

一个参与拟南芥DNA去甲基化过程候选基因的定位与功能分析

罗俊鹏, 王敏, 腊红桂*

南京农业大学生命科学学院, 南京210095

摘要: 以转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Col-LUC为亲本材料, 把它的种子进行甲基磺酸乙酯(EMS)诱变, 在M2代幼苗中筛选出一株荧光降低的候选突变体, 命名为*rll1* (*reduced LUC luminescence 1*), 此突变基因对应的野生型基因位点因此被命名为*AtRLL1*位点。该突变体在生长发育方面表现出明显矮化、角果较短、叶片较小的发育缺陷表型。遗传学分析表明该突变属于细胞核单基因隐性突变。通过图位克隆技术把*AtRLL1*位点定位于2号染色体T3K9克隆。酶切PCR (chop-PCR)结果表明该突变体中35S启动子和基因组DNA上的多个位点均表现出甲基化升高的现象。反转录PCR (RT-PCR)结果表明*rll1*中一些RNA介导的DNA甲基化(RdDM)途径的内源靶基因的表达量明显下降。综上所述, 这些研究结果表明*AtRLL1*位点很可能参与了拟南芥DNA去甲基化过程。

关键词: 拟南芥; *rll1*; 图位克隆; DNA去甲基化

在高等真核生物中, 表观遗传修饰调控基因表达, 在个体发育、病毒抗性、转座子沉默和转基因表达等方面均发挥着重要的作用(Amedeo等2000)。在高等植物中, 基因沉默的类型可以分为转录水平基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS)和转录后水平基因沉默(posttranscriptional gene silencing, PTGS) (Gong等2002)。研究发现, 转录基因沉默和DNA甲基化有十分密切的关系, 一些由内源启动子驱动的转基因可能引发该内源启动子发生DNA甲基化并导致此基因的转录沉默(Mette等2000)。DNA甲基化通常是指胞嘧啶甲基化, 可以分为CG甲基化(CG methylation, ^mCG)、CHG甲基化(CHG methylation, ^mCHG)和CHH甲基化(CHH methylation, ^mCHH)三种类型。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中^mCG是由甲基转移酶AtMET1维持, ^mCHG可由甲基转移酶AtCMT3维持, ^mCHH无法被某一酶维持, 必须每次在DNA复制过程中重新形成(Chan等2005)。人们对烟草RNA病毒的研究中首次发现了RNA介导的DNA甲基化(RNA-directed DNA methylation, RdDM)过程(Was-senegger等1994)。

为形成合适的DNA甲基化模式, 生物体还存在一个DNA去甲基化途径以拮抗过多的DNA甲基化, DNA去甲基化可以被分为被动去甲基化(passive demethylation)和主动去甲基化(active demethylation)两类(Law和Jacobsen 2010)。被动去甲基化是指DNA甲基转移酶活性受损或者非正常表达导致DNA甲基化水平降低的过程, 它主要发生在DNA复制时期(Kapoor等2005); 主动去甲基化是由DNA

去甲基化酶识别5-甲基胞嘧啶并通过一系列生化反应去除该位点的甲基化, 最终使甲基化的DNA恢复到未甲基化状态的过程(Agius等2006)。利用*RD29A-LUC* (*luciferase*)报告基因系统首先筛选到与DNA去甲基化有关的突变体*ros1*, 研究发现*ROS1*编码一个DNA糖基化酶, 具有去甲基化的功能(Gong等2002)。*ROS1*作为DNA主动去甲基化过程的重要蛋白因子, 能特异性识别发生甲基化的DNA链, 并利用其糖基化酶活性移除5-甲基胞嘧啶, 产生缺乏核苷酸的缺口, 再通过DNA修复机制将没有甲基化的胞嘧啶核苷酸填充到此位置, 实现DNA去甲基化过程(Kapoor等2005)。近年来人们对DNA甲基化产生过程的了解在不断加深, 然而对DNA去甲基化机制的研究仍不够透彻。

本研究将2×35S:*LUC*报告基因转入拟南芥*rdr6-11*突变体(Col-0遗传背景)中, 构建出Col-LUC遗传筛选系统。*rdr6*突变位点可以有效阻止PTGS过程对报告基因表达的影响。Col-LUC亲本系被用于甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulfonate, EMS)诱变, 以自发荧光强度为标准来筛选荧光降低的突变体, 已经成功筛选到若干个与DNA去甲基化有关的因子, 如*ROS1*、*IDM1*、*IDM2*等(Qian等2012), 证明这个筛选系统可以用于筛选与DNA去甲基化有关的突变体。*ROS1*作为DNA去甲基化过程中的主要酶, 它在转录水平和蛋白水平上应

