

张 冰,夏德安,马旭俊. 组蛋白去乙酰化酶在杨树根再生和生长中的功能[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):40-43.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.010

组蛋白去乙酰化酶在杨树根再生和生长中的功能

张 冰,夏德安,马旭俊

(东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室,黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:组蛋白去乙酰化酶(HDAC)在植物生长和发育过程中具有十分重要的调控作用。目前,关于 HDAC 的研究主要集中在草本植物,而关于木本植物的 HDAC 功能研究鲜有报道。以 84 K 杨(银白杨×腺毛杨)和小黑杨 2 种杨树组培苗为供试材料,在培养基中添加 0、1、5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素(TSA),研究 TSA 对杨树根再生和生长的影响。结果表明,TSA 处理明显抑制 2 种杨树根的再生和生长,TSA 浓度越高,对组培苗根的再生和生长的抑制作用越大。研究结果对于通过根系改良提高杨树对水分和营养物质的利用率、增强杨树抗逆性具有十分重要的意义。

关键词:组蛋白去乙酰化酶(HDAC);曲古抑菌素(TSA);根再生;生长

中图分类号:S792.110.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)05-0040-04

表观遗传调控是基因表达调控的一种重要方式,是在不改变 DNA 序列的情况下,通过 DNA 或组蛋白修饰来影响基因的转录。组蛋白修饰包括组蛋白乙酰化、磷酸化、甲基化、泛素化、糖基化等^[1],其中组蛋白乙酰化是研究得最早、最清楚的一种组蛋白翻译后修饰^[2]。组蛋白乙酰化修饰主要发生在组蛋白 N 末端的赖氨酸残基上,包括组蛋白乙酰化、组蛋白去乙酰化 2 个动态的、可逆的过程。组蛋白乙酰化能够

减弱组蛋白与带负电荷的 DNA 之间的相互作用,使染色质处于伸展状态^[3];又可以改变核小体的表面结构,形成有利于转录调节因子结合的位点^[3-4],进而对基因的转录具有促进作用。相关研究表明,在转录活化区域内,组蛋白多表现出高度的乙酰化状态。组蛋白去乙酰化常常引起染色质的凝缩,与基因转录抑制或基因沉默有关。组蛋白乙酰化、去乙酰化过程分别由组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase,简称 HAT)、组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,简称 HDAC)催化完成,二者共同作用保证细胞内组蛋白乙酰化水平处于动态平衡。HDAC 是 1 个基因超家族,在真核生物包括真菌、植物和动物中广泛分布。1996 年第 1 个 HDAC 基因从哺乳动物细胞中得到克隆^[5],1988 年在豌豆中首次发现植物组蛋白去乙酰化酶的存在^[6]。近十几年来,植物 HDAC 越来越受到重视,HDAC 基因从玉米、拟南芥、水稻、大麦、马铃薯

收稿日期:2016-09-09

基金项目:中国博士后科学基金(编号:2013M540264);黑龙江省博士后基金(编号:LBH-Z13006)。

作者简介:张 冰(1991—),女,黑龙江大庆人,硕士研究生,主要从事林木遗传育种研究。E-mail:903253543@qq.com。

通信作者:马旭俊,博士,副教授,主要从事林木遗传育种研究。

E-mail:maxj@nefu.edu.cn。

[2]浙江农业大学. 果树育种学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1980:270.

[3]叶 航. 4 种桃砧木对南方根结线虫的抗性研究[D]. 北京:中国农业大学,2006.

[4]曹艳平. 几种桃树砧木的抗旱和耐涝性研究[D]. 北京:中国农业大学,2007.

[5]刘航空,韩明玉,禹 婷,等. 影响油桃叶片产生胚性愈伤组织的因素[J]. 果树学报,2006,23(3):370-374.

[6]齐 贤,谭 彬,郑先波,等. ‘黄水蜜’桃实生苗茎段再生体系的建立[J]. 果树学报,2015,32(5):866-871.

