

蓝莓花芽休眠与解除过程中生理生化变化及DNA甲基化差异分析

李波, 夏秀英*, 刘思

大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁大连116024

摘要: 以‘伯克利’蓝莓花芽为材料, 研究了其在内休眠及解除休眠过程中部分生理生化指标的变化, 并对内休眠与解除休眠花芽进行了基因组DNA甲基化敏感扩增多态性(methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP)分析。结果显示, 蓝莓花芽中脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白含量及SOD、POD活性的变化趋势与休眠进程密切相关。内休眠期间, 脯氨酸含量呈先降后升的趋势, 可溶性糖含量及POD活性持续上升, 可溶性蛋白含量及SOD活性持续下降; 随着休眠开始解除, 可溶性糖、可溶性蛋白含量及SOD活性均上升, 而POD活性下降。MSAP分析表明, 蓝莓花芽内休眠期间, DNA甲基化水平较高, 并以全甲基化为主; 内休眠花芽总甲基化率(38.41%)、全甲基化率(27.09%)及半甲基化率(11.32%)均明显高于解除休眠花芽; 相对于内休眠花芽, 解除休眠花芽约84.48%的位点发生了甲基化模式变化, 其中去甲基化位点数和比例分别为248和40.52%, 超甲基化的位点数和比例分别为185和30.23%。DNA甲基化参与了蓝莓内休眠的调控。

关键词: 蓝莓; 休眠; 生理生化特性; DNA甲基化; 甲基化敏感扩增多态性

Changes in Physiological and Biochemical Properties and Variation in DNA Methylation Patterns during Dormancy and Dormancy Release in Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.)

LI Bo, XIA Xiu-Ying*, LIU Si

School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China

Abstract: Changes in soluble sugar and protein contents, superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) activities in floral buds of ‘Berkeley’ were studied during dormancy period. The results indicated that the proline content showed a rising trend after an initial drop, the soluble sugar content and the POD activity continued to rise, the soluble protein content and SOD activity continued to decline during endodormancy. With the beginning of dormancy release, the soluble sugar and protein contents, the SOD activity increased, while the POD activity decreased. DNA methylation patterns were subsequently analyzed by methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) technology with 56 pairs of primer. The results showed that the level of methylation in dormant buds was high, among which full methylation was dominant. The levels of total DNA methylation, hemi-methylation and fully methylation were down-regulated during bud dormancy release. About 84.48% methylation loci varied during dormancy release when compared with dormancy, among which DNA demethylation loci were 248 with percentages of 40.52%, DNA hypermethylation loci were 185 with percentages of 30.23%. The results implied that DNA methylation is involved in the regulation of the dormancy in blueberries.

Key words: blueberry; dormancy; physiological and biochemical characteristics; DNA methylation; methylation sensitive amplified polymorphism

芽休眠是指植物生活史中芽生长暂时停顿的现象, 是植物经过长期演化而获得的一种对环境及季节性变化的生物学适应(Anderson等2001)。落叶果树芽的自然休眠是为抵御冬季的低温环境。自然条件下, 进入休眠的植株需要经过一定时间的低温积累才能解除休眠、正常萌发生长, 低温不足, 芽萌发及树体生长发育会出现障碍或异常, 严重影响果树生产(Arora等2003)。芽休眠

是温暖地区落叶果树栽培和设施果树生产的主要限制因子之一(李宪利等2001)。对芽休眠及解除机制进行系统研究, 对于开发有效的人工破眠技术, 实现落叶果树可控栽培有重要意义。

收稿 2015-04-13 修定 2015-06-04

资助 辽宁省农业科技创新团队项目(2014204007)。

* 通讯作者(E-mail: xx47@dlut.edu.cn; Tel: 0411-84706356)。

目前,已从生物学及解剖结构特性、生理生化变化、活性氧代谢、差异表达基因等多个角度对芽休眠的机制进行了研究。表明,低温可以诱导植物体内某些基因的表达,恢复细胞间的信号转导,是诱导芽休眠发生和解除的关键因素(Rinne等2011)。碳水化合物代谢、活性氧代谢及多胺等激素的代谢与休眠的诱导、维持及解除密切相关(田莉莉等2006; Noriega等2007; 张昂等2012; 冯晶红等2013)。Ca²⁺可传递环境信号,在诱导芽自然休眠和维持芽的深度休眠中具有重要的作用(王孝娣等2008)。休眠芽内H₂O₂信号和Ca²⁺信号相关联,可能在高温和单氰胺打破休眠的信号转导中起重要作用(谭钺等2015)。碳水化合物代谢、种子脱水、信号转导、衰老等多条代谢途径相关基因可能都参与了休眠的调控(郑鹏华等2013; Wang等2014)。

