

DOI: 10.11686/cyxb2024303

http://cyxb.magtech.com.cn

赵媛媛, 蒲小剑, 徐成体, 等. 蒺藜苜蓿 *MtBMI1* 基因克隆及抗旱性分析. 草业学报, 2025, 34(6): 139–153.

ZHAO Yuan-yuan, PU Xiao-jian, XU Cheng-ti, et al. Cloning of the *MtBMI1* gene from *Medicago truncatula* and its role in drought tolerance. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(6): 139–153.

蒺藜苜蓿 *MtBMI1* 基因克隆及抗旱性分析

赵媛媛^{1,2*}, 蒲小剑^{1,2}, 徐成体^{1,2}, 王伟^{1,2}, 傅云洁^{1,2}

(1. 青海大学畜牧兽医科学院, 青海 西宁 810016; 2. 农业农村部西北耕地保育及边际土地改良企业重点实验室, 青海 德令哈 817000)

摘要: 干旱不利于植物的正常生长、发育及繁殖, 是造成农作物及饲草产量降低的重要因素之一。BMI1 蛋白作为 PcG 蛋白复合体中唯一介导组蛋白泛素化的成员, 在参与植物对外界非生物胁迫响应的表观遗传调控中发挥重要的作用。以蒺藜苜蓿为材料, 克隆得到 PcG 家族成员 *MtBMI1*, 该基因全长 5386 bp, 编码 429 个氨基酸, 具有 zf-C3HC4 和 RAWUL 两个保守的功能结构域。系统进化树分析表明该基因与菜豆 *PvBMI1-1* 和大豆 *GmBMI1-1* 亲缘关系更接近。烟草表皮亚细胞定位结果表明该基因编码的蛋白定位在细胞核上。GUS 化学染色结果表明在成熟的拟南芥花序及柱头、花茎和果柄中具有较强的 *MtBMI1* 启动子表达活性。将 *MtBMI1* 在拟南芥中过表达进行功能分析, 结果表明转基因拟南芥 H2AK119ub 组蛋白含量相比野生型显著 ($P < 0.05$) 升高, 同时干旱处理后的转基因株系相比野生型产生明显的失水表型, 且根长、根鲜重和地上鲜重显著 ($P < 0.05$) 低于野生型, 丙二醛含量显著 ($P < 0.05$) 高于野生型。以上结果表明 *MtBMI1* 在蒺藜苜蓿干旱胁迫响应中发挥负调控作用, 该研究可为进一步揭示蒺藜苜蓿响应干旱胁迫的表观遗传调控机制提供理论依据。

关键词: 蒺藜苜蓿; *MtBMI1*; 基因克隆; 抗旱性

Cloning of the *MtBMI1* gene from *Medicago truncatula* and its role in drought tolerance

ZHAO Yuan-yuan^{1,2*}, PU Xiao-jian^{1,2}, XU Cheng-ti^{1,2}, WANG Wei^{1,2}, FU Yun-jie^{1,2}

1. Academy of Animal Science and Veterinary Medicine, Qinghai University, Xining 810016, China; 2. Northwest Key Laboratory of Cultivated Land Conservation and Marginal Land Improvement, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Delingha 817000, China

Abstract: Drought significantly impedes the normal growth, development, and reproduction of plants, and has emerged as a pivotal factor contributing to the decline in crop and forage yields. The BMI1 protein, a key component of the Polycomb Group (PcG) protein complex that mediates histone ubiquitination, is crucial for the epigenetic regulation of plant responses to abiotic stresses. This study reports the cloning of *MtBMI1*, which encodes a member of the PcG family, from *Medicago truncatula*. Our analyses showed that the *MtBMI1* gene sequence spans 5386 base pairs and encodes a protein comprising 429 amino acids, featuring two functional domains: zf-C3HC4 and RAWUL. Phylogenetic analyses revealed close relationships between *MtBMI1* and *PvBMI1-1* of *Phaseolus vulgaris* and *GmBMI1-1* of *Glycine max*. A subcellular localization analysis in tobacco epidermal cells confirmed the nuclear localization of the *MtBMI1* protein. Moreover, GUS staining analyses revealed robust activity of the *MtBMI1* promoter in the mature inflorescence, stigma, flower, stem, and pedicel of *Arabidopsis*. Functional analysis *via*

收稿日期: 2024-07-31; 改回日期: 2024-09-20

基金项目: 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室自主课题 (2024-ZZ-16), 青海省重大科技专项 (2023-NK-A3) 和青海大学青年科研基金 (2023-QNY-6) 资助。

作者简介: 赵媛媛 (1991–), 女, 山东威海人, 助理研究员, 博士。E-mail: 18893147262@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: 18893147262@163.com

overexpression in *Arabidopsis* demonstrated that the histone H2AK119ub content was significantly higher ($P < 0.05$) in transgenic lines than in wild type. Under drought stress, transgenic lines exhibited pronounced water-loss phenotypes, with reduced root length, root fresh weight, and aboveground fresh weight ($P < 0.05$), and elevated levels of malondialdehyde ($P < 0.05$), compared with the wild type. These findings suggest that *MtBMI1* exerts a negative regulatory effect on *M. truncatula*'s response to drought stress. The results of this study offer insights into the epigenetic mechanisms underlying drought stress tolerance in this model legume species.

Key words: *Medicago truncatula*; *MtBMI1*; gene cloning; drought resistance

多梳蛋白(polycomb group, PcG)介导的基因沉默是真核生物发育过程中一个重要的调控机制。PcG通过形成包括多梳蛋白抑制复合物1(polycomb repressive complexes 1, PRC1)和多梳蛋白抑制复合物2(polycomb repressive complexes 2, PRC2)在内的复合体,使目标染色质失活或保持沉默状态^[1]。植物中的PRC2成分相对保守,该组分的相关成员在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中已被广泛识别,但最初PRC1的存在受到了学者的质疑,因为植物基因组并不编码清晰的PRC1组分,且尚未检测到组蛋白H2A单泛素化(H2Aub1)^[2-3]。直到2010年才有研究人员明确将BMI1A和BMI1B鉴定为PRC1的组分,它们与RING1B形成一个活性异源二聚体泛素连接酶,催化组蛋白H2A赖氨酸第119位泛素化(H2AK119ub1),与PRC2介导的组蛋白H3赖氨酸第27位三甲基化(H3K27me3)一起,在维持细胞身份中发挥关键作用^[4-5]。2011年拟南芥的第3个BMI1(*AtBMI1C*)被鉴定出,其与*AtBMI1A*和*AtBMI1B*在进化上保守,是一种新颖的、普遍表达的核PcG蛋白^[1]。研究表明BMI1是胚胎后植物生长过程中抑制胚胎性状所必需的,例如种子成熟基因的抑制需要*BMI1*基因介导的H2A泛素化^[6];同时*BMI1*积极参与干细胞调控因子的沉默以及体细胞分化状态的维持,例如*AtBMI1A/AtBMI1B*介导H2Aub1,并且一些干细胞调节因子被发现在*Atbmi1a-1/b*子叶中异位表达^[5]。

相关研究表明拟南芥共有3个BMI1蛋白,即*AtBMI1A*、*AtBMI1B*和*AtBMI1C*^[5],它们与*AtRING1*的两个蛋白*AtRING1A*和*AtRING1B*组成5个环指蛋白共同参与PRC1的表观遗传修饰功能^[7]。先前的研究发现蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)有且只有一个BMI1蛋白(*MtBMI1*)^[8],*MtBMI1*蛋白是否兼具拟南芥中3个BMI1蛋白的功能以催化H2AK119单泛素化,该基因对逆境胁迫是否具有调控作用尚不清楚。

因此,为了解*MtBMI1*在蒺藜苜蓿中的功能与作用,本研究对该基因的基因特征、进化、蛋白序列及逆境胁迫下的表型、生理和基因表达谱进行了分析,同时克隆了*MtBMI1*基因编码序列(coding sequence, CDS)和启动子序列,进行亚细胞定位和拟南芥组织GUS化学染色分析,最后将蒺藜苜蓿*MtBMI1*基因转入拟南芥开展功能分析,进一步明确*MtBMI1*基因在干旱胁迫下的调控作用,为揭示PcG蛋白复合体参与蒺藜苜蓿逆境表观遗传调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究于2022年1月在中国农业科学院生物技术研究所开展,试验所需的材料为蒺藜苜蓿(Jemalong A17)、本式烟草(*Nicotiana benthamiana*)和拟南芥(Col-0)种子,植物表达载体pCAMBIA3301和亚细胞定位载体pART-CAM-EGFP由陕西博瑞德生物科技有限公司提供,大肠杆菌DH5 α 感受态细胞购于南京诺唯赞(Vazyme)生物科技股份有限公司,根癌农杆菌感受态GV3101购于上海唯地生物技术有限公司。

1.2 *MtBMI1*生物信息学分析

根据蒺藜苜蓿已有基因组数据及结构注释信息(v4.0),使用在线工具GSDS 2.0(<http://gsds.gao-lab.org/>)对*MtBMI1*基因结构(内含子-外显子)进行可视化,同时通过在线网站ProtParam ExpASy(https://web.expasy.org/compute_pi/)对该基因对应的蛋白序列进行理化性质分析。利用A Plasmid Editor v2.0.61软件对基因的CDS序列及对应的蛋白序列进行可视化。通过在线网站Batch web CD search tool(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/batchcdsearch/>)

nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi) 预测分析获得基因的保守结构域, 利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 获得蛋白质二级结构, 三级结构则通过 SWISS-MODEL 在线分析工具 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 完成。借助在线软件 CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) 进行多序列比对, 利用 Jalview 软件对结果进行可视化展示。使用 MEGA-X 软件对蒺藜苜蓿和大豆 (*Glycine max*)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)、拟南芥、水稻 (*Oryza sativa*) 的 BM11 蛋白构建系统进化树^[9]。

