

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.03.008

# AtMET1 基因在 84K 杨中的遗传转化及诱导表达分析

吴晓娟, 鲁俊倩, 常英英, 钟姍辰, 苏晓华, 张冰玉\*

(林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

**摘要:** [目的] 研究拟南芥甲基化转移酶基因 *AtMET1* 在银腺杨 84K (*Populus alba* × *P. glandulosa* ‘84K’) 中的诱导表达特性, 为建立杨树甲基化诱导变异体系、进而实现杨树品种改良等奠定基础。[方法] 以白杨派优良品种 84K 杨的无菌苗叶片为受体材料, 采用农杆菌介导法将化学诱导启动子与 *AtMET1* 基因导入 84K 杨基因组中; 经潮霉素筛选获得抗性植株, 通过常规 PCR 检测、DNA 测序等方法对抗性植株进行鉴定。通过化学诱导剂 17- $\beta$ -雌二醇对随机挑选的 1 个转基因株系离体叶片进行诱导处理, 处理时间为 0、3、6、12、24、48、96、144 h, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测外源基因 *AtMET1* 表达量变化。[结果] 本研究共获得了潮霉素抗性芽 648 个, 经生根筛选获得 18 株抗性植株, 经分子检测证实全部为转基因植株, 分别标号为 AM-1~18#。qRT-PCR 结果显示: 化学诱导剂 17- $\beta$ -雌二醇处理 3 h 时, 目的基因 *AtMET1* 的表达量即达到最大值, 随后在处理 6 h 时表达量下降, 处理 12 h 时有所回升, 处理 24 h 后表达量降低至不足 12 h 时的一半。[结论] 化学诱导剂 17- $\beta$ -雌二醇能迅速有效地调控转基因杨树中 *AtMET1* 基因的表达, 为进一步研究 *MET1* 基因在杨树基因组甲基化调控方面的作用机制奠定基础, 也为今后杨树化学诱导表达研究及品种改良提供新思路、新方法。

**关键词:** 甲基化基因; 84K 杨; 转基因植株; 17- $\beta$ -雌二醇; 化学诱导表达

**中图分类号:** S722.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2020)03-0063-07

DNA 甲基化修饰是一种重要的表观遗传修饰, 它通过影响 DNA 的构象、稳定性及其与蛋白质的相互作用方式以及染色质的结构等调控基因的表达<sup>[1]</sup>, 在植物生长发育以及环境响应等过程中具有重要的调节作用, 并能够引起可遗传的表观变异<sup>[2-3]</sup>。植物体中 DNA 甲基化的建立和维持受多个基因的协同调控, 这些甲基化相关基因的功能缺失和超表达均能引起基因组 DNA 甲基化水平的变化, 从而影响基因表达; 植物 DNA 甲基化相关基因主要有甲基转移酶 (MET) 基因、域重排甲基转移酶 (DRM) 基因、染色质重塑酶 (CMT) 基因和 DNA 甲基化转移酶 2 (DNMT2) 基因<sup>[4]</sup>。在

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, *MET1* 基因主要维持 CG 对称位置的胞嘧啶甲基化<sup>[5-6]</sup>。拟南芥的 DNA 甲基转移酶 *MET1* 在配子体形成过程中通过维持精细胞中印记基因 *FIS2*、*MPC* 和 *FWA* 的甲基化来实现基因的沉默<sup>[7-9]</sup>。拟南芥 *MET1* 弱突变体的表型变化不大, 但其自交后代出现顶端优势减弱、植株矮小、叶形改变、营养状态差以及开花时间延迟等性状<sup>[10]</sup>。此外, *MET1* 还在植物逆境胁迫中发挥重要的作用<sup>[6, 11-12]</sup>。Brocklehurst 等<sup>[13]</sup> 研究表明, 在拟南芥中, 超表达 *MET1* 会在编码转座因子、非编码 RNA 和蛋白质的基因座上随机产生新的表观等位基因, 这些表观变异可传递给下一代;

收稿日期: 2019-01-23 修回日期: 2019-04-22

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项重点项目子项目“杨树工业用材新型品种选育研究” (项目编号: CAFYBB2017ZA001-3); 国家自然科学基金项目“基于 DNA 甲基化变异的杨树种质创制基因工程技术体系构建” (31770710)

\* 通讯作者: 张冰玉, 博士, 研究员. 主要研究方向: 林木遗传育种. 电话: 010-62889654. E-mail: byzhang@caf.ac.cn

