

文章编号:1000-8551(2005)04-265-04

# 5-azaC 对萝卜茎尖 DNA 甲基化和开花的影响

汪炳良<sup>1,2</sup> 李水凤<sup>1</sup> 曾广文<sup>3</sup> 邓俭英<sup>1,4</sup>

(1. 浙江大学园艺系,浙江 杭州 310029;2. 农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室,浙江 杭州 310029;  
3. 浙江大学生命科学院,浙江 杭州 310029;4. 广西农业科学院蔬菜研究中心,广西 南宁 530007)

**摘要:**本文研究了去甲基化因子 5-氮杂胞苷(5-azaC)对萝卜开花及幼苗茎尖 DNA 甲基化水平的影响。用 0(对照)、0.10、0.25、0.50 和 1.00mmol/L 5-azaC 处理‘短叶 13’萝卜种子 6d,除对照外,茎尖组织 DNA 甲基化水平均有所降低,并与春化后茎尖组织 DNA 甲基化水平相当;茎尖组织 DNA 甲基化水平随着处理浓度的提高而下降。同时,5-azaC 处理明显促进春性品种萝卜‘短叶 13’的开花。结果表明 5-azaC 可以部分代替低温诱导萝卜开花。

**关键词:**萝卜;5-azaC;花芽分化;开花;DNA 甲基化

## EFFECT OF 5-AZACYTOSINE ON FLOWERING AND DNA METHYLATION LEVEL OF STEM APICES IN RADISH( *Raphanus sativus* L.)

WANG Bing-liang<sup>1,2</sup> LI Shui-feng<sup>1</sup> ZENG Guang-wen<sup>3</sup> DENG Jian-ying<sup>1,4</sup>

(1. Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, 310029;  
2. Key Laboratory of Horticultural Plant Development and Biotechnology, Ministry of Agriculture, Hangzhou, Zhejiang, 310029;  
3. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, 310029;  
4. Vegetable Research Center, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi, 530037)

**Abstract:** The effects of 5-azacytosine (5-azaC, a demethylation agent) on flowering and DNA methylation level of stem apices in radish were studied. Seeds of radish cultivar ‘Duan-Ye 13’ were treated with 0.10~1.00 mmol/L 5-azaC for 6 days. 5-azaC treatment induced DNA methylation level decrease in stem apices. The DNA methylation level in stem apices treated with 5-azaC was comparable to (even lower than) that of seedlings treated at 5 °C for 10 days. At the tested concentrations, the higher the 5-azaC concentration was, the lower the DNA methylation level in stem apices. 5-azaC treatment also promoted radish flowering, and the promotion effect was more significant in the spring radish cultivar ‘Duan-Ye 13’. Results verified that 5-azaC could partial substitute the low temperature treatment for radish vernalization.

**Key words:** radish; 5-azacytosine; floral bud differentiation; flowering; DNA methylation

在所有需要经历春化方能开花的植物中,低温诱导实际上是植物生殖生长的启动,但植株经春化诱导后所产生的后代同样必须经过低温诱导才能开花<sup>[1,2]</sup>。所以这种低温对开花的诱导是一种后生的过程,只限于一个单一的有性世代。早在 100 多年前,人们就观察到植物春化现象,但直到上世纪 90 年代才提出了低温促进开花的分子机理假设<sup>[3]</sup>。Burn 等认为低温处理促进植物开花是由一个或多个相关基因去甲基化的结果<sup>[3]</sup>,后来许多的研究结果也支持了这种观点<sup>[4~9]</sup>。由于植物中甲基化模式可能在世代间不能重新启动<sup>[10,11]</sup>, Finnegan 等认为在春化信号的重新启动上,存在除通过 DNA 甲基化水平调控以外的某种因素<sup>[6]</sup>。去甲基化因子 5-azaC 可以部分代替低温而促进植株开花提前<sup>[3,9,12]</sup>,但 5-azaC 除

收稿日期:2005-02-28

基金项目:浙江省自然科学基金(300266)

