

贾永红,刘 聪,高 婧,等. 3 种甲基化抑制剂对苜蓿生长及愈伤诱导的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(8):27-30.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.08.006

3 种甲基化抑制剂对苜蓿生长及愈伤诱导的影响

贾永红,刘 聪,高 婧,韩丹丹,李树梅

(廊坊师范学院生命科学学院,河北廊坊 065000)

摘要:通过在培养基中添加甲基化抑制剂培养紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.) 无菌苗,观测种子萌发和生长情况,统计和分析子叶和下胚轴愈伤诱导情况,结果发现,3 种甲基化抑制剂对苜蓿种子的萌发、无菌苗的生长以及愈伤组织的形成均有不同程度的抑制效应。高浓度姜黄素完全抑制外植体愈伤的形成,而低浓度姜黄素对苜蓿种子的萌发和外植体愈伤的诱导表现某种程度的促进作用。

关键词:苜蓿;甲基化抑制剂;生长;愈伤诱导;种子萌发;无菌苗生长

中图分类号: S541⁺.904.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)08-0027-04

苜蓿(*Medicago sativa* L.) 作为牧草之王,不仅饲用价值高,在畜牧业生产中应用广泛,而且还可以加工成高蛋白人类营养保健食品,此外苜蓿富含各种维生素、矿物质及类胡萝卜素、类黄酮和酚型酸,具有良好的药用价值,全草入药,有助于人体健康的恢复;苜蓿还是防风固沙和绿化荒山的优良作物,具有很高的环保价值。苜蓿在地球上分布广泛,除野生种外,世界各国都有栽培,目前对苜蓿的遗传改良也成为一大研究热点。

DNA 甲基化(DNA methylation)是目前表观遗传学研究的热点之一,DNA 甲基化是基因组遗传信息的重要组成部分,在维持基因组稳定性、调节基因活性以及生长发育中基因的表达调控方面起重要作用^[1-2],甲基化水平过低或过高,都会影响植物生长发育和分化,导致发育和形态异常^[3]。

本研究在培养基中添加甲基化抑制剂,观察其在生长发育和再生过程中的效应,以期对苜蓿遗传改良和表观遗传研究积累基础数据。

1 材料与方 法

1.1 材料试剂

1.1.1 植物材料 中苜 1 号种子购自中国农业科学院,选取

收稿日期:2016-11-29

项目基金:廊坊师范学院大学生创新创业训练计划(国家级)(编号:201510100006);河北省高校食药应用菌应用技术研发中心项目(编号:YF201411-321);河北省化学、生物学综合人才培养创新高地项目;河北省生物学实验教学示范中心项目。

作者简介:贾永红(1969—),男,内蒙古武川人,硕士,副教授,主要从事遗传学和分子生物学教学研究。E-mail:jiayonghong168@163.com。

其无菌苗的下胚轴和子叶。

1.1.2 试剂和培养基 MS 培养基所用试剂、甘露醇、乙醇、氯化汞等均为国产分析纯试剂;植物生长调节剂、5-氮杂胞苷(5-azacytidine,5-azaC)、姜黄素均为生工生物工程(上海)股份有限公司进口分装试剂,植物生长调节剂配成 1 000 × 贮液 -20 ℃ 保存;5-azaC 和姜黄素配成 10 mmol/L 溶液 -20 ℃ 保存。

种子培养基:MS 固体培养基(含 30 g/L 蔗糖和 8 g/L 琼脂),分别添加不同浓度的甘露醇、5-azaC、姜黄素。

愈伤诱导培养基:MS + UM 有机 + 2 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L 6-BA + 30 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂粉 + 2 g/L 水解酪蛋白(UM 有机包含 10 mg/L 盐酸硫酸胺、10 mg/L 盐酸吡哆醇、5 mg/L 烟酸、2 mg/L 甘氨酸、100 mg/L 肌醇),分别添加不同浓度的甘露醇、5-azaC、姜黄素。

其中,甘露醇在灭菌前直接加入培养基中,使终浓度分别为 0、50、100、150、200 mmol/L,灭菌后使用;5-azaC 和姜黄素经抽滤灭菌后,分别在培养基灭菌后降温至 60 ℃ 以下时加入,使终浓度依次为 0、10、25、50、100 μmol/L,摇匀后分装。3 种甲基化抑制剂按浓度从低到高依次标记为 CK(0 添加)、B1、B2、B3、B4。

1.2 方法

挑选饱满无损伤的种子,流水下冲洗 30 min,在 70% 的乙醇中振荡 1 min,换入 0.1% 的氯化汞中振荡消毒 8 min,再用无菌水冲洗 5~7 次,无菌滤纸吸干表面水分后,接种于添加有不同浓度甘露醇、姜黄素和 5-azaC 的 MS 培养基上,每一种甲基化抑制剂每浓度梯度重复 4 瓶(其中 1 瓶作为备用样品,另作标记,只有当某一供试样品污染或发生异常时备用

reconstruct and visualize synteny blocks along eukaryotic chromosomes[J]. PLoS One,2014,9(3):e92621.

