of *EcoRI* and *MspI*; “1” and “0” represent presence or absence of a band, indicating DNA demethylation or methylation at CCGG sites, respectively.

图 6 WT 和 *Ppiaa2-87* 甲基化敏感扩增多态性分析

Fig. 6 MSAP analysis of WT and *Ppiaa2-87* mutant strains

表4 WT和Ppiaa2-87原丝体和原生质体中CCGG位点的胞嘧啶甲基化模式统计

Table 4 Statistics of cytosine methylation patterns at CCGG sites in WT and Ppiaa2-87 protonemata and protoplasts

| 位点类型 Type of sites | 7 d 原丝体 7 d Protonemata | | 0 h 原生质体 0 h Protoplasts | | WT | | Ppiaa2-87 | |
|--|----------------------------|---|-----------------------------|---|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| | H | M | H | M | 条带数 No. of sites | 百分比(%) Percentage | 条带数 No. of sites | 百分比(%) Percentage |
| 无甲基化位点 No methylation sites | 1 | 1 | 1 | 1 | 255 | 95.87 | 253 | 88.46 |
| 相同甲基化位点 Same methylation sites | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0.75 | 0 | 0.35 |
| | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | | 1 | |
| | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | | 0 | |
| 去甲基化变化位点 Demethylation change sites | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | | 0 | |
| | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0.75 | 4 | 1.75 |
| | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | 0 | |
| | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | 1 | |
| | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | | 23 | |
| 甲基化变化位点 Methylation change sites | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | | 3 | |
| | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2.63 | 1 | 9.44 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | | 0 | |
| | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | | 0 | |

注: H代表EcoRI和HpaII的酶切组合,M代表EcoRI和MspI的酶切组合,“1”和“0”分别代表条带的有无,表明DNA去甲基化或CCGG位点甲基化。

Notes: H represents enzyme digestion combination of EcoRI and HpaII; M represents enzyme digestion combination of EcoRI and MspI; “1” and “0” represent presence or absence of a band, indicating DNA demethylation or methylation at CCGG sites, respectively.

3 讨论

目前对原生质体再生的研究多集中于细胞壁恢复、细胞周期重新进入、愈伤组织形成、多能性获得和从头组织再生等,对原生质体再生过程中涉及细胞命运转变的分子过程研究较少。生长素在高等植物组织及原生质体培养中能够促进愈伤组织形成,是细胞重编程、细胞周期和增殖的主要内源性调节因子之一^[23]。苔藓植物具有极强的再生能力,其受伤组织和原生质体不经外源生长素的诱导就能再生形成植株^[19],甚至细胞的DNA链断裂(单链断裂、双链断裂或两者皆有)的瞬时诱导也可以触发分化的叶片细胞重编程为干细胞,而不会导致细胞的死亡^[26],因此是研究再生过程分子机制的理想材料。本文通过对小立碗藓野生型和Ppiaa2-87突变体原生质体的研究,明确了PpAux/IAA2的突变会影响整个细胞再生整个过程,包括多能性的获得阶段及细胞周期的转变。

苔藓中生长素通过转录抑制因子Aux/IAAs调控基因的转录,Aux/IAAs抑制功能的缺失显著改变了转录组,包括改变大量不受生长素直接调控的

基因的表达^[4]。生长素基因表达的诱导受Aux/IAAs激活和抑制ARF之间的复杂相互作用控制^[3]。我们发现,原丝体去除细胞壁后的0 h原生质体中Aux/IAA表达量明显上调,说明游离的生长素可能增加,激活了Aux/IAAs信号通路,如新鲜分离的苔藓植物葫芦藓(*Funaria hygrometrica* Hedw.)原生质体在15 min的培养时间内迅速积累IAA^[27]。Aux/IAAs蛋白作为抑制因子,其周转时间比较短,只要生长素浓度保持在较高水平,就会通过泛素/蛋白酶体途径快速降解。当生长素浓度下降,积累的Aux/IAA mRNA将继续被翻译,最终Aux/IAAs蛋白浓度达到足够的水平。积累的蛋白可以反馈到自身的基因以及生长素早期反应基因^[28],从而下调它们的表达,此过程涉及到复杂的反馈调控网络。生长素的稳态也是植物协调发展的必要条件,受到合成、降解、结合和运输途径的控制^[29]。生长素可能是作为生理上不活跃的缀合物储存的。在高等植物中,通过GH3家族成员合成生长素缀合物来控制生长素水平。小立碗藓中具有两个GH3-like蛋白可将IAA、IBA(indole-3-butyric acid)和茉莉酸(JA)转化为酰胺缀合物^[30]。