1.3 *MtBM11* 的表达模式分析

对生长 6、14、21、40、49 和 63 d 的蒺藜苜蓿叶片及结实初期的叶、茎、花和果实取样, 检测蒺藜苜蓿 *MtBM11* 在不同发育时期和不同组织中的表达模式; 同时对 6 周苗龄的蒺藜苜蓿叶片进行 260、300、360 mmol·L⁻¹ 浓度甘露醇处理 0、3、12 和 24 h, 检测蒺藜苜蓿 *MtBM11* 在不同程度干旱胁迫处理下的表达模式, 每个试验设置 3 次生物学重复。通过 Primer Premier v6.0 软件进行 qRT-PCR 引物的设计, 并使用蒺藜苜蓿 *Actin* 基因作为内参 (表 1)。基因的相对表达水平则依据 2^{-ΔΔCt} 方法进行计算^[10], 结果通过 GraphPad Prism v8.0.2 软件进行可视化。

表 1 *MtBM11* 基因克隆、载体构建及 qRT-PCR 引物汇总

Table 1 Summary of primers used for *MtBM11* gene cloning, vector construction and qRT-PCR

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')
Mt-Actin F	TACCCATTGAGCACGGTAT
Mt-Actin R	ATACATGGCAGGCACATTGA
Mt-BM11 F	AAGGATGGAAGCGTACCTGTCTCA
Mt-BM11 R	TGAATCAGCCACAGCTCAACCAA
MtBM11 F	ATGTCGAATGATGTTGTGAAAGTGA
MtBM11 R	TCAAGGGCGTGGAGATTTCCG
MtBM11 MF	TGACCATGGTATCGAATGATGTTGTGAAAGTGA
MtBM11 MR	AGGGTGACCTCAAGGGCGTGGAGATTTCCG
pC3301-R	AGTAACATAGATGACACCGC
MtBM11 promoter F	TGTATCGAGAGGTGTGTAATCAGTAC
MtBM11 promoter R	CACTTTCACAACATCATTTCGACAT
MtBM11 promoter MF	TACCCGGGGATCCTCTAGAGTATCGAGAGGTGTGTAATC
MtBM11 promoter MR	ACCCTCAGATCTACCATGGATATTCTTGATGATTTCTTGCT
MtBM11 GFP F	TGGAGAGGACACGCTCGAGATGTGCAATGATGTTGTGAA
MtBM11 GFP R	CCCTTGCTCACCATGAATTCAGGGCGTGGAGATTTCCG
Bar F	ATGAGCCCAGAACGACGCC
Bar R	TCAAATCTCGGTGACGGGCA

1.4 *MtBM11* 的亚细胞定位

使用 Primer Premier 5.0 设计克隆 *MtBM11* 基因 CDS 的引物 (表 1), 以蒺藜苜蓿 cDNA 为模板进行目的基因的扩增, 按照同源重组的方法将 *MtBM11* 基因与 pART-CAM-EGFP 载体连接, 使用热激法转化 GV3101 农杆菌感受态。通过测序分析验证后, 加入 1 mL 渗透液 (MgCl₂·6H₂O: 2.033 g·L⁻¹+MES: 2.32 g·L⁻¹) 重悬至 OD₆₀₀ 为 0.4。选择室温生长 4~6 周的本氏烟草, 选取从上往下第 3~6 片叶片背部进行农杆菌侵染。通常注射后 2~3 d 瞬时转化基因的表达量最高。将标记区域的叶片表皮撕下制片, 并于共聚焦显微镜 (徕卡 TCS SP8 SR, 德国) 下进行观察。

1.5 拟南芥组织GUS化学染色

使用Primer Premier 5.0设计克隆*MtBMT1*基因启动子全长序列的引物(表1),以蒺藜苜蓿DNA为模板进行目的基因启动子的扩增,按照同源重组的方法将*MtBMT1*启动子与pCAMBIA3301载体连接,并转化GV3101农杆菌感受态。通过花序浸染法将*MtBMT1*启动子转化拟南芥,使未露白的花苞完全浸泡在制备好的拟南芥侵染液(重悬液)45~60 s,然后套袋24 h暗培养,一周侵染一次,共侵染3次(3周)。选择阳性拟南芥成熟的花序、花茎、果荚以及3周龄的整株幼苗进行GUS染色,将各取样组织部位置于提前配置好的GUS染色工作液中,避光条件下37℃孵育24 h后再用无水乙醇将各组织部位的叶绿素脱去,此时具有GUS活性的部位呈现出蓝色,进行观察拍照。

1.6 *MtBMT1*转化拟南芥及阳性苗的鉴定

将克隆得到的*MtBMT1*基因经过限制性内切酶*NcoI*和*XhoI*进行双酶切后使用T4 DNA连接酶与pCAMBIA3301载体连接,转化GV3101农杆菌感受态。同样使用蘸花法侵染拟南芥,侵染后收种为T₀代种子,当T₀代种子发芽长至三叶期开始使用1/1500 10%的basta溶液进行喷洒筛选后收种,记为T₁代种子;继续按照上述方式筛选T₂代种子。待T₂代株系生长到30 d左右进行DNA水平上的鉴定,分别使用MtBMT1 F/MtBMT1 R和Bar F/Bar R这两对引物进行PCR检测(表1),检测后出现目的条带的拟南芥认为是阳性植株。进一步使用qRT-PCR技术对这些阳性株系的*MtBMT1*基因表达水平进行检测。

1.7 转基因拟南芥表型分析、抗旱性评价及H2AK119ub组蛋白含量分析

以300 mmol·L⁻¹甘露醇处理来模拟干旱胁迫,处理0、24、48 h后对叶片取样(3个生物学重复),用于丙二醛和脯氨酸含量的测定。在处理72 h后,拍照观察表型差异。另外选表达量高的3个转基因株系和野生型分别在正常和含有150 mmol·L⁻¹甘露醇固体1/2 MS培养基垂直培养10 d后开展抗旱性评价试验。以300 mmol·L⁻¹甘露醇处理0 h的样品作为对照,处理24和48 h后分别取样,样品重量不低于0.05 g,各时间点采集3个生物学重复,用于测定H2AK119ub组蛋白含量。将取好的样品按照10%的比例(即1 g组织加9 mL的磷酸盐缓冲液,pH 7.4)进行溶解,离心20 min左右(2000~3000 r·min⁻¹)仔细收集上清液^[11]。分装后一份待检测,其余冷冻备用。试验对H2AK119ub组蛋白含量采用酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)进行反应并在芬兰(Labsystems Multiskan MS)325型酶标仪上进行测定。

1.8 数据处理

所有数据均在Excel 2013中进行整理,采用SPSS 20.0对各指标进行单因素方差分析,处理间的差异选取P<0.05显著差异进行Duncan多重比较,并使用Excel 2013和GraphPad Prism version 8.0.2软件作图。

2 结果与分析

2.1 *MtBMT1*生物信息学分析

2.1.1 *MtBMT1*基因特征 蒺藜苜蓿*MtBMT1*基因全长5386 bp,具有7个外显子和6个内含子(图1)。通过ExPASy在线工具获取了*MtBMT1*基本理化性质,蛋白分子量为47.37 kDa,等电点为9.24,在蒺藜苜蓿数据库中的Gene ID为:Medtr7g096210。

2.1.2 *MtBMT1*蛋白序列分析 *MtBMT1*的CDS全长为1290 bp,编码429个氨基酸(图2)。其中丝氨酸含量最高,为11.19%,其次为赖氨酸,为10.26%,色氨酸含量最少,仅为0.7%。该基因的蛋白序列具有zf-C3HC4和RAWUL两个保守结构域(图3A),图3B和图3C为蒺藜苜蓿*MtBMT1*蛋白质二级结构和三级结构预测,其中*MtBMT1*的α螺旋为31.24%,延伸链为7.93%,β折叠为2.1%,无规则卷曲为58.74%。