[23] Revanna K V, Chiu C C, Bierschank E, et al. GSV: a web-based genome synteny viewer for customized data [J]. BMC Bioinformatics,2011,12(1):316.

[24] Sullivan M J, Petty N K, Beatson S A. Easyfig: a genome comparison visualizer[J]. Bioinformatics,2011,27(7):1009-1010.

[25] Gascoyne R D, Krzywinski M, Birol I, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics[J]. 2009,

[26] Dorn R D. A synopsis of American *Salix*[J]. Canadian Journal of Botany,2011,54(24):2769-2789.

[27] Skvortsov A K. Willows of Russia and adjacent countries: taxonomical and geographical revision [M]. Joensuu: University of Joensuu Press,1999:1-307.

用样品代替),每瓶30粒左右;置于 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照度 $25 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光暗周期比为16 h : 8 h的恒温培养室中培养,每天定时观察种子萌发情况和无菌苗的长势,分别统计8 d时的发芽率、无菌苗根长度、整株鲜质量和干质量。

同法在无添加甲基化抑制剂的MS培养基中,接种苜蓿种子培养,观察无菌苗的长势,待子叶展开即可剪取子叶和下胚轴进行组织培养和愈伤诱导。

选择长势良好的5~6 d无菌苗的子叶(从基部切下)、下胚轴切段(3~5 mm)为外植体,分别接种到添加不同浓度梯度甲基化抑制剂的愈伤诱导培养基中,每一种甲基化抑制剂每一浓度梯度接种子叶外植体和下胚轴外植体各10瓶,每瓶5~8块。培养瓶置于 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照度 $25 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光暗周期比为16 h : 8 h的恒温培养室中培养,定时观察,及时清理污染的培养基,观察并记录下胚轴和子叶开始出现第1块愈伤组织的时间,并于20 d后统计下胚轴和子叶的愈伤诱导情况,计算愈伤诱导率。

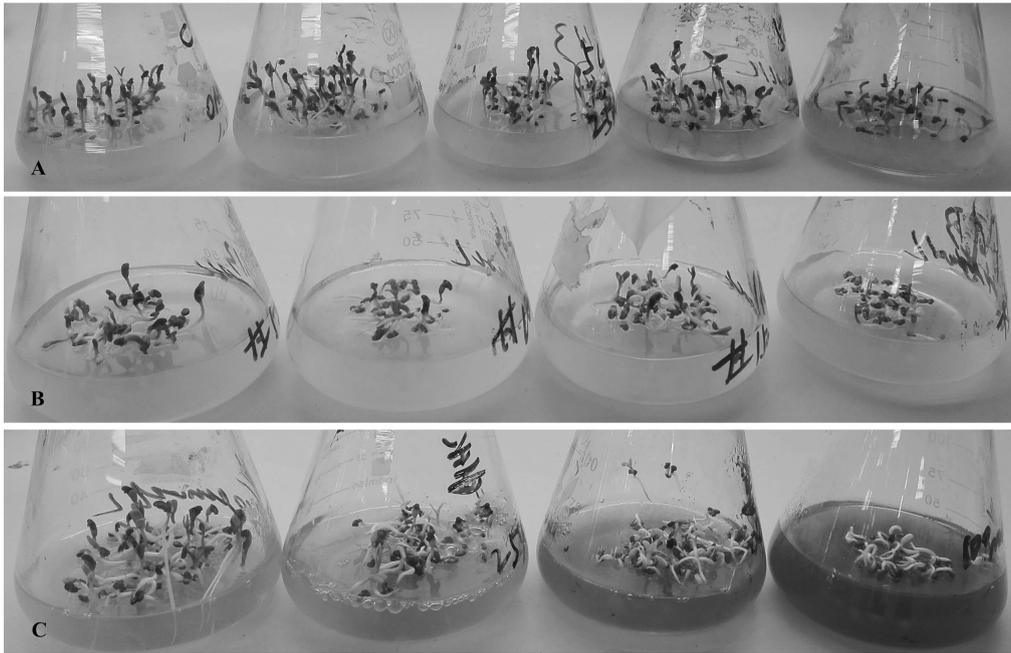


图1 添加不同甲基化抑制剂的MS培养基中苜蓿种子的萌发和生长
A从左到右依次为对照、5-azaC 10、25、50、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 添加组; B从左到右依次为甘露醇50、100、150、200 mmol/L 添加组; C从左到右依次为姜黄素10、25、50、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 添加组。

