

# 植物响应高温胁迫的表观遗传调控

刘军钟, 何祖华\*

中国科学院上海植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032

\* 联系人, E-mail: zhhe@sibs.ac.cn

2013-09-30 收稿, 2013-11-25 接受

国家自然科学基金(91117018, 30730064)资助

**摘要** 由于不能移动, 植物只能被动地应对昼夜温度和四季气温的改变. 为了适应环境温度的变化, 植物进化出复杂的遗传和表观遗传机制去感知周围温度的变化并随之调整生长发育. 全球气候变暖对农作物的生产造成了严重威胁, 因此研究植物响应高温胁迫的机制迫在眉睫. DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和小分子 RNAs 是主要的表观遗传调控机制. 这些表观遗传修饰各自分工又密切联系, 共同调控植物的抗热性. 本文介绍了近年来表观遗传修饰调控植物响应高温胁迫的研究进展.

## 关键词

DNA 甲基化  
组蛋白修饰  
染色质重塑  
小分子 RNAs  
隔代记忆

温度是影响植物生长发育的最重要的环境因子之一, 温度的细微变化能极大地影响植物的生长和发育等行为. 目前最受关注的是全球气候变暖问题. 据统计, 1979~2003 年, 年平均最低气温和最高气温分别上升了 1.13 和 0.35℃<sup>[1]</sup>. 气候变暖不仅导致了英国植物的开花时间提前<sup>[2]</sup>, 而且还改变了欧洲植物物种的分布<sup>[3]</sup>. 此外, 气候变暖对农作物的生产造成了严重的威胁. 在生长季节, 最低温度每升高 1℃, 水稻(*Oryza sativa*)产量就下降 10%<sup>[1]</sup>. 据估计, 气温每上升 1℃, 小麦(*Triticum aestivum*)、水稻、玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)、大麦(*Hordeum vulgare*)和高粱(*Sorghum bicolor*)等 6 种主要农作物的产量就要减少 0.6%~8.9%<sup>[4]</sup>. 1980~2008 年的 30 多年间, 热胁迫导致全球小麦和玉米的产量分别下降了 5.5%和 3.8%<sup>[5]</sup>. 因此, 研究环境中高温影响植物生长发育的机制的意义非常重大. 目前, 对于植物响应高温胁迫的遗传调控的研究主要集中在环境温度升高(22~27℃)改变植物形态的机制<sup>[6]</sup>、高温促使植物开花提前的分子机制<sup>[7]</sup>、高温对植物免疫的调控<sup>[8]</sup>、高温对植物生物钟的调控<sup>[9,10]</sup>和极端高温(37~42℃)下植物的耐热性(thermotolerance)<sup>[11]</sup>等方面. 表观遗传学

(epigenetics)是近年来的研究热点, 指在 DNA 序列没有发生变异的情况下, 基因表达发生可遗传的改变, 主要通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和小分子 RNAs 调控等来实现. 表观遗传修饰在维持基因组稳定性、调节植物生长发育和响应逆境胁迫等方面发挥了重要作用<sup>[12,13]</sup>. 本文总结了表观遗传修饰在植物响应高温胁迫中的作用, 希望能为提高植物抗热性的研究提供新的思路.

## 1 DNA 甲基化

DNA 甲基化是最早发现的表观遗传途径之一, 这一修饰现象广泛存在于多种生物体中. 植物体内的 DNA 甲基化主要存在 5-甲基胞嘧啶和少量的 N6-甲基腺嘌呤这两种形式, 其中 N6-甲基腺嘌呤主要存在于线粒体中<sup>[14]</sup>. 在植物中, DNA 甲基化能发生在处于不同序列特征中的胞嘧啶上, 包括对称的 CG 和 CHG 序列(H 代表 A/T/C)以及不对称的 CHH 序列. 对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组的甲基化进行测序后发现, 整个基因组中大约 24%的 CG 序列、6.7%的 CHG 序列和 1.7%的 CHH 序列发生了胞嘧啶的甲基化修饰. 这些甲基化修饰大多发生在转座元件和

**引用格式:** 刘军钟, 何祖华. 植物响应高温胁迫的表观遗传调控. 科学通报, 2014, 59: 631-639

Liu J Z, He Z H. Epigenetic regulation of heat stress response in plants (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 631-639, doi: 10.1360/972013-1103

重复序列上,同时伴随着 siRNAs(small interfering RNAs)的合成<sup>[15]</sup>.拟南芥中的 DNA 甲基化主要由 3 类 DNA 甲基化酶催化. (i) DRM(DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE)家族,包括 DRM1, DRM2 和 DRM3,参与调控从头甲基化(*de novo* methylation).由于这一过程需要小分子 RNAs 的介导,从头甲基化又被称为 RNA 介导的 DNA 甲基化(RNA-directed DNA methylation, RdDM).同时 DRM1/2/3 还参与维持 CHH 的甲基化; (ii) MET1 (METHYLTRANSFERASE1) 家族,包括 DDM1 (DECREASED DNA METHYLATION 1), MET1, MET2 和 MET3,参与维持 CG 甲基化; (iii) CMT (CHROMOMETHYLASE)家族,包括 CMT1, CMT2 和 CMT3,它们为植物所特有.这类甲基转移酶的作用在于维持非 CG 的甲基化(non-CG methylation)<sup>[16]</sup>.其中, RdDM 信号通路已经得到了比较充分的研究. (i) 基因组上的转座子和重复序列(已被甲基化修饰)在聚合酶 Pol IV 的作用下转录为单链的 RNA 转录本; (ii) 在 RDR2(RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2)的作用下生成双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA); (iii) dsRNA 随后被 DCL3(DICER-LIKE 3)切割为 24 nt(nucleotide)的 siRNAs,这些 siRNAs 的 3'末端被 HEN1(HUA ENHANCER 1)进行甲基化修饰以阻止其降解,随后 24 nt 的 siRNAs 被装载到 AGO4(ARGONAUTE4)上. AGO4 与聚合酶 Pol V 以及 DNA 甲基转移酶 DRM2 等形成复合体介导 DRM2 对与 siRNAs 同源的基因组序列进行甲基化修饰<sup>[16,17]</sup>.在植物中, DNA 甲基化的功能主要体现在调控基因表达和维持基因组的稳定性两个方面.在调控基因表达方面, DNA 甲基化主要是抑制基因的转录<sup>[18]</sup>.在维持基因组稳定性方面, DNA 甲基化一方面能抑制外来的遗传物质如转基因进入体内的 DNA 和 RNA、病原菌的 DNA 和 RNA 等对基因组的威胁;另一方面, DNA 甲基化能抑制体内的 DNA 转座子和反转录转座子的转座,同时维持 rDNA、中心粒和着丝粒以及异染色质区基因的转录抑制状态<sup>[16]</sup>.此外,非生物胁迫如冷、盐、重金属以及渗透胁迫等均能导致植物 DNA 甲基化水平的改变<sup>[16,17]</sup>,说明 DNA 甲基化能调控植物的抗逆性.