收稿 2017-02-20 修定 2017-03-22

资助 南京农业大学中央高校基本科研业务费(KYRC201409)。

* 通讯作者(E-mail: hongguila@njau.edu.cn)。

该有多级调控,并且有不同的协同作用蛋白与它一起工作,因此我们将继续利用这个系统进行遗传筛选,旨在找到新的参与DNA去甲基化过程的蛋白质因子。本研究成功筛选到一株荧光降低的突变体*rll1* (*reduced LUC luminescence 1*),遗传和甲基化分析发现*rll1*属于细胞核单基因隐性突变,*rll1*中部分基因组区域的DNA甲基化程度明显升高,并且一些RdDM内源靶基因表达量显著下降。这些研究结果表明了AtRLL1位点很可能在DNA去甲基化过程中发挥了重要的作用。

材料与amp;方法

1 实验材料

转入2×35S:LUC报告基因的高荧光材料Col-LUC (*rdr6-11*遗传背景),筛选出的低荧光突变体*rll1*、*idm1-4*和*ros1-7* (*idm1-4*和*ros1-7*均为用此体系筛选出的突变体),Col-LUC与野生型Ler-0通过高代回交得到的高荧光材料Ler-LUC,以及Col-0背景的突变体*rdr6-11* (无2×35S:LUC转基因)。

2 EMS诱变与M2低荧光突变体筛选

将Col-LUC种子进行EMS诱变,获得M1种子,然后让M1自交,分批收获M2种子。将对照材料Col-LUC和*ros1-7*以及M2种子同时播种在MS培养基上,2周后在幼苗子叶上均匀喷洒荧光素酶(luciferase)底物荧光素(luciferin),避光处理5 min后在Tanon 5200全自动化学发光成像分析系统中曝光30 s拍摄荧光。利用Winview软件打开拍摄的图片,点击BW/Pseudocolor得到彩色荧光图片。选定一块荧光适度的区域然后点击Scale Intensity来调节图片的荧光对比度,当对照Col-LUC荧光较亮而*ros1-7*荧光较暗的时候,以此为参照挑选出荧光明显降低的单株,让候选低荧光材料自交一代并再次确认幼苗荧光情况。同时提取叶片DNA鉴定*rdr6-11*位点的突变情况。经过上述过程,我们最终获得了一株低荧光候选突变体,并命名为*rll1*。

3 等位性测验与图位克隆

将*rll1*分别与Ler-LUC、*idm1-4*、*ros1-7*和*rdr6-11*四种突变体进行杂交,并把获得的F1代种子与对照材料一起播种在MS培养基上用于拍摄荧光。收获*rll1*与Ler-LUC杂交得到的F2代种子,播种于MS培养基上并拍摄幼苗荧光,挑选低荧光的材

料用于基因定位。根据多态性引物在这些基因定位材料中的连锁表现,判断突变基因所在的区间。

4 突变体表型观察

将突变体*rll1*和Col-LUC同时在温室中培养,采用完全相同的管理方式,5周后观察它们的表型差异并拍照。

5 DNA甲基化分析

根据*ros1-7*全基因组DNA甲基化测序结果,挑选若干在*ros1-7*中甲基化显著升高的位点,设计酶切PCR (chop-PCR)引物用于检测*rll1*中这些位点的甲基化水平。利用十六烷基三甲基溴化铵(cetyl trimethylammonium bromide, CTAB)法提取*rll1*、Col-LUC和*ros1-7*基因组DNA,分别用甲基化敏感酶HaeIII、HpaII和HhaI进行消化,取2 μL样品用于PCR。

6 RdDM靶位点的反转录PCR分析

分别取0.1 g Col-LUC、*ros1-7*和*rll1*的幼苗,在液氮中充分研磨后将粉末转移至装有1 mL TRIzol的无RNA酶离心管中,涡旋震荡15 s,室温静置5 min。加入200 μL氯仿充分混匀,静置5 min,4°C下12 000×g高速离心15 min。把上清液转移到一个新的无RNA酶离心管中,加入500 μL异丙醇后颠倒混匀,室温放置10 min,4°C下12 000×g离心10 min。弃上清并用焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水配制的75%乙醇洗涤白色沉淀,4°C下7 500×g离心5 min,弃上清后轻微干燥,加入30 μL DEPC水溶解RNA。cDNA第一链合成按照爱必梦公司反转录试剂盒说明书进行,所用反转录PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR)引物见表1,然后检测相关基因表达情况。