作者简介:汪炳良(1962-),男,浙江海宁人,博士,副教授,主要从事蔬菜种质资源和遗传育种研究。E-mail:zwg123@mail.hz.zj.cn

了具有去甲基化作用外,还是一种普通的转录抑制剂,所以 5-azaC 对开花的促进作用可能还包括 DNA 去甲基化作用以外的效应<sup>[6]</sup>。

近 10 年来,人们对植物生长转变方面的研究热点之一是生长转变过程中 DNA 甲基化水平的变化,以及这种 DNA 甲基化水平变化的影响因素。Engelen-Egles 等认为,萝卜可以作为研究春化的模式植物<sup>[13]</sup>,本系列试验以春化需求差别较大的 2 个萝卜品种为材料,研究低温春化处理以及去甲基化试剂(5-azaC)对开花的促进及 DNA 甲基化水平的影响,以证明 5-azaC 是否可以代替低温诱导萝卜植株开花。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和处理

试验以冬性品种‘一点红’和春性品种‘短叶 13’两个萝卜(*Raphanus sativus* L.)品种为材料。2003 年 2 月下旬至 3 月初,对‘一点红’和‘短叶 13’两个萝卜品种种子分别进行 5-azaC 处理,所用 5-azaC 浓度为 0(对照)、0.10、0.25、0.50 和 1.00 mmol/L,分别处理 3d 和 6d,于 2003 年 3 月 2 日结束。具体方法为:种子经表面消毒后,置于铺有事先用 5-azaC 浸湿滤纸的培养皿中,(25±1)℃恒温箱中培养,每天补充 5-azaC 溶液。另设低温处理对照,即将在 25℃下萌动 24h 的种子放入(5±0.5)℃人工气候箱内处理 10d。处理结束后,各处理材料(包括对照)定植于的塑料盆(直径 20cm)中,每盆 5 株,温室培养。培养期间日最低温度 15℃,人工补充光照(光照时间为 16h)。生长期间补充水分和营养<sup>[13]</sup>。

### 1.2 花芽分化和现蕾开花观察

经 5-azaC 处理的材料在培养的第 16、19、22、30 和 46 天观察生长点花芽分化情况,计算花芽分化指数,并于培养 102d 时调查全部剩余植株(6~27 株)的现蕾和开花情况。

### 1.3 DNA 甲基化水平测定

DNA 提取:处理结束后,取 5-azaC 处理 6d 以及低温处理对照的幼苗剥去未脱离的种皮并切去子叶,取包括部分上胚轴的茎尖(长约 0.2cm)0.3g,用液氮冷冻后于 -70℃下保存。DNA 提取及检测参照曹家树方法<sup>[14]</sup>。

DNA 沉淀与水解:提取的 100μl DNA(含 DNA 大约 30μg)溶液中加入 10μl 3 mol/L NaAC(pH5.2),再加入 200μl 的冰无水乙醇,-20℃放置约 1h,使 DNA 沉淀,10000rpm 离心 10min 后去上清液,超净工作台上风干。风干的 DNA 中加入 70%高氯酸 50μl,在沸水浴中水解 1h,然后用 1mol/L 的 KOH 调 pH 值到 3~5,形成 KClO<sub>4</sub> 沉淀后 12000rpm 离心 5min,上清液用于 DNA 甲基化水平测定。

DNA 甲基化水平测定:上述 DNA 水解液在室温下 HPLC(Waters 201)的 Hypersil BDS C18 柱(中科院大连国家色谱中心提供)分离,柱温 40℃。流动相由 6.25mmol/L PICB7、0.1%TEA、0.4%HAC 和 50%甲醇组成,流速 0.8ml/min。用购自 SIGMA 公司的胞嘧啶(C)和 5-甲基胞嘧啶(<sup>5m</sup>C)标样作对照,紫外检测器在 273nm 下根据标样 C 和<sup>5m</sup>C 洗脱峰的保留时间自动检测样品 DNA 水解产物中 C 和<sup>5m</sup>C 的洗脱峰,通过计算样品中 C 和<sup>5m</sup>C 的克分子数,以<sup>5m</sup>C 的百分率作为 DNA 甲基化水平的指标。