[7]Peérez-Jimeénez M, Carrillo-Navarro A, C-Terrer J. Regeneration of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] cultivars and *Prunus persica* × *Prunus dulcis* rootstocks via organogenesis[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2012, 108:55-62.

[8]Zhou H C, Li M, Zhao X, et al. Plant regeneration from *in vitro* leaves of the peach rootstock ‘Nemaguard’ (*Prunus persica* × *P. davidiana*) [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2010, 101:79-87.

[9]张衡涛,李 靖,宋尚伟,等. 桃矮化砧木的组织培养及植株再生[J]. 河南农业大学学报,2004,38(1):77-81.

[10]马常念,张慧琴,肖金平,等. 三种桃砧木茎尖培养技术的研究[J]. 浙江农业学报,2013,25(3):503-508.

[11]Pooler M. R., Scorza R. Regeneration of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] rootstock cultivar from cotyledons of mature stored seed[J]. HortScience, 1995, 30(2):355-356.

[12]San B S, Li Z G, Hu J, et al. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaf explants of peach rootstock Guardian is significantly enhanced by silver thiosulfate[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2015, 120:757-765.

[13]丛 芳,韩明玉,赵彩平,等. 桃叶片再生不定芽的研究[J]. 果树学报,2009,26(5):614-618.

[14]张永庆,陈大明,金勇丰,等. 桃离体组织分化再生植株的研究[J]. 园艺学报,2001,28(4):342-343.

[15]Gentile A, Monticelli S, Damiano C, et al. Adventitious shoot regeneration in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch][J]. Plant Cell Rep, 2002, 20:1011-1016.

[16]吴延军,徐昌杰,张上隆. 桃组织培养和遗传转化研究现状及展望[J]. 果树学报,2002,19(2):123-127.

薯、葡萄、烟草等多种植物中得以鉴定和分析。根据与酵母 HDAC 序列同源性比较,这些植物 HDAC 可分为 3 个亚家族: RPD3/HDA1、HD2、SIR2,其中 HD2 是植物所特有的一类组蛋白去乙酰化酶。HDAC 在植物生长、发育、胁迫反应和基因沉默过程中具有十分重要的调控作用。

虽然相关报道不多,但在拟南芥等草本植物中的研究表明,HDAC 在根系发育(包括根毛发育、侧根形成和主根生长)过程中发挥着十分重要的调节作用。HDAC 与根毛发育有密切关系。早在 2000 年,Murphy 等研究发现,HDAC 特异性抑制剂如组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素(trichostatin A,简称 TSA)、丁酸钠(sodium butyrate)能够抑制豌豆(*Pisum sativum*)根分生组织细胞的有丝分裂^[7]。2005 年,Xu 等研究发现,TSA 处理能够改变根模式形成相关基因 *CPC*、*GL2*、*WER* 的表达,并引起根毛细胞在非根毛形成部位的出现和发育^[8]。2011 年,Zhu 等研究发现拟南芥 RPD3/HDA1 亚家族另一个成员 HDA6 能够抑制根发育调节因子 EIN3(ethylene insensitive 3)所调节基因的表达,并抑制茉莉酸(JA)信号反应;TSA 处理会诱导拟南芥幼苗产生大量根毛^[9]。拟南芥 HDA19 也与根毛发育有关,HDA19 促进低磷(Pi)条件下根毛的产生^[10]。除了调节根毛发育,HDAC 对侧根发育也有十分重要的作用。侧根的发育受到生长素以及生长素应答因子(auxin response factor,简称 ARF)的调节。HDAC 对生长素介导的拟南芥侧根的发育具有负调控作用^[11]。在根发育过程中,生长素到达主根根尖需要生长素转运蛋白如 PIN(pin-formed)家族、ABC(ATP-binding cassette)超家族的运输^[12]。2013 年,Nguyen 等研究发现,在 HDAC 抑制剂如 TSA、NaB 存在下,PIN1 蛋白被 26S 蛋白酶降解,导致 PIN 蛋白不能在根尖部位积累,进而显著抑制了拟南芥主根的生长^[13]。在水稻中,*OsHDAC1* 与根生长有关,*OsHDAC1* 基因过量表达能够促进水稻根的生长^[14]。近期的关于玉米的研究表明,HDAC 抑制剂 NaB 处理引起玉米根分生组织细胞有丝分裂停滞在早前期,根的生长受到严重抑制^[15]。虽然 HDAC 在根生长发育中的功能研究较少,但已有研究充分说明,HDAC 对植物根系形成和发育十分重要。