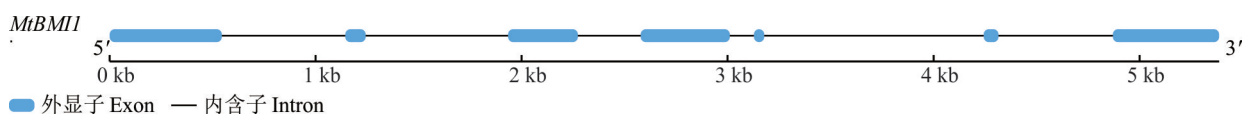


图1 *MtBMT1*的基因特征

Fig. 1 The characteristics of *MtBMT1* gene

```

1 ATGTCGAATGATGTTGTGAAAGTGAAGAGAGAAACGATTGCAGCATGCATGACCTGTCCACTATGTAACAATTTGTTCAAAACACCTACA
1 M S N D V V K V S N R E T I A A C M T C P L C N N L F K Q P T
91 ACTATATCTGAATGCTTTCACACGTTTTCAGGAAATGCATTTATGACAAATTTACTGATGAGGATTTGGAATGCTGCCAGTATGCAAC
31 T I S E C L H T F C R K C I Y D K F T D E D L E C C P V C N
181 ATTGATTGGGTTGTGTTCCACTTGAGAAACTAAGCCTGACCACACTAAGCAAGATGTAAGGGCCAAAATCTTCCCCTTAAAGGGAAGA
61 I D L G C V P L E K L R P D H T K Q D V R A K I F P L K G R
271 AAGGTGAAAGCACCTGAACCTGAAGCTGTGCGCGCTCAGAACCTTGCCAGCTAAAAGAAAGGAGAGATCTTTTCGCTTTGGTGGTC
91 K V K A P E P E A V A A S E P L P A K R K E R S L S S L V V
361 AACACACCAAGGGTATCTGTGCAAAACACCATGACAGGAAGAAGAACGAAACCTACCAGAAAGGCTAGCAGTCTGCGGTCTAGTTTT
121 N T P R V S V Q T T M T G R R T K P T R K A S S L R S S S F
451 TCCATTGATAAATCAATTAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
151 S I D K S I K K E A E L L D D C P E S S S S P E A S N K L R
541 CAGAACAACGGACAGCAGAGTGAGGGTAGTCAATCCGACCAAAATAGAGTAACAGAGAACGATTCCAAAACATGTGACGCAAAAGATGGAT
181 Q N N G Q Q S E G S Q S A P N R V T E N D S K T C D A K M D
631 CTTTGAAACCGTTGAATGTTAGTAGAGGTCGCAAGCAGGACTAAATCTTGAAGTCTAATAATATACAAGGGTCTGATGCTAAACCA
211 L W K P L N C L V E V A S R T K S L K S N N I Q G S D A K P
721 GAACCTGCTCAAGCAATGAGAGTGGCTCTCAAGTGCAGAAAATCAAAAATAAGGAAAAGAACGCAAGGCAAAAGTTGAGGATGAAAGT
241 E P A Q A N E S G S Q V Q K I K N K E K K R K A K V E D E S
811 ATTAGCCCATTTCCCGTTTCTCAGATACAGCAAAACCAATAAATGGCGAGAGTACGCGAGAAAAGAACCTTTTGGAGATCAGGC
271 I S P F P V S S D T A K P N K L R R V R R K K E P F G E S G
901 ATATACCCCAAGCTGTGGTTGATTCTACCGGAGTAACTCTTAAAGGGTGGTCCAATTTGGTTCTCTTAGTAGCTTCTGAAAATCAA
301 I S P Q A V V D S T G S K L F K G G P I W F S L V A S E N Q
991 GAAGGAGACACACCCCTGGCCAAAATTCCTGCAAGCTATGTGAGAATAAAGGATGGAAGCGTACCTGTCTATTATCCAAAATACCTA
331 E G D T P L P Q I P A S Y V R I K D G S V P V S F I Q K Y L
1081 ATGAAGAACTCGATCTGACCAATGAAACTGAGATTGAGATTATGTATGGGACAACAGTTCTCCCTACATTGACACTACATAATTTG
361 M K K L D L T N E T E I E I C M G Q P V L P T L T L H N L
1171 GTTGAGCTGTGGCTGATTCAACAGCGTCCACATCACACCGAATCCGGCTATTATTGGATCTCAGCAAAGGATTTTGTGATGGTCCTT
391 V E L W L D S T A S T S H R I P A I I G S S A K D F V M V L
1261 GCTTATGCCCGGAAATCTCCACGCCCTTGA
421 A Y A R K S P R P *

```

图 2 *MtBMI1* 的全长 CDS 序列及对应的氨基酸序列

Fig. 2 The full length of CDS and corresponding amino acid sequence of *MtBMI1*

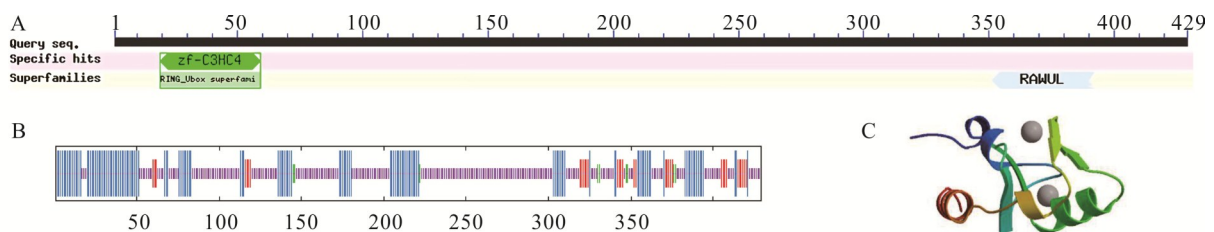


图 3 *MtBMI1* 蛋白的保守结构域、二级和三级结构

Fig. 3 Conserved domains, secondary and tertiary structures of *MtBMI1* protein

A: 蒺藜苜蓿 *MtBMI1* 蛋白的结构域分析; B: 蒺藜苜蓿 *MtBMI1* 蛋白质二级结构预测; C: 蒺藜苜蓿 *MtBMI1* 蛋白质三级结构预测。A: The conserved domain analysis of *MtBMI1* protein in *M. truncatula*; B: Prediction of secondary structure of *MtBMI1* protein in *M. truncatula*; C: Prediction of tertiary structure of *MtBMI1* protein in *M. truncatula*.

将大豆 (*GmBMI1-1*: XP_003520583)、菜豆 (*PvBMI1-1*: XP_007162503)、拟南芥 (*AtBMI1A*: NP_001323803)、水稻 (*OsBMI1a*: XP_015633275) 和蒺藜苜蓿 (*MtBMI1*: XP_013449836) 5 种植物的 *BMI1* 蛋白进行多序列比对, 如图 4 所示, 不同物种间 (包括单子叶和双子叶植物) *BMI1* 的结构域相似度较高, 且 *zf-C3HC4* 和 *RAWUL* 结构域保守性较好, 其中 *zf-C3HC4* 横跨越约 41 个氨基酸, *RAWUL* 横跨越约 42 个氨基酸。同时通过多序列比对, 发现蒺藜苜蓿 *MtBMI1* 与菜豆的 *PvBMI1-1* 序列一致性最高, 为 73.96%, 其次是大豆 (71.05%) 和拟南芥 (43.65%), 与水稻的 *OsBMI1a* 的序列一致性最低, 只有 30.90%。

2.1.3 *MtBMI1* 进化分析 为进一步预测蒺藜苜蓿 *MtBMI1* 的功能, 使用 MEGAX 软件对已有报道的大豆、菜豆、蒺藜苜蓿、拟南芥、水稻 5 种植物的 *BMI1* 基因与蒺藜苜蓿 *MtBMI1* 基因进行系统进化树构建, 如图 5 所示。

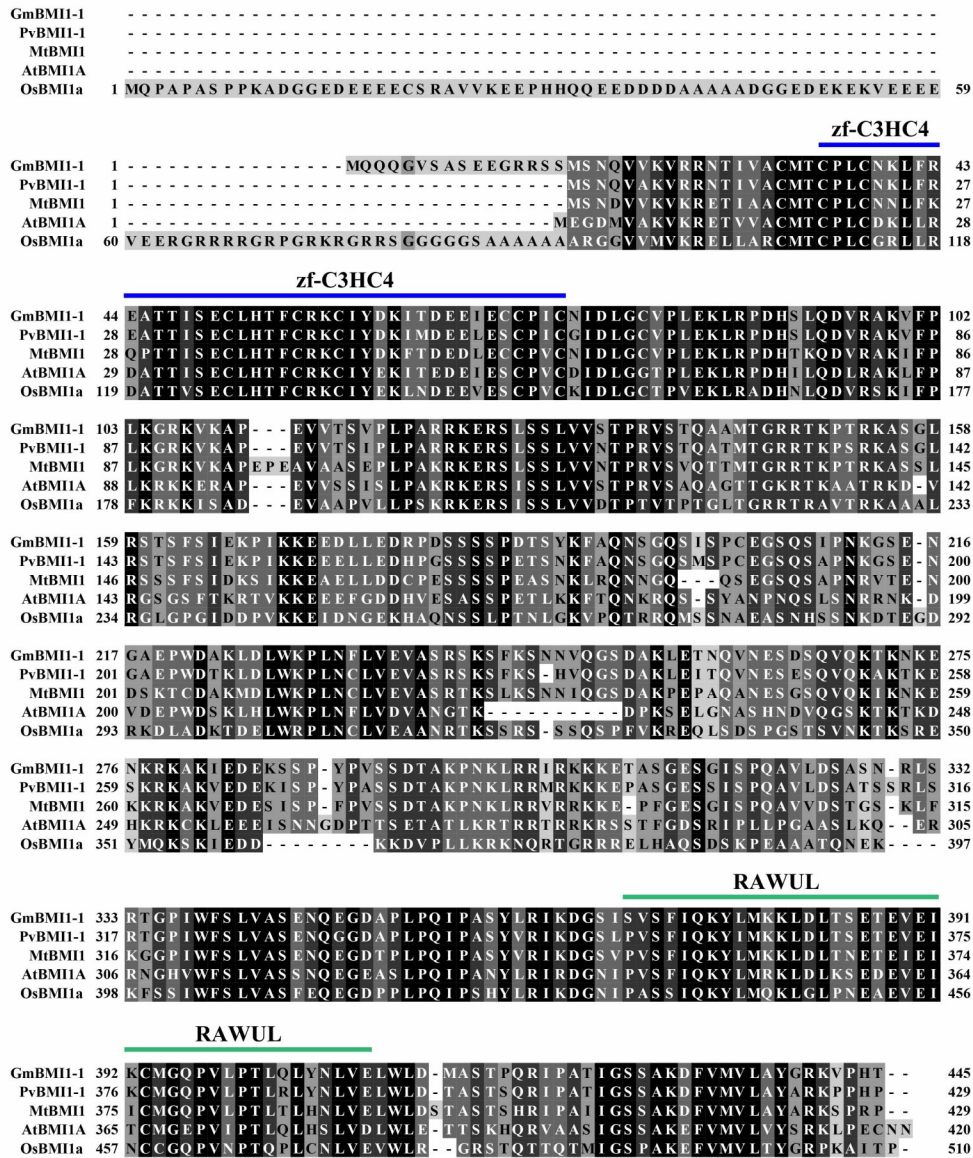


图4 Bmi1蛋白的多序列比对

Fig. 4 Multiple sequence alignment of Bmi1 protein

Gm:大豆 *G. max*; Pv:菜豆 *P. vulgaris*; At:拟南芥 *A. thaliana*; Os:水稻 *O. sativa*; Mt:蒺藜苜蓿 *M. truncatula*; 下同 The same below.