图1 添加不同甲基化抑制剂的MS培养基中苜蓿种子的萌发和生长

2.2 甲基化抑制剂对苜蓿无菌苗生长的影响

接种后8 d,可发芽的种子都已发芽成苗,部分已经长出真叶,须根极少或没有,取出无菌苗,测量每一株的根长度,每一瓶无菌苗的数量、鲜质量和干质量(80°C 烘干至恒质量),计算每一培养瓶中无菌苗的平均根长度、单株平均鲜质量和单株平均干质量,以及每一处理浓度组的平均值,结果见表1。

对各组根长数据进行方差分析,结果表明,甘露醇和5-azaC各处理组与对照组彼此差异均不显著($P > 0.05$),且苜蓿无菌苗根长未表现出随浓度变化的规律性变化,姜黄素处理组苜蓿苗根长均极显著小于对照组($P < 0.01$),10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 处理组苜蓿苗根长显著大于100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 处理组($P < 0.05$)。

各组的单株干鲜质量数据方差分析结果表明,5-azaC各处理组单株鲜质量均低于对照组,且随处理浓度变化,单株

对统计数据采用SPSS 20.0软件进行单因素方差分析,SNK法对差异达显著水平的数据进行多重比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 甲基化抑制剂对苜蓿种子萌发的影响

经消毒的苜蓿种子接种于添加有不同浓度甘露醇、姜黄素和5-azaC的MS培养基上,4~5 d即可发芽(图1),分别统计8 d时每浓度梯度各3瓶的发芽种子数和未发芽种子数,计算得到发芽率,以及每一处理组的平均发芽率(表1),利用方差分析和多重比较方法对数据进行统计学分析。结果发现,除姜黄素10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 处理组苜蓿种子发芽率极显著高于其他姜黄素浓度组和对照组外($P < 0.01$),其他甲基化抑制剂及其他各浓度处理,并未引起苜蓿种子发芽率的显著变化($P > 0.05$),只是随各种试剂浓度增加表现出发芽率降低的趋势,但差异没有统计学意义。

鲜质量呈现钟形曲线变化,但差异均无统计学意义($P > 0.05$);添加甘露醇有使无菌苗鲜质量降低的趋势,且与对照组相比达到极显著差异水平($P < 0.01$),而各处理浓度组之间苜蓿无菌苗单株鲜质量无显著差异($P > 0.05$);姜黄素的添加使苜蓿单株鲜质量极显著降低($P < 0.01$),且低浓度组(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)单株鲜质量显著大于高浓度组(50、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)($P < 0.05$),而中高浓度处理组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3种甲基化抑制剂处理得到的无菌苗单株平均干质量与对应试剂各处理组鲜质量有相似的变化趋势,但均未达到显著差异水平($P > 0.05$)。

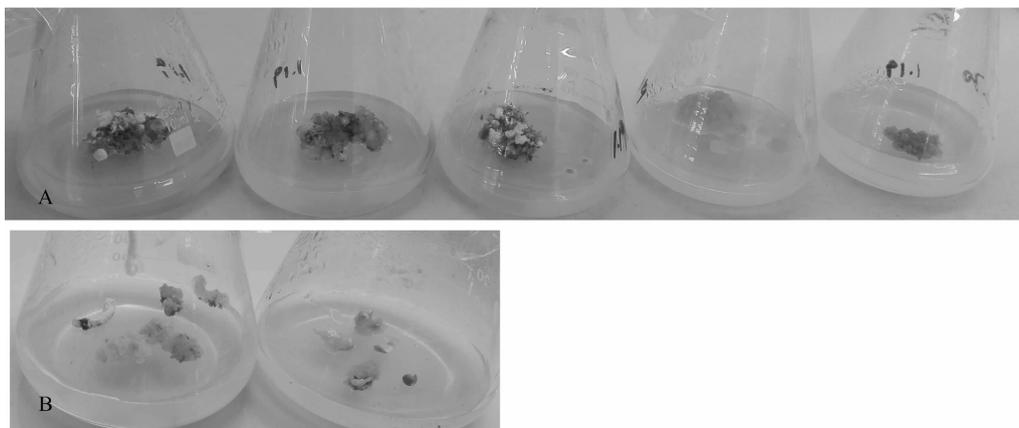
2.3 甲基化抑制剂对愈伤组织诱导的影响

分别统计下胚轴和子叶作为外植体进行愈伤诱导(图2)