一系列的研究显示,极端高温(37~42℃)的处理均不会导致植物中外源转基因的 DNA 甲基化的改变<sup>[19-21]</sup>.而环境温度的升高(22~27℃)会导致外源转

基因位点上部分区域 DNA 甲基化程度升高,部分区域 DNA 甲基化程度下降,没有一致的趋势<sup>[22]</sup>.这似乎表明, DNA 甲基化与植物中外源转基因的表达所受高温的调控无关,但环境温度的升高对植物体内基因 DNA 甲基化的影响尚未得到研究(图 1(a)).用 37℃ 的高温处理拟南芥后发现植物体内的同源重组频率增加了,同时全基因组水平上的 DNA 甲基化程度升高了<sup>[23]</sup>.此外,用 DNA 甲基化缺失突变体进行基础性耐热性(basal thermotolerance,植物与生俱来的具有在高于适宜生长温度下存活的能力)测试后发现,虽然 DNA 甲基转移酶缺失突变体 *drm1drm2* 和 *cmt3* 表现为对热不敏感,但是参与 RdDM 途径的基因的突变体 *nRPD2*(nuclear RNA polymerase d2), *dcl3*, *rdr2* 和 *ago4* 表现为对热敏感,即经热处理后存活率降低.其中对热最为敏感的突变体为 *nRPD2*<sup>[24]</sup>. *NRPD2/NRPE2* 编码聚合酶 Pol IV 和 Pol V 共有的第二大亚基,是 RdDM 途径所必需的基因<sup>[25]</sup>.对 *nRPD2* 热处理前后的全基因组表达谱分析发现, *NRPD2* 的缺失能导致转座子相关的假基因 *Atlg34230* 的启动子区和编码区的 CHH 型甲基化程度降低,同时导致一个编码 PPR(pentatricopeptide repeat)蛋白的基因 *Atlg07590* 启动子区的 CG 和 CHH 型甲基化程度降低,最终导致这两个基因在热处理后表达量大幅度上调.此外, *NRPD2* 的缺失能导致 6 个高度同源的生长素响应基因 *Atlg29430*, *Atlg29440*, *Atlg29450*, *Atlg29460*, *Atlg29500* 和 *Atlg29510* 表达量下调,同时导致另一个含 COPIA(意为复制,因在基因组中有大量的相似序列而得名)类转座子的生长素应答基因 *Atlg29475* 中的转座子的 CG 和 CHH 型甲基化程度降低, COPIA 类转座子的表达量升高而 *Atlg29475* 的表达量下降<sup>[24]</sup>.这些结果说明,在高温胁迫下, RdDM 途径能够通过改变转座子的 DNA 甲基化状态从而影响一些转座子附近或者含转座元件的基因的转录,进而调节植物体内生长素信号途径等提高植物的基础耐热性(图 1(m)).

## 2 组蛋白修饰

组蛋白修饰包括组蛋白的共价修饰和组蛋白变体两种修饰形式.组蛋白共有 H1, H2A, H2B, H3 和 H4 五种类型,其中 H2A, H2B, H3 和 H4 为核心组蛋白.4 种核心组蛋白各两分子聚合组成了组蛋白八聚体,和缠绕在八聚体上的 146 bp 的 DNA 构成染色质