在轮藻 (*Chara L.*) 中, 生长素的结合速率非常缓慢, 因此生物合成是其自由生长素的主要来源, 而苔藓和维管植物生长素的结合速率增加, 其在维持生长素稳态中也起重要作用^[31]。生长素从内质网到细胞核的运输是直接控制细胞核内生长素水平的一个主要亚细胞途径, 也是植物细胞生长素介导的下游反应的基础^[32]。生长素外排蛋白 PIN 介导的生长素运输在苔藓植物中保守^[33], 小立碗藓的一种分泌囊泡的亚基 *PpEXO70.3d* 作用于 PIN 循环和生长素的极性运输, 也是原生质体再生所需要的。*Ppexo70.3d* 原生质体再生表型和 *Ppiaa2-87* 具有一致性, 多数在第 2 天发生死亡^[34]。小立碗藓原生质体再生过程除了生长素调控途径外, 其合成及结合是如何维持游离生长素的浓度及转运到细胞核起始调控功能的, 还需要进行深入研究。

若不施用激素, 高等植物原生质体经历染色质浓缩/去浓缩就不能进入细胞周期, 最终导致死亡^[15]。同样, 我们发现 *Ppiaa2-87* 突变体的原生质体在培养过程中的存活率低于 WT, 说明生长素信号通路也决定了小立碗藓原生质体的命运。细胞分裂重新进入细胞周期, 通常是植物细胞去分化的一个特征。通过流式细胞仪检测发现 *Ppiaa2-87* 的原生质体从 G1 期到 S 期的转变受阻, 可能是因为生长素调控 SKP2A, 进而影响了细胞分裂。SKP2A 是一种与 TIR1 家族结构相似的 F-box 蛋白, 可通过促进包括 E2FC 和 DPB 在内的细胞周期转录调控因子的降解来调节细胞周期进程, 而生长素可以直接结合 SKP2A 调节其稳定性^[35, 36]。

生长素不仅是激活细胞周期所必需的, 也是诱导染色质松弛和 DNA 复制所必需的^[37]。对 0 h 原生质体的核进行 DAPI 染色观察, 发现部分 *Ppiaa2-87* 的染色质未发生去浓缩。同时, 我们检测到 SWI/SNF 蛋白家族的部分同源基因在 *Ppiaa2-87* 的 0 h 原生质体中表达量较原丝体下降。SWI/SNF 是 ATP 依赖的染色质重塑复合体中的一个蛋白家族, 依赖 ATP 水解释放的能量, 通过与核小体区域的组蛋白相结合或者与 DNA 的相互作用而改变核仁区域的结构, 使染色质发生重塑^[38]。同时, 染色质的变化可能与被 Aux/IAA 结合抑制的 ARF 蛋白有关。如拟南芥 ARF5 招募 SWI/SNF 染色质重塑 ATP 酶到染色质区域, 使染色质的结构松动, 介导了染色质的

变化, 这也是基因激活所必需的^[39]。

植物再生过程中, DNA 甲基化与细胞命运的转变密切相关, 其协调参与了细胞周期的调控。植物再生过程 DNA 甲基化模式的改变不是伴随着显著降低 DNA 甲基化整体水平的变化, 而是在 DNA 甲基化模式中检测到局部改变, 这可能参与了去分化原生质体中特定基因表达的激活^[20]。通过甲基化敏感扩增多态性分析, 发现 WT 和 *Ppiaa2-87* 的 DNA 甲基化程度和模式不完全一致, *Ppiaa2-87* 在 0 h 的原生质体甲基化程度偏高, 说明 *PpAux/IAA2* 可以通过改变 DNA 的甲基化模式来调控特定基因的表达, 从而控制细胞的命运。除生长素外, 细胞分裂素也是参与细胞分化分裂过程的关键激素, 而其他激素似乎对细胞重编程并不那么重要, 但可能通过调节生长素的影响发挥作用。如油菜素内酯或水杨酸的应用可以上调拟南芥肉原生质体中的生长素信号转导^[37]。