*MET1* 以及其他编码表观遗传因子基因的超表达及抑制表达, 提供了另一种鉴定表观遗传靶基因和创建新的表观等位基因的策略。

Zuo 等<sup>[14]</sup> 利用细菌阻遏物 LexA 的 DNA 结合域 (DBD) 和 VP16 的反式激活结构域开发的基于人类雌激素受体 (ER) 调节区域的诱导系统, 称为 XVE 系统, 它是一种高效的严格依赖于动物 17- $\beta$ -雌二醇诱导的嵌合式转录激活系统, 能够根据雌激素的使用剂量来严格控制下游基因的表达水平。目前, XVE 诱导系统能够有效控制目的基因在拟南芥<sup>[14-17]</sup>、烟草<sup>[6, 18-19]</sup>、长春花<sup>[20]</sup>、水稻<sup>[21-22]</sup> 和柑橘<sup>[23]</sup> 等植物中的表达, 并且在拟南芥中已经通过 XVE 系统的应用得到了一系列的突变体<sup>[24]</sup>。目前, XVE 系统已经应用于植物基因功能研究等多个方面, 是比较理想的操纵基因表达和研究基因功能的化学诱导表达系统<sup>[19]</sup>。pER8-MET1 载体是依据 XVE 系统构建, 研究证明 17- $\beta$ -雌二醇能够有效调控烟草中外源基因的表达<sup>[6]</sup>。

本研究利用农杆菌介导法将化学诱导启动子与拟南芥甲基化转移酶基因 *AtMET1* 导入银腺杨 84K (*Populus alba*×*P. glandulosa* ‘84K’) 的核基因组, 利用化学诱导剂 17- $\beta$ -雌二醇调控目的基因 *AtMET1* 的表达, 研究其在杨树中的诱导表达特性, 为建立杨树甲基化诱导变异体系、实现杨树品种改良和基因功能分析等奠定良好的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

植物材料为 84K 无菌苗。农杆菌菌株 GV3101、植物表达载体 pER8-*AtMET1* 均由本实验室保存。Premix Taq™ 购自 TaKaRa 公司 (日本), 引物由上海生工有限公司合成, DNA 测序由 Invitrogen 公司 (上海) 完成。

### 1.2 方法

1.2.1 *AtMET1* 基因的遗传转化 采用电击转化法将植物表达载体 pER8-*AtMET1* 转入农杆菌 GV3101, 经 PCR 鉴定后保菌。挑取单菌落接种于 2 mL LB 液体培养基 (含有 50 mg·L<sup>-1</sup> 壮观霉素和 17 mg·L<sup>-1</sup> 利福平) 中, 28℃ 过夜振荡培养。取 2 mL 菌液接种于 100 mL 与以上相同的 LB 培养液中再次振荡培养至 OD 值为 0.6~0.8。

取继代培养 4 周的 84K 杨无菌苗顶部第 3~5 片叶, 切成 1.5 cm×1.5 cm 的叶盘, 垂直主脉

切 2~3 刀。将处理好的叶片放入摇好的菌液中浸染 12~15 min, 将叶片置于无菌滤纸上吸净表面菌液, 接种于共培养培养基 (MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA) 上暗培养 3 d 后, 转至筛选培养基 (MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA+Timentin 200 mg·L<sup>-1</sup>+Hygromycin 3 mg·L<sup>-1</sup>) 上, 在温度为 28℃、16 h/8 h 光周期、光照强度 1 500~2 000 lax 下培养。当分化的芽长到 1~2 cm 时, 将其转入生根筛选培养基 (1/2MS+0.02 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> IBA+Timentin 200 mg·L<sup>-1</sup>+Hygromycin 3 mg·L<sup>-1</sup>) 中进行生根筛选。

1.2.2 转化植株的分子检测 用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, 北京) 提取转基因植株及对照叶片基因组 DNA。根据已知 pER8-*AtMET1* 载体特异序列设计扩增 Hygromycin 基因 (*HPT*) 的引物 HP, 同时扩增部分 *HPT* 基因和 *AtMET1* 基因的引物 HM (表 1), 用 ABI Veriti 96 孔梯度 PCR 仪 (ABI, 美国) 进行 PCR 检测, 总的反应体系为 20  $\mu$ L: Premix Taq™ 10  $\mu$ L, Primer-F(10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)0.5  $\mu$ L, Primer-R(10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L, DNA 模板 5  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 20  $\mu$ L。PCR 反应参数为: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 10 s, 56℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 1 min 15 s, 共 35 个循环; 72℃ 终延伸 7 min。扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 Axygen 公司 (美国) 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化 HM 扩增片段, 连接到克隆载体 pMD™19-T Vector Cloning Kit (TaKaRa, 日本), 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  (TIANGEN, 北京), 经过蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆进行 DNA 序列测定。用 DNAMAN 9.0 软件将测序得到的基因序列与目的基因序列进行比对。