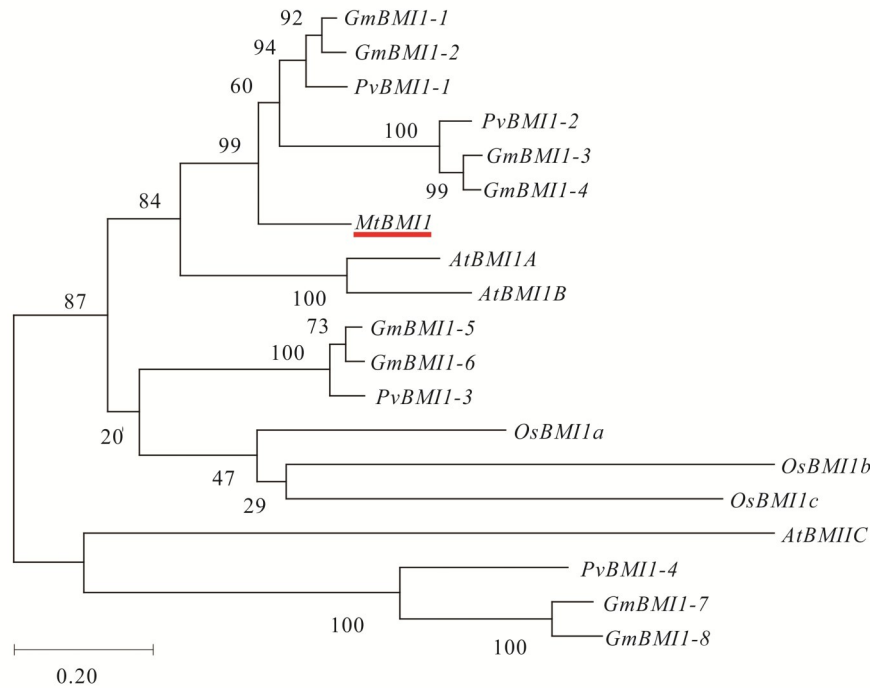
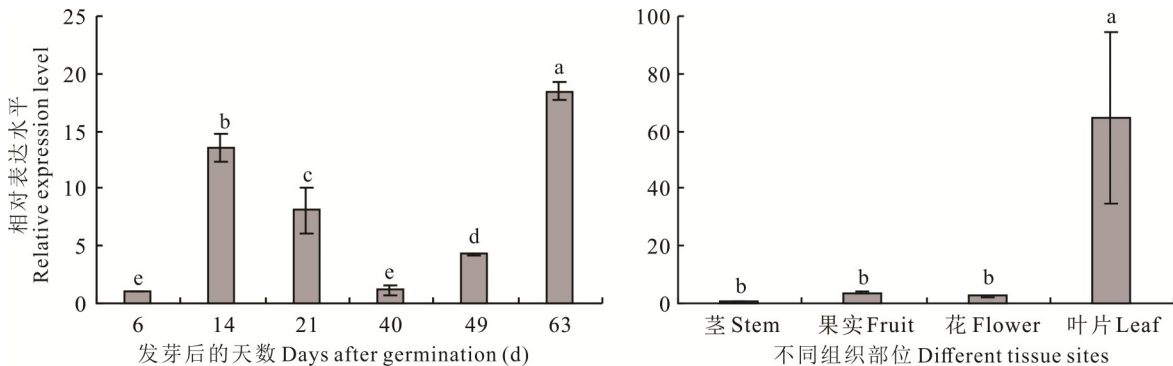
MtBmi1 基因与大豆的 *GmBmi1-1*、*GmBmi1-2*、*GmBmi1-3*、*GmBmi1-4* 和菜豆的 *PvBmi1-1*、*PvBmi1-2* 亲缘关系较近,表明 *MtBmi1* 与这 6 个基因相似性较高,功能相似。相反 *MtBmi1* 基因与拟南芥 *AtBmi1C*、菜豆 *PvBmi1-4* 以及大豆的 *GmBmi1-7* 和 *GmBmi1-8* 亲缘关系较远。

2.2 *MtBmi1* 在不同组织,不同发育时期的表达谱分析

为明确蒺藜苜蓿 *MtBmi1* 在不同发育时期以及不同组织中的表达模式,通过 qRT-PCR 检测该基因在 6 个发育时期(6、14、21、40、49 和 63 d)叶片及结实初期 4 个组织(叶、茎、花和果实)中的表达量,结果表明 *MtBmi1* 在发育初期 6 d 时表达量最低,然后随着生长时间的增加 *MtBmi1* 表达量呈先升高再降低再升高的趋势,在生长到 40 d 时 *MtBmi1* 表达量急剧降低,到 63 d 时 *MtBmi1* 表达量达到最高。在同时期 4 个组织中 *MtBmi1* 表达量的结果显示,叶片中的 *MtBmi1* 表达量最高,其次是果实和花,茎中 *MtBmi1* 表达量最低(图 6)。

2.3 *MtBmi1* 在不同程度干旱胁迫下的表达谱分析

为了分析蒺藜苜蓿 *MtBmi1* 在不同干旱胁迫条件下的表达模式,使用甘露醇模拟干旱胁迫,通过 qRT-PCR

图 5 *BMII* 基因的系统进化树构建Fig. 5 Phylogenetic tree construction of *BMII* gene图 6 *MtBMII* 在蒺藜苜蓿不同发育时期和不同组织中的表达谱Fig. 6 Expression profiles of *MtBMII* in different developmental stages and tissues of *M. truncatula*

不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 下同。Different letters show significant difference ($P < 0.05$), the same below.

试验测定该基因在不同浓度 ($260, 300, 360 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 甘露醇胁迫下 6 周龄蒺藜苜蓿叶片的表达水平。结果表明对于不同浓度的甘露醇处理, 在 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理 12 h 时 *MtBMII* 表达量达到最高, $360 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下的整体表达量均低于 260 和 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理。在 $260 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下 *MtBMII* 表达量随处理时间的增加而下降, 而 300 和 $360 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下 *MtBMII* 表达量随处理时间的增加呈先增后降的变化趋势 (图 7)。

2.4 *MtBMII* 基因的亚细胞定位

为了确定蒺藜苜蓿 *MtBMII* 蛋白所在的亚细胞位置, 通过同源重组的方法成功构建了 pART-CAM-EGFP-*MtBMII* 瞬时表达载体, 使用热激法将载体转化 GV3101 农杆菌。通过注射农杆菌液来侵染烟草表皮细胞, 在注射后 2~3 d *MtBMII* 表达量最高时, 将侵染区域撕下表皮制片放于激光共聚焦显微镜 (徕卡 TCS SP8 SR, 德国) 下进行观察, 如图 8 所示, *MtBMII* 绿色荧光蛋白在细胞核上有荧光信号, 且与叶绿体自发荧光信号重叠, 证实 *MtBMII* 蛋白定位在细胞核。

2.5 *MtBMI1*: GUS 转基因拟南芥组织 GUS 化学染色

为了能直观地看到 *MtBMI1* 在蒺藜苜蓿组织部位的表达情况,将 *MtBMI1* 的启动子替换 pCAMBIA3301 载体中 GUS 的启动子序列,进而转到拟南芥中进行 GUS 化学染色。通过 *MtBMI1* 基因所在位置向前推 2000 bp 碱基找到该基因的启动子序列,通过在序列两头设计扩增该启动子全长的引物,成功的以蒺藜苜蓿 DNA 为模板克隆出了 *MtBMI1* 启动子序列(图 9)。

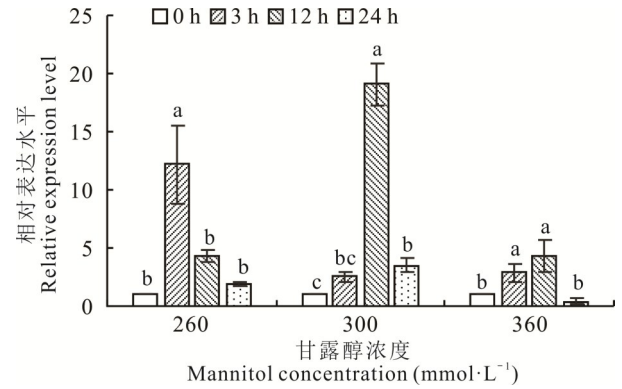


图 7 不同浓度甘露醇处理下 *MtBMI1* 的表达谱

Fig. 7 Expression profiles of *MtBMI1* under different concentrations of mannitol

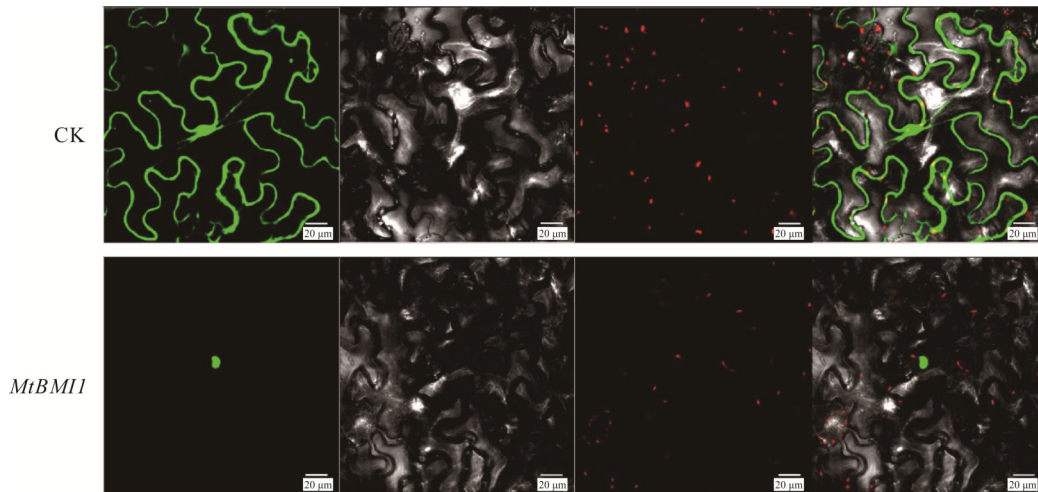


图 8 *MtBMI1* 基因在烟草叶片中的亚细胞定位

Fig. 8 Subcellular localization of *MtBMI1* gene in tobacco leaf

从左到右依次为绿色荧光蛋白、明场、叶绿体自发荧光、3个通道的叠加图。Pictures from left to right are the green fluorescent protein channel (UV), bright field (DIC), chlorophyll autofluorescence channel (CHI) and overlay of three channels (Merge).

