

# 春化对白菜 DNA 甲基化、GA 含量及蛋白质的影响

李梅兰<sup>1,3</sup> 汪俏梅<sup>1</sup> 朱祝军<sup>1</sup> 曾广文<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学园艺系, 杭州 310029; <sup>2</sup> 浙江大学生命科学学院, 杭州 310029; <sup>3</sup> 山西农业大学园艺学院, 太谷 030801)

**摘 要:** 以普通白菜‘油冬儿’为试材, 研究了低温对白菜开花的诱导效应, 并分析了萌动种子和幼苗春化诱导后 DNA 甲基化水平、赤霉素 (GA) 含量和蛋白质种类的变化。结果表明, 不论萌动种子还是幼苗, 4 低温处理 30 d 均可完成春化。春化处理后, 两处理植株茎尖组织 DNA 甲基化水平都较对照下降; 但 GA 含量明显上升, 为对照的 2~3 倍; 低温诱导植株产生了一种分子量为 58 kD 的特异蛋白质, 同时也使一种蛋白质消失。说明低温可能通过降低 DNA 甲基化水平或增加 GA 含量而诱导植物开花。

**关键词:** 白菜; 开花; DNA 甲基化; 赤霉素; 蛋白质

**中图分类号:** S 634 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 04-0353-05

有关春化诱导植物开花的机理有过许多报道, 但主要侧重于麦类<sup>[1,2]</sup>和拟南芥<sup>[3]</sup>等植物。我国在冬小麦春化研究方面取得了一定的进展, 通过相关基因 cDNA 文库构建, 现在已经克隆了几个冬小麦春化基因: *Vcr203*<sup>[4~6]</sup>、*Vcr17*<sup>[7]</sup>和 *Vcr79*<sup>[8]</sup>, 并对这些基因的功能进行了初步分析。但有关这些基因如何进行表达调控方面的研究还未见报道。近年来许多研究结果表明<sup>[9,10]</sup>, DNA 甲基化参与植物基因表达的调控。Burn 等<sup>[3]</sup>认为春化的分子基础是 DNA 的去甲基化。Finnegan 等<sup>[11]</sup>利用反义转基因植物研究的结果也证实春化通过降低植物基因组 DNA 的甲基化水平来发挥作用。但这些都是模式植物拟南芥上研究得到的结果。白菜是典型的低温长日照 2 年生植物, 对春化条件要求严格<sup>[12]</sup>, 属于种子春化型, 无论是萌动种子还是幼苗或成株, 经过一段时间的低温处理都可以诱导其开花。作者通过研究低温对白菜开花的诱导效应及春化过程中 DNA 甲基化水平、GA 含量和蛋白质种类的变化, 探讨春化诱导白菜开花的生理生化调控机制, 为阐明植物的开花机理提供理论上的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及春化处理

试材为白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino) 弱冬性品种‘油冬儿’。春化处理于 2000 年秋季在实验室光照培养箱中进行。

**1.1.1 种子春化处理及取样** 将种子浸种 1~2 h 后放于铺有滤纸的培养皿中, 在 25℃ 的恒温箱中催芽。当胚根突破种皮时将培养皿移至光照培养箱中进行低温 (4℃) 处理。处理过程中保持滤纸湿润, 当幼苗稍大时加入适量营养液, 同时适当加光 (两支灯管照光即可); 对照于取样前 5 d 催芽, 当种子萌动后于光照培养箱 (21℃) 中进行生长。低温处理 30 d 后取子叶期幼苗含生长点的上部 (用于 DNA 提取的取样量为 2 g, GA 和蛋白质分析的取样量均为 0.3 g), 立即用液氮固定, 保存于 -70℃ 的冰箱中待用。

**1.1.2 幼苗春化处理及取样** 将种子播种于塑料筐中, 基质为珍珠岩和岩棉灰的混合物, 营养液为园试配方。环境温度 > 15℃。当幼苗长至 4 片真叶时, 将苗筐放于光照培养箱中进行春化处理 (4℃, 30 d)。低温处理前及处理 30 d 后, 取幼苗的茎尖部位 (大小 0.5 cm 左右) 待用。取样量及保存方法