DNA甲基化(DNA methylation)是最重要的表观遗传修饰形式之一,与植物的生长发育、防御、逆境胁迫等生命活动密切相关,在植物体的整个生命过程都发挥着重要调节作用(Boyko和Kovalchuk 2008; Tang等2014; 李青芝等2014)。研究表明,DNA甲基化在调节芽休眠的过程中可能也起着重要调控作用。Finnegan等(1998)的研究表明,DNA甲基化可以调节春化作用促进开花。Law和Suttle (2002)的研究发现,马铃薯块茎休眠诱导和解除过程中伴随着强烈的DNA甲基化过程。盖树鹏等(2012)的研究表明,牡丹内休眠期间花芽内DNA甲基化程度很高,甲基化位点占总位点比率的60%以上,在低温处理进程中,甲基化水平呈下降趋势,与未经低温的对照相比,约50%的位点发生了甲基化模式变化,DNA甲基化参与了牡丹内休眠的调控。

蓝莓,学名越橘,属于杜鹃花科越橘属(*Vaccinium* spp.)小浆果果树,其果实中抗氧化物质花色苷的含量在众多果蔬中高居榜首(Prior等2001),在抗衰老、抗癌及提高免疫力等方面具有明显的功效。近年来,蓝莓鲜果市场需求不断增加。但由于对蓝莓芽休眠及其解除机制认识不足,栽培生产中往往出现引种失败、花芽休眠解除不彻底、产量低、设施栽培技术落后等问题,限制了蓝莓的栽培及推广,严重影响了蓝莓产业的发

展。目前,我国尚未开展蓝莓芽休眠及其调控的相关研究。

本研究以蓝莓品种‘伯克利’为材料,检测了花芽休眠及解除过程中的可溶性糖及可溶性蛋白含量、抗氧化酶活性等的变化,并对处于内休眠及解除休眠时期的花芽进行了甲基化敏感扩增多态性(methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP)分析,以了解芽休眠及解除进程中的生理生化及DNA甲基化变化,为全面理解蓝莓芽休眠及解除的机理,并在此基础上开发有效人工破眠技术提供新的证据及思路。

材料与方法

1 材料

实验用蓝莓学名高丛越橘(*Vaccinium corymbosum* L.)品种为‘伯克利’(‘Berkeley’),材料采集于大连市城子坦地区蓝莓种植基地10年生树,试验期间未进行修剪和化学药剂处理。

2 萌芽率统计

采集带有饱满、健康花芽的蓝莓枝条,置于装有清水的玻璃瓶中,以淹没基部2~3 cm为宜,立即放入培养室中培养,培养条件为:光周期12 h·d⁻¹,光照强度320 μmol·m⁻²·s⁻¹;温度(25±3) °C;空气相对湿度75%。每隔2 d换一次水,同时剪去基部少许,露出新茬。培养3周后统计萌芽率,以花芽顶端露绿为萌芽标准。当水培枝条第1个芽萌发时间≥10 d时,判定该枝条进入内休眠(王海波等2009);萌芽率≥50%时的采样日期为内休眠解除的日期(郑鹏华等2013)。每处理3个枝条,重复3次。

3 生理生化指标测定

可溶性糖含量、可溶性蛋白含量、脯氨酸含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性测定方法参照植物生理学实验教程(路文静和李奕松2012)。测定使用材料均为蓝莓花芽。

4 DNA提取

采用天根生化科技(北京)有限公司的试剂盒(DP 305)提取内休眠及解除内休眠的蓝莓花芽基因组DNA。得到的DNA用ddH₂O溶解,经1%琼脂糖凝胶电泳及NanoDrop 2000超微量分光光度计检测,-20 °C保存备用。

5 甲基化敏感扩增多态性(MSAP)分析

参考Xiong等(1999)的方法进行酶切、连接、PCR扩增及电泳, 对分析过程中的关键步骤进行了优化。MSAP分析采用的接头序列、预扩增引物

及选择性扩增引物见表1。接头和引物均由生物工程(上海)有限公司合成。试验所用*Ex Taq* DNA polymerase购自TaKaRa (大连)公司, T_4 DNA Ligase、限制性内切酶购自Thermo公司。

表1 MSAP分析所用接头跟引物序列表

Table 1 Adapters and primers used in MSAP analysis

引物类型	引物名称及碱基序列(5'→3')	
	<i>EcoRI</i> (E)	<i>HpaII/MspI</i> (H/M)
接头	EA1 CTCGTAGACTGCGTACC EA2 AATTGGTACGCAGTC	HMA1 GATCATGAGTCCTGCT HMA2 TCATGATCCTGCTCG
预扩增引物	E GTAGACTGCGTACCAATTCA	HM ATCATGAGTCCTGCTCGG
选择性扩增引物	E1 GTAGACTGCGTACCAATTCAAC E2 GTAGACTGCGTACCAATTCACT E3 GTAGACTGCGTACCAATTCAACA E4 GTAGACTGCGTACCAATTCAATC E5 GTAGACTGCGTACCAATTCAAGC E6 GTAGACTGCGTACCAATTCAAG E7 GTAGACTGCGTACCAATTCAACC E8 GTAGACTGCGTACCAATTCAAG	HM1 ATCATGAGTCCTGCTCGGAG HM2 ATCATGAGTCCTGCTCGGCCA HM3 ATCATGAGTCCTGCTCGGTGC HM4 ATCATGAGTCCTGCTCGGTAG HM5 ATCATGAGTCCTGCTCGGTCA HM6 ATCATGAGTCCTGCTCGGTCAA HM7 ATCATGAGTCCTGCTCGGTCCA