表1 添加甲基化抑制剂对苜蓿生长及再生的影响

处理	种子发芽率(%)			根长(cm)			鲜质量(mg)		
	5-氮杂胞苷	甘露醇	姜黄素	5-氮杂胞苷	甘露醇	姜黄素	5-氮杂胞苷	甘露醇	姜黄素
CK	83.01 ± 2.45	83.01 ± 2.45	83.01 ± 2.45	3.75 ± 0.94	3.75 ± 0.94	3.75 ± 0.94	38.57 ± 9.93	38.57 ± 9.93	38.57 ± 9.93
B1	69.83 ± 2.86	75.03 ± 9.09	96.10 ± 3.62**	3.03 ± 0.57	3.12 ± 0.46	2.02 ± 0.15##	24.69 ± 4.07	25.01 ± 0.64##	21.55 ± 1.35##
B2	82.01 ± 9.55	74.52 ± 4.28	84.76 ± 5.77	3.03 ± 0.70	2.80 ± 0.41	1.61 ± 0.28##	31.69 ± 9.55	20.13 ± 2.44##	13.62 ± 1.18##
B3	80.16 ± 7.65	75.10 ± 18.33	78.89 ± 5.09	3.37 ± 0.26	2.84 ± 0.74	1.36 ± 0.15##	32.47 ± 4.94	16.18 ± 4.30##	10.57 ± 0.91##
B4	86.08 ± 4.19	63.04 ± 3.96	76.88 ± 6.60	2.48 ± 0.62	2.90 ± 0.41	0.89 ± 0.10##	26.33 ± 7.30	19.74 ± 2.92##	7.48 ± 0.66##
处理	干质量(mg)			下胚轴愈伤诱导率(%)			子叶愈伤诱导率(%)		
	5-氮杂胞苷	甘露醇	姜黄素	5-氮杂胞苷	甘露醇	姜黄素	5-氮杂胞苷	甘露醇	姜黄素
CK	2.02 ± 0.27	2.02 ± 0.27	2.02 ± 0.27	82.50 ± 11.89	82.50 ± 11.89	82.50 ± 11.89	35.33 ± 14.42	35.33 ± 14.42	35.33 ± 14.42
B1	2.01 ± 0.17	2.21 ± 0.03	2.06 ± 0.05	73.13 ± 23.75	84.38 ± 18.02	97.50 ± 7.07#	25.42 ± 3.65	34.69 ± 12.07	40.83 ± 21.51
B2	2.07 ± 0.12	1.72 ± 0.24	1.32 ± 1.16	53.75 ± 5.18##	65.63 ± 23.52	56.04 ± 17.88**	31.25 ± 8.63	23.33 ± 6.94	30.83 ± 13.74
B3	2.09 ± 0.33	1.75 ± 0.19	1.49 ± 0.36	45.00 ± 10.69##	67.50 ± 11.34	33.13 ± 14.13**	23.33 ± 7.07	27.19 ± 5.85	13.33 ± 10.04
B4	1.92 ± 0.19	1.46 ± 0.66	0.97 ± 0.74	28.75 ± 6.94**	50.00 ± 18.90**	0.00 ± 0.00**	21.04 ± 3.56#	23.39 ± 10.45	0.00 ± 0.00**

注:CK为对照组,对于5-azaC和姜黄素B1、B2、B3、B4分别为10、25、50、100 μmol/L,对于甘露醇B1、B2、B3、B4分别为50、100、150、200 mmol/L;“*”“**”“***”分别表示与对照组和其他试验组相比在0.05、0.01水平上差异显著、极显著;“#”“##”分别表示与对照组相比在0.05、0.01水平上差异显著、极显著。



A从左到右依次为对照、5-azaC 10、25、50、100 μmol/L添加组中下胚轴愈伤;
B分别为5-azaC 25 μmol/L添加组下胚轴和子叶的愈伤组织