1.2.3 转基因植株目的基因的诱导表达 随机取 1 个转基因株系及未转化的 84K 对照无菌苗叶片 (第 3~5 片叶子), 切成 1.0 cm×1.0 cm 的叶盘, 垂直主脉切 2~3 个伤口, 平铺于加有 100  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>

表 1 常规 PCR 检测相关引物序列  
Table 1 The primer sequences of PCR

引物名称	检测基因	产物长度/bp	引物序列(5'-3')
HP	<i>HPT</i>	843	F: TAAATAGCTGCGCCGATGGT
			R: GGTTCCTCACTATCGGCGAGT
HM	<i>HPT-AtMET1</i>	1 040	F: CTGTCGGGCGTACACAAATC
			R: ACATCAGTTTCCAGAGCCGT

17-β-雌二醇的不定芽分化培养基上, 每个平板约放 10 个叶盘(叶正面朝下、保证叶盘完全接触培养基), 2 次重复, 野生型对照处理 0、12 h, 转基因株系处理 0、3、6、12、24、48、96、144 h。处理后随机各取 5 个叶盘, 液氮冷冻后保存于 -80℃ 冰箱, 用于 RNA 提取。

1.2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *AtMET1* 基因的表达量 用 EASY spin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒 (Aidlab, 北京) 分别提取经雌激素诱导处理不同时间转基因株系叶片的总 RNA, 1 μg 总 RNA 用于 cDNA 合成。首先去除残留 DNA, 反应体系如下: 5×gDNA Eraser Buffer 2.0 μL, gDNA Eraser 1.0 μL, Total RNA 1 μg, RNase Free H<sub>2</sub>O 补足至 10 μL, 42℃ 2 min。向上述离心管中加入体系 RNase Free H<sub>2</sub>O 4 μL, 5×PrimeScript Buffer 2(for Real Time) 4 μL, RT Primer Mix 1 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μL, 混匀后 37℃ 下反应 15 min, 85℃ 5 s 终止反应, -20℃ 保存备用。将反转录产物 cDNA 稀释 5 倍作为反应模板, 参照 TaKaRa 公司的 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNase HPlus) 试剂盒说明配制反应体系, 总反应体系为 20 μL, 其中, TB Green Premix TaqII (Tli RNase HPlus) 10 μL, Primer-F (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 0.8 μL, Primer-R (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 0.8 μL, cDNA 模板 2 μL, 用去离子水补足至 20 μL。用 Roche Light Cycle 480 II 型荧光定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士) 进行 qRT-PCR 反应, 反应程序为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 个循环; 95℃ 5 s, 60℃ 1 min, 95℃; 50℃ 30 s。引物见表 2。以 *Actin* 为内参基因, 每个样品 6 次重复, 用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 算法进行分析<sup>[16]</sup>。

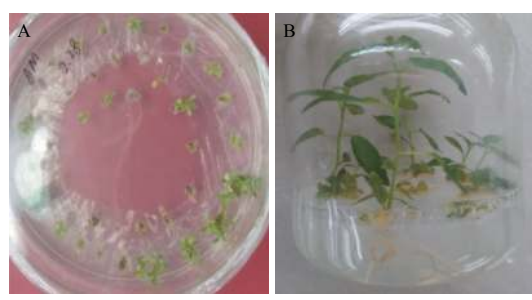
表 2 qRT-PCR 反应相关引物序列		
Table 2 The primer sequences of qRT-PCR		
基因	产物长度/bp	引物序列(5'-3')
<i>Actin</i>	195	F: AAACGTGAATGGTCTCCCTCCG
		R: GCATCATCACAACTACTCTCCGA
<i>AtMET1</i>	190	F: ACGGGTTGAGCATTGGAGTA
		R: ATCCCCACCAGATGACTTGG