实验结果

1 *rll1*的荧光表现

把筛选出的低荧光候选突变材料*rll1*的种子播种在MS培养基上,生长2周后拍摄幼苗荧光,结果表明*rll1*呈稳定的低荧光状态(图1-A)。对*rll1*的离体叶片进行荧光观察验证了这一结果(图1-B)。*rdr6-11*突变位点的鉴定结果显示,*rll1*与Col-LUC在这个位点均有突变,因为它们的PCR产物均不能被TaqI酶切消化(图1-C)。以上结果表明*rll1*是符合要求的低荧光候选突变体,它的低荧光表型是稳定并可以遗传的。

表1 PCR分析所用引物列表

Table 1 List of PCR primers

引物	序列	用途
ACTIN-S	5'-TTCCTCATGCCATCCTCCGTCTT-3'	ACTIN RT-PCR
ACTIN-AS	5'-CAGCGATACCTGAGAACAATAGT-3'	ACTIN RT-PCR
RT-At1g21310-S	5'-CACTACGTGTACAAATCTCCAC-3'	At1g21310 RT-PCR
RT-At1g21310-AS	5'-GTGGAGAGTAGTGGTGTACTG-3'	At1g21310 RT-PCR
RT-At1g76930-S	5'-CTACTCACCTCTCCAGTTG-3'	At1g76930 RT-PCR
RT-At1g76930-AS	5'-CATATGTATCCGTTTCAATTCTC-3'	At1g76930 RT-PCR
RT-LUC-S	5'-CATTGCCAGCTATCTGTC-3'	LUC RT-PCR
RT-LUC-AS	5'-AGAGGAAGGCTTGCGAAG-3'	LUC RT-PCR
RT-At2g41260-S	5'-TGGACGGTGCAGATACTGTTGC-3'	At2g41260 RT-PCR
RT-At2g41260-AS	5'-AACATCCCCACCTACAACCACC-3'	At2g41260 RT-PCR
RT-At5g46900-S	5'-ATGTCATCTTCTCACTTATAGTC-3'	At5g46900 RT-PCR
RT-At5g46900-AS	5'-ACCAGATGGAACCTTCTTACCA-3'	At5g46900 RT-PCR
Chop-35S pro-S	5'-TGGCTAGAGCAGCTTGC-3'	35S启动子chop-PCR
Chop-35S pro-AS	5'-AGAGGAAGGCTTGCGAAG-3'	35S启动子chop-PCR
Chop-At2g41260 pro-S	5'-GATTCCCTTAGTAACGGCG-3'	At2g41260启动子chop-PCR
Chop-At2g41260 pro-AS	5'-CGGTACTTGTTCGCTATCGG-3'	At2g41260启动子chop-PCR
Chop-At5g46900 pro-S	5'-CTCACTCAAGCTTCGGTTC-3'	At5g46900启动子chop-PCR
Chop-At5g46900 pro-AS	5'-TGTTGGTGAAGGACCGTAC-3'	At5g46900启动子chop-PCR
Chop-At1g76930 pro-S	5'-ACAGTGCCACAGTTGAGCAG-3'	At1g76930启动子chop-PCR
Chop-At1g76930 pro-AS	5'-CAGAAAAATACTCGGTGCCAAT-3'	At1g76930启动子chop-PCR
Chop-At1g21310 pro-S	5'-ATGGCTAAGTTTGTCTCCATCATC-3'	At1g21310启动子chop-PCR
Chop-At1g21310 pro-AS	5'-ACATGGGACGTAACAGATACAC-3'	At1g21310启动子chop-PCR
Chop-At1g26400-S	5'-TGTCTCTAAGCCACTACTCCCTCA-3'	At1g26400 chop-PCR
Chop-At1g26400-AS	5'-ACTGCCTCGCTAGCGTCGGCAAAC-3'	At1g26400 chop-PCR
Gt-rdr6-11-S	5'-GGCAATTGGACGATGTCATTCATAT-3'	rdr6-11位点基因型分析
Gt-rdr6-11-AS	5'-CACCTCACACGTTCTCTTGCA-3'	rdr6-11位点基因型分析