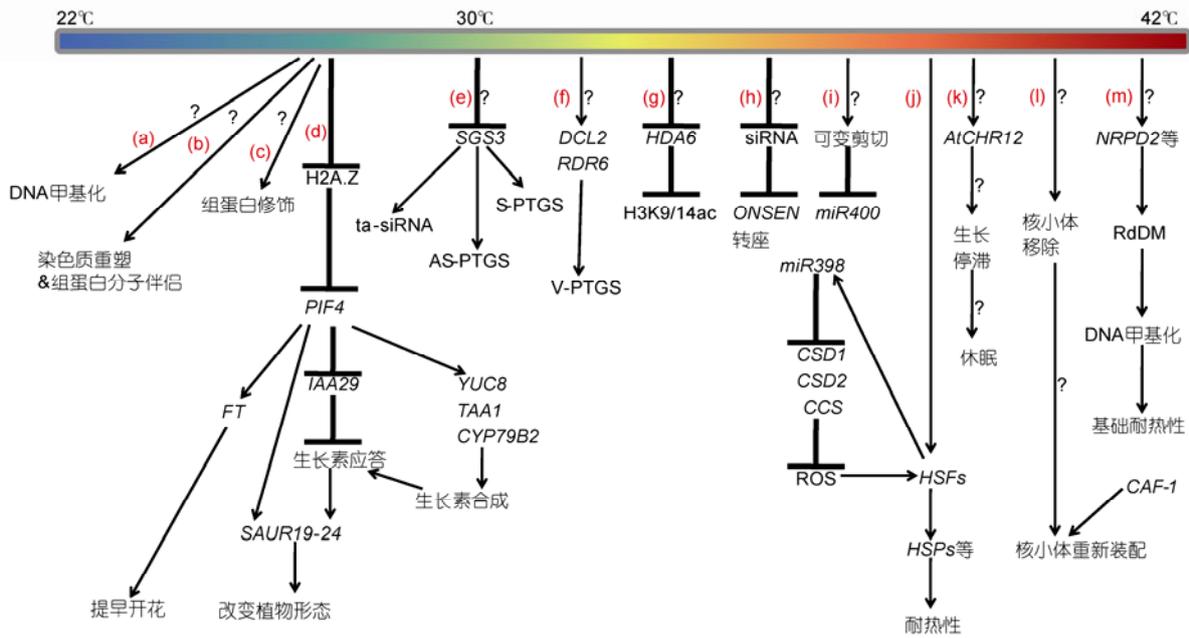


图 1 植物响应高温的表观遗传调控

DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和小分子 RNAs 等表观遗传修饰各自分工又密切联系，共同调控植物的抗热性。(a)~(d) 环境温度升高(22~27℃)导致的表观遗传修饰的改变；(e)~(f) 高温对转录后水平上的基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)的影响；(g)~(m) 极端高温(37~42℃)下表观遗传修饰对植物抗热性的调节

的基本结构单位核小体。相邻的核小体之间通过 DNA 和组蛋白 H1 连接。组蛋白共价修饰包括甲基化(methylation)、乙酰化(acetylation)、泛素化(ubiquitination)、类泛素化(sumoylation)、磷酸化(phosphorylation)、糖基化(glycosylation)和 ADP 核糖基化(ADP-ribosylation)等类型<sup>[26]</sup>。这些组蛋白修饰发生在基因的不同区域，有些能激活转录(如乙酰化、磷酸化和部分甲基化修饰)，有些能抑制转录(如去乙酰化和部分甲基化修饰)，共同调控基因的时空特异性表达<sup>[27]</sup>。目前研究较多的是组蛋白的乙酰化和甲基化修饰。组蛋白乙酰化与去乙酰化的过程分别由组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase, HATs)和组蛋白去乙酰基酶(histone deacetylases, HDACs)催化。组蛋白乙酰化可以使染色质结构变得松散，促进转录，而组蛋白去乙酰化则使染色质结构变得紧密，抑制转录<sup>[28]</sup>。组蛋白的甲基化修饰是目前研究的最为深入的修饰。植物体中组蛋白甲基化修饰主要发生在 H3 和 H4 上。H3 上主要修饰位点为第 4, 9, 27 和 36 位赖氨酸(Lys, K)和第 17 位精氨酸(Arg, R)残基上，而 H4 上主要为第 20 位赖氨酸和第 3 位精氨酸残基上。单个氨基酸残基的修饰水平也有

不同，赖氨酸残基上的甲基化修饰可分为单甲基化(me1)、双甲基化(me2)和三甲基化(me3)，精氨酸上的甲基化可分为单甲基化、不对称的双甲基化和对称的双甲基化，这些修饰形式的不同造成对基因表达的促进或抑制的差异。组蛋白甲基化修饰的调节主要包括甲基化形成、甲基化识别和维持及去甲基化 3 个过程。组蛋白的甲基化和去甲基化主要由相应的甲基化酶(Writer)和去甲基化酶(Eraser)进行，而甲基化的识别和维持则由多种因子(Reader)参与<sup>[29]</sup>。不同形式的组蛋白甲基化修饰在染色质上分布的区域不同，对基因表达的调控作用也不同。H3K4me3, H3K9me3, H3K36me3 和 H4K20me3 主要分布在常染色质区，促进基因的转录。而 H3K9me1, H3K9me2, H3K27me1, H3K27me3, H3K20me1 和 H4R3me2 则主要位于异染色质区域，参与抑制基因的表达。对于单个基因来说，H3K4me1 和 H3K9me2 一般在整个转录区域都有分布，而 H3K4me2, H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 和 H3K36me3 则主要在基因的 5'端密集分布<sup>[30-32]</sup>。

组蛋白的共价修饰通过影响基因的表达，参与调控植物的发育、生理活动及逆境的响应等过

程<sup>[26-28,33]</sup>. 目前研究的最为充分的是春化过程中组蛋白修饰对 *FLC*(*FLOWERING LOCUS C*)基因的表达调控. *FLC* 基因的染色质在拟南芥春化的过程中会受到一系列表观遗传的调控, 包括 H3K4me3 修饰程度的降低, H3K9me2, H3K27me3 和 H4R3me2 修饰程度的升高等. 这些表观遗传修饰导致了 *FLC* 基因的染色质区域变为异染色质状态, 使得 *FLC* 表达量降低, 解除对开花的抑制<sup>[34]</sup>. 已有的研究结果显示, 高温不能改变基因的组蛋白甲基化修饰状态, 无论是外源转基因位点上的 H3K9me2, H3K27me1 和 H3K4me3 修饰<sup>[19,20]</sup>, 还是内源的 5S rRNA、转座子 LINEs(long interspersed nuclear elements)和 MULE(mutator-like element)-F19G14 以及 180 bp 卫星重复序列上的 H3K9me2, H3K27me2, H3K27me3 和 H3K4me3 修饰<sup>[19,21]</sup>. 但是, 高温能导致外源转基因位点上和内源异染色质区域的组蛋白乙酰化修饰(H3K9ac1 和 H3K9/14ac2)程度均升高<sup>[19-21]</sup>. 这一过程可能与组蛋白去乙酰化酶 HDA6(HISTONE DEACETYLASE 6)相关(图 1(g))<sup>[19]</sup>. 但目前尚无环境温度升高对组蛋白修饰影响的报道(图 1(c)). 目前组蛋白修饰调控植物响应高温的机制尚不明确, 在全基因组水平检测高温胁迫下各种组蛋白修饰的变化, 可能为揭示这个机制提供更多的线索.