将克隆得到的启动子序列利用同源重组的方法成功构建了 pCAMBIA3301-*MtBMI1* 启动子表达载体。将构建好的 pCAMBIA3301-*MtBMI1* 启动子表达载体通过热激法转化农杆菌,通过花序浸染法转化拟南芥。分别取 3 周的阳性幼苗和成熟的拟南芥花序、花茎及长角果进行 GUS 染色。如图 10 所示,GUS 活性在 3 周拟南芥莲座叶中较弱,根尖处有表达,对于成熟的拟南芥,花序及柱头、花茎和果柄中具有较强的 *MtBMI1* 启动子表达活性,而在果荚中未检测到 GUS 活性,说明 *MtBMI1* 启动子可能在成熟的种子中不表达。

2.6 *MtBMI1* 转基因拟南芥功能分析

2.6.1 pCAMBIA3301-*MtBMI1* 重组载体转化拟南芥

通过先前的基因家族鉴定,在蒺藜苜蓿数据库中获得了 *MtBMI1* 基因的 CDS 序列,为了克隆该全长序列,在 CDS 起始和终止密码子处设计扩增 *MtBMI1* 基因全长的引物,成功地在蒺藜苜蓿 cDNA 中克隆出 *MtBMI1* 基因(图 11)。测序结果表明该基因共含有

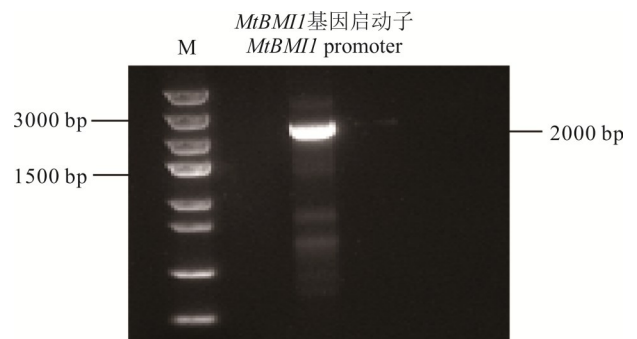


图 9 RT-PCR 克隆 *MtBMI1* 启动子

Fig. 9 *MtBMI1* promoter cloned by RT-PCR

M 表示 marker,下同。M represents marker, the same below.

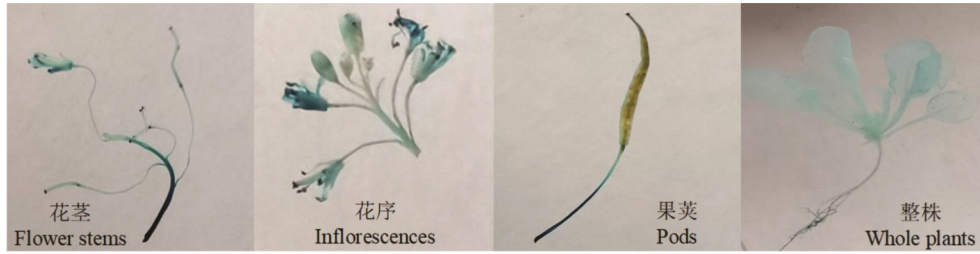


图 10 pCAMBIA3301-*MtBMII* 启动子转拟南芥 GUS 染色

Fig. 10 GUS staining results of pCAMBIA3301-*MtBMII* promoter transgenic *Arabidopsis*

1290 个碱基,能够编码 429 个氨基酸,与从数据库获得的信息是一致的。将克隆得到的 *MtBMII* 基因通过酶切连接的方法与 pCAMBIA3301 载体连接,成功构建了 pCAMBIA3301-*MtBMII* 表达载体。通过花序侵染法转入拟南芥中,使用 1/1500 浓度 10% 的 basta 初步筛选后,共获得了 23 株拟南芥抗性株系,将这 23 株抗性株系分别取样进行目的基因和抗性标记 (*Bar*) 的 PCR 检测,共有 11 个株系含有 *MtBMII* F/*MtBMII* R 和 *Bar* F/*Bar* R 这两对引物的 PCR 扩增产物。因此,这 11 株拟南芥被鉴定为转基因阳性植株。可通过继续筛选获得 T₃ 代转 *MtBMII* 基因纯合拟南芥。

进一步通过 qRT-PCR 检测每个阳性株系中的 *MtBMII* 基因的表达水平。如图 12 所示,与野生型拟南芥相比,这 11 株转基因株系均检测到 *MtBMII* 基因的表达,其中株系 OE-7 的 *MtBMII* 的表达量最低,OE-6、OE-9、OE-18 的 *MtBMII* 的表达量较高,分别是 OE-7 的 7.28、5.68、6.10 倍。

2.6.2 *MtBMII* 转基因拟南芥表型分析及抗旱性评价 通过观察,并未发现转基因株系和野生型在苗期(14 d)及抽薹期(40 d)的表型存在明显差异(图 13)。

基于之前对 *MtBMII* 在不同胁迫下的表达模式研究发现,与冷胁迫相比,*MtBMII* 在不同浓度甘露醇处理下响应更强烈,且在 300 mmol·L⁻¹ 处理下表达量最高。为了进一步开展对 *MtBMII* 基因功能分析及对转基因拟南芥进行抗旱性评价,使用 300 mmol·L⁻¹ 的甘露醇处理模拟干旱胁迫,选择表达量较高的 3 个转基因拟南芥阳性株系 OE-6、OE-9、OE-18 进行表型观察和后续试验。如图 14 所示,当甘露醇处理 72 h 后转基因株系出现明显的失水表型,表现为茎秆下垂且叶片萎蔫,相比野生型受到的伤害更严重。

进一步分析了甘露醇处理下转基因与野生型株系丙二醛和脯氨酸含量的变化,如图 15A 所示,转基因与野生型材料随处理时间增加丙二醛含量均呈升高趋势,在相同处理时间下前者的丙二醛含量显著高于后者。处理 24 h 时,OE-6、OE-9 和 OE-18 丙二醛含量相比 WT 分别增加了 30.52%、25.13% 和 44.13% ($P < 0.05$); 处理 48 h 时,OE-6、OE-9 和 OE-18 丙二醛含量相比 WT 分别增加了 30.02%、37.52% 和 53.03% ($P < 0.05$)。如图 15B 所示,转基因与野生型材料随处理时间的增加脯氨酸含量均升高,在相同处理时间下前者的脯氨酸含量明显高于后者。与处理 0 h 相比,处理 24 h 时的 WT、OE-6、OE-9 和 OE-18 脯氨酸含量分别增加了 14.93%、286.50%、

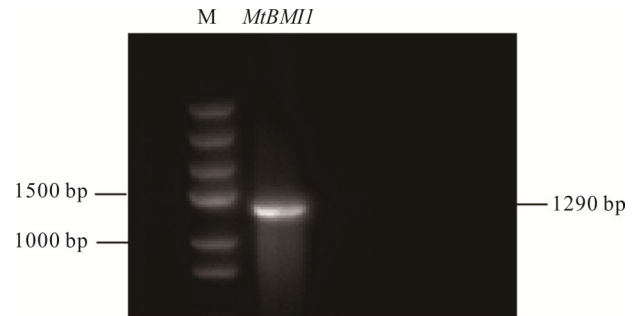


图 11 RT-PCR 克隆 *MtBMII* 基因

Fig. 11 *MtBMII* gene cloned by RT-PCR

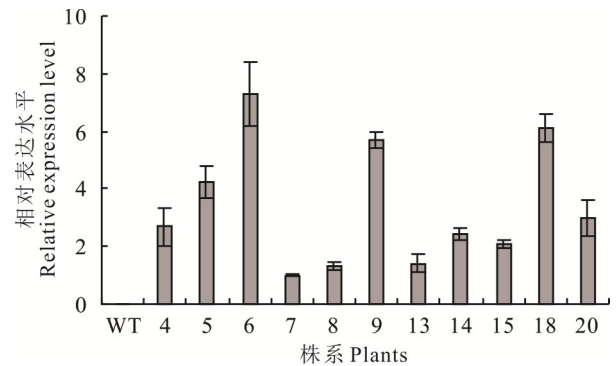
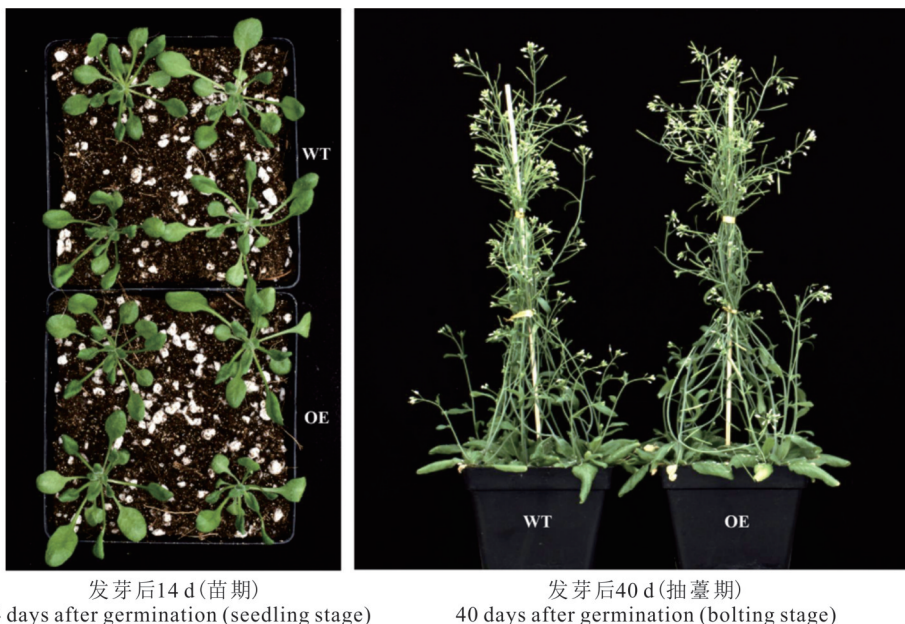