2 *rll1*的等位性测验和基因定位

当*rll1*与Ler-LUC杂交后, 所得F1植株荧光升高, 表明*rll1*是隐性突变; *rll1*与低荧光突变体*ros1-7*和*idm1-4*杂交后, F1植株荧光升高, 表明*rll1*突变基因与*ros1*和*idm1*并不是等位基因; 把*rll1*和*rdr6-11*突变体杂交后, F1植株荧光升高, 表明*rll1*不是*epiallele*或*luciferase*基因突变造成的(图2)。将*rll1*与Ler-LUC杂交获得的F2代种子播种在MS培养基上, 培养2周后拍摄荧光, 统计低荧光单株的数目。F2群体中高荧光植株数目:低荧光植株数目接近3:1, 卡方测验结果 χ^2 为0.001, 小于显著水平=0.05时的 χ^2 值, 表明*rll1*属于核内单基因隐性突变(表2)。挑选F2群体中的低荧光材料并提取基因组DNA, 利用Col-0和Ler-0之间的多态性引物进行基因定位, 把*AtRLL1*位点定位于2号染色体BAC克隆T3K9上的分子标记CL217-B4M1和CL217-B4M2之间(图3), 此突变基因与左侧分子标记CL217-B4M1的重组

率为3%, 与右侧分子标记CL217-B4M2的重组率同样为3%, 而与其他染色体上分子标记的重组率介于25%~45%之间, 表明了*AtRLL1*位点位于2号染色体BAC克隆T3K9上的分子标记CL217-B4M1与CL217-B4M2之间。在这个分子标记区间内的共有12个基因, 它们的具体基因号及预测的功能见表3。对这些基因进行初步分析后发现, *AT2G-41130*与*AT2G41070*编码的蛋白可以与特异序列的DNA结合并拥有转录因子的活性, 转录因子通常可以激活基因表达并抑制DNA甲基化造成的基因沉默, 因此这两个基因可能和DNA去甲基化或拮抗基因沉默相关; *AT2G41060*编码的蛋白可以与RNA结合并参与植物防御反应, 该基因可能和转录产物调控过程相关; *AT2G41120*、*AT2G-41080*以及*AT2G41050*这三个基因的功能未知; *AT2G41140*、*AT2G41110*、*AT2G41100*和*AT2G41090*编码蛋白可以与钙离子结合并参与环境刺激应答过程; *AT2G-*

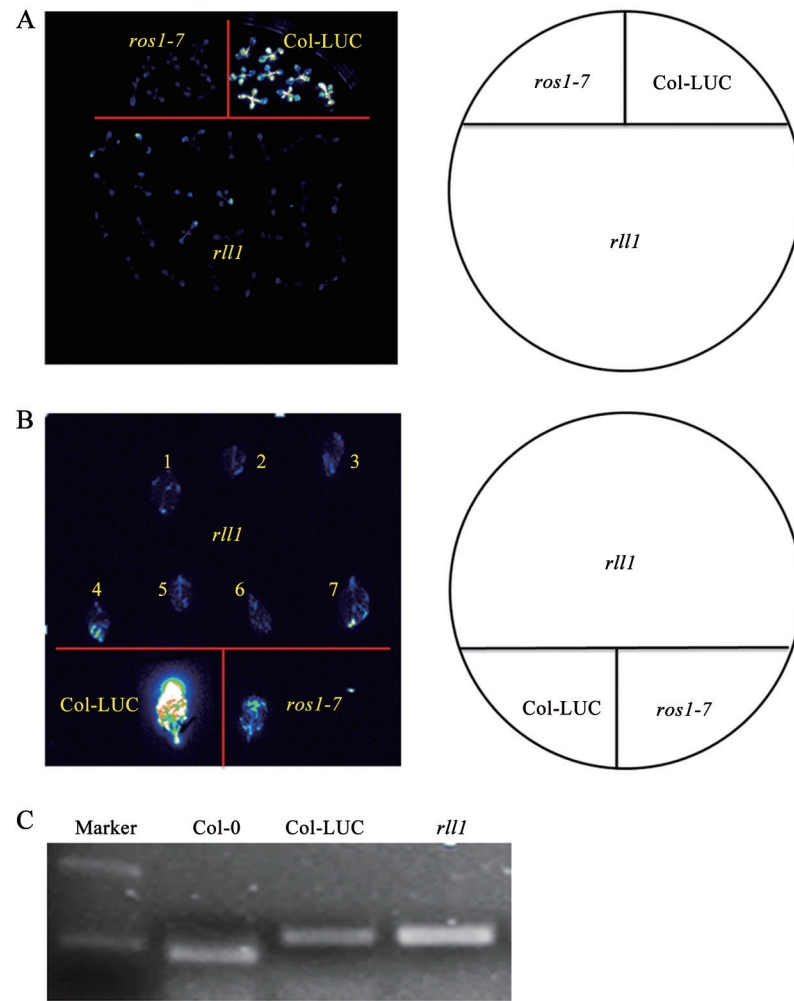


图1 *rll1*突变体的低荧光表现与*rdr6-11*突变位点的鉴定

Fig.1 The reduced LUC luminescence of *rll1* mutants and genotyping of *rdr6-11* mutations

