

## 菊花基因组DNA甲基化水平对根系硝态氮吸收的影响

于媛媛, 郭芸琿, 温立柱, 孙翠慧, 樊红梅, 孙宪芝, 王文莉, 孙霞, 郑成淑\*

山东农业大学园艺科学与工程学院/山东省中日韩菊花国际合作研究中心, 山东泰安271018

**摘要:** 以菊花的扦插生根苗为试材, 在缺氮和适氮水培条件下, 分别使用甲基化抑制剂(5-azaC)和甲基供体(SAM)处理菊花根系, 测定处理后基因组DNA甲基化水平变化、根系构型相关参数、根系硝态氮含量以及NO<sub>3</sub><sup>-</sup>转运蛋白基因*CmNRT1.1*、*CmNRT2.1*、*CmNAR2.1*的相对表达量。结果表明, 在适氮条件下, 5-azaC处理的菊花根系DNA甲基化水平降低, 根系总直径、总表面积及总体积增大; 根系NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量与对照相比显著增加, 根系NO<sub>3</sub><sup>-</sup>转运蛋白基因*CmNRT1.1*、*CmNRT2.1*、*CmNAR2.1*相对表达量也有所升高。据此推测, 降低菊花根系基因组DNA甲基化水平可以提高根系NO<sub>3</sub><sup>-</sup>转运相关基因的表达, 进而促进根系对NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的吸收。

**关键词:** 菊花; 根系; DNA甲基化; 硝态氮; 5-azaC; SAM; MSAP

菊花是我国传统名花和世界四大切花之一, 栽培面积和产量均位于花卉前列。菊花品种繁多, 广泛用于盆花、切花、地被和园林绿化, 而且作为中药材和茶饮用途的菊花栽培面积也在不断扩大。氮素是植物生长发育所不可或缺的重要营养元素之一(王新超等2006), 植物对土壤中有效性养分的利用能力对植株发育和完成其生命周期起着至关重要的作用(Seccod等2017)。合理施用氮肥对菊花的生长和品质提高有较大的促进作用(黄在范等2009)。

DNA甲基化是有机体极为重要的调控方式(Law和Jacobsen 2010; Gutzat和Scheid 2012)。在植物的生长发育过程中, DNA甲基化通过调控基因表达、转座子转座、染色质结构稳定等方面, 影响植物生长的形态、稳定性、分化和发育(Gonzalez和Li 2012; Bucher等2012)。DNA甲基化通过改变DNA构象, 影响染色质的结构及DNA与蛋白质的相互作用, 从而调节相关基因表达, 完成相关生命活动(李照令等2014)。研究表明, 拟南芥与水稻中DNA甲基化水平改变导致植株矮小, 叶面积变小, 表现出类似植物氮素营养缺乏有关症状(Finnegan等1996; Vanyushin 2006)。还有研究发现缺氮处理后的玉米根系DNA甲基化率较正常供氮有所升高, 推测植物DNA甲基化与硝态氮的吸收有一定关系(武永军2012)。菊花的甲基化目前已有一定的研究, 如王子成等(2009)和聂丽娟(2008)研究了菊花开花及组织培养与甲基化水平的关系, 但目前关于菊花基因组DNA甲基化水平与根系NO<sub>3</sub><sup>-</sup>吸收的相关研究未见报道。因此, 开展DNA甲基化与菊

花根系NO<sub>3</sub><sup>-</sup>吸收之间的关系研究, 提高菊花氮素利用效率, 从而进一步提高菊花产量和观赏品质具有重要意义。

本实验用外源DNA甲基化抑制剂5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-azaC)和甲基化供体S-腺苷酰-L-甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)处理, 通过测定菊花根系的基因组DNA甲基化水平、根系构型相关参数、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>转运蛋白基因*CmNRT1.1*、*CmNRT2.1*、*CmNAR2.1*的相对表达量以及NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量的变化, 探讨菊花根系DNA甲基化水平与NO<sub>3</sub><sup>-</sup>吸收之间的关系, 从表观遗传学的角度为进一步提高菊花氮肥的利用效率提供新的理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

本研究以切花菊(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)品种‘神马’为实验材料, 于2016年3月~11月进行。选取大小一致、生长健壮的菊花插穗(顶部带2~3片幼叶, 高约8 cm)进行扦插, 约21 d后扦插生根。

#### 1.2 实验设计

实验在山东农业大学园艺实验室进行, 将根系长势较为一致的菊花扦插生根苗置于盛有无N元素的Hoagland营养液的培养容器(长48 cm、宽29 cm、高12 cm的方形塑料盆)中培养, 用挖孔的

收稿 2017-11-20 修定 2018-04-13

资助 国家科技支撑计划项目(2011BAD10B07)和国家自然科学基金面上项目(31670663)。

\* 通讯作者(zcs@sdau.edu.cn)。

泡沫板作为固定菊花植株, 容器外周用黑色卡纸包裹。将培养容器置于光照培养箱内, 光照培养箱温度为25°C, 湿度为75%, 光周期为14 h昼/10 h夜, 以气泵对营养液连续通气并及时添加蒸馏水以补充蒸发的水分。各组培养液初始pH调节为6.8, 每容器定植25株, 共24盆。参考Guo等(2017)方法, 本实验的KNO<sub>3</sub>处理浓度设为0 (缺氮条件)和5 mmol·L<sup>-1</sup> (适氮条件)。在含0和5 mmol·L<sup>-1</sup>硝态氮的Hoagland营养液水培条件下, 分别设空白对照、100 μmol·L<sup>-1</sup>甲基化抑制剂5-azaC和100 μmol·L<sup>-1</sup>甲基供体SAM处理, 分别记为0-0、0-a、0-s、5-0、5-a和5-s, 于处理0、5、10和15 d取菊花根系, 根据实验需要进行后续观察和分析。每个处理3次重复。