## 2 结果与分析

### 2.1 84K 杨潮霉素抗性植株的获得

取 4 周大的野生型 84K 杨无菌苗叶片切成叶

盘后进行遗传转化。经过 3~4 d 的共培养后将叶片放入含有 3 mg·L<sup>-1</sup> 潮霉素的 MS 分化培养基上进行抗性筛选, 约 10 d 后叶盘切口处产生小的突起, 35 d 后抗性芽长至 0.5 cm 左右, 将抗性芽连同下面的着生叶盘切下, 转移到新鲜的潮霉素分化培养基上进行二次筛选分化。经过多次筛选 (图 1A) 后, 将伸长至 1 cm 左右的抗性芽切下, 并转移到含有 3 mg·L<sup>-1</sup> 潮霉素的生根筛选培养基中进行生根培养, 约 10 d 后开始生根 (图 1B)。总计转化叶盘数约 2 700 个, 在分化初筛培养基上产生的抗性芽数约 648 个, 最终获得 18 株潮霉素抗性植株。



注: A: 分化筛选 40 d 芽; B: 生根筛选 30 d 植株  
Notes: A: Resistant buds obtained by screening for 40 d on hygromycin selection medium; B: Resistant plants obtained by screening for 30 d on hygromycin rooting medium.

图 1 抗性芽及抗性植株的获得  
Fig. 1 The hygromycin resistant buds and resistant plants of *AtMET1* transgenic *P. alba*×*P. glandulosa* ‘84K’

### 2.2 转基因植株的分子检测

提取野生型植株和 18 株抗性植株的植物总 DNA, 以质粒为阳性对照, 以野生型 84K 杨为阴性对照, 进行 PCR 检测。HP 引物扩增结果显示: 获得的 18 株潮霉素抗性植株的 DNA 均可扩增出 843 bp 的目的条带, 与预期目的条带大小相符 (图 2); 为区别导入的 *AtMET1* 基因与杨树基因组内的同源基因, 设计 HM 引物扩增从 *HPT* 基因下游的 119 bp 到 *AtMET1* 基因上游的 233 bp 的序列, 包含两基因间 688 bp 的间隔。PCR 结果显示: 上述 18 株 HP 基因阳性均能扩出 1 条 1 040 bp 大小的条带, 与预测目的条带大小相符 (图 3)。以上结果证明: 诱导表达系统及目的基因已成功导入 84K 杨, 外源基因的遗传转化效率为 2.78 %。这 18 株阳性植株分别编号为 AM-1~18#。

切取图 3 中目的条带, 经过胶回收纯化后连入 pMD™19-T Vector 载体 (TaKaRa), 挑取白色



克隆进行 DNA 测序。测序结果表明：PCR 产物序列与质粒序列比对结果相似度为 100%，其中，潮霉素抗性基因的测序长度为 119 bp（图 4A），*AtMET1* 基因的测序长度为 102 bp（图 4B）。

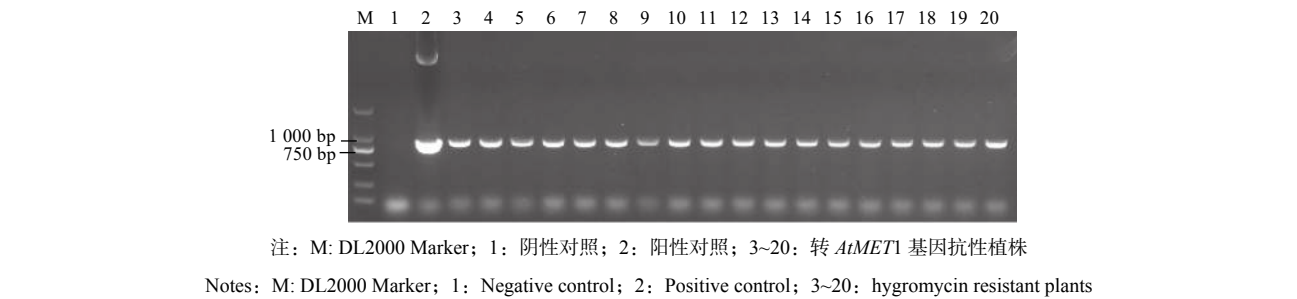


图 2 抗性植株潮霉素抗性基因 PCR 检测

Fig. 2 PCR detection of *HPT* gene in *AtMET1* transgenic *P. alba*×*P. glandulosa* ‘84K’ plants