A: MS培养基上生长2周的*rll1*幼苗荧光表现, *Col-LUC*和*ros1-7*均为对照; B: *rll1*的离体叶片荧光表现; C: *rdr6-11*位点的鉴定。

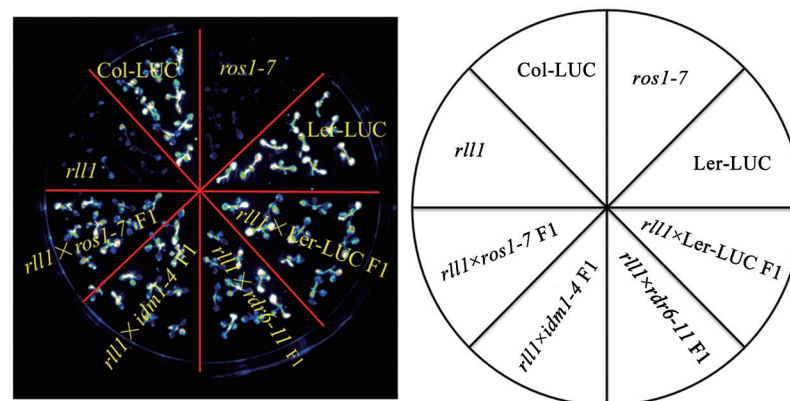


图2 *rll1*与*ros1-7*、*idm1-4*、*rdr6-11*和*Ler-LUC*杂交F1的幼苗荧光表现

Fig.2 The LUC luminescence performance of F1 seedlings derived from *rll1* × *ros1-7*, *rll1* × *idm1-4*, *rll1* × *rdr6-11* and *rll1* × *Ler-LUC*. *Col-LUC*和*Ler-LUC*是高荧光对照, 而*ros1-7*是低荧光对照。

表2 *rll1*与Ler-LUC杂交F2代的荧光分离比例Table 2 Segregation ratio of high LUC to low LUC luminescence in F2 population derived from *rll1*×Ler-LUC

父本	母本	代数	植株总数	高荧光数	低荧光数	χ^2
Ler-LUC	<i>rll1</i>	F2	1 546	1 160	386	0.001

41160与AT2G41150编码的蛋白分别有丝氨酸内肽酶活性和转移酶活性, 这些基因可能参与了植物抗逆与生理代谢过程。

3 突变体*rll1*的发育表型

处于开花期的*rll1*植株明显比Col-LUC矮(图

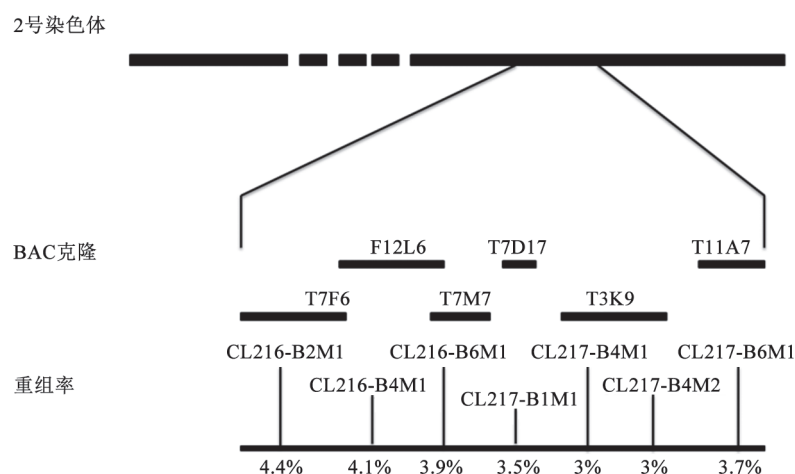
图3 *AtRLL1*位点的图位克隆Fig.3 Map based-cloning of *AtRLL1* locus

表3 分子标记CL217-B4M1与CL217-B4M2之间的基因和功能预测

Table 3 Genes between markers CL217-B4M1 and CL217-B4M2 and their functional annotations