### 1.3 测定项目与方法

#### 1.3.1 根系DNA提取

取处理0、5、10和15 d的0.3 g菊花根尖(长约0.2 cm), 采用DNA提取试剂盒提取DNA, 提取过程参照试剂盒说明书进行。在提取过程中用RNA酶处理, 去除RNA, 纯化后的DNA质量用1%的琼脂糖凝胶电泳检验提取结果, 使用微量紫外分光光度计测定提取的DNA浓度, 置于-20°C冰箱保存备用。

#### 1.3.2 甲基化敏感扩增多态性分析(MSAP)

MSAP主要参考Xiong等(1999)方法, 采用双酶切组合*EcoRI/HpaII*和*EcoRI/MspI*, 经酶切、连接、预扩增和选择性扩增等4个步骤完成, 其中接头、预扩增和选择性扩增引物见表1, 扩增后采用

6%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 进行硝酸银染色并统计条带数。

#### 1.3.3 根系形态构型测定

使用根系扫描仪EPSON (G780B, Seiko Epson Corp., Tokyo, Japan)扫描整个根系。用Win RHIZO (Pro 2007)根系图像分析系统软件对菊花根系生长指标测定, 计算每个根样品的总根长、平均直径、总表面积、总体积和根尖数等参数的平均值。

#### 1.3.4 硝态氮含量测定

采用水杨酸比色法。取2 g根系, 加10 mL去离子水研磨后移入15 mL离心管, 30 min沸水浴, 冷却后1 370×g离心10 min。将提取液过滤到25 mL容量瓶中并定容, 吸取0.1 mL样品液, 加入0.4 mL 5%水杨酸试剂, 混匀后室温放置20 min, 再加入9.5 mL 8% NaOH, 摇匀, 待冷却至室温后, 在410 nm处比色测OD值。每个样品重复3次。

#### 1.3.5 NO<sub>3</sub>转运蛋白相关基因表达的实时荧光定量(qRT-PCR)分析

采用田素波等(2011)的方法。分别取甲基化试剂处理0、5、10、15 d的根系, 在-80°C超低温冰箱中保存。通过TRNzol法提取总RNA, 并使用1%琼脂糖凝胶电泳检测进行检测。采用天根生化科技(北京)有限公司的FastKing RT Kit (With gD-Nase) (KR116)试剂盒进行反转录反应, 将RNA反转录为cDNA。用qRT-PCR技术检测*CmNRT1.1*、*CmNRT2.1*和*CmNAR2.1* mRNA在菊花根系中的表达水平。引物的设计是从NCBI数据库中引用*AtNRT1.1*、*AtNRT2.1*和*AtNAR2.1*的序列, 然后与菊花

表1 MSAP分析所用引物序列  
Table 1 Primer sequences used in MSAP analysis

接头和引物	序列(5'→3')	
	<i>EcoRI</i>	<i>MspI/HpaII</i> (H/M)
接头1	CTCGTAGACTGCGTACC	GTCATGAGTCCTGCT
接头2	AATTGGTACGCAATC	TCATGATCCTGCTCG
预扩引物	GACTGCGTACCAATTCA	ATCATGAGTCCTGCTCGG
选扩引物	GACTGCGTACCAATTC AAC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCA
	GACTGCGTACCAATTC AAG	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAA
	GACTGCGTACCAATTC ACA	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAC
	GACTGCGTACCAATTC ACT	
	GACTGCGTACCAATTC AAG	
	GACTGCGTACCAATTC ACC	
	GACTGCGTACCAATTC ACG	
	GACTGCGTACCAATTC ACG	

转录组相关基因进行Blast同源性比对,再使用Primer 5.0软件进行设计。每个处理取3次重复,qRT-PCR引物设计见表2。

#### 1.4 数据处理

采用Microsoft Excel软件处理数据和作图,采用SPSS 17.0软件的LSD法进行差异显著性检验和相关分析。

## 2 实验结果

### 2.1 甲基化抑制剂5-azaC和甲基化供体SAM处理对菊花根系基因组DNA甲基化水平的影响

样品DNA经2种酶切组合*EcoRI/HpaII* (H)和*EcoRI/MspI* (M)酶切后,在聚丙烯酰胺凝胶电泳分析中检测出3种带型。I类: H和M组合都有带,表明无甲基化发生; II类: H有带, M无带,表明CCGG位点发生半甲基化; III类: H无带, M有带,表明CCGG位点发生全甲基化。本实验共采用24对引物对不

表2 基因的实时荧光定量所用PCR扩增引物序列

Table 2 Primer sequences used in real-time PCR amplification

引物名称	序列(5'→3')
<i>CmNRT1.1-F</i>	AACAGGGACCGTCAAGAGAA
<i>CmNRT1.1-R</i>	AGCAATCAAGAACAGCGAAA
<i>CmNRT2.1-F</i>	GTAACACCTCCGAGCAACAC
<i>CmNRT2.1-R</i>	TTTCACAATGCAATAGCATG
<i>CmNAR2.1-F</i>	AATGGCTGAAAACCTCAAGAA
<i>CmNAR2.1-R</i>	AATCATGCAATGGCATAAAC
<i>CmACTIN-F</i>	ACAACCTGCTGAACGGGAAAT
<i>CmACTIN-R</i>	TCATAGACGGCTGGAAAAGG