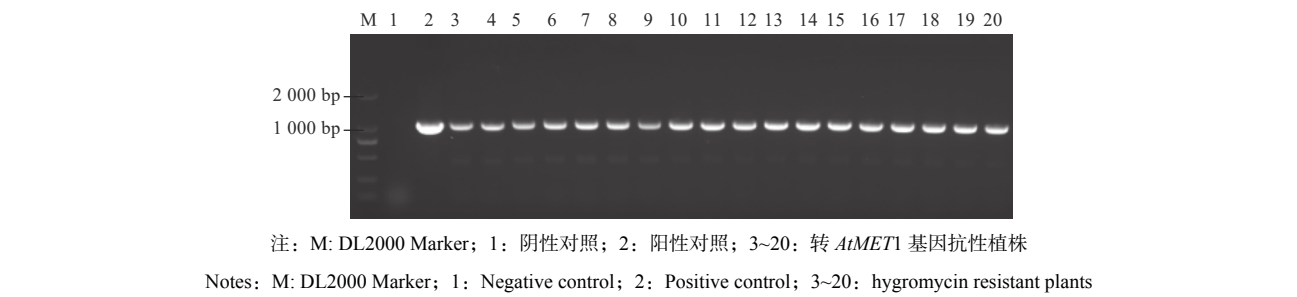


图 3 抗性植株 HM 引物扩增结果

Fig. 3 PCR detection of *HPT* and *AtMET1* gene in *AtMET1* transgenic *P. alba*×*P. glandulosa* ‘84K’ plants

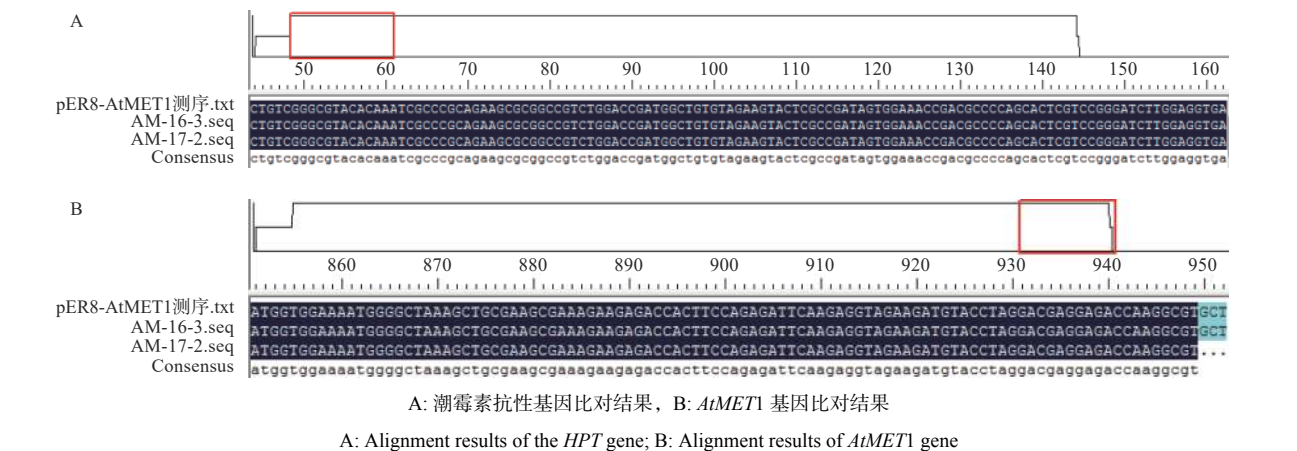


图 4 阳性植株 DNA 测序比对结果

Fig. 4 Alignment results of *HPT* gene and *AtMET1* gene by DNA sequencing of the transgenic *P. alba*×*P. glandulosa* ‘84K’ plants.

### 2.3 转基因植株诱导表达

为了研究转基因杨树中 XVE 系统能否有效启动目的基因表达以及其表达水平随 17-β-雌二醇处理时间变化的趋势，分别提取用雌激素诱导处理不同时间的 AM-1#离体叶片总 RNA，利用 qRT-PCR 检测 *AtMET1* 基因的表达情况。结果显示：用 100 μmol·L<sup>-1</sup> 的 17-β-雌二醇处理后，野生型植

株处理 12 h 与处理前一样，都没有目的基因的表达；转基因植株未经诱导时目的基因没有表达，诱导 3 h 时目的基因的表达量即达到最大值，处理 6 h 后表达下降，处理 12 h 有所回升，处理 24 h 以后表达量降低至不足处理 12 h 时的一半（图 5）。以上结果说明，雌激素能够有效诱导转基因杨树中 XVE 系统诱导启动子的启动，使下游基因表