基因	功能注释
<i>AT2G41160</i>	与丝氨酸内肽酶活性有关
<i>AT2G41150</i>	与转移酶活性有关
<i>AT2G41140</i>	与钙离子结合活性和激酶活性有关
<i>AT2G41130</i>	与DNA结合活性和转录因子活性有关
<i>AT2G41120</i>	功能未知
<i>AT2G41110</i>	与钙离子结合活性和蛋白质结合活性有关
<i>AT2G41100</i>	与钙离子结合活性和响应温度刺激有关
<i>AT2G41090</i>	与钙离子结合活性和抗氧化过程有关
<i>AT2G41080</i>	功能未知
<i>AT2G41070</i>	与DNA结合活性和转录因子活性有关
<i>AT2G41060</i>	与RNA结合活性和防御应答过程有关
<i>AT2G41050</i>	功能未知

4-A), 并且叶片变小, 叶缘有缺刻(图4-B), 果荚变短(图4-C), 种子量明显减少, 表明*AtRLL1*突变影响了植株的正常生长发育。

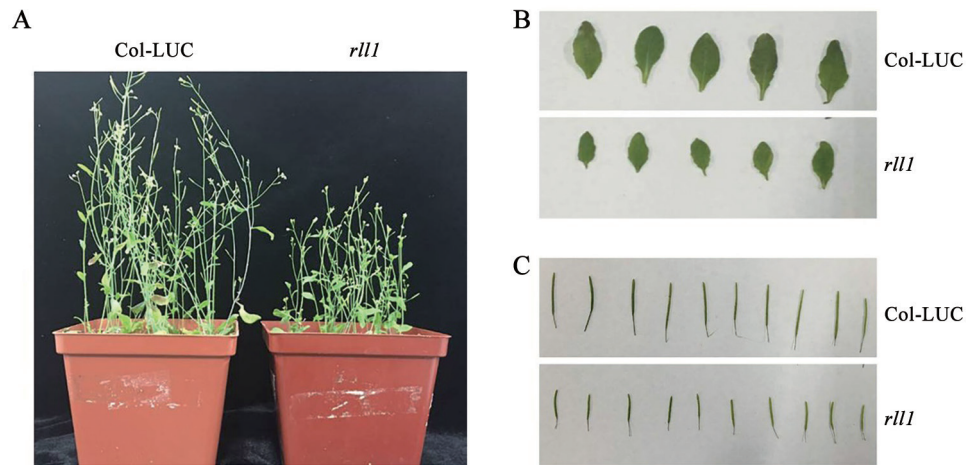
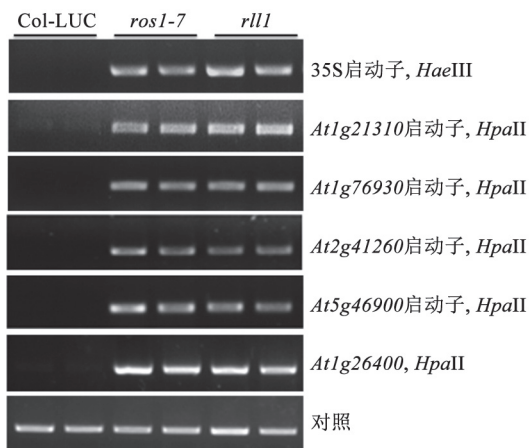
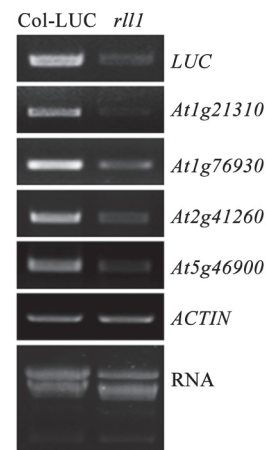
4 *rll1*的DNA甲基化状况分析

全基因组DNA甲基化测序结果表明, *ros1-7*基因组大量区域DNA甲基化水平明显升高, 其中35S启

动子甲基化水平明显比Col-LUC高, 从而导致了LUC表达量降低。为探索*rll1*荧光降低是否由于DNA甲基化升高造成的, 以及*AtRLL1*位点突变是否造成基因组DNA其他区域甲基化升高, 我们对*rll1*基因组的甲基化状况进行了chop-PCR检测(Qian等2014; He等2009b), 相关引物见表1。结果显示, *rll1*与*ros1-7*在35S和4个选定的基因AT1G21310、AT1G76930、AT2G41260以及AT5G46900启动子区域的DNA甲基化水平都显著升高, 同时AT1G26400基因的甲基化也明显升高, 而Col-LUC的甲基化水平则很低(图5)。这些结果表明, 与*ros1-7*类似, *AtRLL1*位点突变导致了基因组部分区域DNA甲基化升高, 因此*AtRLL1*位点很可能参与了DNA去甲基化过程。