对2组DNA分别进行*EcoRI/HpaII*和*EcoRI/MspI* 2个组合酶切。酶切反应体系20 μ L, 含基因组DNA 600 ng, *EcoRI* 10 U, *HpaII*或*MspI* 10 U, $10\times$ Tango Buffer 2 μ L。37 $^{\circ}$ C酶切6 h。反应结束后, 用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果。随后进行接头连接, 反应体系30 μ L, 含双酶切产物20 μ L, *HpaII/MspI*接头HMA1、HMA2各50 pmol, *EcoRI*接头EA1、EA2各50 pmol, T_4 DNA Ligase 1 U, $10\times T_4$ DNA Ligase Buffer 3 μ L。16 $^{\circ}$ C连接12 h。连接产物稀释5倍后进行预扩增。预扩增体系25 μ L, 含连接产物稀释液3 μ L, *EcoRI*预扩增引物E 10 pmol, *HpaII/MspI*预扩增引物HM 10 pmol, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 2 μ L, TaKaRa *Ex Taq* 1 U。预扩增反应程序为94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 20个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。反应结束后, 将预扩增产物稀释5倍用于选择性扩增, 反应体系20 μ L, 含预扩增产物稀释液2 μ L, 选择性扩增引物10 pmol, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 2 μ L, TaKaRa *Ex Taq* 1 U。反应程序为94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C (每个循环下降1 $^{\circ}$ C) 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共10个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。选择扩增产物变性后, 取8 μ L进行6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后硝酸银染色观察。

电泳结果中, *EcoRI/MspI*酶切泳道记作M, *EcoRI/HpaII*酶切泳道记作H, 对M及H泳道条带数及带型进行统计, 在同一位点, 有带和无带分别记为“1”和“0”。

实验结果

1 ‘伯克利’蓝莓花芽休眠进程的确定

以花芽萌发率判断休眠阶段(图1)。观察发现, 2013年10月15日采集的花芽萌芽率为85.16%, 此后萌芽率持续降低, 表明已进入休眠诱导时期。11月15日采集的花芽, 第1芽13 d萌发, 大于10 d, 表明花芽已开始进入内休眠。随着温度继续降低及日照长度变短, 花芽休眠程度进一步加深。11月22日采集的花芽完全不能萌发, 表明此时花芽休眠程度最深。12月14日采集的花芽萌芽率开始升高, 12月30日采集的花芽萌芽率已达到98%, 表明内休眠已经完全解除。认为在本实验年度, 蓝莓‘伯克利’10月30日开始进入休眠诱导状态, 11月15日至12月15日期间, 蓝莓花芽处于内休眠时期, 休眠不能被人工打破。12月30日内休眠完全解除。分别用12月15日及12月30日采集的花芽作为内休眠及解除休眠的材料, 用于MSAP分析。