## 2 结果与分析

### 2.1 5-azaC 处理对萝卜幼苗茎尖的 DNA 甲基化水平的影响

从图 1 可以看出,5-azaC 处理降低了茎尖组织的 DNA 甲基化水平,在本试验的 5-azaC 处理浓度范围内,随着处理浓度的提高,茎尖组织 DNA 甲基化水平呈逐渐下降的趋势。与未经 5-azaC 处理和低温处理的对照(CK)相比,0.25 mmol/L 的 5-azaC 处理 6d 后,茎尖 DNA 甲基化水平(25.87%)与萌动种子 5℃处理 10d 后茎尖 DNA 甲基化水平(28.38%)相当,而 0.50 和 1.00 mmol/L 的 5-azaC 处理 6d 的幼苗其茎尖组织的 DNA 甲基化水平较萌动种子 5℃处理 10d 分别降低了 0.46%和 10.99%。

### 2.2 5-azaC 处理促进了萝卜花芽分化和开花

5-azaC 对萝卜花芽分化、现蕾和开花的影响如表 1 所示。低浓度的 5-azaC 处理对冬性萝卜品种‘一

点红 花芽分化的促进作用并不明显,用 0.10 和 0.25 mmol/L 的 5-azaC 处理 3d,在处理结束培养 46d 取样观察时,其花芽分化程度并没有明显高于对照(未经 5-azaC 处理)。但随着处理浓度的提高和处理时间的延长,5-azaC 对其花芽分化的促进作用趋于明显。然而,在试验的 5-azaC 浓度(0.10 ~ 1.00 mmol/L)范围内,5-azaC 对其现蕾和开花均有显著的促进作用。在处理结束并培养 102d 调查时,5-azaC 处理者,其现蕾和开花株率分别为 43.49 % ~ 83.33 %和 8.70 % ~ 27.27 %,而未作任何的对照此时的现蕾株率仅 27.27 %,且没有植株开花(表 1)。从中可以发现,5-azaC 对萝卜花芽分化和开花有明显的促进作用,但这种促进作用随处理浓度和处理时间而发生一定的变化。

5-azaC 对春性萝卜品种‘短叶 13’花芽分化、现蕾和开花亦具有显著的促进作用,但这种促进作用似乎并不受处理浓度和处理时间的影响,0.10 ~ 1.00 m mol/L 的 5-azaC 处理 3d 或 6d,在处理结束并培养 46d 时,几乎所有植株完成或接近完成花芽分化,并且有 16.67 % ~ 90.00 %植株开始现蕾,部分处理已有植株开花,而此时对照植株仅处于花芽分化的中期,无植株现蕾和开花(表 1)。

表 1 5-azaC 处理对萝卜花芽分化和开花的影响

Table 1 Effects of 5-azaC on floral bud differentiation and flowering of radish										
品种 cv.		5-azaC 处理		处理结束后 46d				处理结束后 102d		
		5-azaC treatments		(46 days after treatment)				(102 days after treatment)		
	浓度 concentration (m mol/L)	时间 time (d)	植株数 number of plants	花芽分化 指数 IBD	现蕾 PBE( %)	开花 PF( %)	植株数 number of plants	现蕾 PBE( %)	开花 PF( %)	
冬性品种 ‘一点红’ winter radish cultivar ‘ Yidianhong ’	CK		8	1.1	0	0	11	27.27	0	
	D - 5 - 10		10	2.8	0	0	10	100	100	
	0.10	3	11	0.7	0	0	11	72.73	27.27	
		6	5	1.4	0	0	18	61.11	11.11	
	0.25	3	10	1.1	0	0	20	60.00	15.00	
		6	5	1.6	0	0	23	43.49	8.70	
	0.50	3	10	1.6	0	0	11	63.64	18.18	
		6	5	2.0	0	0	19	73.68	26.32	
	1.00	3	13	1.6	0	0	6	83.33	16.67	
		6	5	1.6	0	0	15	46.67	13.23	
春性品种 ‘短叶 13’ spring radish cultivar ‘ Duanye 13 ’	CK		10	2.7	0	0	8	100	100	
	D - 5 - 10		10	5.0	100	70	10	100	100	
	0.10	3	11	4.5	72.73	0	23	100	100	
		6	9	4.6	44.44	0	27	100	100	
	0.25	3	11	4.8	81.82	9.10	13	100	100	
		6	6	3.8	16.67	0	21	100	100	
	0.50	3	11	4.9	72.73	18.18	20	100	100	
		6	11	4.6	63.64	0	18	100	100	
	1.00	3	10	4.9	90.00	30	15	100	100	
		6	9	4.7	44.44	0	24	100	100	