5 *rll1*中LUC基因与RdDM内源靶基因的表达检测

在*ros1*突变体中, 一些转座子和RdDM内源靶基因的表达量因DNA甲基化升高而出现不同程度的降低。为检测*rll1*中这些基因的表达量是否也降低了, 我们利用RT-PCR检测了35S启动子驱动的LUC基因和另外4个RdDM过程内源靶基因AT1G-21310、AT1G76930、AT2G41260以及AT5G46900的表达量。结果表明LUC基因的表达量大幅度下

图4 *rll1*的发育缺陷表型Fig.4 The developmental defects of *rll1*A: *rll1*与Col-LUC株高的比较; B: *rll1*与Col-LUC叶片的比较; C: *rll1*与Col-LUC角果的比较。图5 *rll1* DNA甲基化水平的chop-PCR检测Fig.5 Detection of DNA methylation levels of *rll1* by chop-PCR methodCol-LUC和*ros1-7*为对照材料。图6 *LUC*及RdDM内源靶基因在Col-LUC、*ros1-7*和*rll1*中的表达检测Fig.6 Detection of expression levels of *LUC* and several endogenous targets of RdDM pathway in Col-LUC, *ros1-7* and *rll1*

降(图6),很可能*rll1*荧光降低是由于35S启动子功能降低所引起的,因为35S启动子甲基化水平明显升高(图5)。此外,本研究发现4个选定的RdDM过程内源靶基因的启动子区域甲基化升高(图5),它们的表达量均明显下降(图6)。综上所述,与ROS1类似,AtRLL1很可能作用在RdDM的一些内源靶基因,通过调控这些基因启动子的DNA甲基化水平来调控这些基因的表达。

讨 论

大量研究结果表明,在高等生物中DNA甲基

化是一种常见的表观遗传标记,具有重要的生物学功能(Zhang和Zhu 2012)。RdDM过程作为植物体内产生DNA甲基化的重要途径已经被广泛地研究。这个过程从RNA聚合酶Pol IV产生单链RNA (single-strand RNA, ssRNA)开始(Law和Jacobsen 2010),RNA聚合酶RDR2帮助ssRNA转换为双链RNA (double-strand RNA, dsRNA) (Zhang等2007),接着dsRNA被核糖核酸酶DCL3切割为24 nt小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) (Gao等2010; Matzke等2007)。RNA聚合酶Pol V同时转录

出初期支架RNA (He等2009a; Wierzbicki等2008), 这些初期支架RNA和siRNA通过碱基互补配对一起结合在AGO4或AGO6上(Li等2008), 在DMS3、DRD1、RDM1、IDN2和KTF1等作用下形成引导复合体, 并招募DNA甲基转移酶DRM2在目标区域产生DNA甲基化(Wierzbicki等2009)。

DNA去甲基化有助于解除转录沉默, 激活基因表达。ROS1是一个关键的DNA去甲基化酶, 通过其糖基化酶与裂合酶活性来发挥去甲基化功能(Zhang等2007)。本研究利用模式植物拟南芥构建出 $2 \times 35S:LUC$ 转基因的Col-LUC遗传筛选体系, 成功筛选到一株荧光降低的突变体 $rll1$, 为深入研究DNA去甲基化机制提供了重要参考依据。以低荧光候选突变体 $rll1$ 与Ler-LUC杂交F2的低荧光群体作为图位克隆材料, 最终将目标区域锁定在2号染色体T3K9克隆上, 为进一步克隆此候选突变基因奠定了基础。此外, 该突变体有比较明显的发育缺陷, 植株矮化, 果荚变短, 叶片变小, 表明 $AtRLL1$ 位点对拟南芥发育有重要作用。值得注意的是 $rll1$ 与 $ros1-7$ 突变体在 $35S$ 启动子和基因组DNA上的若干特定位点的甲基化水平明显升高, 并且 $rll1$ 中一些RdDM靶基因的表达量明显下降(部分基因的启动子甲基化水平升高), 根据这些结果我们推测 $AtRLL1$ 位点的功能很可能与ROS1相似, 共同参与了拟南芥DNA去甲基化过程。后续试验中, 我们将用更大的F2群体对 $AtRLL1$ 位点进行更加精细的定位, 利用全基因组测序手段最终确定突变基因, 然后分析它的具体功能以及与ROS1的相互关系。