图 12 转基因拟南芥各株系 *MtBMII* 表达水平

Fig. 12 The relative expression levels of *MtBMII* in transgenic *Arabidopsis* lines



发芽后14 d (苗期) 14 days after germination (seedling stage) 发芽后40 d (抽薹期) 40 days after germination (bolting stage)

图 13 苗期和抽薹期的转基因与野生型拟南芥表型比较

Fig. 13 Phenotypic comparison of transgenic and wild-type *Arabidopsis* at seedling and bolting stages

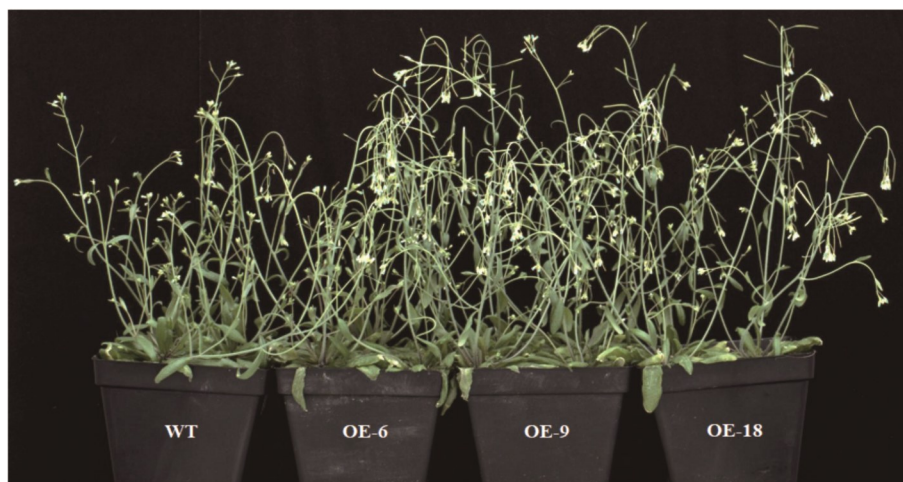


图 14 300 mmol·L⁻¹甘露醇处理下转基因与野生型拟南芥表型比较

Fig. 14 Phenotypic comparison of transgenic and wild-type *Arabidopsis* under 300 mmol·L⁻¹ mannitol treatment

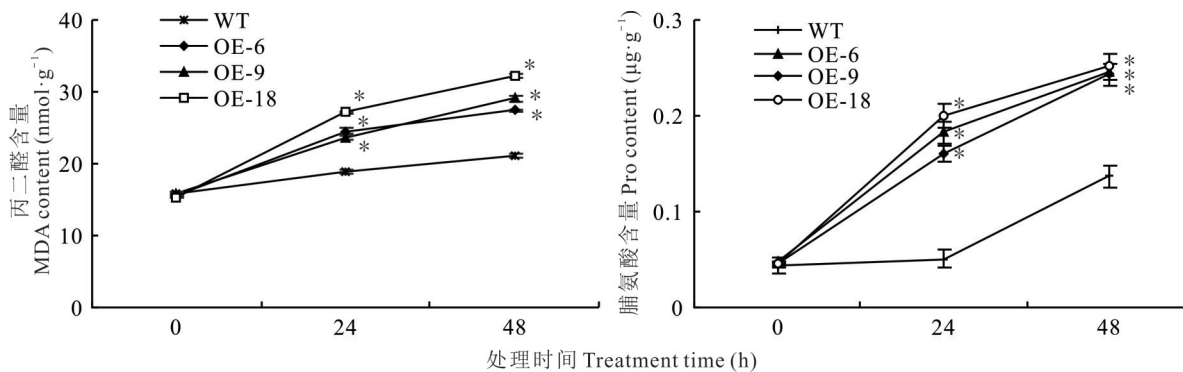


图 15 甘露醇处理对转基因与野生型拟南芥丙二醛和脯氨酸的影响

Fig. 15 Effects of mannitol treatment on the content of malondialdehyde and proline in transgenic and wild-type *Arabidopsis*

*表示各材料间差异显著($P < 0.05$). * indicate the significant differences among materials ($P < 0.05$).

255.01% 和 333.57% ($P < 0.05$); 处理 48 h 分别增加了 208.38%、420.87%、435.63% 和 443.99% ($P < 0.05$)。

同时在 1/2 MS 培养基上开展 *MtBMI1* 转基因拟南芥抗旱性评价试验。将野生型和转基因株系分别置于正常及含有 150 mmol·L⁻¹甘露醇的 1/2 MS 培养基上垂直培养 10 d, 并分别统计 4 个基因型拟南芥的根长及根鲜重。在正常培养基 10 d, 野生型和转基因株系长势良好(图 16A), 当在含有 150 mmol·L⁻¹甘露醇的培养基上 10 d, 野生型和转基因株系生长明显受到抑制(图 16B)。进一步计算根长、根鲜重、地上鲜重和根冠比, 结果表明正常培养基下生长的野生型与转基因株系相比, 根长、根鲜重、地上鲜重和根冠比均无显著差异(图 16C~F), 而在含有 150 mmol·L⁻¹甘露醇的培养基上生长 10 d 后的转基因株系根长、根鲜重和地上鲜重均显著低于野生型 ($P < 0.05$), 根冠比差异不显著。

2.6.3 *MtBMI1* 转基因拟南芥 H2AK119ub 组蛋白含量分析 此外, *MtBMI1* 作为一种泛素连接酶, 通过测定该基因介导的 H2AK119ub 组蛋白含量, 进一步验证 *MtBMI1* 转基因对拟南芥 H2AK119ub 组蛋白含量的影响。如图 17 所示, 正常条件下, *MtBMI1* 转基因拟南芥的 H2AK119ub 组蛋白含量显著高于野生型, OE-6、OE-9 和

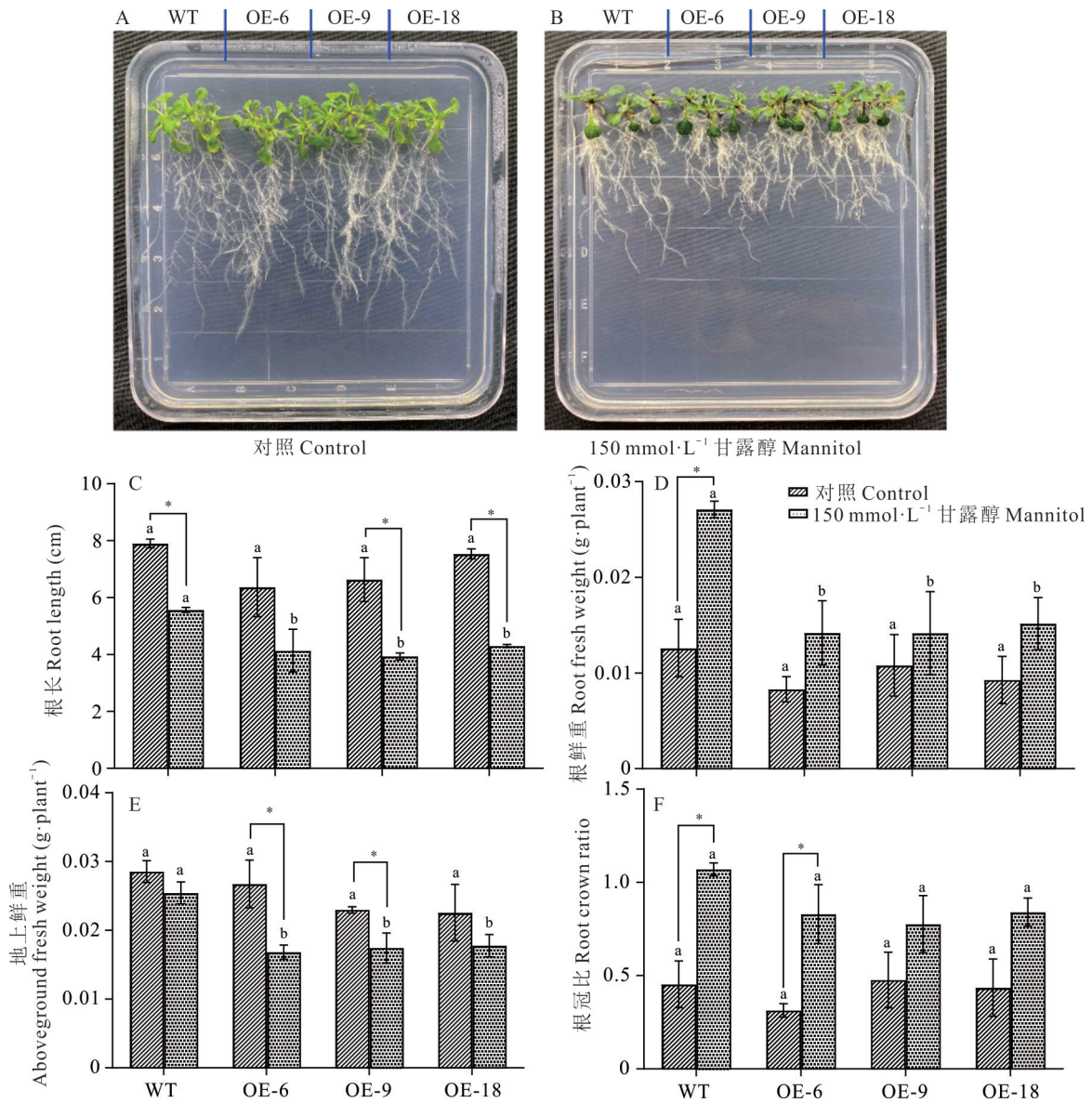


图 16 *MtBMI1* 转基因拟南芥抗旱性评价

Fig. 16 Evaluation of drought resistance in *MtBMI1* transgenic *Arabidopsis*

*表示对照与处理间差异显著 ($P < 0.05$), 不同字母表示材料间差异显著 ($P < 0.05$). * mean significant difference between control and treatment ($P < 0.05$), different letters show significant difference among materials ($P < 0.05$).