组蛋白变体是相对于常规的组蛋白而言, 为特殊状态的染色体所需的组蛋白类型. 不同的组蛋白变体能使染色体形成不同的构型. 拟南芥中研究较多的是组蛋白 H3 和 H2A 的变体. 拟南芥中目前已鉴定出 15 个基因编码组蛋白 H3 及其变体, 其中 6 个基因编码常规的组蛋白 H3.1 及其类似物, 8 个基因编码 H3.3 及其类似物, 另外 1 个基因编码 CenH3<sup>[35]</sup>. H3.3 仅在第 31, 41, 87 和 90 位 4 个氨基酸上与 H3.1 存在差异. 其中, H3.3 的第 87 位和 90 位氨基酸介导了 rDNA 的核小体组装过程, 而第 31 和 41 位氨基酸介导了 rDNA 的核小体去组装过程<sup>[36]</sup>. 拟南芥中共有 13 个基因编码 H2A 家族蛋白, 根据同源性可划分为 4 类: 传统的 H2A 编码基因(*HTA1/2/10/13*), H2A.X 编码基因(*HTA3/5*), H2A.Z 编码基因(*HTA8/9/11*)和其他 4 种尚未明确分类的基因(*HTA4/6/7/12*)<sup>[37]</sup>. 目前最引人注目的是组蛋白变体 H2A.Z 在感受温度中的重要作用. 热休克蛋白 HSP70(HEAT SHOCK PROTEIN 70)是一个高温应答蛋白, 它的表达量随着温度的升高而升高. 利用 HSP70 进行正向遗传筛选分离到了

一个与温度相关的突变体 *arp6*(actin-related protein 6). *arp6-10* 在 22℃ 下即表现出下胚轴伸长、叶柄伸长和早开花等正常植株在高温下才具有的表型<sup>[38]</sup>. *ARP6* 基因是 SWR(Swi2/Snf2-related)复合体的一个亚基, 负责将 H2A.Z 组装入核小体中取代 H2A 的位置<sup>[37]</sup>. 这些结果表明, H2A.Z 在高温改变植物形态的过程中起了重要作用. 进一步研究显示, H2A.Z 在低温下能紧密地缠绕 DNA, 阻止 RNA 聚合酶 II 转录基因; 当温度升高时, H2A.Z 从核小体中解离出来, DNA 链随之变松弛, 允许 RNA 聚合酶 II 结合 DNA 行使转录功能, 同时允许激活子和抑制子结合 DNA, 调控基因的转录以应对环境温度的升高. 在高温下, bHLH(basic helix-loop-helix)转录因子 *PIF4* (*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4*) mRNA 表达水平和蛋白质累积水平平均上调. 同时, H2A.Z 能调控 *PIF4* 与开花素 *FT*(*FLOWERING LUCUS T*)启动子的结合. 低温下含 H2A.Z 的核小体紧密缠绕 *FT* 启动子上的 *PIF4* 结合区域, 阻止 *PIF4* 与 *FT* 启动子的结合; 当温度升高时, H2A.Z 从核小体中解离出来, 使得 *PIF4* 能与 *FT* 启动子结合, 激活 *FT* 表达促使开花提前<sup>[7]</sup>(图 1(d)). 此外, *PIF4* 在高温改变植物形态中起着中心调控作用<sup>[6,39]</sup>. *PIF4* 能直接结合生长素合成基因 *YUC8*(*YUCCA8*), *TAA1*(*TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS*)和 *CYP79B2* (*CYTOCHROME P450, FAMILY 79, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 2*)等的启动子, 激活这些基因的表达促进生长素的合成<sup>[40,41]</sup>. *PIF4* 的上调表达也会导致生长素应答基因 *IAA29*(*INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 29*)等在高温下的表达量下降, 解除 *IAA29* 等对生长素应答信号的抑制<sup>[39]</sup>. 同时 *PIF4* 能直接促进生长素应答信号的靶基因 *SAUR*(*SMALL AUXIN UP RNA*)*19-24* 在下胚轴中的表达, 促进细胞延伸生长<sup>[41]</sup>(图 1(d)).

### 3 染色质重塑和组蛋白分子伴侣

染色质是高度动态的, 其丝状结构经常受到各种修饰而改变. 染色质重塑(chromatin remodeling)是基因表达调控过程中所出现的一系列染色质结构变化的总称. 染色质重塑过程是由依赖于 ATP 的染色质重塑复合体介导的. 染色质重塑复合体利用 ATP 水解的能量以一种非共价方式调整染色质结构, 移动核小体的位置使 DNA 序列暴露或者被掩盖, 从而

调节基因的表达. 染色质重塑复合体利用的 ATP 酶主要可以分为 SWI/SNF(switch/sucrose nonfermentable)ATP 酶、ISWI(imitation switch)ATP 酶和 CHD(chromodomain and helicase-like domain)ATP 酶三大类<sup>[42]</sup>. 在干旱和高温胁迫下, 过表达 SNF2/Brahma (BRM)型染色质重塑因子 *AtCHR12(CHROMATIN REMODELING 12)*, 引起拟南芥花芽和初生茎的生长停滞, 敲除 *AtCHR12* 则导致该生长停滞作用减弱(图 1(k)). 表明 *AtCHR12* 在调控干旱和高温胁迫诱导的瞬时生长停滞中起作用, 这一作用可能与胁迫条件下休眠相关基因的表达有关, 但具体的机制尚待进一步的研究<sup>[43]</sup>.