目前,关于木本植物 HDAC 基因在根生长发育中的功能研究鲜有报道。杨树在世界范围内广泛分布,不仅是重要的造林和工业用材树种,也是木本植物研究的模式植物。本研究分析了 HDAC 在杨树根再生和生长过程中的功能,这一研究不仅在理论上有利于人们了解杨树根系生长发育的表现遗传调控机制,而且对于通过根系改良提高杨树对水分、营养物质的利用率以及提高杨树抗逆性具有一定的意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究所用的植物材料 84K 杨、小黑杨无菌苗,由东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 杨树无菌苗的继代培养 84K 杨、小黑杨无菌苗在 WPM 培养基上培养 4~5 周,切茎段,将含有腋芽的茎段插入 WPM 培养基上培养 3 周,至腋芽萌发、长出幼苗。然后将幼苗从茎段上切下,并放到含有 0.1 mg/L IBA 的 WPM 培养基上进行生根培养。WPM 培养基含有 2% 蔗糖、0.1 mg/L IBA、0.6% 琼脂,用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 5.8。组培苗在温度为 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、光—暗周期 16 h—8 h 的条件下培养。

1.2.2 杨树幼苗的 TSA 处理 将 4~5 周龄 84K 杨、小黑杨组培幼苗切茎段,茎段在 WPM 培养基上培养 3 周,然后将杨树茎段上由腋芽萌发出幼苗用剪刀剪下,分别放在含有 0、1、5 $\mu\text{mol/L}$ TSA 的 WPM 培养基上进行生根培养,培养温度为 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,光—暗周期为 16 h—8 h。

1.2.3 植株根长、高度的测定 将 84K 杨、小黑杨组培幼苗在含有 0、1、5 $\mu\text{mol/L}$ TSA 的 WPM 培养基上生根 1、2 周时,分别测量并记录 84K 杨、小黑杨再生幼苗的主根长度、植株高度,利用 Prism 6 软件对数据进行处理,并通过多重比较法分析差异显著性。当 $P < 0.05$ 时,表示存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 TSA 抑制杨树根的再生

2.1.1 TSA 抑制 84K 杨根的再生 84K 杨含腋芽的茎段在 WPM 培养基上培养 3 周后,腋芽长出高 1.5 cm 左右的幼苗;将幼苗用剪刀剪下,分别放在含有 0、1、5 $\mu\text{mol/L}$ TSA 的 WPM 培养基上生根培养。生根培养 1 周时,在含有不同浓度 TSA 的培养基上再生出的不定根长度存在明显差别(图 1)。在含有 0 $\mu\text{mol/L}$ TSA 的培养基上,84K 杨幼苗基部能够再生出不定根,不定根平均长度为 6.3 mm;在含有 1 $\mu\text{mol/L}$ TSA 的培养基上,84K 杨组培幼苗再生出的不定根平均长度为 2 mm;在含有 5 $\mu\text{mol/L}$ TSA 的培养基上,84K 杨组培幼苗不能再生出不定根(图 2)。结果表明,TSA 处理抑制不定根的再生,TSA 浓度越高,对根再生的抑制作用越强。