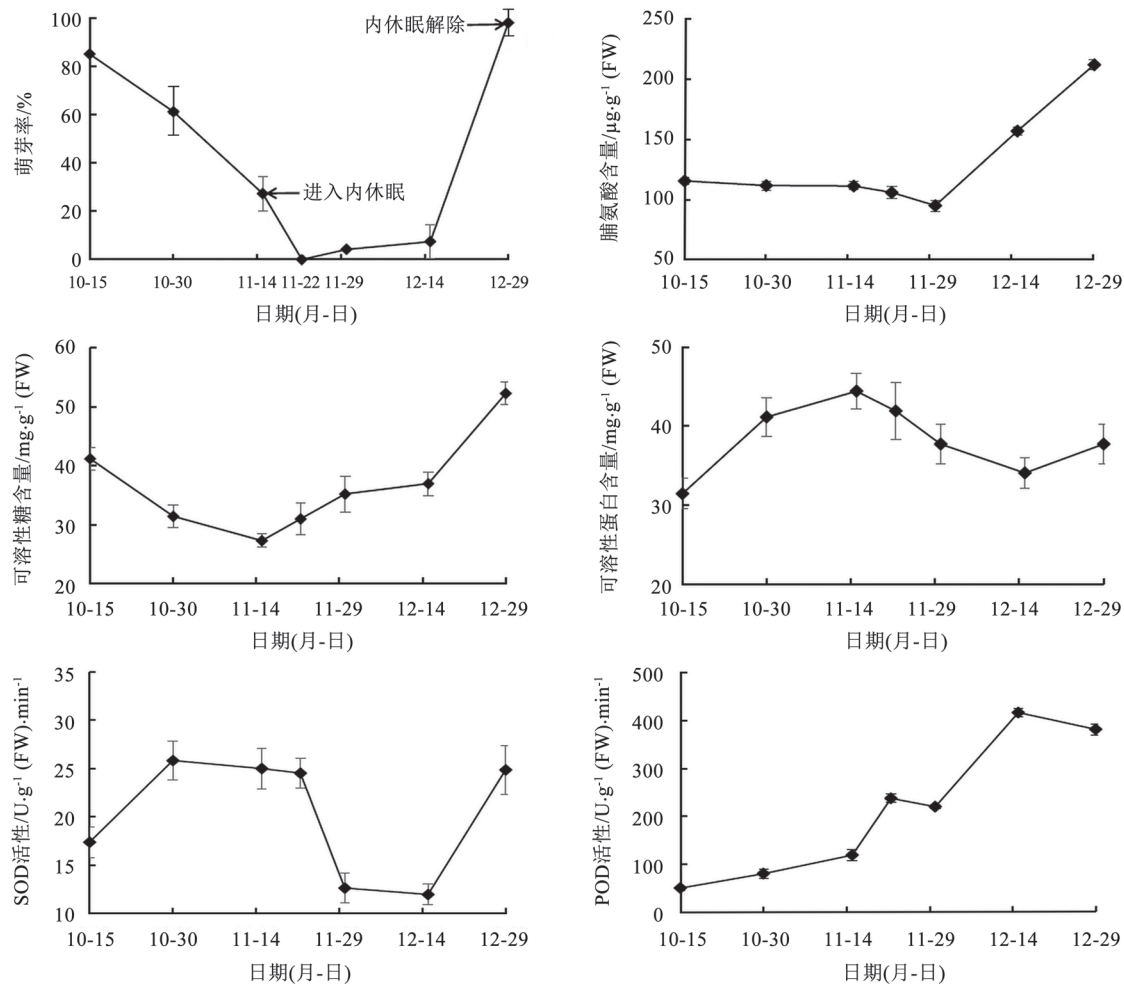


图1 休眠进程的确定及生理生化变化

Fig. 1 Determination of the dormancy process and detection of physiological and biochemical changes

2 ‘伯克利’蓝莓花芽休眠及解除期间生理生化变化

脯氨酸含量在诱导休眠及内休眠的前期呈下降趋势,内休眠后期开始急剧上升,一直持续到休眠解除之后(图1)。

在整个休眠期间,可溶性糖含量的变化趋势与可溶性蛋白相反(图1)。在诱导休眠期,可溶性糖含量下降,可溶性蛋白含量上升;进入内休眠时,芽体内可溶性糖含量最低,可溶性蛋白含量最高;在整个内休眠期可溶性糖含量持续上升,可溶性蛋白含量持续下降。在休眠开始解除时,可溶性蛋白及可溶性糖含量的变化趋势变得一致,均上升。

在两种抗氧化酶中,SOD活性在内休眠期一直呈下降趋势,在内休眠解除前降到最低,而在内休眠解除后急剧上升,这与邵浩和马锋旺(2004)在梨树中的研究结果一致。POD活性在整个内休眠

期间一直呈上升趋势,在内休眠解除前升至最高,内休眠完全解除后下降。表明低的SOD活性、高的POD活性有利于解除蓝莓花芽休眠,促使花芽萌发。这与张昂等(2012)在葡萄中的研究相同。

3 内休眠及解除休眠期‘伯克利’花芽DNA甲基化水平变化分析

*HpaII*和*MspI*均能识别并切割5'-CCGG-3'序列,但对于不同甲基化状态的敏感性不同。*HpaII*能够识别并切割单链甲基化位点;*MspI*对全甲基化的内部胞嘧啶敏感。基因组DNA经过*EcoRI*/*HpaII* (H)和*EcoRI*/*MspI* (M)酶切后通常产生4种带型。类型I: M、H两条泳道均有带,说明无甲基化发生,代表非甲基化位点;类型II: H泳道有带而M泳道无带,表明单链DNA发生甲基化,代表半甲基化位点;类型III: H泳道无带而M泳道有带,表明双

链DNA内侧发生甲基化,代表全甲基化位点;类型IV:两泳道均无带,为双链DNA外侧发生甲基化。在聚丙烯酰胺凝胶电泳中只能检测到前3种甲基化类型。

选择8个*EcoRI*选择性扩增引物和7个*HpaII*/*MspI*选择性扩增引物形成56对引物组合,对两种休眠状态的蓝莓花芽基因组DNA进行扩增(部分引物组合扩增结果如图2)。内休眠花芽共产生539条清晰可辨的条带,在全部扩增条带中检测到总甲基化位点207个,总甲基化率为38.41%。其中全

甲基化位点146个,全甲基化率为27.09%;半甲基化位点61个,半甲基化率为11.32%(表2)。解除休眠蓝莓花芽共扩增产生438条清晰可辨的条带,检测到总甲基化条带113条,总甲基化率为25.80%。其中,全甲基化条带73条,全甲基化率为16.67%;半甲基化条带40条,半甲基化率为9.13%(表2)。表明,蓝莓内休眠及解除休眠花芽基因组DNA全甲基化水平高于半甲基化水平;内休眠时期,蓝莓花芽的DNA甲基化水平较高,以全甲基化为主;解除休眠过程中,蓝莓花芽DNA甲基化水平降低。