组蛋白分子伴侣以不依赖 ATP 的方式介导组蛋白与 DNA 相互作用, 参与核小体的去组装和重新组装过程, 在维持染色质结构稳定和调控基因表达方面起重要作用. 根据亲和力的差异, 组蛋白分子伴侣主要分为 H3-H4 组蛋白分子伴侣和 H2A-H2B 组蛋白分子伴侣两类. 植物中的 H3-H4 组蛋白分子伴侣包括 CAF-1(chromatin assembly factor-1), HIRA(histone regulatory homolog A)和 ASF1(anti-silencing function1). H2A-H2B 组蛋白分子伴侣包括 NAP1 (nucleosome assembly protein1), NRPs(NAP1-related proteins)和 FACT(facilitates chromatin transcription)<sup>[44]</sup>. 拟南芥经过 37°C 处理 30 h 后, 部分核小体连同上面携带的 DNA 甲基化和 H3K9me2 等抑制性表观遗传标记一起被移除, 导致异染色质区域变松弛, 使得原本被沉默的重复序列激活表达. 当热胁迫处理结束, 拟南芥重新回到正常生长温度后, 核小体被重新装载到染色体上, 同时伴随着 H3K9me2 的重新建立, 最终导致重复序列恢复沉默. 但值得注意的是, 这一过程并没有伴随着紧密的异染色质区域的重新形成. H3-H4 组蛋白分子伴侣 CAF-1 在核小体重新装载到染色体上的过程中发挥重要作用<sup>[20]</sup>(图 1(l)). 此外, SNF 家族的染色质重塑因子 *DRD1(DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1)* 缺失能增强高温诱导重复序列的转录. *DRD1* 能参与 RdDM 过程, 辅助 *DRM2* 和 *CMT3* 调控非 CG 甲基化<sup>[17]</sup>, 暗示 RdDM 途径可能参与调节高温介导的核小体卸载过程. 染色质重塑和组蛋白分子伴侣在植物响应环境温度升高的过程中发挥的作用尚未得到研究(图 1(b)).

## 4 小分子 RNAs

小分子 RNAs(small RNAs)是一组非编码的、对基因表达起调控作用的 RNA 分子, 在生命活动中起非常重要的作用. 根据合成途径和功能的不同, 内源小分子 RNAs 分为 miRNA(microRNA)和 siRNA 两类. siRNA 与 miRNA 的形成过程比较相似. 前体 RNAs 被核酸内切酶 DCLs 剪切为 21~26 nt 大小的 small RNA, small RNA 经 HEN1 甲基化修饰后装载到含有 argonaute 蛋白的蛋白复合体 RISC(RNA-induced silencing complex)中, 然后再根据序列的互补性特异性地抑制靶标基因表达. miRNA 是与靶 mRNA 高度互补的单链 RNA, 主要通过与靶 mRNA 的 3'-非翻译区(untranslated regions, UTR)结合, 调控 mRNA 降解或抑制转录后的翻译过程<sup>[45]</sup>. 而 siRNA 由长双链 RNA 前体(dsRNA)加工而来, 现已发现多种在转录和转录后水平调控基因表达的内源 siRNA 分子, 包括 ta-siRNA(trans-acting siRNAs), nat-siRNA(natural anti-sense transcript-derived siRNAs), ra-siRNAs(repeat-associated siRNAs)和 hc-siRNA(heterochromatic siRNAs)等<sup>[46]</sup>. 这些内源小分子 RNAs 在维持基因组稳定、调节植物的生长发育和应对逆境胁迫等方面起重要作用<sup>[45,46]</sup>. 除了内源的 siRNA 和 miRNA 外, 转基因和病毒侵染也会导致 siRNA 的产生. 这些 siRNA 能导致转基因和病毒的转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS). 其中, 转入正义链序列(sense)、反义链序列(antisense)、反向重复序列(inverted repeat)和病毒入侵引发的 PTGS 分别被称为 S-PTGS, AS-PTGS, IR-PTGS 和 V-PTGS<sup>[47]</sup>.

高温能够影响 small RNAs 的产生, 进而影响植物的生长发育和耐热性. 高温能迅速地诱导 *miR398* 的表达, 而 *miR398* 表达量升高会导致它的靶基因 *CSD1(COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 1)*, *CDS2* 和 *CCS(COPPER CHAPERONE FOR SOD 1)* 的 mRNA 降解<sup>[48,49]</sup>. *CCS* 负责编码铜离子伴侣蛋白, 负责将铜离子传递给 *CSD1* 和 *CSD2* 蛋白. *CSD1* 和 *CSD2* 编码超氧化物歧化酶, 能够催化超氧化物通过歧化反应转化为氧气和过氧化氢, 降低细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累. 高温下, *CSD1*, *CSD2* 和 *CCS* 表达量的降低导致了细胞内 ROS 的积累, 激活热休克因子 *HSA1b(CLASS A HEAT SHOCK FACTOR 1b)* 和 *HSA7b* 的表达, 进而激活

*HSPs* 的表达增加植物的耐热性。有趣的是, 高温下 *miR398* 的过量表达是 *HSFA1b* 和 *HSFA7b* 介导的。据此, 高温下 *miR398* 能与 *HSFA1b* 和 *HSFA7b* 形成一个正向反馈调节, 增强植物的耐热性<sup>[49]</sup>(图 1(j))。此外, 高温能通过影响可变剪接调控 *miR400* 的形成过程<sup>[50]</sup>。高温能够诱导 RNA 剪接相关基因的大量表达, 通过调节基因的转录本改变植物的生长发育<sup>[51]</sup>。产生 *miR400* 前体的基因 *MIR400* 隐藏在 *At1g32583* 的第一个内含子(长 306 bp)中。正常情况下, *MIR400* 和 *At1g32583* 能够共同转录, 然后被加工形成成熟的 *miR400*。高温能介导 *At1g32583* 的第一个内含子发生可变剪接, 将 100 bp 的序列从内含子中切掉, 剩下的包括了 *MIR400* 在内的 206 bp 序列保留了下来。这 206 bp 序列仍能转录形成 *miR400* 初级转录本, 但这个转录本不能被 miRNA 加工中心加工为成熟的 *miR400*。因此, 高温能降低成熟的 *miR400* 的表达量同时促进其初级转录本的积累, 但不影响 *At1g32583* 的正常表达<sup>[50]</sup>(图 1(i))。但是高温介导可变剪接的机制有待深入研究。