Notes: IBD: Index of floral bud differentiation, floral bud differentiation finished when the index was 5; PBE: Percentage of floral bud emerged; PF: Percentage of flowering.

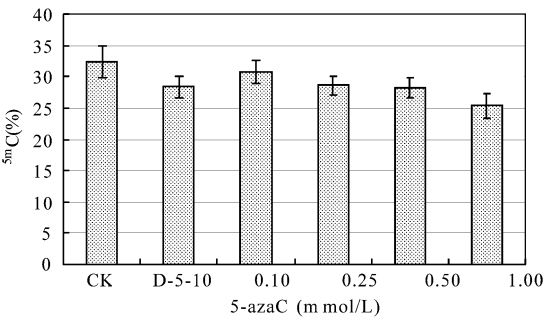


图 1 5-azaC 处理对春性萝卜品种‘短叶 13’幼苗茎尖 DNA 甲基化水平的影响

Fig. 1 Effect of 5-azaC treatment on DNA methylation level of stem apices in the spring radish cultivar ‘Duanye 13’

CK:幼苗既未进行低温处理,也未进行 5-azaC 处理;D - 5 - 10:萌动种子在 5 条件下处理 10d。下表同。  
CK:germinated seeds (seedlings) were neither treated by low temperature nor 5-azaC. D - 5 - 10: germinated seeds treated at 5 for 10 days. The same as following table.

另一方面,就冬性品种‘一点红’而言,在相同的处理浓度下,在处理结束并培养 102d 调查时,处理 6d 的植株其现蕾和开花百分率并没有高于处理 3d 的植株(表 1)。同时,从表 1 可见,春性品种‘短叶 13’在处理结束并培养 46d 时,5-azaC 处理 6d 的植株,其现蕾和开花株率也普遍低于相同浓度处理 3d 的植株。这可能与 5-azaC 处理对植株生长具有一定的抑制作用有关<sup>[7]</sup>。

### 3 结论与讨论

在高等植物中,DNA 中被甲基化的碱基一般是 C(胞嘧啶),不同植物其 DNA 甲基化水平不同,一般在 30 % 左右<sup>[15, 16]</sup>。迄今为止尚未见萝卜中基因组 DNA 甲基化水平的报道。本试验研究结果发现,萝卜茎尖组织中 DNA 甲基化水平接近高等植物中 DNA 甲基化的一般水平。