同处理的菊花根系DNA的甲基化水平进行MSAP分析(图1)。在所有样品的扩增条带中甲基化数为119~202条,比例为31.27%~49.55%。

5-azaC和SAM处理后检测菊花根系基因组DNA甲基化水平。结果(表3)表明,适氮条件下DNA甲基化率总体低于缺氮条件下的甲基化率。而且无论缺氮还是适氮条件下,5-azaC处理的根系DNA甲基化水平随着时间的延长总体出现逐渐下降趋势。在处理15 d,适氮条件下5-azaC处理(5-a) DNA甲基化水平与对照相比下降6.39%,而SAM处理的则与对照(0-0)相比上升6.89%。从甲基化类型来看,菊花根系CCGG位点的甲基化主要是双链内部胞嘧啶甲基化,即CG甲基化占绝对优势。

### 2.2 5-azaC和SAM处理对菊花根系外观形态构型的影响

利用根系扫描仪扫描5-azaC和SAM处理15 d的菊花根系。由图2可以看出,适氮条件下菊花根系的总根长与缺氮条件下相比处于较高水平。与对照相比,5-azaC处理的根系直径显著增大,而SAM处理的根系平均直径显著减小。对根系生长指标进行统计的结果(表4)表明,在缺氮和适氮条件下,根系总根长、总表面积、总体积、根尖数和平均直径等生长指标随着处理时间的延长不同程度地增加。适氮条件下,5-azaC处理的菊花根系总表面积、总体积和平均直径与对照相比始终处于较高水平,而SAM处理的根系则处于较低水平。适氮条件下处理15 d,5-azaC处理的总根长和

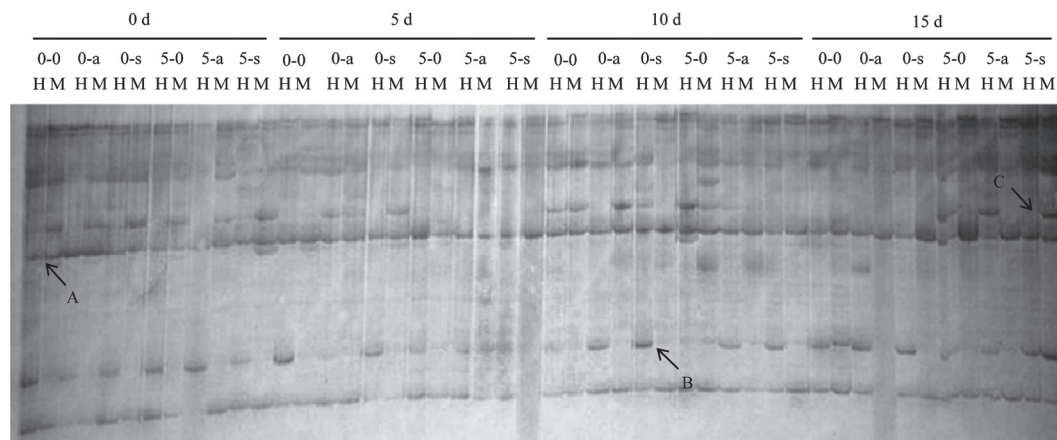


图1 5-azaC和SAM处理的菊花根系MSAP扩增图谱

Fig.1 MSAP patterns of chrysanthemum roots treated with 5-azaC and SAM

A: 该位点没有发生甲基化; B: 该位点发生了半甲基化; C: 该位点发生了全甲基化。

表3 5-azaC和SAM处理对菊花根系基因组DNA甲基化水平的影响

Table 3 Effect of 5-azaC and SAM on the levels of genomic DNA methylation in the roots of chrysanthemum

处理时间/d	处理	MSAP扩增带谱			扩增条带 总数	甲基条带 总数	甲基化带 比率/%	半甲基条 带比率/%	全甲基化条 带比率/%
		I	II	III					
0	0-0	240	73	97	401	170	42.29	18.20	24.19
	0-a	226	72	107	405	179	44.20	17.78	26.42
	0-s	238	58	98	394	156	39.59	14.72	24.87
	5-0	214	64	104	382	168	43.98	16.75	27.23
	5-a	238	52	101	391	153	39.13	13.30	25.83
5	5-s	234	61	108	403	169	41.94	15.14	26.80
	0-0	237	59	103	399	162	40.60	14.79	25.81
	0-a	279	41	92	412	133	32.28	9.95	22.33
	0-s	206	84	118	408	202	49.51	20.59	28.92
	5-0	234	55	96	385	151	39.23	14.29	24.94
10	5-a	269	34	89	392	123	31.38	8.67	22.71
	5-s	196	74	104	374	178	47.59	19.79	27.80
	0-0	238	49	109	396	158	39.90	12.37	27.53
	0-a	262	34	85	381	119	31.23	8.92	22.31
	0-s	223	79	113	415	192	46.27	19.04	27.23
15	5-0	249	56	100	405	156	38.52	13.83	24.69
	5-a	254	49	99	402	148	36.82	12.19	24.63
	5-s	225	77	109	411	186	45.25	18.73	26.52
	0-0	245	55	106	406	161	39.66	13.55	26.11
	0-a	280	37	92	409	129	31.54	9.05	22.49
15	0-s	214	85	115	414	200	48.31	20.53	27.78
	5-0	251	50	102	403	152	37.72	12.41	25.31
	5-a	279	38	90	407	128	31.45	9.34	22.11
	5-s	228	74	110	412	184	44.66	17.96	26.70