达,且处理 3 h 时表达量最高,但随着处理时间的延长,诱导表达效果减弱。

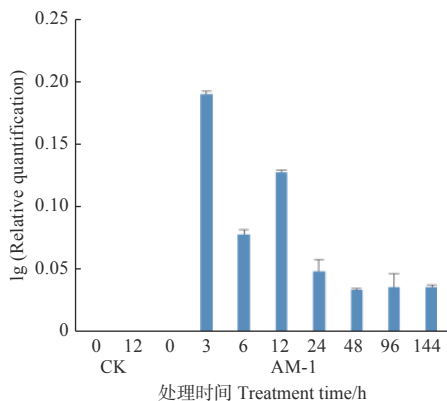


图5 转基因植株中 *AtMET1* 的诱导表达检测  
Fig. 5 Expression of *AtMET1* in leaf of transgenic *P. alba* × *P. glandulosa* '84K' induced by 17-β-estradiol treatment

### 3 讨论

本研究将受 17-β-雌二醇诱导的化学诱导启动子及 *AtMET1* 基因用农杆菌介导法导入 84K 杨基因组,并利用 qRT-PCR 检测其中 *AtMET1* 基因的表达量随 17-β-雌二醇诱导时间变化的趋势。结果表明,处理 3 h 目的基因的表达量即达到最大值,随后在处理 6 h 时表达量下降,处理 12 h 时有所回升,处理 24 h 以后表达量降低至不足处理 12 h 时的一半,说明化学诱导剂 17-β-雌二醇能迅速有效地调控 *AtMET1* 基因在杨树中的表达。

Zuo 等<sup>[14]</sup> 研究显示,用  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 17-β-雌二醇处理拟南芥幼苗,目的基因的表达量随着处理时间的增加而逐渐上升,在 24 h 时达到最高后逐渐下降;代丽娟等<sup>[19]</sup> 研究显示,用  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 17-β-雌二醇处理烟草幼苗,在 48 h 时目的基因表达量最高;梁立雄等<sup>[6]</sup> 研究显示,用  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 17-β-雌二醇涂抹 *AtMET1* 基因瞬时转化的烟草叶片进行诱导表达时,外源在 12 h 时表达量最高。本研究结果显示,转 *AtMET1* 基因杨树叶片在放置于  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  雌二醇培养基上时,外源基因的表达量在 3 h 时达到最高,这可能是三方面的原因:一是诱导剂浓度不同,本研究依据前期实验结果<sup>[6]</sup>,采用  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 17-β-雌二醇对转基因杨树叶片进行处理,所用的雌激素浓度是上述研究的 2~50 倍,可能导致诱导启动子响应时间提前;二是处理方式不同,本研究对转基因植株的离体叶

片进行诱导处理,而上述研究是将雌激素加入幼苗培养基中或进行叶片涂抹的瞬时表达;三是处理对象不同,本研究首次在杨树中采用化学诱导表达的方式,不同于拟南芥、烟草等草本植物,可能由于物种的差异导致响应时间的不同。后续研究将在 0~3 h 之间进行时间细化处理,看其是否在 3 h 前就已达到平台期。在处理 6 h 时,目的基因的表达降低,其原因可能是 *AtMET1* 基因在杨树中表达量达到一定程度时,与 RdDM (RNA-directed DNA methylation) 相互作用发生了转录基因沉默 (TGS, transcriptional gene silencing)<sup>[25]</sup>,即 siRNA (Small interfering RNA) 对靶 mRNA 产生了降解<sup>[26]</sup>。随着诱导时间的延长,目的基因的表达量逐渐降低,这可能与 17-β-雌二醇的降解有关,Snyder 等<sup>[27]</sup> 研究表明,当暴露于 290~720 nm 之间的模拟太阳光时,光降解 17-β-雌二醇可达 26%。

本研究发现,XVE 系统在杨树中对目的基因 *AtMET1* 的调控强度低于其在烟草中对目的基因的调控强度<sup>[6]</sup>,其原因可能是其表达方式上的差异导致的,在烟草中所采用的是瞬时表达方式,而本实验中所采用的是稳定表达方式<sup>[28]</sup>。此外,本研究通过遗传转化,获得了潮霉素抗性芽 648 个,经生根筛选及分子检测最后获得了 18 株转基因植株,遗传转化效率仅为 2.78%,低于以往 84K 杨的遗传转化效率 7%<sup>[29]</sup>。因为前期实验已经确定了最佳的潮霉素分化选择压<sup>[4]</sup>,假阳性较高不可能是由于分化培养基中潮霉素选择压偏低导致的。其原因主要是由于叶盘筛选培养时边缘上翘导致部分非抗性再生芽的产生,以及转化过程中出现了嵌合体<sup>[30]</sup>。