图2 添加甲基化抑制剂苜蓿外植体的再生

的数据,由表1可知,经方差分析和多重比较,结果表明,添加5-azaC后,下胚轴愈伤诱导率呈现随添加浓度升高而降低的趋势,除低浓度(10 μmol/L)处理组与对照组差异不显著外($P > 0.05$),中高浓度(25~100 μmol/L)处理组下胚轴愈伤诱导率极显著低于对照组($P < 0.01$),100 μmol/L处理组下胚轴愈伤诱导率显著或极显著低于对照组和其他处理浓度组($P < 0.05$);添加甘露醇除高浓度(200 mmol/L)处理组下胚轴愈伤诱导率极显著低于对照组和低浓度(50 mmol/L)处理组外($P < 0.01$),其余各处理组及对照组间均无显著差异($P > 0.05$);添加低浓度(10 μmol/L)姜黄素可促进下胚轴愈伤组织的形成,愈伤诱导率显著高于对照组($P < 0.05$),但随添加浓度的增加,下胚轴愈伤诱导率急剧降低,直至高浓度(100 μmol/L)完全抑制愈伤组织的形成,各浓度梯度间呈现出极显著差异($P < 0.01$)。

添加5-azaC使子叶愈伤诱导率呈现降低趋势,但除高浓度处理组(100 μmol/L)显著低于无添加的对照组外($P < 0.05$),其余各处理组间相比均无显著差异($P > 0.05$);添加甘露醇也使子叶愈伤诱导率呈现降低趋势,但无统计学意义($P > 0.05$);添加姜黄素诱导子叶愈伤组织,也呈现出与下胚

轴愈伤诱导相似的倾向,同样在高浓度完全不能诱导产生愈伤组织,对照组、低浓度组(10 μmol/L)和中浓度组(25 μmol/L)三者之间愈伤诱导率均无显著差异($P > 0.05$),三者愈伤诱导率极显著高于高浓度(50~100 μmol/L)添加组($P < 0.01$)。

3 讨论

DNA甲基化能够导致植物表观形态改变,形成可遗传的表型性状^[4]。DNA甲基化水平的升高或降低对植物的一些重要性状会产生极为重要的影响。非生物胁迫能够造成全基因组或特定定位点胞嘧啶甲基化水平的升高或降低^[3,5],甚至会影响植物的免疫抗性^[6]。

5-azaC是一种研究和应用较多的DNA甲基化抑制剂,可以降低基因组甲基化水平^[7]。5-azaC还可发挥植物生长调节剂效应,诱导植物开花^[8-9]。研究表明,5-azaC使紫花苜蓿幼苗高度和干质量、鲜质量降低^[10],虽未发现基因甲基化状态明显改变,但高浓度的5-azaC会抑制愈伤组织的增殖和再分化^[11]。本研究结果也表明,添加5-azaC使无菌苗根长和单株平均鲜质量下降,但未达到显著差异水平;而在离体组织培养中,愈伤诱导率随5-azaC添加浓度的增加而逐

渐降低,甚至呈现出极显著差异,支持 Brown 等的结论^[11]。

姜黄素 (curcumin) 对 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase, DNMT1) 有明显的抑制作用,是最新发现的一类甲基化抑制剂,用于白血病细胞株系基因组 DNA 的研究,发现浓度为 3.0 ~ 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素可导致 DNA 甲基化水平降低 15% ~ 20%^[12],此外姜黄素具有清除自由基、抑菌抗炎、抗增殖、抗肿瘤等广泛的药理作用^[13-14]。本研究结果表明,低浓度姜黄素可提高苜蓿种子发芽率,也可提高离体子叶和下胚轴的愈伤诱导率,但随姜黄素添加浓度升高愈伤诱导率急剧下降,至浓度升高到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,完全不形成愈伤;同时添加姜黄素使苜蓿无菌苗根长和鲜质量随其添加浓度增加而迅速下降,甚至达到显著或极显著差异水平。