除了影响 *miR398* 和 *miR400* 外, 高温还能导致内源的 ta-siRNA、外源转基因以及病毒入侵产生的 siRNA 的表达量发生变化。拟南芥在 30°C 高温下生长 4 周后, 体内的大部分 ta-siRNA 表达量下调, 伴随着它们的前体和它们作用的靶标基因 mRNA 的累积。同时, 30°C 的高温处理能抑制转入正义链序列(sense)引发的 S-PTGS 和转入反义链序列(antisense)导致的 AS-PTGS, 但不能抑制反向重复序列(inverted repeats)引起的 IR-PTGS<sup>[22]</sup>。对其机制的研究表明, 高温可能通过促进 SGS3(SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3)蛋白的降解进而抑制双链 RNA 形成, 从而解除 PTGS 并抑制 ta-siRNA 产生, 提高 SGS3 蛋白水平可以抑制高温对 PTGS 的解除。但高温导致 SGS3 蛋白降解的具体机制尚不清楚<sup>[22]</sup>(图 1(e))。此外, 37°C 的高温处理能导致拟南芥体内的一个 COPIA 类反转录转座子 *ONSEN*(日语“温泉”)活跃转录, 同时在染色体外产生多个拷贝。在 siRNA 合成相关基因 *NRPD2* 和 *RDR2* 的突变体中, *ONSEN* 的转录更为活跃, 表明 siRNA 途径能抑制由热胁迫激活的反转录转座子转录过程<sup>[52]</sup>。*nrdp2* 和 *rdr2* 突变体植株经热胁迫处理后, *ONSEN* 活跃转录但并未发现 *ONSEN* 在植株中转座。令人吃惊的是, 在子代植株中发现高频率的 *ONSEN* 的转座, 即隔代反转座现象。隔代反转座可能发生在

配子体形成之前的花发育过程中。研究发现, *ONSEN* 的转录和转座可能是由两个独立的机制调控的。新插入的 *ONSEN* 位点周边的基因表现出热胁迫的应答, 表明 *ONSEN* 可能包含受热诱导的启动子。*ONSEN* 的转录可能同时受热敏感的启动子和 siRNA 途径的调节(图 1(h))。而 *ONSEN* 能特异性地在愈伤组织或者未分化细胞中被激活转座, 这一过程可能受 *DCL2-4* 和其他未知因子的调控<sup>[52,53]</sup>。

温度强烈地影响植物与病毒的相互作用。病毒疾病的爆发往往伴随着低温, 而随着温度的升高, 病毒的症状通常会减轻或消退。低温状态下, 病毒介导的 V-PTGS 被抑制, 相应的 siRNA 显著降低。与此相反, V-PTGS 随着温度的升高而被激活, 同时 siRNA 的丰度升高<sup>[54,55]</sup>。对其机制的研究表明, 高温能够增强拟南芥中 *DCL2* 的活性, 产生更多的 22 nt 的 siRNA, 加强对 *Turnip crinkle virus*(TCV)的沉默。RNA 沉默通路中的 AGO2 和 HEN1 蛋白的活性也能被高温增强, 在这一过程中发挥辅助作用<sup>[56]</sup>。*Chinese wheat mosaic virus*(CWMV)在 16°C 时能侵染烟草(*Nicotiana tabacum*)和小麦, 但在 24°C 时不能。用 CWMV 侵染 *RDR6* 被沉默的烟草时发现, 24°C 下 CWMV 能在烟草的根中积累并伴随着 CWMV siRNA 的减少, 但 CWMV 不能在叶中积累。这证明了烟草中的 *RDR6* 蛋白在高温下能特异性地在根中促进 CWMV siRNAs 的生成, 抑制 CWMV 的积累<sup>[57]</sup>(图 1(f))。

## 5 植物对高温胁迫的隔代记忆

在逆境的条件下, 植物会产生表观遗传上的变化以应对胁迫, 而且这种改变还能传递给下一代, 即使后代没有受到逆境影响, 这种现象被称为隔代记忆(transgenerational memory)。用紫外线照射或者用能激发植物防卫反应的细菌鞭毛蛋白处理拟南芥时, 拟南芥细胞会发生高频率的体细胞重组。令人吃惊的是, 下一代的植株虽然没有受到胁迫, 但仍表现出较高频率的体细胞重组<sup>[52]</sup>。隔代记忆过程可能增强植物后代对逆境的适应性。温和高温和极端高温导致的表观遗传上的变化均能传递给下一代, 表现出隔代记忆效应<sup>[19,22,23,52,53]</sup>。有研究表明, 隔代记忆可能依赖于 DNA 的甲基化过程以及 siRNA 合成途径中核酸内切酶 *DCLs* 的作用<sup>[23]</sup>。针对反转录转座子 *ONSEN* 的研究也表明, *DCL2-4* 在隔代记忆过程中具