扩增条带总数=I+II+III; 甲基化条带总数=II+III; 全甲基条带数=III。

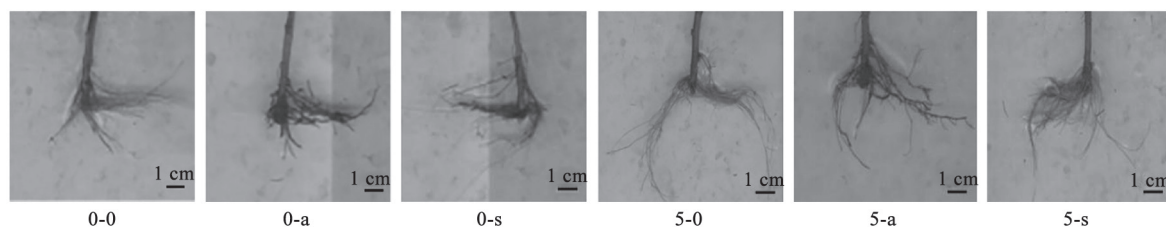


图2 5-azaC和SAM处理对菊花根系外观形态的影响

Fig.2 Effects of 5-azaC and SAM on the root appearance of chrysanthemum

根尖数与对照相比分别降低了14.73%和10.13%, 但总表面积、总体积和平均直径与对照相比分别增加了12.60%、27.12%和39.31%; 而SAM处理的总根长、总表面积、总体积、根尖数和平均直径与对照相比分别降低了13.00%、24.44%、32.20%、31.12%和17.93%。

### 2.3 5-azaC和SAM处理对菊花根系NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量的影响

适氮条件下生长的菊花根系NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量比缺氮

条件下的明显增加(图3)。缺氮条件下, 5-azaC和SAM处理的菊花根系中NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量与对照相比均没有明显差异, 而且随着处理时间的延长, 也未发现明显增加的趋势。适氮条件下, 随着处理时间延长, 根系NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量均有所增加, 但5-azaC处理的比对照增加, 而SAM处理的比对照减少。在处理15 d, 5-azaC处理的NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量比对照增加19.44%, 而SAM处理的比对照减少13.89%。

表4 5-azaC和SAM处理对菊花总根长、总表面积、总体积、根尖数和平均直径的影响  
Table 4 Effects of 5-azaC and SAM on the overall lengths, total surface areas, total volumes, tips of roots and average diameters in chrysanthemum

处理时间/d	总根长/cm					
	0-0	0-a	0-s	5-0	5-a	5-s
0	8.18±0.52 <sup>a</sup>	9.74±0.76 <sup>a</sup>	8.25±0.56 <sup>a</sup>	8.43±0.26 <sup>a</sup>	8.37±0.50 <sup>a</sup>	8.79±0.22 <sup>a</sup>
5	25.62±0.91 <sup>c</sup>	24.95±0.20 <sup>c</sup>	25.17±0.72 <sup>c</sup>	41.85±0.72 <sup>a</sup>	34.27±0.54 <sup>b</sup>	31.54±0.81 <sup>b</sup>
10	39.58±1.57 <sup>c</sup>	35.76±0.35 <sup>d</sup>	34.08±1.24 <sup>d</sup>	52.73±1.24 <sup>a</sup>	46.56±0.93 <sup>b</sup>	40.55±1.40 <sup>c</sup>
15	41.04±1.77 <sup>c</sup>	40.67±0.63 <sup>e</sup>	37.51±1.32 <sup>b</sup>	66.39±0.69 <sup>a</sup>	56.61±0.75 <sup>d</sup>	57.76±0.40 <sup>b</sup>
处理时间/d	总表面积/cm <sup>2</sup>					
	0-0	0-a	0-s	5-0	5-a	5-s
0	5.45±0.38 <sup>a</sup>	5.68±0.39 <sup>a</sup>	5.89±0.54 <sup>a</sup>	6.32±0.30 <sup>a</sup>	6.25±0.20 <sup>a</sup>	5.91±0.40 <sup>a</sup>
5	8.48±0.24 <sup>d</sup>	9.14±0.16 <sup>cd</sup>	10.27±0.22 <sup>c</sup>	13.29±0.59 <sup>b</sup>	14.63±0.57 <sup>a</sup>	8.77±0.31 <sup>d</sup>
10	16.08±0.54 <sup>c</sup>	16.91±0.17 <sup>c</sup>	11.69±0.38 <sup>d</sup>	21.61±0.69 <sup>b</sup>	23.64±0.44 <sup>a</sup>	20.28±0.64 <sup>b</sup>
15	20.92±0.16 <sup>e</sup>	23.91±0.16 <sup>d</sup>	20.71±0.63 <sup>e</sup>	36.74±0.17 <sup>b</sup>	41.37±0.60 <sup>a</sup>	27.76±0.29 <sup>c</sup>
处理时间/d	总体积/cm <sup>3</sup>					
	0-0	0-a	0-s	5-0	5-a	5-s
0	0.15±0.05 <sup>bc</sup>	0.18±0.05 <sup>a</sup>	0.15±0.04 <sup>c</sup>	0.16±0.02 <sup>b</sup>	0.18±0.03 <sup>a</sup>	0.14±0.05 <sup>c</sup>
5	0.23±0.10 <sup>d</sup>	0.27±0.07 <sup>c</sup>	0.34±0.04 <sup>b</sup>	0.27±0.15 <sup>c</sup>	0.56±0.17 <sup>a</sup>	0.22±0.05 <sup>d</sup>
10	0.59±0.06 <sup>c</sup>	0.64±0.06 <sup>b</sup>	0.42±0.06 <sup>e</sup>	0.62±0.12 <sup>b</sup>	0.81±0.11 <sup>a</sup>	0.52±0.09 <sup>d</sup>
15	0.77±0.01 <sup>c</sup>	0.82±0.10 <sup>c</sup>	0.67±0.06 <sup>d</sup>	1.18±0.04 <sup>b</sup>	1.50±0.05 <sup>a</sup>	0.80±0.18 <sup>c</sup>
处理时间/d	根尖数/条					
	0-0	0-a	0-s	5-0	5-a	5-s
0	20±1.53 <sup>ab</sup>	22±0.58 <sup>a</sup>	24±1.53 <sup>a</sup>	21±1.52 <sup>ab</sup>	18±1.15 <sup>b</sup>	23±1.00 <sup>a</sup>
5	36±0.58 <sup>c</sup>	42±1.15 <sup>ab</sup>	41±1.00 <sup>b</sup>	46±2.08 <sup>a</sup>	41±1.53 <sup>b</sup>	35±1.53 <sup>c</sup>
10	87±1.53 <sup>c</sup>	79±2.52 <sup>cd</sup>	69±2.00 <sup>d</sup>	121±5.13 <sup>a</sup>	102±4.36 <sup>b</sup>	113±4.58 <sup>ab</sup>
15	115±2.08 <sup>d</sup>	105±2.65 <sup>e</sup>	95±2.52 <sup>f</sup>	187±4.73 <sup>a</sup>	174±3.51 <sup>b</sup>	155±2.65 <sup>c</sup>
处理时间/d	平均直径/mm					
	0-0	0-a	0-s	5-0	5-a	5-s
0	1.14±0.04 <sup>b</sup>	1.12±0.02 <sup>b</sup>	1.12±0.02 <sup>b</sup>	1.01±0.02 <sup>c</sup>	1.21±0.03 <sup>a</sup>	1.03±0.02 <sup>c</sup>
5	1.22±0.03 <sup>b</sup>	1.32±0.04 <sup>a</sup>	1.25±0.03 <sup>b</sup>	1.08±0.05 <sup>c</sup>	1.33±0.04 <sup>a</sup>	1.13±0.04 <sup>c</sup>
10	1.38±0.03 <sup>b</sup>	1.49±0.02 <sup>a</sup>	1.26±0.03 <sup>c</sup>	1.10±0.02 <sup>d</sup>	1.42±0.02 <sup>ab</sup>	1.18±0.05 <sup>cd</sup>
15	1.45±0.03 <sup>c</sup>	1.71±0.04 <sup>b</sup>	1.39±0.05 <sup>c</sup>	1.45±0.04 <sup>c</sup>	2.02±0.03 <sup>a</sup>	1.19±0.01 <sup>d</sup>