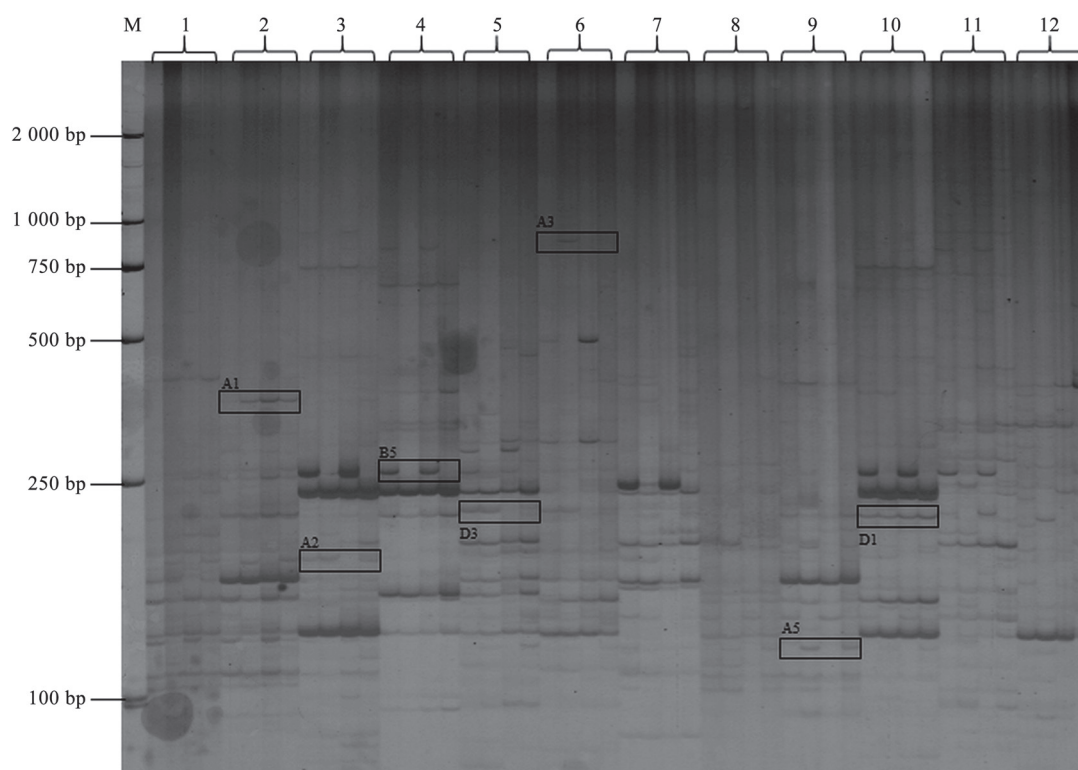


图2 内休眠及解除休眠蓝莓花芽甲基化敏感位点扩增电泳结果

Fig.2 Examples of MSAP profiles in blueberry floral bud during endodormancy and dormancy release

1~12为12对选择性扩增引物;每组引物从左至右4条泳道依次为内休眠花芽DNA经*MspI*/*EcoRI*酶切、解除休眠花芽DNA经*MspI*/*EcoRI*酶切、内休眠花芽DNA经*HpaII*/*EcoRI*酶切、解除休眠花芽DNA经*HpaII*/*EcoRI*酶切;A1、A2、A3、A5、B5、D1、D3为基因组DNA不同的甲基化模式(表3);M: DL2000 DNA Marker。

表2 蓝莓不同休眠状态基因组DNA的甲基化水平

Table 2 The degree of genomic DNA methylation of different dormancy period of blueberry

休眠状态	类型I	类型II	类型III	甲基化水平			
				总扩增带数	总甲基化条带数 及比例	完全甲基化带数 及比例	半甲基化带数 及比例
内休眠	332	61	146	539	207 (38.41%)	146 (27.09%)	61 (11.32%)
解除休眠	325	40	73	438	113 (25.80%)	73 (16.67%)	40 (9.13%)

4 内休眠及解除休眠期‘伯克利’花芽DNA甲基化模式变化分析

56对引物共扩增出15种带型(表3, 图2), 分多态性和单态性2种。单态性指内休眠花芽与解除休眠花芽间有相同的带型, 表明甲基化模式没有改变, 此类位点共有95个, 占总位点数的15.52% (表4, D型), 即在内休眠和解除休眠过程中15.52%的位点的甲基化模式保持不变。多态性是指内休眠与解除休眠花芽中的DNA甲基化模式不同, 此类位点共有517个, 占总位点数的84.48%。在多态性变异类型中, 发生去甲基化(表4, A型)的位点数

为248个, 占总位点的40.52%, 比例最高, 表明解除休眠的花芽中基因组在这些位点发生了去甲基化; 发生超甲基化(表4, B型)的位点数为185个, 占总位点的30.23%, 表明解除休眠的花芽中基因组在这些位点发生了甲基化; 发生不定型改变(表4, C型)的位点数为84个, 占总位点数的13.73%, 表明这些位点在解除休眠花芽中甲基化水平呈现上升或降低的趋势。可见, 花芽解除休眠过程中同时发生甲基化和去甲基化, 但发生去甲基化的机率明显大于发生甲基化的机率。