2.1.2 TSA 抑制小黑杨根的再生 与 84K 杨相似,小黑杨幼苗不定根的再生受 TSA 的明显抑制(图 3)。小黑杨在含有 0 $\mu\text{mol/L}$ TSA 的 WPM 培养基上生长 1 周时,在幼苗的基部能够再生出不定根,不定根的平均长度为 16 mm;当培养基



a. 0 $\mu\text{mol/L}$ TSA

b. 1 $\mu\text{mol/L}$ TSA

c. 5 $\mu\text{mol/L}$ TSA

图1 TSA 处理抑制 84K 杨不定根的再生情况

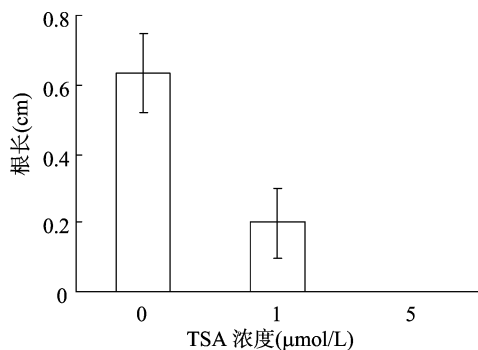


图2 TSA 处理 1 周时 84K 杨再生根的根长

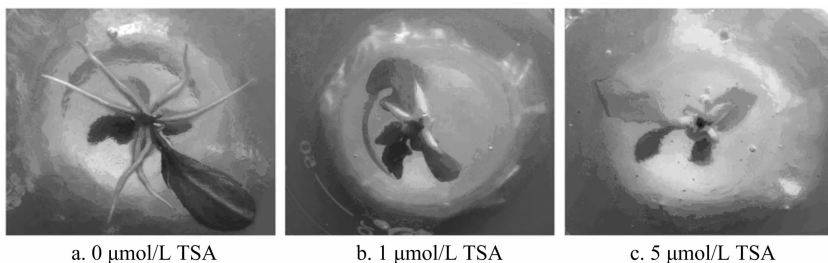


图3 TSA 处理抑制小黑杨不定根的再生情况

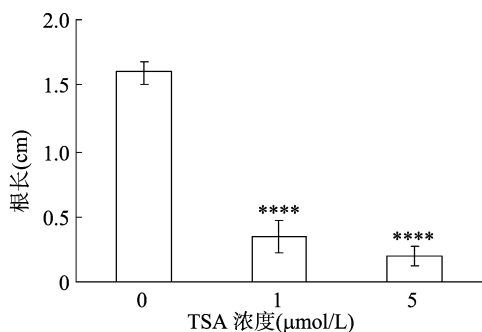
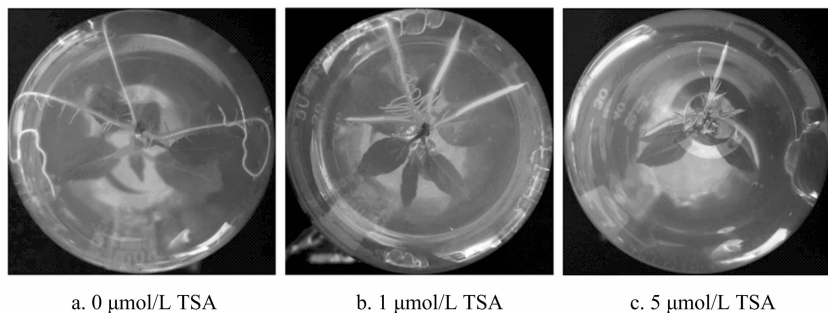
图4 TSA 处理 1 周时小黑杨再生根的根长
“****”表示与对照在 0.000 1 水平差异显著。图 6、图 8 同

图5 TSA 处理 2 周时对 84K 杨根生长的影响情况

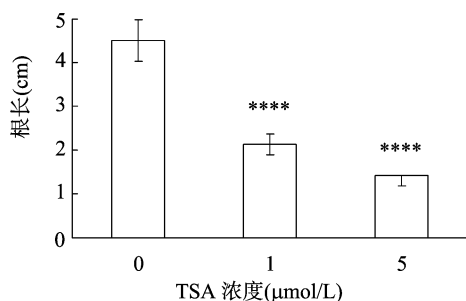


图6 84K 杨幼苗生长 2 周时再生根的根长

中 TSA 浓度为 1 μmol/L 时,再生出的不定根平均长度为 3.5 mm;当培养基中 TSA 浓度为 5 μmol/L 时,再生出的不定根平均长度为 2 mm(图 4)。