同行中不同小写字母表示达到5%显著性差异水平。

#### 2.4 5-azaC和SAM处理对菊花根系硝态氮转运蛋白基因*CmNRT1.1*、*CmNRT2.1*和*CmNAR2.1*表达的影响

随时间延长, 缺氮条件下, 菊花根系*CmNRT1.1*、*CmNRT2.1*和*CmNAR2.1*的相对表达量均有所上升, 但与适氮条件相比上升幅度较小(图4)。适氮条件下, 5-azaC处理15 d的菊花根系3个基因相对表达量达到高峰, 与对照相比, *CmNRT1.1*相对表达量上调14.29%, 而SAM处理的下调17.86% (图4-A); *CmNRT2.1*相对表达量升高15.58%, 而SAM处

理的降低12.99% (图4-B); *CmNAR2.1*相对表达量升高23.48%, 而SAM处理的降低5.17% (图4-C)。

### 3 讨论

DNA甲基化是一种重要的表观遗传修饰, 与真核细胞的生长、分化和转化机制密切相关(Zhang等2017)。植物基因组DNA的甲基化是调节基因功能的重要手段, 许多内源基因被甲基化抑制剂5-azaC处理后处于去甲基化状态而激活(李雪林等2009)。已有研究表明, 番茄悬浮细胞培养液中加

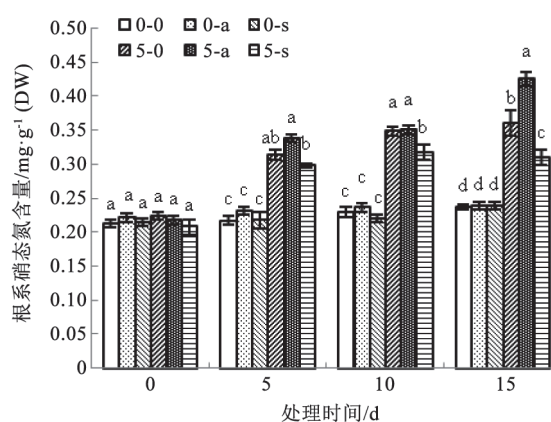


图3 5-azaC和SAM处理对菊花根系 $\text{NO}_3^-$ 含量的影响  
Fig.3 Effects of 5-azaC and SAM on the nitrate contents in chrysanthemum roots