收稿日期: 2001-10-22; 修回日期: 2002-02-10

与种子春化处理的相同。

## 1.2 低温处理后植株栽培管理及花芽分化进程的确定

萌动种子低温处理分别于 11 月 1 日、11 日、21 日开始, 12 月 2 日将低温处理 30、20、10 d 的子叶期幼苗栽植于苗盘中, 采用无土栽培管理, 所用基质和营养液与幼苗处理时相同。幼苗低温处理于 8 月 17 日开始, 9 月 7 日和 17 日分别栽植于大田, 采用普通栽培方式进行管理。在植株的生长过程中连续观察花芽分化的进程。通过解剖镜观察, 参照李曙轩等<sup>[13]</sup>白菜花芽分化的分级标准确定花芽分化的进程。1 级: 生长点膨大, 但仍处于营养生长状态; 2 级: 中心圆突起, 四周有 3~5 个小圆突起; 3 级: 周围圆突起继续增加, 形成圆突群; 4 级: 圆突群分化为花蕾的雏形, 花柄开始伸长。

## 1.3 测定方法

1.3.1 DNA 甲基化水平测定 DNA 提取按照张明<sup>[14]</sup>的方法进行。DNA 水解参照 Demeulemeester 等<sup>[15]</sup>的方法稍作改动。在 100  $\mu\text{L}$  (含 DNA 大约 30  $\mu\text{g}$ ) 的 DNA 溶液中加入 70 % 的高氯酸 50  $\mu\text{L}$  (100 , 1 h) 进行水解, 然后用 KOH (1 mol/L) 将 pH 值调整到 3~5, 形成  $\text{KClO}_4$  沉淀后 12 000 rpm 离心 5 min, 取上清液室温下通过进样器加到 Waters 201 型高效液相色谱仪的 Hypersil BDS  $\text{C}_{18}$  柱 (5  $\mu\text{m}$  200  $\times$  4.0 mm, 中科院大连国家色谱中心提供) 进行测定。柱温为 40 , 以 10 % 的甲醇、5 mmol/L 的戊烷磺酸钠 (PICB5) 和 0.2 % 的三乙胺 (TEA) 混合液 (pH 4.0) 为洗脱液进行洗脱, 流速为 0.5 mL/min。紫外检测器检测, 波长 273 nm, 灵敏度 0.1。以胞嘧啶 (C) 和 5-甲基胞嘧啶 ( $^5\text{mC}$ ) 标样作对照, 通过计算  $^5\text{mC}$  克分子数/ ( $^5\text{mC}$  克分子数 + C 克分子数) 的百分比检测总基因组 DNA 中  $^5\text{mC}$  的含量, 即 DNA 甲基化的水平。每个处理重复 3 次。

1.3.2 GA 含量测定 采用 ELISA<sup>[16]</sup>方法进行, 在酶联免疫检测仪 (华东电子管厂生产, DG3022A 型) 上测定, 测定波长为 490 nm。试剂盒购自南京农业大学植物生理组。每个处理重复 3 次。

1.3.3 蛋白质电泳 蛋白质提取: 0.3 g 的样品在冰浴中用 0.25 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 6.8) 0.5 mL 研磨成匀浆, 4 12 000 rpm 离心 20 min; 取上清液 50  $\mu\text{L}$ , 加入 2 倍上样缓冲液 50  $\mu\text{L}$ , 沸水浴 3 min, 冷却后做蛋白质电泳分析。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 参照何忠效等<sup>[17]</sup>的方法采用垂直板型凝胶电泳, 分离胶浓度 12 %, 浓缩胶浓度 5 %, 标准蛋白选用华美低分子量标准蛋白 (分子从 14.4~97 kD)。电泳后用 10 % 的三氯乙酸固定过夜, 然后用考马斯亮蓝 R-250 酸甲醇水染色液染色 3~12 h; 染色完毕, 用酸甲醇水脱色液脱至凝胶的蓝色背景褪清、蛋白质色带清晰为止。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温处理对白菜开花的促进效应