表3 蓝莓不同休眠状态基因组DNA甲基化模式种类

Table 3 The variety of genomic DNA methylation patterns of different dormancy period of blueberry

休眠状态		甲基化模式														
		A型					B型					C型		D型		
		A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	D1	D2	D3
内休眠	M	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
	H	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
解除休眠	M	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
	H	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0

H和M分别代表HpaII/EcoRI和MspI/EcoRI酶切; 1: 有带, 0: 无带。

表4 蓝莓不同休眠状态基因组DNA的甲基化模式比例

Table 4 The ratio of patterns of genomic DNA methylation of different dormancy period of blueberry

种类	条带类型		差异条带数	各类型差异条带总数	比例/%
	内休眠	解除休眠			
A1	II	I	131	248	40.52
A2	III	I	44		
A3	IV	II	28		
A4	IV	III	40		
A5	IV	I	5		
B1	I	II	36	185	30.23
B2	I	III	40		
B3	II	IV	62		
B4	III	IV	7		
B5	I	IV	40		
C1	III	II	29	84	13.73
C2	II	III	55		
D1	I	I	66	95	15.52
D2	II	II	22		
D3	III	III	7		

讨 论

抗冻性发展和芽休眠是木本植物越冬的重要

生理过程, 涉及到一系列复杂的生理生化反应和信号转导过程。脯氨酸作为细胞渗透压的重要调

节物质,其含量的增长是植物自身对抗逆境的一种手段。脯氨酸含量在蓝莓休眠进程中呈现有规律的变化,在进入内休眠期呈下降趋势,在内休眠后期开始急剧上升,一直持续到内休眠解除之后。碳水化合物是休眠期间生命活动的主要能量来源,蔗糖和葡萄糖等可溶性碳水化合物不但可以提高低温下的渗透调节作用,增强植株抵御低温的能力,又在植物的信号转导中起着重要作用。高东升等(1999)研究发现,低温条件下淀粉的降解和可溶性糖的增加标志着内休眠的结束。杨秀苹(2004)认为,戊糖磷酸途径的增加可能是内休眠解除的重要原因。王海波等(2009)发现桃芽中淀粉和可溶性糖含量变化趋势与其内休眠进程密切相关。与这些研究结果相似,本研究中,在诱导休眠期,蓝莓花芽可溶性糖含量下降,并在进入内休眠时降至最低,随后,在整个内休眠期及解除休眠期,可溶性糖含量持续上升。蛋白质可以参与多种生命活动,田莉莉等(2006)认为蛋白质水解后产生的游离氨基酸分别以不同的途径进入呼吸代谢,休眠解除过程中可溶性蛋白含量增加可能与休眠解除后呼吸代谢途径的改变有关。贺润平等(2006)认为内休眠可能使蛋白质的合成受阻或者影响了RNA的翻译,当自然休眠接近解除时,蛋白质的合成能力变强。本研究中,在诱导休眠期,蓝莓可溶性蛋白含量上升,在进入内休眠时升至最高,随后,可溶性蛋白含量持续下降,在内休眠开始解除时,可溶性蛋白含量再次上升。可见,蓝莓花芽内脯氨酸、可溶性糖及可溶性蛋白含量随休眠进程呈现有规律的变化,推测,蓝莓响应外界温度及光周期的变化后,调节代谢,通过增加渗透调节物质含量、改变信号分子种类及含量或改变呼吸作用途径等方式,发展其抗冻性,并诱导芽体进入休眠状态或适时解除休眠,以适应外界环境变化。渗透调节物质、可溶性糖及可溶性蛋白参与了蓝莓芽休眠的诱导、维持及解除。

许多研究表明 H_2O_2 含量和抗氧化酶活性变化与休眠的解除紧密相关(高东升等2002; 韩浩章等2007; 张昂等2012; 谭钺等2015)。Pérez等(2008)发现 H_2O_2 能促进葡萄芽休眠的解除。自然低温、氰胺和硫脲等破眠剂在打破休眠的过程中都能降低芽内过氧化氢酶(CAT)活性或诱导 H_2O_2 增加(Nir等

1986; Or等2000)。对马铃薯块茎的研究表明,外施 H_2O_2 、抑制CAT活性或降低CAT基因表达都具有破眠作用(Bajji等2007)。SOD、POD是抗氧化酶系统中的主要成员,在活性氧代谢及平衡中起到非常重要的作用。SOD可催化生物体内超氧阴离子自由基通过歧化反应生成 H_2O_2 和 H_2O ,POD可将 H_2O_2 催化还原为水。在蓝莓花芽内休眠及解除进程中,SOD活性与POD活性变化趋势正好相反,SOD在休眠诱导期及内休眠期一直呈下降趋势,而在内休眠解除后急剧上升;POD活性在内休眠期间一直呈上升趋势,内休眠解除后下降。表明低的SOD活性、高的POD活性有利于解除蓝莓花芽休眠,促使花芽萌发。推测蓝莓通过调节SOD、POD等抗氧化酶的活性,改变 H_2O_2 的含量来调节休眠进程, H_2O_2 参与调控蓝莓花芽休眠的维持及解除。