OE-18 相比 WT 分别增加了 20.80%、28.34% 和 15.34% ($P < 0.05$)。甘露醇处理后各株型的 H2AK119ub 组蛋白含量均有所增加,且转基因植株仍显著高于野生型。处理 24 h 时,OE-6、OE-9 和 OE-18 相比 WT 分别增加了 20.70%、28.76% 和 33.00% ($P < 0.05$);处理 48 h 时,OE-6、OE-9 和 OE-18 相比 WT 分别增加了 16.41%、18.87% 和 20.15% ($P < 0.05$)。

2.6.4 *MtBMI1* 转基因拟南芥中与表观修饰相关基因的表达变化 先前的研究表明各种表观遗传修饰之间具有密切的联系,因此在转基因拟南芥株系中检测主要与表观遗传修饰相关基因的表达水平可在分子水平上阐释 *MtBMI1* 基因的功能。图 18 为转基因拟南芥中与表观遗传修饰相关的 12 个基因表达水平,其中与 DNA 甲基化修饰相关的基因有 3 个: *AtCMT1*、*At-*

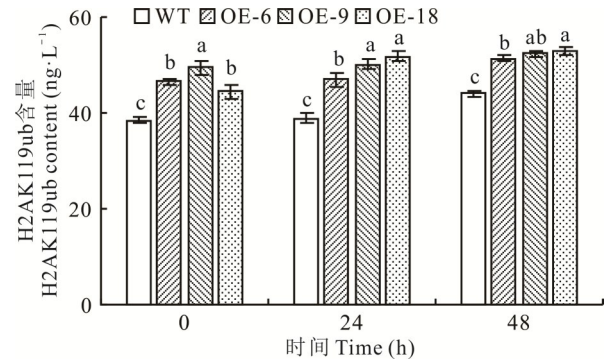


图 17 *MtBMI1* 转基因拟南芥 H2AK119ub 组蛋白含量分析
Fig. 17 Analysis of H2AK119ub histone content in *MtBMI1* transgenic *Arabidopsis*

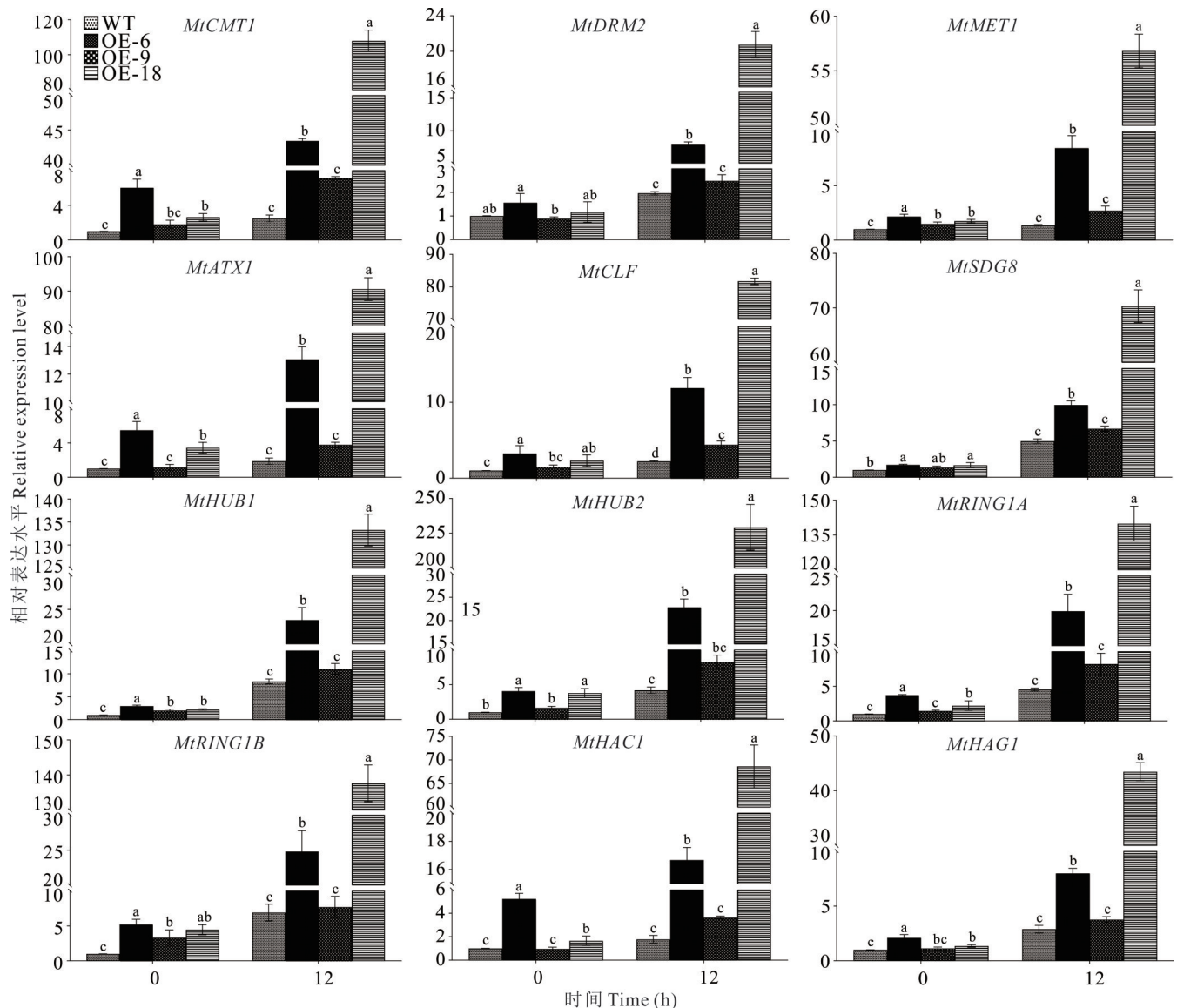


图 18 转基因拟南芥中与表观遗传修饰相关基因的表达水平

Fig. 18 Expression levels of epigenetic modification related genes in transgenic *Arabidopsis*

DRM2、*AtMET1*；与组蛋白甲基化修饰相关的基因有3个：*AtATX1*、*AtCLF*、*AtSDG8*；与组蛋白泛素化修饰相关的基因有4个：*AtHUB1*、*AtHUB2*、*AtRING1A*、*AtRING1B*；与组蛋白乙酰化修饰相关的基因有2个：*AtHAC1*、*AtHAG1*。结果表明，与表观修饰相关的这12个基因在正常情况下(0 h)转基因株系表达量均比野生型高，也有部分基因在转基因株系中的表达量与野生型持平，差异不显著，例如：*AtDRM2*、*AtATX1*、*AtHAC1*、*AtHAG1*等，而这些基因普遍存在于OE-9株系中，可能与该株系在3株阳性株系中*MtBMI1*基因表达量最低有关。当甘露醇处理12 h后，所有株系的这些基因均显著升高($P < 0.05$)，其中转基因株系各基因表达水平升高幅度普遍大于野生型，且在转基因株系中OE-18的各基因水平升高幅度最大。另外处理后转基因株系的各基因水平也显著高于处理后的野生型，最高是其处理后野生型的54.98倍(*AtHUB2*)($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 *MtBMI1*的表达模式

BMI1蛋白是植物介导H2AK119ub1的PRC1组分，该表观遗传标记与PRC2介导的H3K27me3在维持细胞特性中起着关键作用^[12-13]。在植物中只有少数物种鉴定出了该基因，研究也正处于起步阶段。在植物中研究较为清楚的就是拟南芥，拟南芥中有3个*AtBMI1*，其中拟南芥中的*AtBMI1A*和*AtBMI1B*也被称为*DRIP1*和*DRIP1*^[5]。