萌动种子和幼苗经过低温处理后, 统计花芽分化 4 级时植株移栽后的生长天数和植株的叶片数。从表 1 中可以看出, 无论萌动种子还是幼苗, 4 低温处理都可以诱导白菜开花, 而且低温处理时间越长, 对植株开花的诱导效果就越明显。另外, 在同样低温处理 30 d 和 20 d、花芽分化 4 级时, 萌

表 1 低温处理对白菜花芽分化的影响

Table 1 Effects of cold treatment on floral differentiation of non-heading Chinese cabbage

处 理 Treatment	移栽天数 (花芽分化 4 级) Growing days (Floral differentiation stage 4)		叶片数 (花芽分化 4 级) Leaf number of plants (Floral differentiation stage 4)	
	种子 Seed	幼苗 Seedling	种子 Seed	幼苗 Seedling
对 照 Control	未 花 芽 分 化 No floral differentiation	未 花 芽 分 化 No floral differentiation	未 花 芽 分 化 No floral differentiation	未 花 芽 分 化 No floral differentiation
4 10 d	43 d	—	7	—
4 20 d	35 d	32 d	4	20
4 30 d	28 d	15 d	2 大叶 1 小叶几个幼叶 2 old and a few young leaves	10

注: 每个处理观察 20 株, 花芽分化百分率 70 %。Note: Observed 20 every treatment, floral differentiation percentage 70 %.

动种子移栽后的生长天数分别为 28 d 和 35 d; 而幼苗低温处理后的生长天数为 15 d 和 32 d。说明植株越大, 越容易通过春化。

## 2.2 春化处理对 DNA 甲基化水平的影响

春化处理对 DNA 甲基化水平的影响如图 1 所示。无论是萌动种子春化还是幼苗春化处理, 茎尖 DNA 甲基化水平都较未处理的对照降低。萌动种子低温处理后的甲基化水平为 23.03 %, 而对照为 32.19 %, 下降了 28.46 %。幼苗低温处理前茎尖 DNA 甲基化水平为 30.43 %, 低温处理后为 25.36 %, 降低了 16.66 %。说明春化可以降低植物的 DNA 甲基化水平。

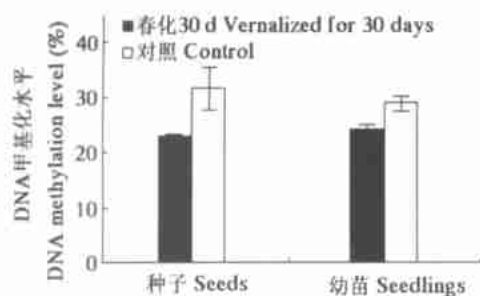


图 1 春化对 DNA 甲基化水平的影响

Fig. 1 Effects of vernalization on the degree of DNA methylation

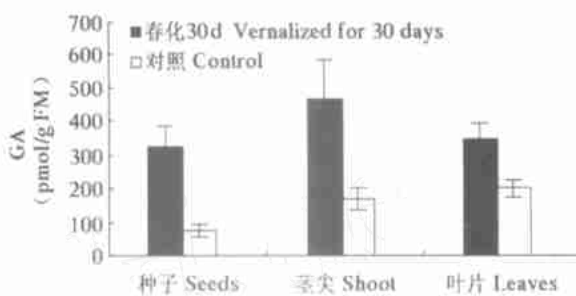


图 2 春化对 GA 含量的影响

Fig. 2 Effect of vernalization on the content of GA

## 2.3 春化处理对 GA 含量的影响

春化处理对 GA 含量的影响如图 2 所示。无论是萌动种子春化还是幼苗春化处理, 其茎尖和叶片 GA 含量均比对照明显上升。萌动种子春化处理 GA 的含量比对照高 3 倍左右; 幼苗春化处理, 茎尖和叶片的 GA 含量较处理前分别增加了 150 % 和 70 %。表明春化处理促进内源 GA 的生物合成。

## 2.4 春化处理对蛋白质种类的影响

萌动种子和幼苗经过低温处理后都较对照多出一条分子量为 58 kD 的蛋白质条带, 而且这条带随着低温处理时间的延长逐渐加重。但幼苗低温处理后消失了一条分子量为 57 kD 的条带。蛋白质电泳图谱如图 3 所示。