甘露醇 (mannitol) 常被用作组织液吸收剂,作为植物组织或细胞培养的水分胁迫因子,是一种植物组织相容性物质。有研究发现,甘露醇处理能明显地提高大麦花粉粒存活率和质量,有利于进一步分裂形成愈伤组织和胚状体;还能明显提高大麦花药培养愈伤组织诱导率、绿苗分化率及绿苗产量^[15-18]。植物组织培养中添加一定浓度的甘露醇可以抑制植物的生长,高渗透胁迫能够影响植物 DNA 甲基化状态^[19],甘露醇处理影响 DNA 甲基化水平和模式改变,呈现表观遗传变异。有研究表明,甘露醇处理使拟南芥幼苗基因组 DNA 的甲基化状态发生了不同程度的变化,50 ~ 200 mmol/L 甘露醇可使拟南芥基因组 CCGG 位点发生双链半甲基化 (mCCGG) 以至双链全甲基化 (CmCCGG),浓度 375 mmol/L 以上甘露醇处理组幼苗全部死亡^[20]。本研究结果也显示,添加甘露醇使苜蓿种子发芽率、无菌苗根长、单株鲜质量和干质量呈下降趋势,但只有单株鲜质量有统计学意义;高浓度的甘露醇还可极显著降低苜蓿下胚轴的愈伤形成,对苜蓿子叶影响较为温和。

由此可见,3 种甲基化抑制剂均可不同程度地对苜蓿种子的萌发、无菌苗的生长以及愈伤组织形成产生抑制效应,其中高浓度姜黄素对苜蓿无菌苗的生长以及外植体愈伤诱导的抑制效应最为突出,然而其低浓度又对苜蓿种子的萌发和外植体愈伤的诱导表现某种程度的促进作用。

参考文献:

- [1] Finnegan E J, Kovac K A. Plant DNA methyltransferases [J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 43 (2/3): 189 - 201.
- [2] Finnegan E J, Peacock W J, Dennis E S. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2000, 10 (2): 217 - 223.
- [3] Bender J. DNA methylation and epigenetics [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55 (1): 41 - 68.
- [4] Chwialkowska K, Nowakowska U, Mrozwicz A, et al. Water - deficiency conditions differently modulate the methylome of roots and leaves in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67 (4): 1109 - 1121.
- [5] Lukens L N, Zhan S H. The plant genome's methylation status and response to stress; implications for plant improvement [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10 (3): 317 - 322.
- [6] Deleris A, Halter T, Navarro L. DNA methylation and demethylation in plant immunity [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2016, 54 (1): 579 - 603.
- [7] Baubec T, Pecinka A, Rozhon W, et al. Effective, homogeneous and transient interference with cytosine methylation in plant genomic DNA by zebularine [J]. *Plant Journal*, 2009, 57 (3): 542 - 554.
- [8] Burn J E, Bagnall D J, Metzger J D, et al. DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90 (1): 287 - 291.
- [9] 李梅兰, 曾广文, 朱祝军. 5 - 氮胞苷 (5 - azac) 和赤霉素 (GA_3) 对白菜开花的影响 [J]. *上海交通大学学报 (农业科学版)*, 2002, 20 (2): 125 - 128, 136.
- [10] Al - Lawati A, Al - Bahry S, Victor R, et al. Salt stress alters DNA methylation levels in alfalfa (*Medicago* spp) [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2016, 15 (1): 15018299.
- [11] Brown P T, Yoneyama K, Lorz H. An investigation into the role of 5 - azacytidine in tissue culture [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1989, 78 (3): 321 - 328.
- [12] Liu Z, Xie Z, Jones W, et al. Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19 (3): 706 - 709.
- [13] Menon L G, Kuttan R, Kuttan G. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds [J]. *Cancer Letters*, 1995, 95 (1/2): 221 - 225.
- [14] Li W J, Pung D, Su Z Y, et al. Epigenetics reactivation of Nrf2 in prostate TRAMP C1 cells by curcumin analog FN1 [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2016, 29 (4): 694 - 703.
- [15] 郭向荣, 方红曼, 李安生, 等. 甘露醇预处理方式、方法对大麦花粉植株再生的影响 [J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7 (4): 321 - 324.
- [16] 李文泽, 景健康, 姚根怀, 等. 基因型和甘露醇预处理对大麦花粉植株高频率再生的影响 [J]. *科学通报*, 1992, 37 (10): 935 - 938.
- [17] Cistué L, Ramos A, Castillo A M, et al. Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol [J]. *Plant Cell Reports*, 1994, 13 (12): 709 - 712.
- [18] 刘辉, 卢翠华, 邱宏, 等. 甘露醇预处理对马铃薯花药愈伤诱导率和褐化率的影响 [J]. *中国马铃薯*, 2009, 23 (1): 19 - 21.
- [19] Tan M P. Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation - sensitive amplified polymorphism [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48 (1): 21 - 26.
- [20] 杜亚琼, 王子成. 甘露醇对拟南芥基因组 DNA 甲基化的影响 [J]. *植物学报*, 2011, 46 (3): 285 - 292.