5-azaC 处理可以明显促进拟南芥<sup>[3, 9]</sup>、小麦<sup>[17, 18]</sup>、白菜<sup>[19]</sup>开花,5-azaC 的处理时间一般在 5d 左右<sup>[6, 18, 19]</sup>。本研究结果证实,5-azaC 能够部分代替低温的作用。用 5-azaC 处理萝卜种子能够显著促进其花芽分化和开花,而且这种促进作用在春性品种‘短叶 13’上更加明显。这与春性萝卜品种‘短叶 13’其茎尖组织的 DNA 甲基化水平更容易被低温处理所降低的结果相一致(另文报道)。从处理结束时‘短叶 13’幼苗生长点 DNA 甲基化水平测定结果看,经 5-azaC 处理 6d 的幼苗茎尖组织其 DNA 甲基化水平随着处理浓度的提高而降低,当 5-azaC 的处理浓度为 0.25 ~ 1.00 mmol/L 时,幼苗茎尖组织的 DNA 甲基化水平与萌动种子在 5℃ 下处理 10d 时的 DNA 甲基化水平相近甚至更低。这再次证明了正是由于 DNA 甲基化水平的降低导致了植物从营养生长向生殖生长的转变。这与 Burn 等<sup>[3]</sup>、李梅兰<sup>[19]</sup>和 Horvath 等<sup>[18]</sup>分别以拟南芥、白菜和菜心、小麦为材料进行不同浓度的 5-azaC 处理所获得的结果相似。

萝卜属于种子春化植物,在冬春萝卜品种选育和栽培实践中,均非常重视其先期抽薹性,这种先期抽薹性与萝卜植株由营养生长向生殖生长转变有密切的关系。本研究结果表明,萝卜的这种生长转变与其茎尖 DNA 甲基化水平降低有关。所以,本研究在证明植物的生长转变与 DNA 甲基化水平降低的关系的同时,也为耐抽薹萝卜品种的选育提供依据。

### 参考文献:

- [1] Lang A. Physiology of flowering. *Ann Rev Plant Physiol*, 1952, 3: 265 ~ 306
- [2] Levy Y Y, Dean C. The transition of flowering. *Plant Cell*, 1998, 10: 1973 ~ 1989
- [3] Burn J E, Bagnall D J, et al. DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 287 ~ 291
- [4] Ronemus M J, Galbiati M, et al. Demethylation-induced development pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science*, 1996, 273: 654 ~ 657
- [5] Richard E J. DNA methylation and plant development. *Trends in Genetics*, 1997, 13: 319 ~ 322
- [6] Finnegan E J, Genger P K, et al. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5824 ~ 5829
- [7] Finnegan E J, Genger P K, et al. DNA methylation in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 223 ~ 247
- [8] Sheldon C C, Burn J E, et al. The *FLC* MADS box gene, a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell*, 1999, 11: 445 ~ 458
- [9] Lital P, Relichova J. The effect of day length, vernalization and DNA demethylation on the flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 2001, 113: 121 ~ 127
- [10] Vongs A, Kakutani T, et al. *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science*, 1993, 226: 1926 ~ 1928
- [11] Finnegan E J, Peacock W J, et al. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 8449 ~ 8454
- [12] Bodson M, Outlaw W H J. Elevation in the sucrose content of the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral evocation. *Plant Physiol*, 1985, 79: 420 ~ 424
- [13] Engelen-Egles G, Erwin J E. A model plant for vernalization studies. *Scientia Horticulturae*, 1997, 70: 197 ~ 202
- [14] 曹家树, 曹寿椿, 等. 白菜及其相邻类群基因组 DNA 和 RAPD 分析. *园艺学报*, 1995, 22: 47 ~ 52
- [15] Wanger I, Capesius I. Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high performance liquid chromatography. *Biochemica and Biophysica Acta*, 1981, 654: 52 ~ 56
- [16] Pradhan S, Adams R L P. Distinct CG and CNG DNA methyltransferases in *Pisum sativum*. *Plant J*, 1995, 7: 471 ~ 481
- [17] Brock R D, Davidson J L. 5-azacytidine and gamma rays partially substitute for cold treatment in vernalizing winter wheat. *Environ Exp Bot*, 1994, 34: 195 ~ 199
- [18] Horvath E, Szalai G, et al. Effect of vernalization and 5-azacytidine on the methylation level of DNA in wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Martonvasar 15). *Plant Science*, 2003, 165: 689 ~ 692
- [19] 李梅兰, 曾广文, 等. 5-氮杂胞苷促进白菜开花的效应分析. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2003, 29: 287 ~ 29