不同小写字母表示同一时间不同处理间达到5%显著性差异水平。下图同此。

入5-azaC后, 基因组范围5-甲基胞嘧啶减少25%, CCGG序列的5-甲基胞嘧啶也减少16%~30% (Law和Suttle 2005)。本研究结果表明, 甲基化抑制剂5-azaC处理后菊花根系基因组整体的DNA甲基化水平均较对照显著下降, 这与前人研究相符(李梅兰等2003)。无论缺氮还是适氮条件下, 5-azaC处理的根系DNA甲基化水平随着时间的延长总体出现逐渐下降趋势, 说明5-azaC的抑制作用具有时间累加效应。徐宝华(2005)以甲基供体SAM为外源诱导物处理小麦种子的研究结果表明, 小麦初生根的基因组DNA甲基化水平升高, 初生根的生长受到抑制。本实验中甲基供体SAM处理后菊花根系整个基因组的DNA甲基化水平与对照相比显著上升, 这也与前人研究结果相一致。说明5-azaC处理导致菊花根系基因组DNA甲基化水平下降, 而SAM则导致其DNA甲基化水平上升。

根系是植物水分和养分吸收的主要器官, 也是植株地下部分和地上部分进行营养交换的代谢器官。植物需要的氮素主要是由根系吸收的, 研究认为根系的形态和大小与氮素的吸收密切相关 (Wang和Chen 2004)。已有研究表明, 水稻氮高效基因型根系总吸收面积和活跃吸收面积大, 氧化力和还原力强, 氮吸收效率不同基因型的水稻拔节期的总根长、根密度、根干重和根表面积有显著差异, 根系吸收面积大、根系活力强, 根系吸收养分能力就较强(程建峰等2007)。DNA甲基化抑

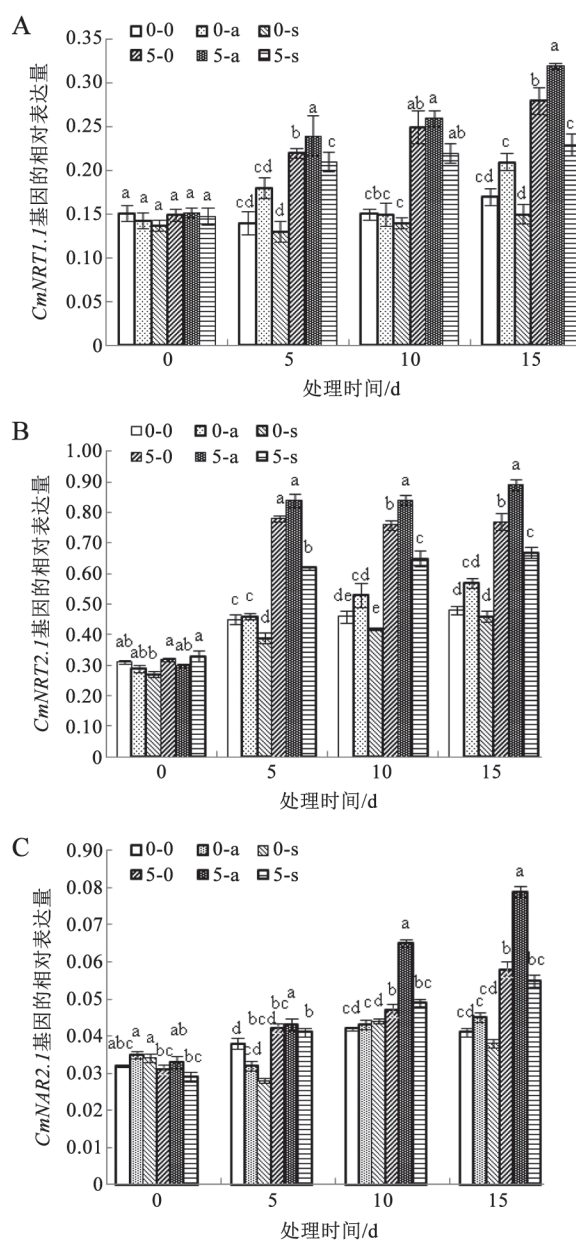


图4 5-azaC和SAM处理对菊花根系 $CmNRT1.1$ 、 $CmNRT2.1$ 和 $CmNAR2.1$ 相对表达量的影响

Fig.4 Effects of 5-azaC and SAM on the relative expression of  $CmNRT1.1$ ,  $CmNRT2.1$  and  $CmNAR2.1$  in chrysanthemum roots

制剂的处理可以使甲基化程度降低, 使植株产生表型差异, 最后导致植物生长发育过程中出现异常, 其中包括根系生长的异常等。5-azaC处理的甘蓝幼苗(King 1995)、拟南芥种子(Finnegan等1996)和亚麻种子(Fieldes等2005)在植株生长发育过程中DNA甲基化水平均有所降低, 导致植株矮化、

株型丛状、叶片变小等异常性状,并且这些变异性状遗传给了后代。本研究结果表明,菊花根系经甲基化抑制剂5-azaC处理后,DNA甲基化水平降低,菊花根系的总根长和根尖数相比于对照变小,这与陈芳(2009)使用5-azaC对小麦进行处理后的结果相似。但总表面积、总体积和平均直径比对照增大,推测5-azaC处理抑制了根系的伸长,但是增加了根系直径,导致根系总面积、体积较对照有所增加。而SAM处理的菊花根系生长各指标与对照相比均出现下降趋势,对根系生长有抑制作用,这与徐宝华(2005)用SAM处理抑制小麦初生根生长的结果相一致。说明菊花根系DNA甲基化水平的变化影响了菊花的根系构型的改变,但其机理还需进一步深入研究。