DNA甲基化在植物的生长发育过程中起着重要的调控作用。通常情况下,基因的甲基化会抑制其表达,而去甲基化会导致其转录水平的增加,从而促进表达(Kovarík等1997)。在同一组织的不同发育阶段,基因组DNA的甲基化水平和模式存在差异。盖树鹏等(2012)研究表明,伴随着低温积累量的增加,牡丹基因组总甲基化水平和全甲基化水平呈现下降的趋势,牡丹可能通过甲基化和去甲基化的方式调控基因的表达,并最终决定芽的休眠状态。本研究中蓝莓内休眠花芽甲基化水平显著高于解除休眠花芽,内休眠花芽与解除休眠花芽之间甲基化模式存在广泛的变异。内休眠花芽的高甲基化及内休眠花芽与解除休眠花芽间甲基化修饰模式的高度变异,体现出蓝莓的休眠特性与表观遗传修饰具有紧密的关联性。对比内休眠花芽和解除休眠花芽DNA的甲基化状况,发现解除休眠花芽中约有84.48%的位点发生了甲基化模式的变化,发生去甲基化的比率大于发生甲基化的比率,导致其基因组甲基化水平的显著降低。推测可能是基因组去甲基化导致了蓝莓芽休眠的解除及花芽的萌发。表观遗传调控的改变必然会导致生物体生理生化过程的改变,休眠花芽的甲基化水平及模式的改变与其芽体中可溶性糖、可溶性蛋白含量及SOD、POD活性的改变可能具有一定的相关性。但代谢过程或抗氧化防御

过程中具体哪一个基因发生了甲基化修饰的改变还需要进一步的研究。另外,本试验也只对蓝莓内休眠解除过程中基因组DNA甲基化的水平及模式变化进行了研究,DNA甲基化修饰的差异具体会影响哪些基因的表达,这些基因的表达对于内休眠的诱导、维持及解除起到什么样的作用,仍需进一步研究与探讨。

MSAP方法是目前较为成熟且应用广泛的DNA甲基化分析方法(Zhang等2009; Portis等2004; 韩柏明等2010; Tan 2010; Lewis和Zhan 2007; 姚培娟等2013),可在全基因组水平有效检测样品DNA的甲基化位点。但MSAP只能有效检测位于50~1 500 bp内的片段,分子量过大或过小都无法显示;而且,四碱基的HpaII和MspI同裂酶只能检测基因组中CCGG序列的甲基化情况,而对于非CCGG位点的胞嘧啶甲基化位点都不敏感,而且同裂酶的分辨能力有限,也不能完全检测出CCGG位点甲基化,这可能也是本研究中检测到的甲基化水平不高的缘故。