参考文献

- Agius F, Kapoor A, Zhu JK (2006). Role of the *Arabidopsis* DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (31): 11796–11801
- Amedeo P, Habu Y, Afsar K, Scheid OM, Paszkowski J (2000). Disruption of the plant gene *MOM* releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature*, 405 (6783): 203–206
- Chan SWL, Henderson IR, Jacobsen SE (2005). Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet*, 6 (5): 351–360
- Gao Z, Liu HL, Daxinger L, Pontes O, He X, Qian W, Lin H, Xie M, Lorkovic ZJ, Zhang S, et al (2010). An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 465 (7294): 106–109
- Gong Z, Morales-Ruiz T, Ariza RR, Roldán-Arjona T, David L, Zhu JK (2002). *ROS1*, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*, 111 (6): 803–814
- He XJ, Hsu YF, Pontes O, Zhu J, Lu J, Bressan RA, Pikaard C, Wang CS, Zhu JK (2009a). NRPD4, a protein related to the RPB4 subunit of RNA polymerase II, is a component of RNA polymerases IV and V and is required for RNA-directed DNA methylation. *Genes Dev*, 23 (3): 318–330
- He XJ, Hsu YF, Zhu S, Wierzbicki AT, Pontes O, Pikaard CS, Liu HL, Wang CS, Jin H, Zhu JK (2009b). An effector of RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis* is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell*, 137 (3): 498–508
- Kapoor A, Agius F, Zhu JK (2005). Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett*, 579 (26): 5889–5898
- Law JA, Jacobsen SE (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*, 11 (3): 204–220
- Li CF, Henderson IR, Song L, Fedoroff N, Lagrange T, Jacobsen SE (2008). Dynamic regulation of ARGONAUTE4 within multiple nuclear bodies in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 4 (2): e27
- Matzke M, Kanno T, Huettel B, Daxinger L, Matzke AJM (2007). Targets of RNA-directed DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol*, 10 (5): 512–519
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJM (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J*, 19: 5194–5201
- Qian W, Miki D, Lei M, Zhu X, Zhang H, Liu Y, Li Y, Lang Z, Wang J, Tang K, et al (2014). Regulation of active DNA demethylation by an α -crystallin domain protein in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, 55 (3): 361–371
- Qian W, Miki D, Zhang H, Liu Y, Zhang X, Tang K, Kan Y, La H, Li X, Li S, et al (2012). A histone acetyltransferase regulates active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Science*, 336 (6087): 1445–1448
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, 76 (3): 567–576
- Wierzbicki AT, Haag JR, Pikaard CS (2008). Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell*, 135 (4): 635–648
- Wierzbicki AT, Ream TS, Haag JR, Pikaard CS (2009). RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat Genet*, 41 (5): 630–634
- Zhang H, Zhu JK (2012). Seeing the forest for the trees: a wide perspective on RNA-directed DNA methylation. *Genes Dev*, 26 (16): 1769–1773
- Zhang X, Henderson IR, Lu C, Green PJ, Jacobsen SE (2007). Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (11): 4536–4541

Mapping and functional analysis of a candidate gene involved in DNA demethylation process in *Arabidopsis thaliana*

LUO Jun-Peng, WANG Min, LA Hong-Gui*

College of life science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: In this study, a low luminescence mutant named *rll1* (*reduced LUC luminescence 1*) was obtained by screening a M2 population derived from an ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenized transgenic *Arabidopsis thaliana* Col-LUC line. The wild-type gene locus defined by the mutation was therefore designed as *AtRLL1* locus. The *rll1* mutant exhibited obvious developmental defects, such as dwarfism, shorter siliques and smaller leaves when compared to Col-LUC. Genetic analysis revealed that the *rll1* was a single recessive mutation on nuclear and the candidate gene locus was subsequently mapped on BAC clone T3K9 on chromosome 2 by means of map-based cloning strategy. Methylation-sensitive restriction enzyme PCR (chop-PCR) analysis demonstrates that the DNA methylation levels of *35S* promoter and a few genomic loci were obviously increased in the *rll1* mutant. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) results show that the expression level of several endogenous targets of RNA-directed DNA methylation (RdDM) pathway were decreased to varying extents in *rll1*. Taken together, these results suggest that the *AtRLL1* locus is presumably involved in DNA demethylation process in *A. thaliana*.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *rll1*; map-based cloning; DNA demethylation

Received 2017-02-20 Accepted 2017-03-22

This work was supported by the Basic Scientific Research Foundation of the Central University of Nanjing Agricultural University (Grant No. KYRC201409).

*Corresponding author (E-mail: hongguila@njau.edu.cn).