2.2 TSA 抑制杨树根的生长

2.2.1 TSA 抑制 84K 杨根的生长 84K 杨含腋芽的茎段在 WPM 培养基上培养 3 周后,腋芽长出高 1.5 cm 左右的幼苗,将幼苗用剪刀剪下,分别放在含有 0、1、5 μmol/L TSA 的 WPM 培养基上生根培养。TSA 处理抑制了再生根的生长,而且随着 TSA 浓度的增加,其根生长受到的抑制作用越大(图 5)。84K 杨幼苗在含有 0 μmol/L TSA 的培养基上生长 2 周后,幼苗再生出的不定根平均长度为 4.5 cm;在含有 1 μmol/L

TSA 的培养基上,不定根平均长度为 2.1 cm;而在含有 5 μmol/L TSA 的培养基上,不定根平均长度为 1.4 cm(图 6)。

2.2.2 TSA 抑制小黑杨根的生长 小黑杨含腋芽的茎段在 WPM 培养基上培养 3 周后,腋芽萌发出高 1.5 cm 左右的幼苗,将幼苗用剪刀剪下,分别放在含有 0、1、5 μmol/L TSA 的 WPM 培养基上生根培养。在含有不同浓度 TSA 的培养基上生长 2 周时,小黑杨再生根的长度存在明显差异,TSA 浓度越高,根的长度越短,呈负相关趋势(图 7)。当 TSA 浓度为 0 μmol/L 时,植株根的长度平均为 5.3 cm;当 TSA 浓度为 1 μmol/L 时,植株根的长度明显比 0 μmol/L 处理时短小,根长平均为 1.3 cm;当 TSA 浓度为 5 μmol/L 时,植株根的长度

平均为 0.6 cm(图 8)。研究结果显示,TSA 处理能够抑制小黑杨根的生长。

3 结论与讨论

组织培养是木本植物快速繁殖的一种有效方式,一些树种在组织培养过程中不定芽或根的再生十分困难。通过改变培养基成分(如营养物质或激素含量和比例)或培养条件(如温度、光照度)仍不能有效获得再生植株。因此,亟需一种方法来实现和提高植物的再生率。表观遗传学是基因表达调控的一种重要方式,对植物生长和发育具有重要的调控作用,但