综上所述, 本文通过研究小立碗藓 *PpAux/IAA2* 对原生质体再生存活率和表观遗传特征的影响, 论证了内源生长素信号途径对原生质体再生的重要性, 有助于促进对苔藓植物细胞分化的分子机制和强大再生能力的认识。但细胞再生过程还存在许多问题亟待解决, 利用小立碗藓原生质体进一步阐明细胞再生的调控机制, 如内源生长素浓度对原生质体再生过程的影响, 以及其他植物激素与生长素之间的协同和拮抗关系在此过程中的作用等, 可推动对植物基于细胞再生的深入认识及应用。

参考文献:

- [1] Luo J, Zhou JJ, Zhang JZ. Aux/IAA gene family in plants: molecular structure, regulation, and function [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): 259.
- [2] Perrot-Rechenmann C. Cellular responses to auxin: division versus expansion [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(5): a001446.
- [3] Li K, Wang S, Wu H, Wang H. Protein levels of several *Arabidopsis* auxin response factors are regulated by multiple factors and ABA promotes ARF6 protein ubiquitination [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9437.
- [4] Lavy M, Estelle M. Mechanisms of auxin signaling [J]. *Development*, 2016, 143(18): 3226–3229.
- [5] Niemeyer M, Moreno Castillo E, Ihling CH, Iacobucci C, Wilde V, et al. Flexibility of intrinsically disordered degrons

- in AUX/IAA proteins reinforces auxin co-receptor assemblies [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2277.
- [6] Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ. Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(2): 533–543.
- [7] Trenner J, Poeschl Y, Grau J, Gogol-Doring A, Quint M, Delker C. Auxin-induced expression divergence between *Arabidopsis* species may originate within the TIR1/AFB-AUX/IAA-ARF module [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(3): 539–552.
- [8] Ashton NW, Grimsley NH, Cove DJ. Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants [J]. *Planta*, 1979, 144(5): 427–435.
- [9] Kim SH, Bahk S, An J, Hussain S, Nguyen NT, et al. A gain-of-function mutant of IAA15 inhibits lateral root development by transcriptional repression of *LBD* genes in *Arabidopsis* [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 1239.
- [10] Lavy M, Prigge MJ, Tao S, Shain S, Kuo A, et al. Constitutive auxin response in *Physcomitrella* reveals complex interactions between Aux/IAA and ARF proteins [J]. *Elife*, 2016, 5: e13325.
- [11] Prigge MJ, Lavy M, Ashton NW, Estelle M. *Physcomitrella patens* auxin-resistant mutants affect conserved elements of an auxin-signaling pathway [J]. *Curr Biol*, 2010, 20(21): 1907–1912.
- [12] Birnbaum KD, Sanchez Alvarado A. Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals [J]. *Cell*, 2008, 132(4): 697–710.
- [13] Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM. *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway [J]. *Dev Cell*, 2010, 18(3): 463–471.
- [14] Iwase A, Ohme-Takagi M, Sugimoto K. WIND1: a key molecular switch for plant cell dedifferentiation [J]. *Plant Signal Behav*, 2011, 6(12): 1943–1945.
- [15] Zhao J, Morozova N, Williams L, Libs L, Avivi Y, Grafi G. Two phases of chromatin decondensation during dedifferentiation of plant cells: distinction between competence for cell fate switch and a commitment for S phase [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(25): 22772–22778.
- [16] Nishiyama T, Miyawaki K, Ohshima M, Thompson K, Naganashima A, et al. Digital gene expression profiling by 5'-end sequencing of cDNAs during reprogramming in the moss *Physcomitrella patens* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36471.
- [17] Prigge MJ, Bezanilla M. Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens* [J]. *Development*, 2010, 137(21): 3535–3543.
- [18] Ishikawa M, Murata T, Sato Y, Nishiyama T, Hiwatashi Y, et al. *Physcomitrella* cyclin-dependent kinase A links cell cycle reactivation to other cellular changes during reprogramming of leaf cells [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(8): 2924–2938.
- [19] Sakakibara K, Reisewitz P, Aoyama T, Friedrich T, Ando S, et al. *WOX13-like* genes are required for reprogramming of leaf and protoplast cells into stem cells in the moss *Physcomitrella patens* [J]. *Development*, 2014, 141(8): 1660–1670.
- [20] Avivi Y, Morad V, Ben-Meir H, Zhao J, Kashkush K, et al. Reorganization of specific chromosomal domains and activation of silent genes in plant cells acquiring pluripotentiality [J]. *Dev Dyn*, 2004, 230(1): 12–22.
- [21] Givaty-Rapp Y, Yadav NS, Khan A, Grafi G. S1-type endonuclease 2 in dedifferentiating *Arabidopsis* protoplasts: translocation to the nucleus in senescing protoplasts is associated with de-glycosylation [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170067.
- [22] Grafi G, Avivi Y. Stem cells: a lesson from dedifferentiation [J]. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(8): 388–389.
- [23] Wang X, Qi M, Li J, Ji Z, Hu Y, et al. The phosphoproteome in regenerating protoplasts from *Physcomitrella patens* protonemata shows changes paralleling postembryonic development in higher plants [J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(8): 2093–2106.
- [24] Cove DJ, Perroud PF, Charron AJ, McDaniel SF, Khandelwal A, Quatrano RS. The moss *Physcomitrella patens*: a novel model system for plant development and genomic studies [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009, 2009(2): pdb em0115.
- [25] Widholm JM. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells [J]. *Stain Technol*, 1972, 47(4): 189–194.
- [26] Gu N, Tamada Y, Imai A, Palfalvi G, Kabeya Y, et al. DNA damage triggers reprogramming of differentiated cells into stem cells in *Physcomitrella* [J]. *Nat Plants*, 2020, 6(9): 1098–1105.
- [27] Geier U, Werner O, Bopp M. Indole-3-acetic acid uptake in isolated protoplasts of the moss *Funaria hygrometrica* [J]. *Physiol Plant*, 1990, 80: 584–592.
- [28] Tiwari SB, Wang XJ, Hagen G, Guilfoyle TJ. AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(12): 2809–2822.
- [29] Norman J, Bartel B. Redundancy as a way of life-IAA metabolism [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2(3): 207–213.
- [30] Ludwig-Muller J, Julke S, Bierfreund NM, Decker EL, Reski R. Moss (*Physcomitrella patens*) GH3 proteins act in auxin homeostasis [J]. *New Phytol*, 2009, 181(2): 323–338.