本研究将受 17-β-雌二醇调控的 XVE 系统及 *AtMET1* 基因成功导入白杨派优良品种 84K 杨的基因组,通过 qRT-PCR 证实 *AtMET1* 基因能够在化学诱导剂的诱导下表达,并且随诱导时间的不同而表达量有很大差异。由于植物不具有类似的激素系统<sup>[31]</sup>,植物生长环境下外源基因并不表达,不会影响植物的正常生长发育。通过人为 17-β-雌二醇处理,能够严格控制外源基因 *AtMET1* 的表达,进而能够通过对转基因植株诱导前后基因组甲基化状况以及表型性状的对比,排除转基因过程中其他因素干扰所导致的突变<sup>[19]</sup>,为进一步研究 *MET1* 基因在杨树基因组甲基化调控方面的作用机制奠定基础。

## 4 结 论

本研究在前期研究<sup>[6]</sup>的基础上,将含有 *AtMET1* 基因的载体转化农杆菌感受态细胞,通过叶盘法侵染、潮霉素筛选,获得阳性植株;通过 PCR 扩增及 DNA 测序,结果表明,化学诱导启动子及目的基因已成功导入 84K 杨基因组中,获得了 84K 杨的转 *AtMET1* 基因植株 18 株;同时,通过化学诱导表达实验,证明了化学诱导启动子在杨树中能够有效发挥作用,并且目的基因的表达受到 17- $\beta$ -雌二醇的严格控制,最适雌激素处理时间是 3 h,但随着时间的延长效果减弱。为杨树品种改良以及基因功能分析等奠定了良好的基础。

## 参考文献:

- [1] 李佳佳,陈德桂. DNA甲基化修饰研究概述[J]. 中国细胞生物学学报, 2010, 32(2): 189-192.
- [2] Gehring M, Henikoff S. DNA methylation dynamics in plant genomes[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1769(5): 276-286.
- [3] Centomani I, Alessandra S, Pietro D A, *et al.* Involvement of DNA methylation in the control of cell growth during heat stress in tobacco BY-2 cells[J]. Protoplasma, 2015, 252(6): 1451-1459.
- [4] 常英英. 拟南芥甲基化相关基因化学诱导表达载体的构建及杨树遗传转化[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
- [5] Du J, Johnson L M, Jacobsen S E, *et al.* DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation[J]. Nature reviews molecular cell biology, 2015, 16(9): 519-532.
- [6] 梁立雄, 常英英, 高亚南, 等. *AtMET1* 基因克隆及化学诱导表达分析[J]. 林业科学研究, 2016, 29(6): 946-950.
- [7] Kinoshita T, Miura A, Choi Y, *et al.* One-way control of FWA imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation[J]. Science, 2004, 303(5657): 521-523.
- [8] Jullien P E, Kinoshita T, Ohad N, *et al.* Maintenance of DNA methylation during the *Arabidopsis* life cycle is essential for parental imprinting[J]. The Plant Cell, 2006, 18(6): 1360-1372.
- [9] Tiwari S, Schulz R, Ikeda Y, *et al.* MATERNALLY EXPRESSED PAB C-TERMINAL, a novel imprinted gene in *Arabidopsis*, encodes the conserved C-terminal domain of polyadenylate binding proteins[J]. The Plant Cell, 2008, 20(9): 2387-2398.
- [10] Kankel M W, Ramsey D E, Stokes T L, *et al.* *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants[J]. Genetics, 2003, 163(3): 1109-1122.
- [11] Lira-Medeiros C F, Parisod C, Fernandes R A, *et al.* Epigenetic variation in mangrove plants occurring in contrasting natural environment[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10326.
- [12] Finnegan E J. Epialleles-a source of random variation in times of stress[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5(2): 101-106.
- [13] Brocklehurst S, Watson M, Carr I M, *et al.* Induction of epigenetic variation in *Arabidopsis* by over-expression of DNA METHYLTRANSFERASE1(MET1)[J]. PloS one, 2018, 13(2): e0192170.
- [14] Zuo J, Niu Q W, Chua N H. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants[J]. The Plant Journal, 2000, 24(2): 265-273.
- [15] Zuo J R, Niu Q W, Möller S G, *et al.* Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(2): 157-161.
- [16] Sun J, Niu Q W, Tarkowski P, *et al.* The *Arabidopsis* AtIPT8/PGA22 Gene Encodes an Isopentenyl Transferase That Is Involved in De Novo Cytokinin Biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2003, 131(1): 167-176.
- [17] 李 芳, 许 颖, 张 姣, 等. 超量表达细胞D型周期蛋白CY-CD3; 1影响拟南芥根的发育[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(3): 431-435.
- [18] 常英英, 高亚南, 梁立雄, 等. *AtDME1* 化学诱导表达载体的构建及其瞬时表达[J]. 东北林业大学学报, 2016, 44(2): 75-79.
- [19] 代丽娟, 郑唐春, 刘彩霞, 等. 烟草化学诱导表达系统的建立[J]. 植物研究, 2016, 36(6): 917-924.
- [20] Xu M J, Dong J F. Enhancing terpenoid indole alkaloid production by inducible expression of mammalian Bax in *Catharanthus roseus* cells[J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2007, 50(2): 234-241.
- [21] Okuzaki A, Konagaya K I, Nanasato Y, *et al.* Estrogen-inducible GFP expression patterns in rice(*Oryza sativa* L.)[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(4): 529-538.
- [22] Sreekala C, Wu L, Gu K, *et al.* Excision of a selectable marker in transgenic rice(*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated Cre / lox P system[J]. Plant Cell Reports, 2005, 24(2): 86-94.
- [23] 李琳洁, 杨 莉, 李 芳, 等. 柑橘无标记转基因转化体系的建立[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 36(6): 649-652.
- [24] 张 健, 徐金相, 孔英珍, 等. 化学诱导激活型拟南芥突变体库的构建及分析[J]. 遗传学报, 2005, 32(10): 1082-1088.
- [25] Jones L, Ratcliff F, Baulcombe D C. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance[J]. Current Biology Cb, 2001, 11(10): 747-757.
- [26] Matzke M A, Kanno T, Matzke A J M. RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2014, 66(1): 243.
- [27] Leech D M, Snyder M T D M, Wetzel R G. Natural organic matter and sunlight accelerate the degradation of 17 $\beta$ -estradiol in water[J]. Science of the Total Environment, 2009, 407(6): 2087-2092.
- [28] Sparkes I A, Runions J, Kearns A, *et al.* Rapid, transient expression