有重要作用<sup>[53]</sup>。对缺少CG甲基化的突变体连续分析数代后发现,CG型DNA甲基化的缺失会导致全基因组水平上其他的表观遗传修饰如 RdDM 途径、DNA 去甲基化途径、组蛋白 H3K9 甲基化和 siRNA 等的随机改变,直到经过数代后重新建立新的表观遗传模式替代 CG 型 DNA 甲基化的作用。因此,CG 型 DNA 甲基化在植物的隔代记忆过程中起中心调控的作用,维持稳定的隔代遗传。其他的表观遗传修饰可能在瞬时的、非遗传性的逆境胁迫应答过程中发挥功能<sup>[58]</sup>。研究显示,高温改变了外源转基因的 DNA 甲基化状态,但这种改变与隔代记忆效应没有相关性,可能是基因组上其他位点的 DNA 甲基化影响了隔代记忆。此外,过表达 SGS3 蛋白能一定程度上减弱隔代记忆,表明 SGS3 蛋白参与的 siRNA 途径也能在隔代记忆过程中发挥作用<sup>[22]</sup>。

## 6 总结与展望

高温导致 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和小分子 RNAs 等表观遗传修饰的变化可调控热胁迫应答基因的表达并提高植物对高温的适应能力。目前,表观遗传修饰调控植物耐热性的研究虽然取得了不少突破,但仍有很长的路要走。如图 1(d)所示,环境温度的升高通过改变 H2A.Z 的含量激活 PIF4,

进而改变植物的形态和开花时间。这一机制已经研究得较为清楚,但仍有不少问题尚待回答,如高温是如何调节组蛋白变体 H2A.Z 的含量的。此外,在环境温度升高的过程中,DNA 甲基化、组蛋白修饰和染色质重塑发挥的作用尚无报道(图 1(a)~(c))。高温能降低 SGS3 蛋白的含量从而解除 PTGS,但高温降低 SGS3 蛋白的含量的具体机制尚在研究中(图 1(e))。高温能增强对病毒的 PTGS,但具体的机制也需要深入的研究(图 1(f))。极端高温下 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和小分子 RNAs 等表观遗传修饰对植物抗热性的调节目前虽有报道,但都研究得不够深入(图 1(g)~(m))。此外,Tittel-Elmer 等人<sup>[21]</sup>所用的高温处理条件能激活异染色质的转录,但其内在机制不属于目前已经报道的表观遗传修饰,可能是一个未知的表观遗传修饰。隔代记忆的内在机制也需要深入研究。此外,如何利用表观遗传修饰调控和提高植物的抗逆性也有待进一步的研究。在所有尚待研究的问题中,最关键的和最迫在眉睫的目标是寻找植物感受高温的受体,并对其在高温下所受的遗传和表观遗传调控进行深入研究。期待有朝一日,能够利用表观遗传修饰改变农作物感知温度的方式,打破作物引种的限制,甚至培育出能够抵御气候变化的农作物。

## 参考文献

- 1 Peng S B, Huang J L, Sheehy J E, et al. Rice yields decline with higher night temperature from global warming. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 9971-9975
- 2 Fitter A, Fitter R. Rapid changes in flowering time in British plants. *Science*, 2002, 296: 1689-1691
- 3 Pauli H, Gottfried M, Dullinger S, et al. Recent plant diversity changes on Europe's mountain summits. *Science*, 2012, 336: 353-355
- 4 Lobell D B, Field C B. Global scale climate-crop yield relationships and the impacts of recent warming. *Environ Res Lett*, 2007, 2: 014002
- 5 Lobell D B, Schlenker W, Costa-Roberts J. Climate trends and global crop production since 1980. *Science*, 2011, 333: 616-620
- 6 Proveniers M C G, van Zanten M. High temperature acclimation through PIF4 signaling. *Trends Plant Sci*, 2013, 18: 59-64
- 7 Kumar S V, Lucyshyn D, Jaeger K E, et al. Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*, 2012, 484: 242-245
- 8 Hua J. Modulation of plant immunity by light, circadian rhythm, and temperature. *Curr Opin Plant Biol*, 2013, 16: 406-413
- 9 Thines B, Harmon F G. Ambient temperature response establishes ELF3 as a required component of the core *Arabidopsis* circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 3257-3262
- 10 James A B, Syed N H, Bordage S, et al. Alternative splicing mediates responses of the *Arabidopsis* circadian clock to temperature changes. *Plant Cell*, 2012, 24: 961-981
- 11 Qu A L, Ding Y F, Jiang Q, et al. Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432: 203-207
- 12 Henderson I R, Jacobsen S E. Epigenetic inheritance in plants. *Nature*, 2007, 447: 418-424
- 13 Chinnusamy V, Zhu J K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12: 133-139