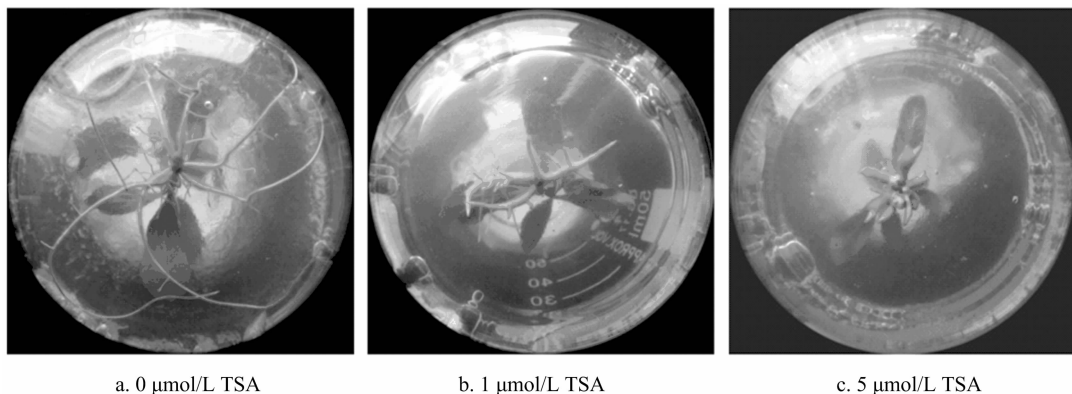


图7 TSA 处理 2 周时小黑杨根生长的影响

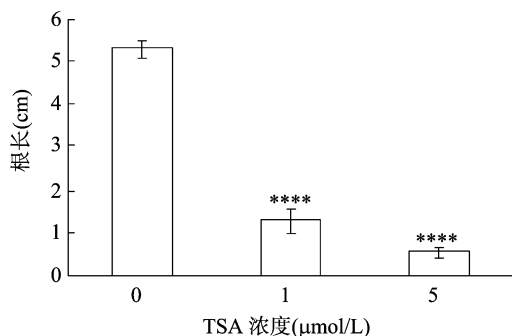


图8 小黑杨幼苗生长 2 周时再生根的根长

是目前关于表观遗传调控在木本植物不定芽或根再生中的功能鲜有报道。

本研究分析了组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 对 84K 杨、小黑杨 2 种杨树根再生和生长的影响,结果显示,TSA 处理能够显著抑制这 2 种杨树根的再生和生长,TSA 浓度越大,根再生和生长受到的抑制作用越大。结果表明,HDAC 的存在对于杨树根的再生、生长发育具有十分重要的调节作用,也说明杨树根的再生、生长受表观遗传调控。

参考文献:

- [1] Hildmann C, Riestler D, Schwienhorst A. Histone deacetylases—an important class of cellular regulators with a variety of functions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(3): 487–497.
- [2] Allfrey V, Faulkner R, Mirsky A. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1964, 51: 786–794.
- [3] Shahbazian M, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation[J]. Annual Review of Biochemistry, 2007, 76: 75–100.
- [4] Berger S L. The complex language of chromatin regulation during transcription[J]. Nature, 2007, 447(7143): 407–412.
- [5] Taunton J, Hassig C A, Schreiber S L. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p[J]. Science, 1996, 272(5260): 408–411.
- [6] Sendra R, Rodrigo I, Salvador M, et al. Characterization of pea histone deacetylases[J]. Plant Molecular Biology, 1988, 11(6): 857–866.
- [7] Murphy J, Mcalister J, Uglierolo A, et al. Histone deacetylase inhibitors and cell proliferation in pea root meristems[J]. Phytochemistry, 2000, 55(1): 11–18.
- [8] Xu C, Liu C, Wang Y, et al. Histone acetylation affects expression of cellular patterning genes in the *Arabidopsis* root epidermis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(40): 14469–14474.
- [9] Zhu Z, An F, Feng Y, et al. Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(30): 12539–12544.
- [10] Chen C, Wu K, Schmidt W. The histone deacetylase HDA19 controls root cell elongation and modulates a subset of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 15708.
- [11] Fukaki H, Taniguchi N, Tasaka M. PICKLE is required for SOLITA-RY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during *Arabidopsis* lateral root initiation[J]. The Plant Journal, 2006, 48(3): 380–389.
- [12] Zazimalová E, Murphy A, Yang H, et al. Auxin transporters—why so many? [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010, 2(3): a001552.
- [13] Nguyen H, Kim J, Jeong C, et al. Inhibition of histone deacetylation alters *Arabidopsis* root growth in response to auxin via PIN1 degradation[J]. Plant Cell Reports, 2013, 32(10): 1625–1636.
- [14] Jang I, Pakh Y, Song S, et al. Structure and expression of the rice class-I type histone deacetylase genes *OsHDAC1-3*; *OsHDAC1* overexpression in transgenic plants leads to increased growth rate and altered architecture[J]. The Plant Journal, 2003, 33(3): 531–541.
- [15] Zhang Q, Wang P, Hou H L, et al. Histone acetylation and reactive oxygen species are involved in the preprophase arrest induced by sodium butyrate in maize roots[J]. Protoplasma, 2017, 254(1): 167–179.