硝态氮是植物吸收利用的主要氮源。 $\text{NO}_3^-$ 的吸收首先需要 $\text{NO}_3^-$ 转运蛋白的转运(Orsel等2006; Plett等2010; Møller等2011)。植物可以通过基因组DNA甲基化的表观遗传修饰,来调控内源基因表达从而实现相关生命活动的正常进行(刘宝2008)。常染色质中高度甲基化的基因往往是沉默的,而DNA去甲基化有助于解除转录沉默激活基因表达(Li等2008; 罗俊鹏等2017)。掌握基因组甲基化水平的变化有助于研究功能基因的表达调控以及植物适应逆境胁迫的分子机理(李忠爱等2016)。在拟南芥中,当外界温度升高,其中编码基因*At3g-50770*甲基化水平降低,同时基因表达水平增高(Naydenov等2015)。在转基因烟草中,当外源基因*NptII*基因被甲基化后,*NptII*酶活性表达水平大幅度下降;然而经过5-azaC处理后*NptII*酶活性表达水平得到恢复,转化组织抗性增强(李梅兰等2003)。在植物外界环境改变的过程中,DNA甲基化状态的改变涉及多条片段和多个基因,通过多种途径的协同作用来共同适应环境的改变(陆许可等2014; Liang等2014)。本研究结果表明,无论缺氮还是适氮条件下,5-azaC处理的根系全基因组DNA甲基化水平显著降低,同时qRT-PCR检测发现 $\text{NO}_3^-$ 转运蛋白基因*CmNRT1.1*、*CmNRT2.1*、*CmNAR2.1*的相对表达量也显著上调,而且根系中 $\text{NO}_3^-$ 含量也随之显著升高。SAM处理则相反,菊花根系全基因组DNA甲基化水平显著升高, $\text{NO}_3^-$ 转运相关基因的表达量下调,根系中 $\text{NO}_3^-$ 的含量显著降低。说明菊

花基因组DNA甲基化水平可能是通过影响 $\text{NO}_3^-$ 转运蛋白基因*CmNRT1.1*、*CmNRT2.1*、*CmNAR2.1*的相对表达量,进而影响根系对 $\text{NO}_3^-$ 的吸收。植物DNA甲基化影响基因表达的研究说明两者之间可能存在相应的关系,但是植物如何通过DNA甲基化的改变影响基因表达的研究,还需进一步的实验证据以阐明该问题。

本实验探究了菊花根系DNA甲基化水平与根系 $\text{NO}_3^-$ 吸收之间的关系,初步发现,降低菊花根系基因组DNA甲基化水平,促进根系 $\text{NO}_3^-$ 转运相关基因的表达,从而促进根系对 $\text{NO}_3^-$ 的吸收。从表观遗传学的角度为进一步提高菊花氮肥的利用效率提供新的理论依据。

#### 参考文献(References)

- Bucher E, Reinders J, Mirouze M (2012). Epigenetic control of transposon transcription and mobility in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol*, 15 (5): 503–510
- Chen F (2009). 5-azaC on the development and DNA methylation of wheat (*Triticum aestivum* L.) (dissertation). Kaifeng: Henan University (in Chinese with English abstract) [陈芳(2009). 5-氮杂胞苷对小麦生长发育及DNA甲基化的影响(学位论文). 开封: 河南大学]
- Cheng JF, Dai TB, Jing Q, et al (2007). Root morphological and physiological characteristics in relation to nitrogen absorption efficiency in different rice genotypes. *Acta Pedol Sin*, (2): 266–272 (in Chinese with English abstract) [程建峰, 戴廷波, 荆奇等(2007). 不同水稻基因型的根系形态生理特性与高效氮素吸收. *土壤学报*, (2): 266–272]
- Fieldes MA, Schaeffer SM, Krech MJ, et al (2005). DNA hypomethylation in 5-azacytidine induced early flowering lines of flax. *Theor Appl Genet*, 111 (1): 136–149
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (16): 8449–8454
- Gonzalez M, Li F (2012). DNA replication, RNAi and epigenetic inheritance. *Epigenetics*, 7 (1): 14–19
- Guo YH, Yu YY, Wen LZ, et al (2017). Up-regulation of *CmNRTs* and *CmANR1* genes expression contribute to root configuration changes for efficient capturing  $\text{NO}_3^-$  in the roots of chrysanthemum. *Sci Hortic*, 225: 438–444
- Gutzat R, Scheid OM (2012). Epigenetic responses to stress: triple defense. *Curr Opin Plant Biol*, 15 (5): 568–573
- Huang ZF, Zheng CS, Zhang CH, et al (2009). Effects of controlled release fertilizer on available nutrient utilization rate and growth and ornamental quality of chrysanthemum.