- 14 Vanyushin B F. DNA methylation in plants. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 301: 67–122
- 15 Cokus S J, Feng S, Zhang X, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 2008, 452: 215–219
- 16 Law J A, Jacobsen S E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 204–220
- 17 Zhang H M, Zhu J K. RNA-directed DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 14: 142–147
- 18 Curradi M, Izzo A, Badaracco G, et al. Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 3157–3173
- 19 Lang-Mladek C, Popova O, Kiok K, et al. Transgenerational inheritance and resetting of stress-induced loss of epigenetic gene silencing in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2010, 3: 594–602
- 20 Pecinka A, Dinh H Q, Baubec T, et al. Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2010, 22: 3118–3129
- 21 Tittel-Elmer M, Bucher E, Broger L, et al. Stress-induced activation of heterochromatic transcription. *PLoS Genet*, 2010, 6: e1001175
- 22 Zhong S H, Liu J Z, Jin H, et al. Warm temperatures induce transgenerational epigenetic release of RNA silencing by inhibiting siRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 9171–9176
- 23 Boyko A, Blevins T, Yao Y L, et al. Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of dicer-like proteins. *PLoS One*, 2010, 5: e9514
- 24 Popova O V, Dinh H Q, Aufsatz W, et al. The RdDM pathway is required for basal heat tolerance in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2013, 6: 396–410
- 25 Ream T S, Haag J R, Wierzbicki A T, et al. Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Mol Cell*, 2009, 33: 192–203
- 26 Peterson C L, Laniel M A. Histones and histone modifications. *Curr Biol*, 2004, 14: R546–R551
- 27 Pfluger J, Wagner D. Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10: 645–652
- 28 Pandey R, Muller A, Napoli C A, et al. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 5036–5055
- 29 Liu C, Lu F, Cui X, et al. Histone methylation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 395–420
- 30 Turck F, Roudier F, Farrona S, et al. *Arabidopsis* TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genet*, 2007, 3: e86
- 31 Zhou J, Wang X, He K, et al. 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*, 2010, 72: 585–595
- 32 Zhang X, Bernatavichute Y V, Cokus S, et al. Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol*, 2009, 10: R62
- 33 Yuan L, Liu X, Luo M, et al. Involvement of histone modifications in plant abiotic stress responses. *J Integr Plant Biol*, 2013, 55: 892–901
- 34 Song J, Angel A, Howard M, et al. Vernalization—A cold-induced epigenetic switch. *J Cell Sci*, 2012, 125: 3723–3731
- 35 Okada T, Endo M, Singh M B, et al. Analysis of the histone H3 gene family in *Arabidopsis* and identification of the male-gamete-specific variant *AtMGH3*. *Plant J*, 2005, 44: 557–568
- 36 Shi L, Wang J, Hong F, et al. Four amino acids guide the assembly or disassembly of *Arabidopsis* histone H3.3-containing nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 10574–10578
- 37 March-Díaz R, Reyes J C. The beauty of being a variant: H2A.Z and the SWR1 complex in plants. *Mol Plant*, 2009, 2: 565–577
- 38 Kumar S V, Wigge P A. H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell*, 2010, 140: 136–147
- 39 Koini M A, Alvey L, Allen T, et al. High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Curr Biol*, 2009, 19: 408–413
- 40 Sun J, Qi L, Li Y, et al. PIF4-mediated activation of *YUCCA8* expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating *Arabidopsis* hypocotyl growth. *PLoS Genet*, 2012, 8: e1002594
- 41 Franklin K A, Lee S H, Patel D, et al. Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 20231–20235
- 42 Sudarsanam P, Winston F. The SWI/SNF family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet*, 2000, 16: 345–351
- 43 Mlynarova L, Nap J P, Bisseling T. The SWI/SNF chromatin-remodeling gene *AtCHR12* mediates temporary growth arrest in *Arabidopsis thaliana* upon perceiving environmental stress. *Plant J*, 2007, 51: 874–885

- 44 Avvakumov N, Nourani A, Cote J. Histone chaperones: Modulators of chromatin marks. *Mol Cell*, 2011, 41: 502–514
- 45 Rogers K, Chen X. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell*, 2013, 25: 2383–2399
- 46 Ghildiyal M, Zamore P D. Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 94–108
- 47 Vaucheret H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: Mechanisms and regulations. *Genes Dev*, 2006, 20: 759–771
- 48 Lu X, Guan Q, Zhu J. Downregulation of *CSD2* by a heat-inducible *miR398* is required for thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav*, 2013, 8: e24952
- 49 Guan Q M, Lu X Y, Zeng H T, et al. Heat stress induction of *miR398* triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2013, 74: 840–851
- 50 Yan K, Liu P, Wu C A, et al. Stress-induced alternative splicing provides a mechanism for the regulation of microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell*, 2012, 48: 521–531
- 51 Mastrangelo A M, Marone D, Laido G, et al. Alternative splicing: Enhancing ability to cope with stress via transcriptome plasticity. *Plant Sci*, 2012, 185: 40–49
- 52 Ito H, Gaubert H, Bucher E, et al. An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature*, 2011, 472: 115–119
- 53 Matsunaga W, Kobayashi A, Kato A, et al. The effects of heat induction and the siRNA biogenesis pathway on the transgenerational transposition of *ONSEN*, a *copia*-like retrotransposon in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 824–833
- 54 Szittya G, Silhavy D, Molnar A, et al. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J*, 2003, 22: 633–640
- 55 Chellappan P, Vanitharani R, Ogbe F, et al. Effect of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants. *Plant Physiol*, 2005, 138: 1828–1841
- 56 Zhang X, Zhang X, Singh J, et al. Temperature-dependent survival of *Turnip Crinkle Virus*-infected *Arabidopsis* plants relies on an RNA silencing-based defense that requires DCL2, AGO2, and HEN1. *J Virol*, 2012, 86: 6847–6854
- 57 Andika I B, Sun L, Xiang R, et al. Root-specific role for *Nicotiana benthamiana* RDR6 in the inhibition of *Chinese wheat mosaic virus* accumulation at higher temperature. *Mol Plant Microbe Interact*, 2013, 26: 1165–1175
- 58 Mathieu O, Reinders J, Caikovski M, et al. Transgenerational stability of the *Arabidopsis* epigenome is coordinated by CG methylation. *Cell*, 2007, 130: 851–862

## Epigenetic regulation of heat stress response in plants

LIU JunZhong & HE ZuHua

National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Owing to their sessile nature, plants have to passively respond to daily and seasonal temperature changes. Plants have evolved sophisticated genetic and epigenetic regulatory systems to perceive the ambient temperature and adjust the growth and development to survive. Global warming has posed a serious threat to the global food supply. It is of great urgency to investigate the molecular mechanism of heat stress response in plants. DNA methylation, histone modification, chromatin remodeling and small RNAs are major epigenetic regulation mechanisms. These epigenetic modifications have their own roles and work together in regulating the thermotolerance of plants. In this review, we summarized recent published researches on the epigenetic regulation of heat stress response in plants.

**DNA methylation, histone modification, chromatin remodeling, small RNAs, transgenerational memory**

doi: 10.1360/972013-1103