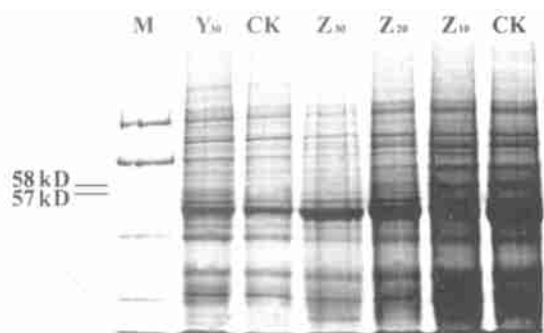


图 3 春化对萌动种子及幼苗蛋白质 SDS 电泳图谱的影响

M: 标准蛋白; Z<sub>30</sub>, Z<sub>20</sub>, Z<sub>10</sub>: 萌动种子低温处理 30、20、10 d; Y<sub>30</sub>: 幼苗低温处理 30 d; CK: 对照

Fig. 3 Effects of vernalization on protein SDS electropherogram of germinated seeds and seedlings

M: Protein marker; Z<sub>30</sub>, Z<sub>20</sub>, Z<sub>10</sub>: Germinated seeds vernalized for 30, 20, 10 d; Y<sub>30</sub>: Seedlings vernalized for 30 d; CK: Control

## 3 讨论

Burn 等<sup>[3]</sup>的试验结果表明, 拟南芥经过去甲基剂 5- 氮胞苷处理后, 植株的开花时间明显早于对照; 而对春化不敏感的生态型对 5- 氮胞苷处理没有反应。经过 5- 氮胞苷和春化处理的植株 DNA 甲基化水平较未处理的对照都降低, 而这两种处理均可促进植物开花。所以他们提出植物春化的分子基础就是 DNA 的去甲基化。Finnegan 等<sup>[11]</sup>将甲基转移酶反义基因导入拟南芥植物中, 反义植株的甲基化水平较对照明显下降, 且下降后的植物表现出开花时间比对照提前, 也说明甲基化水平的降低可以促进植物的开花。用反义植物进行低温处理, 开花较未处理对照提前, 说明低温春化与甲基化水平降低在促进开花中具有加成的作用。本研究结果表明, 白菜萌动的种子及幼苗的茎尖经过春化处理后, DNA 甲基化水平较对照明显下降。进一步证实春化诱导植物开花与 DNA 甲基化水平的降低有关。

李秀珍等<sup>[1]</sup>、逯斌等<sup>[2]</sup>研究冬小麦春化机理发现, 在春化时间达到一定阈值时植物体产生一些春化的特异蛋白。本试验结果也表明, 白菜茎尖组织伴随着 DNA 甲基化水平的下降, 也产生了新的蛋

白质种类,同时还消失了某些蛋白质,与在冬小麦上的试验结果相似,只是分子量不同。植物在其生长发育过程中,DNA甲基化能关闭某些基因的活性,使处于表达状态的基因关闭;也可以通过去甲基化使一些关闭的基因重新活化,进而表达<sup>[18]</sup>。低温降低了植物的DNA甲基化水平,就意味着基因表达数目和基因表达量的增加,特异蛋白的产生正好印证了这一点。另外在诱导过程中还消失了某种蛋白质,说明该蛋白质与植物开花的内抑制有关,低温诱导可消除这种内抑制从而诱导植物开花<sup>[19]</sup>。总之,低温诱导使与开花有关的基因或基因的启动子发生去甲基化进行表达,又使抑制开花的基因重新甲基化关闭表达,导致植物体的生理生化状态发生改变,诱导植物开花。对于基因组来说,活化的基因量多于关闭的基因量,这就导致了基因组DNA总甲基化水平的下降。