of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants[J]. Nature protocols, 2006, 1(4): 2019-2025.

[29] 王丽娜, 王玉成, 杨传平. 84K杨愈伤组织再生体系和直接分化再生体系遗传转化的比较性研究[J]. 植物研究, 2017, 37(4): 542-548.

[30] 古同华, 丁 博, 陈小强, 等. 小麦原位转化技术的现状及展望[J]. 分子植物育种, 2017, 15(02): 565-570.

[31] Aoyama T, Reynolds P H S. Glucocorticoid-inducible gene expression in plants[J]. Heredity, 1999, 83(4): 500-501.

Genetic Transformation of *AtMET1* in *Populus alba* × *P. glandulosa* ‘84K’ and Its Chemical-inducible Expression Analysis

WU Xiao-juan, LU Jun-qian, CHANG Ying-ying, ZHONG Shan-chen, SU Xiao-hua, ZHANG Bing-yu

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

**Abstract:** [Objective] To study the chemically-induced expression characteristics of *Arabidopsis thaliana* methyltransferase gene *AtMET1* in *Populus alba* × *P. glandulosa* '84K', to lay a foundation for the establishment of the popular methylation-induced variation system and genetic improvement of poplars. [Method] The chemically-induced promoter and *AtMET1* were transformed into genome of *P. alba* × *P. glandulosa* '84K' using *Agrobacterium*-mediated transformation. The hygromycin resistant plants were obtained and transgenic plants were identified as by traditional PCR and DNA sequencing. The chemical inducer 17- β -estradiol was used to induce expression of *AtMET1* in leaves of *in vitro* leaves of a transgenic line for 0, 3, 6, 12, 24, 48, 96 and 144 h, and the expression of *AtMET 1* gene was detected by Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR). [Result] A total of 648 hygromycin resistant buds were obtained, among them 18 hygromycin resistant plants were screened, and all of them were identified to be transgenic plants by molecular detection method. qRT-PCR showed that the expression of *AtMET1* reached its highest at 3 h by17- β -estradiol treatment, then decreased at 6 h, increased at 12 h and decreased again to less than half of the expression at 12 h. [Conclusion] The chemical inducer can efficiently and rapidly induce the expression of *AtMET1* in transgenic poplar plant, that laid a solid foundation for the regulation mechanism of *MET1* in poplars and provided new idea and method for chemical induction of genes and genetic improvement of poplars.

**Keywords:** methyltransferase gene; *Populus alba* × *Populus glandulosa* ‘84K’; transgenic plant; 17-β-estradiol; chemical-inducible expression

( 责任编辑: 张 研 )