- [31] Cooke TJ, Poli D, Sztein AE, Cohen JD. Evolutionary patterns in auxin action [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 49(3/4): 319–338.
- [32] Middleton AM, Dal Bosco C, Chlap P, Bensch R, Harz H, et al. Data-driven modeling of intracellular auxin fluxes indicates a dominant role of the ER in controlling nuclear auxin uptake [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(11): 3044–3057.
- [33] Bennett T, Brockington SF, Rothfels C, Graham SW, Stevenson D, et al. Paralogous radiations of PIN proteins with multiple origins of noncanonical PIN structure [J]. *Mol Biol Evol*, 2014, 31(8): 2042–2060.
- [34] Rawat A, Brejskova L, Hala M, Cvrckova F, Zarsky V. The *Physcomitrella patens* exocyst subunit EXO70.3d has distinct roles in growth and development, and is essential for completion of the moss life cycle [J]. *New Phytol*, 2017, 216(2): 438–454.
- [35] Jurado S, Abraham Z, Manzano C, Lopez-Torrejon G, Pacion LF, Del Pozo JC. The *Arabidopsis* cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(12): 3891–3904.
- [36] Del Pozo JC, Diaz-Trivino S, Cisneros N, Gutierrez C. The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(9): 2224–2235.
- [37] Pasternak T, Lystvan K, Betekhtin A, Hasterok R. From single cell to plants: mesophyll protoplasts as a versatile system for investigating plant cell reprogramming [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4195.
- [38] Tang L, Nogales E, Ciferri C. Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2010, 102(2/3): 122–128.
- [39] Wu MF, Yamaguchi N, Xiao J, Bargmann B, Estelle M, Sang Y, et al. Auxin-regulated chromatin switch directs acquisition of flower primordium founder fate [J]. *Elife*, 2015, 4: e09269.

(责任编辑：李惠英)