不同物种中存在的*BMI1*基因数目是不同的，除拟南芥外已报道小麦(*Triticum aestivum*)中有6个*TaBMI1*^[14]，大豆中有8个*GmBMI1*基因，菜豆中有4个*PvBMI1*基因，水稻中有4个*OsBMI1*基因，玉米(*Zea mays*)中有7个*ZmBMI1*等^[15]。但是在蒺藜苜蓿中只鉴定到一个*MtBMI1*基因^[8]，推测该基因很有可能是一个多效性基因，具有其他植物中的多个*BMI1*基因的功能。目前关于*BMI1*基因功能的研究仅在拟南芥中有报道，其中*AtBMI1A*和*AtBMI1B*在拟南芥发育过程中普遍表达^[16]，且*AtBMI1A*组织特异性表达模式结果表明在3周龄*AtBMI1A*pro:GUS转基因植株中GUS在莲座叶中表达较弱，根部根尖和伸长区活性明显，以及GUS在已开放花的花药中表达，授粉后的柱头上也有启动子活性，但是*AtBMI1A*在成熟的干种子中几乎没有表达^[17]。而*AtBMI1C*仅在拟南芥根、胚乳和雄蕊中表达，且*AtBMI1C*表现出胚乳优先表达^[18]。本研究GUS染色结果与*AtBMI1A*一致，但是本试验中对蒺藜苜蓿*MtBMI1*基因在不同组织表达谱分析与GUS染色结果存在部分差异，表达谱分析表明该基因在茎、叶、花、果实中均有表达，在叶中的相对表达量较高，在茎中的相对表达量较少，这主要是因为本研究GUS染色的叶片来自于3周龄的莲座叶，而表达谱分析用的叶片为花期成熟的叶片，另外GUS染色使用的是成熟的果荚，表达量分析用的是未成熟的果荚。此外，对不同发育时期的*MtBMI1*基因表达量分析表明在蒺藜苜蓿生长至40 d时该基因的表达量显著降低，此时蒺藜苜蓿的生长状态为营养阶段向生殖阶段转变的过渡阶段，*MtBMI1*基因表达量下降可能是因为调控蒺藜苜蓿生殖生长的基因抑制了该基因的表达，推测该基因在维持蒺藜苜蓿营养发育和抑制生殖发育中具有重要作用。拟南芥*BMI1*系统进化分析表明*AtBMI1A*的全长蛋白及RING结构域都与*AtBMI1B*高度相关，其在进化树上的分布较近而与*AtBMI1C*的距离略远，这表明*AtBMI1C*在拟南芥发育过程中可能具有不同的功能^[1]。本研究通过系统进化树构建发现蒺藜苜蓿*MtBMI1*与拟南芥*AtBMI1A*和*AtBMI1B*亲缘关系较近，而与*AtBMI1C*亲缘关系较远，表明*MtBMI1*与*AtBMI1A*和*AtBMI1B*在功能上更相近。Li等^[1]研究发现*AtBMI1C*是一种普遍表达的核蛋白，*AtBMI1A*和*AtBMI1B*也均定位在细胞核上^[19]，本试验亚细胞定位结果与之一致。

3.2 *MtBMI1*在干旱胁迫下的负调控作用

关于*AtBMI1A*和*AtBMI1B*在表观修饰中的作用很早就有学者开展研究，Bratzel等^[5]通过体外泛素化试验表明*AtBMI1A*和*AtBMI1B*能够特异性的单泛素化H2A，然而对第3种*BMI1*基因*AtBMI1C*知之甚少，Li等^[1]通过酵母双杂验证了*AtBMI1C*与*AtBMI1A*和*AtBMI1B*相互作用，均为拟南芥PRC1组分。本研究结果表明转基因拟南芥株系中的H2AK119ub组蛋白含量显著升高，该结果进一步证明了蒺藜苜蓿中的*MtBMI1*也具有组蛋白泛素化的作用。使用35S启动子来过表达*AtBMI1A*的转基因植物，所有转基因株系的生长与野生型植物相似，没有任何显著的表型变化^[17]，然而*AtBMI1C*过表达导致H2Aub1化增加和早花表型^[1]。本试验将蒺藜苜蓿

*MtBMI1*在拟南芥中进行了过表达研究,通过对过表达株系和野生型的观察并未发现二者在表型上具有显著差异,这与拟南芥 *AtBMI1A* 过表达表型符合。结合 *MtBMI1* 在不同胁迫下表达量的研究结果,进一步使用 $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘露醇处理模仿干旱胁迫,当处理 72 h 后转基因株系出现了明显的失水表现,相比野生型其茎秆下垂叶片萎蔫更严重,同时丙二醛含量进一步升高,根系生长明显减缓,说明 *MtBMI1* 基因的转入影响了植物的耐旱强度。研究发现 *atbmi1a/b* 在脱水处理下的离子渗漏率远小于野生型,干旱胁迫下野生型的存活率为 37.5%,双突变体的存活率为 65.4%,且双突变体在应对水分胁迫时的标准化含水量也高于野生型^[17]。进一步研究表明 *AtBMI1A* 和 *AtBMI1B* 通过介导 *DREB2A* 在水分胁迫下的泛素化,导致其蛋白被 26S 蛋白酶体水解,该转录因子对控制缺水诱导基因的表达具有重要作用,因此 *AtBMI1A/AtBMI1B* 突变能够增强胁迫响应基因的表达,赋予拟南芥对脱水胁迫的耐受性^[1]。综合本试验结果表明 *MtBMI1* 介导组蛋白泛素化在参与表观遗传调控的同时,也在蒺藜苜蓿干旱胁迫响应中发挥了新的负调控作用。在后续的研究中可以借助基因编辑的手段将苜蓿中的该基因敲除,从而获得优质抗旱苜蓿新品种。另外本研究结果也表明在蒺藜苜蓿中唯一的 *BMI1* 基因与拟南芥中的 *AtBMI1A* 和 *AtBMI1B* 功能更接近。

4 结论

本研究克隆了蒺藜苜蓿 PcG 家族中唯一的 BMI1 成员 *MtBMI1*,该基因具有 7 个外显子和 6 个内含子,CDS 全长 1290 bp,编码 429 个氨基酸,蛋白亚细胞定位在细胞核上。在拟南芥花序、柱头、花茎和果柄中具有较强的 *MtBMI1* 启动子表达活性。*MtBMI1* 在不同发育阶段的表达量呈波动式变化,在不同组织中叶片表达量最高,在 $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇处理 12 h 表达量最高。转 *MtBMI1* 拟南芥在正常生长条件下与野生型表型无明显差异,而在干旱处理后转基因株系出现明显失水表型,且根长、根鲜重和地上鲜重均显著降低,丙二醛含量显著升高。综上,*MtBMI1* 基因在蒺藜苜蓿干旱响应中具有负调控作用。

参考文献 References:

- [1] Li W, Wang Z, Li J, *et al.* Overexpression of *AtBMI1C*, a polycomb group protein gene, accelerates flowering in *Arabidopsis*. PLoS One, 2011, 6(6): e21364.
- [2] De Napoles M, Mermoud J E, Wakao R, *et al.* Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. Developmental Cell, 2004, 7(5): 663–676.
- [3] Zhang K, Sridhar V V, Zhu J, *et al.* Distinctive core histone post-translational modification patterns in *Arabidopsis thaliana*. PLoS One, 2007, 2(11): e1210.
- [4] Ginjala V, Nacerddine K, Kulkarni A, *et al.* BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA damage-induced H2A ubiquitination and repair. Molecular and Cellular Biology, 2011, 31(10): 1972–1982.
- [5] Bratzel F, López-Torrejón G, Koch M, *et al.* Keeping cell identity in *Arabidopsis* requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. Current Biology, 2010, 20(20): 1853–1859.
- [6] Yang C, Bratzel F, Hohmann N, *et al.* VAL- and AtBMI1-mediated H2Aub initiate the switch from embryonic to postgerminative growth in *Arabidopsis*. Current Biology, 2013, 23(14): 1324–1329.
- [7] Chen D, Molitor A, Liu C, *et al.* The *Arabidopsis* PRC1-like ring-finger proteins are necessary for repression of embryonic traits during vegetative growth. Cell Research, 2010, 20(12): 1332–1344.
- [8] Zhao Y, Zhang J, Sun Z, *et al.* Genome-wide identification and analysis of the polycomb group family in *Medicago truncatula*. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(14): 7537.
- [9] Kong H M, Song J X, Yang J, *et al.* Identification and transcript profiling of the *CAMTA* gene family under abiotic stress in alfalfa. Acta Prataculturae Sinica, 2024, 33(5): 143–154.
孔海明, 宋家兴, 杨静, 等. 紫花苜蓿 *CAMTA* 基因家族鉴定及其在非生物胁迫下的表达模式分析. 草业学报, 2024, 33(5): 143–154.
- [10] Hu S Q, Wang J C, Yao L R, *et al.* Cloning and preliminary functional analysis of the root gene *HgAKR6C* of *Halogeton glomeratus*. Acta Prataculturae Sinica, 2024, 33(1): 61–74.
胡尚钦, 汪军成, 姚立蓉, 等. 盐生草根基因 *HgAKR6C* 的克隆与初步功能分析. 草业学报, 2024, 33(1): 61–74.

- [11] Qian C L, Ji Z J, Zhu Q, *et al.* Effects of 1-MCP on proline, polyamine, and nitric oxide metabolism in postharvest peach fruit under chilling stress. *Horticultural Plant Journal*, 2021, 7(3): 188–196.
- [12] Chen D, Molitor A M, Xu L, *et al.* *Arabidopsis* PRC1 core component AtRING1 regulates stem cell-determining carpel development mainly through repression of class I *KNOX* genes. *BMC Biology*, 2016, 14: 1–17.
- [13] Jiang L W, Huang L F, Jiang W. H3K27me3-mediated epigenetic regulation in pluripotency maintenance and lineage differentiation. *Cell Insight*, 2024, 3(4): 1–11.
- [14] Strejčková B, Čegan R, Pecinka A, *et al.* Identification of polycomb repressive complex 1 and 2 core components in hexaploid bread wheat. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 1–13.
- [15] Chen D, Huang Y, Ruan Y, *et al.* The evolutionary landscape of PRC1 core components in green lineage. *Planta*, 2016, 243(4): 825–846.
- [16] Merini W, Romero-Campero F J, Gomez-Zambrano A, *et al.* The *Arabidopsis* polycomb repressive complex 1 (PRC1) components AtBMI1A, B, and C impact gene networks throughout all stages of plant development. *Plant Physiology*, 2017, 173(1): 627–641.
- [17] Qin F, Sakuma Y, Tran L S P, *et al.* *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *The Plant Cell*, 2008, 20(6): 1693–1707.
- [18] Bratzel F, Yang C, Angelova A, *et al.* Regulation of the new *Arabidopsis* imprinted gene *AtBMIIC* requires the interplay of different epigenetic mechanisms. *Molecular Plant*, 2012, 5(1): 260–269.
- [19] Xu L, Shen W H. Polycomb silencing of *KNOX* genes confines shoot stem cell niches in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 2008, 18(24): 1966–1971.