参考文献

- 冯晶红,张秀娟,贾桂霞(2013). 低温对东方百合试管鳞茎解除休眠及生长的影响. 植物生理学报, 49 (12): 1427~1432
- 盖树鹏,张风,张玉喜,郑国生(2012). 低温解除牡丹休眠进程中基因组DNA甲基化敏感扩增多态性(MSAP)分析. 农业生物技术学报, 20 (3): 261~267
- 高东升,束怀瑞,李宪利(2002). 几种落叶果树H₂O₂含量变化与自然休眠关系的研究. 园艺学报, 29 (3): 209~213
- 高东升,夏宁,王兴安(1999). 休眠桃树枝条中碳水化合物的含量变化和外源生长调节剂对破除休眠的效应. 植物生理学通讯, 35 (1): 10~12
- 韩柏明,赵恺,李贺,高秀岩,张志宏(2010). 组织培养导致的草莓DNA甲基化变异. 植物生理学通讯, 46 (8): 797~802
- 韩浩章,姜卫兵,费宪进,曹晶,李刚(2007). 葡萄和油桃自然休眠解除过程中H₂O₂含量和抗氧化酶活性的变化. 南京农业大学学报, 30 (1): 50~54
- 贺润平,翟明普,杜俊杰(2006). 枣树休眠生理研究. 果树学报, 23 (6): 814~817
- 李青芝,李成伟,杨同文(2014). DNA甲基化介导的植物逆境应答和胁迫记忆. 植物生理学报, 50 (6): 725~734
- 李宪利,袁志友,高东升(2001). 影响落叶果树芽自然休眠的因素. 山东农业大学学报, 32 (3): 386~392
- 路文静,李奕松主编(2012). 植物生理学实验教程. 北京: 中国林业出版社, 34~110
- 邵浩,马锋旺(2004). 梨花芽休眠解除与活性氧代谢的关系. 植物生理与分子生物学学报, 30 (6): 660~664
- 谭钺,高东升,李玲,魏海蓉,王甲威,刘庆忠(2015). 油桃花芽破眠过程中H₂O₂代谢与Ca²⁺转运的关系. 应用生态学报, 26 (2): 425~429
- 田莉莉,方金豹,王力荣,牛良(2006). 华光油桃解除休眠过程中几项生理指标的变化. 果树学报, 23 (1): 121~124
- 王海波,王孝娣,高东升,王宝亮,李疆,刘凤之(2009). 不同需冷量桃品种芽休眠诱导期间的生理变化. 果树学报, 26 (4): 445~449
- 王孝娣,王海波,高东升,李疆,杨荣光,刘凤之,聂继云(2008). 钙离子在‘春捷’桃芽自然休眠诱导、维持和解除中的作用. 植物生理学通讯, 44 (5): 869~872
- 杨秀苹(2004). 油桃花芽自然休眠期间呼吸机制的研究[硕士论文]. 合肥: 安徽农业大学
- 姚培娟,李际红,元晓,邢世岩(2013). 欧石楠体细胞胚发生过程中的DNA甲基化. 植物生理学报, 49 (12): 1413~1420
- 张昂,郑瑜琬,陈腾,耿万刚,房玉林,王华(2012). 葡萄休眠解除过程中冬芽组织活性氧与抗氧化系统的变化特征. 西北植物学报, 32 (10): 2075~2081
- 郑鹏华,刘国琴, Hussain S, 滕元文(2013). ‘翠冠’梨花芽休眠期碳水化合物变化及其相关基因表达研究. 园艺学报, 40 (2): 325~332
- Anderson JV, Chao WS, Horvath DP (2001). A current review on the regulation of dormancy in vegetative buds. Weed Sci, 49: 581~589
- Arora R, Rowland LJ, Tanino K (2003). Induction and release of bud dormancy in woody perennials: a science comes of age. Hort-Science, 38 (5): 911~921
- Bajji M, M'Hamdi M, Gastiny F, Rojas-Beltran JA, du Jardin P (2007). Catalase inhibition accelerates dormancy release and sprouting in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. Biotechnol Agron Soc Environ, 11 (2): 121~131
- Boyko A, Kovalchuk I (2008). Epigenetic control of plant stress response. Environ Mol Mutagen, 49: 61~72
- Finnegan EJ, Genger RK, Kovac K, Peacock WJ, Dennis ES (1998). DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. Proc Natl Acad Sci USA, 95 (10): 5824~5829
- Kovarik A, Koukalová B, Bezdek M, Opatrn Z (1997). Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. Theor Appl Genet, 95: 301~306
- Law RD, Suttle JC (2002). Transient decreases in methylation at 5'-CCGG-3' sequences in potato (*Solanum tuberosum* L.) meristem DNA during progression of tubers through dormancy precede the resumption of sprout growth. Plant Mol Biol, 51: 437~447
- Lewis NL, Zhan SH (2007). The plant genome's methylation status and response to stress: implications for plant improvement. Curr Opin Plant Biol, 10: 317~322
- Nir G, Shulman Y, Fenberstein L, Lavee S (1986). Changes in the activity of catalase (EC 1.11.1.6) in relation to the dormancy of grapevine (*Vitis vinifera* L.) buds. Plant Physiol, 81 (4): 1140~1142
- Noriega X, Burgos B, Perez FJ (2007). Short day-photoperiod triggers and low temperatures increase expression of peroxidase RNA transcripts and basic peroxidase isoenzyme activity in grapevine buds. Phytochemistry, 68 (10): 1376~1383
- Or E, Vilozny I, Eyal Y, Ogrodovitch A (2000). The transduction of the signal for grape bud dormancy breaking induced by hydrogen

- cyanamide may involve the SNF-like protein kinase GDBRPK. *Plant Mol Biol*, 43 (4): 483~494
- Pérez FJ, Vergara R, Rubio S (2008). H₂O₂ is involved in the dormancy-breaking effect of hydrogen cyanamide in grapevine buds. *Plant Growth Regul*, 55: 149~155
- Portis E, Acquadro A, Comino C, Lanteri S (2004). Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci*, 166: 169~178
- Prior RL, Lazarus SA, Cao G, Muccitelli H, Hammerstone JF (2001). Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 49 (3): 1270~1276
- Rinne PLH, Welling A, Vahala J, Ripei L, Ruonala R, Kangasjärvi J, van der Schoot C (2011). Chilling of dormant buds hyperinduces *FLOWERING LOCUS T* and recruits GA-inducible 1,3- β -glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*. *Plant Cell*, 23: 130~146
- Tan MP (2010). Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism. *Plant Physiol Biochem*, 48: 21~26
- Tang XM, Tao X, Wang Y, Ma DM, Li D, Yang H, Ma XR (2014). Analysis of DNA methylation of perennial ryegrass under drought using the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique. *Mol Genet Genomics*, 289: 1075~1084
- Wang WQ, Wu YR, Messing J (2014). RNA-Seq transcriptome analysis of *Spirodela* dormancy without reproduction. *BMC Genomics*, 15: 60~73
- Xiong LZ, Xu CG, Maroof MAS, Zhang Q (1999). Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 261: 439~446
- Zhang MS, Xu CM, Yan HY, Zhao N, von Wettstein D, Liu B (2009). Limited tissue culture-induced mutations and linked epigenetic modifications in F₁ hybrids of sorghum pure lines are accompanied by increased transcription of DNA methyltransferases and 5-methylcytosine glycosylases. *Plant J*, 57 (4): 666~679