GA可以代替低温长日促进植物的开花,许多研究都证实了这一点<sup>[21~23]</sup>。Blazquez等<sup>[20]</sup>的试验证明,GA促进植物的开花是通过活化 $LFY$ 基因启动子的活性而进行的。他们发现外施GA促进开花与 $LFY$ 的表达有关;而且GA合成缺陷突变体 $ga1-3$ 在短日条件下不能开花是由于缺乏 $LFY$ 启动子的诱导而引起的,通过 $LFY$ 转基因可以恢复 $ga1-3$ 突变体在短日条件下的开花。另外在 $GA1$ 突变体中, $LFY$ 基因启动子的活性较低,长日对其的上调作用被延迟,开花推迟。说明GA促进植物的开花通过活化 $LFY$ 基因的表达而进行。Burn<sup>[3]</sup>在试验中发现,经过低温处理之后,分生组织区GA合成路径中的关键酶(异贝壳杉烯酸羟化酶)的转录水平提高。他们认为:该酶基因的启动子可被甲基化所钝化,而春化可以去甲基化,从而使基因活化,进行表达。Metzger<sup>[24]</sup>在 $Thlaspi arvense$  L. 中的试验结果表明,低温处理促进茎的伸长是通过内源GA状态的改变而进行的。我们在白菜上的试验结果也表明,低温春化可显著提高内源GA的含量,这也是GA促进植物开花的原因之一,表明低温通过GA合成路径中基因的去甲基化诱导GA生物合成,提高内源GA水平,促进花分生组织特性基因的表达,使植物从营养生长向生殖生长转变。尽管有资料证实春化和GA促进植物开花的路径是不同的<sup>[25,26]</sup>,但以上的结果说明它们促进开花的路径具有交汇点,而且GA的作用位于春化作用的下游。

总之,春化使与开花有关的基因启动子去甲基化,启动基因的转录表达,产生新的蛋白质;GA合成路径中的一个关键酶基因即是其中之一,所以春化促进GA合成代谢增强,使GA含量提高,进而促进花分生组织特性基因的表达,促进植物的开花。有关春化过程中哪些基因的甲基化状态发生变化,它们在开花的路径中处于什么位置还需要深入的研究。低温诱导白菜开花究竟通过哪一条途径发挥作用,GA和DNA甲基化之间有什么联系,低温与它们之间的关系如何,这都有待于进一步的研究和探讨。

## 参考文献:

- 1 李秀珍,郝斌,谭克辉. 冬小麦春化过程中可溶性蛋白质组成的变化与形态发生的关系. 植物学报, 1987, 29 (5): 492~498
- 2 逯斌,谭克辉,林兵,等. 冬小麦春化过程中低温诱导的与花芽分化相关的mRNA和蛋白质的合成. 植物生理学报, 1992, 18 (2): 113~120
- 3 Burn J E, Bagnall D J, Metzger J D, et al. DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90: 287~291
- 4 种康,谭克辉,黄华燊,等. 冬小麦春化作用相关基因的cDNA分子克隆研究. 中国科学(B辑), 1994, 24 (9): 964~970
- 5 种康,谭克辉,黄华燊,等. 冬小麦春化相关基因cDNA( $verc203$ )片段序列的分析. 植物生理学报, 1997, 23 (1): 99~102
- 6 Chong K, Bao S L, Xu T, et al. Functional analysis of the  $ver$  gene using antisense transgenic wheat. Physiol. Planta, 1998, 102: 87~92
- 7 Chong K, Wang L P, Tan K H, et al. Molecular cloning and characterization of vernalization-related genes in winter wheat. Physiol. Planta, 1994, 92: 511~515
- 8 赵大中,种康,万莉,等. 冬小麦春化相关基因cDNA克隆 $Vrc79$ 的分子克隆. 植物学报, 1999, 41 (1): 34~39
- 9 Wassenaar M. RNA-directed DNA methylation. Plant Mol. Biol., 2000, 43: 203~220
- 10 Ng H H, Bird A. DNA methylation and chromatin modification. Cur. Opin. Genet. Dev., 1999, 9: 158~163
- 11 Finnegan E J, Genger R K, Kovac K. DNA methylation and the promotion by vernalization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 5824~5829

- 12 李曙轩, 寿诚学. 春化及光照对于白菜和芥菜发育的影响. 植物学报, 1957, 6 (1): 7~23
- 13 李曙轩, 李式军. 白菜的花芽分化与叶球形成. 园艺学报, 1964, (6): 36~40
- 14 张 明. 白菜核雄性不育基因的分子标记及遗传分析: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2000. 41 页
- 15 Demeulemeester M A C, Stallen N V, Proft M P D. Degree of DNA methylation in chicory influence of plant age and vernalization. Plant science, 1999, 142: 101~108
- 16 李宗霆, 周 燮. 植物激素及其免疫检测技术. 南京: 南京大学出版社, 1998. 274~278
- 17 何忠效, 张树政. 电泳. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999. 127~139
- 18 朱玉贤, 李 毅. 现代分子生物学. 北京: 高等教育出版社, 1997. 305~314
- 19 王隆华. 植物的开花生理. 见: 余叔文, 汤章诚主编: 植物生理与分子生物学. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999. 546
- 20 Blazquez M A, Green R, Nilsson O, et al. Gibberellins promote flowering of Arabidopsis by activating the LEAFY promoter. Plant Cell, 1998, 10: 791~800
- 21 孙日飞, 张淑江, 司家钢, 等. 春化和赤霉素对大白菜开花的影响. 中国蔬菜, 1999, (3): 14~17
- 22 马国华, 张启明. 赤霉素和多效唑对白鹤芋幼苗生长及诱导开花的作用. 植物生理学通讯, 1995, 31 (6): 413~415
- 23 孙兆法, 李世润, 李长生, 等. 赤霉素处理对满天星秋季生长开花的影响. 吉林蔬菜, 1997, 5: 1~2
- 24 Metzger J D. Role of gibberellins in the environmental control of stem growth in *Thlaspi arvense* L. Plant Physiol., 1988, 86: 237~240
- 25 雍伟东, 种 康, 许智宏, 等. 高等植物开花时间决定的基因调控研究. 科学通报, 2000, 45 (5): 455~466
- 26 种 康, 雍伟东, 谭克辉. 高等植物春化作用研究进展. 植物学通报, 1999, 16 (5): 481~487

## Studies on the Changes of DNA Methylation Level, GA Content and Protein in Non-heading Chinese Cabbage during Vernalization

Li Meilan<sup>1,3</sup>, Wang Qiaomei<sup>1</sup>, Zhu Zhujun<sup>1</sup>, and Zeng Guangwen<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Horticultural Department, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; <sup>2</sup> Biological Science Department, Life Science College, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; <sup>3</sup> College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030801, China)

**Abstract:** With common variety 'Youdonger' as experimental material, the effects of low temperature on flowering of non-heading Chinese cabbage were studied and the changes of DNA methylation level, gibberellin (GA) content and protein varieties were also researched during vernalization of germinated seeds and seedlings. The results showed that either germinated seeds or seedlings could be induced to flower after 4 cold treatment for 30 days. After vernalization, DNA methylation level in shoot apices under both treatment condition was decreased comparing with control plants, but GA content was increased to 2 - 3 times of control's. A specific protein with a molecular weight of 58 kD was induced during vernalization but another kind of protein disappeared. According to the results mentioned above, it implied that vernalization induced flowering of plants by either decreasing DNA methylation level or increasing GA content in shoot apical tissues.

**Key words:** Chinese cabbage; Flowering; DNA methylation; Gibberellins; Proteins

## 欢迎订阅 2003 年下列期刊

《中国农业资源与区划》是中国农科院资源区划所、全国农业资源区划办公室、中国农业资源与区划学会联合主办的综合性刊物。双月刊, 公开发行, 大 16 开, 64 页, 自办发行。每册定价 5 元, 全年 30 元。订阅款请汇寄北京海淀区中关村南大街 12 号, 中国农科院农业自然资源和农业区划研究所《中国农业资源与区划》发行组, 邮编: 100081, 帐号: 801050-14。电话 (传真): (010) 68919647, 68975316。

《中国农业信息快讯》由中国农科院农业自然资源和农业区划研究所、中国农学会农业信息学会共同主办, 国内外公开发行。月刊, 国际标准开本。本刊自办发行, 每册定价 5 元, 全年每套 60 元。订阅者请将款汇寄到北京海淀区中关村南大街 12 号, 中国农科院农业自然资源和农业区划研究所《中国农业信息快讯》杂志发行组。邮编: 100081, 帐号: 801050-14。电话 (传真): (010) 68919647, 68975316。