- mum. Shandong Agric Sci, 10: 70–73 (in Chinese with English abstract) [黄在范, 郑成淑, 张翠华等(2009). 控释肥对土壤有效养分利用率及菊花生长和观赏品质的影响. 山东农业科学, 10: 70–73]
- King GJ (1995). Morphological development in *Brassica oleracea* is modulated by *in vivo* treatment with 5-azacytidine. J Horticult Sci, 70 (2): 333–342
- Law JA, Jacobsen SE (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. Nat Rev Genet, 11 (3): 204
- Law RD, Suttle JC (2005). Chromatin remodeling in plant cell culture: patterns of DNA methylation and histone H3 and H4 acetylation vary during growth of asynchronous potato cell suspensions. Plant Physiol Bioch, 43 (6): 527–534
- Liang D, Zhang ZJ, Wu HI, et al (2014). Single-base-resolution methylomes of *Populus trichocarpa* reveal the association between DNA methylation and drought stress. BMC Genet, 15 (1): S9
- Li ML, Zeng GW, Zhu ZJ (2003). Analysis of effects of 5-azacytidine on promoting flowering in non-heading chinese cabbage. J Zhejiang Univ, 29 (3): 287–290 (in Chinese with English abstract) [李梅兰, 曾广文, 朱祝军(2003). 5-氮杂胞苷促进白菜开花的效应分析. 浙江大学学报, 29 (3): 287–290]
- Li XL, Lin ZX, Nie YC, et al (2009). MSAP analysis of epigenetic changes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under salt stress. Acta Agron Sin, (4): 588–596 (in Chinese with English abstract) [李雪林, 林忠旭, 聂以春等(2009). 盐胁迫下棉花基因组DNA表观遗传变化的MSAP分析. 作物学报, (4): 588–596]
- Li XY, Wang XF, He K, et al (2008). High-resolution mapping of epigenetic modifications of the rice genome uncovers interplay between DNA methylation, histone methylation, and gene expression. Plant Cell, 20 (2): 259–276
- Li ZA, Du YQ, Li J, et al (2016). Effects of dimethyl sulphoxide on *Arabidopsis thaliana* DNA methylation. Plant Physiol J, 52 (01): 117–124 (in Chinese with English abstract) [李忠爱, 杜亚琼, 李杰等(2016). 二甲基亚砜对拟南芥基因组DNA甲基化的影响. 植物生理学报, 52 (01): 117–124]
- Li ZL, Wang HT, Chen RJ, et al (2014). Studying genomic methylation of *Arabidopsis thaliana* seedlings under cadmium stress using MSAP. J Agro-Environ Sci, 33 (01): 28–36 (in Chinese with English abstract) [李照令, 王鹤潼, 陈瑞娟等(2014). 运用MSAP研究镉胁迫对拟南芥幼苗基因甲基化的影响. 农业环境科学学报, 33 (01): 28–36]
- Liu B (2008). Epigenetic variation and crop genetic improvement. Jilin Agric Univ, 30 (4): 386–393 (in Chinese with English abstract) [刘宝(2008). 表观遗传变异与作物遗传改良. 吉林农业大学学报, 30 (4): 386–393]
- Luo JP, Wang M, La HG (2017). Mapping and functional analysis of a candidate gene involved in DNA demethylation process in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol J, 53 (04): 721–728 (in Chinese with English abstract) [罗俊鹏, 王敏, 腊红桂(2017). 一个参与拟南芥DNA去甲基化过程候选基因的定位与功能分析. 植物生理学报, 53 (04): 721–728]
- Lu XK, Wang DL, Yin ZJ, et al (2014). Genomic DNA methylation polymorphism analysis of cotton under NaCl and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> stress. Sci Agric Sin Chin, 47 (16): 3132–3142 (in Chinese with English abstract) [陆许可, 王德龙, 阴祖军等(2014). NaCl和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>对不同棉花基因组的DNA甲基化影响. 中国农业科学, 47 (16): 3132–3142]
- Møller AL, Pedas P, Andersen B, et al (2011). Responses of barley root and shoot proteomes to long-term nitrogen deficiency, short-term nitrogen starvation and ammonium. Plant Cell Environ, 34 (12): 2024–2037
- Naydenov M, Baev V, Apostolova E, et al (2015). High-temperature effect on genes engaged in DNA methylation and affected by DNA methylation in *Arabidopsis*. Plant Physiol Bioch, 87: 102–108
- Nie LJ (2008). DNA methylation alteration of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) during *in vitro* growth by artificial inducement (dissertation). Kaifeng: Henan University (in Chinese with English abstract) [聂丽娟(2008). 离体条件下人工诱导菊花DNA甲基化变化(学位论文). 开封: 河南大学]
- Orsel M, Chopin F, Leleu O, et al (2006). Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. Plant Physiol, 142 (3): 1304–1317
- Plett D, Toubia J, Garnett T, et al (2010). Dichotomy in the *NRT* gene families of dicots and grass species. PLoS ONE, 5 (12): 152–158
- Secco D, Whelan J, Rouached H, et al (2017). Nutrient stress-induced chromatin changes in plants. Curr Opin Plant Biol, 39: 1–7
- Tian SB, Lin GY, Zheng CB, et al (2011). Cloning and expression of *CmCO* and *CmFT* of floral development genes in chrysanthemum. Acta Horticult Sin, 38 (6): 1129–1138 (in Chinese with English abstract) [田素波, 林桂玉, 郑成淑等(2011). 菊花花发育基因*CmCO*和*CmFT*的克隆与表达分析. 园艺学报, 38 (6): 1129–1138]
- Vanyushin BF (2006). DNA methylation in plants. Curr Top Microbiol, 301 (1): 67
- Wang XC, Chen L, Yang YJ, et al (2006). Advances in plant nitrogen nutrient genotypic difference. J Eco-Agric, 14 (03): 12–15 (in Chinese with English abstract) [王新超, 陈亮, 杨亚军等(2006). 植物氮素营养基因型差异研究进展. 中国生态农业学报, 14 (03): 12–15]
- Wang YM, Chen FJ (2004). Response of root morphology to nitrate supply and its contribution to nitrogen uptake in maize. J Plant Nutr, 27 (12): 2189–2202



- Wang ZC, Nie LJ, He YX (2009). The effect of 5-azaC cytidine to the DNA methylation and morphogenesis character of chrysanthemum during *in vitro* growth. *Acta Horti Sin*, 36 (12): 1783–1790 (in Chinese with English abstract) [王子成, 聂丽娟, 何艳霞(2009). 离体条件下5-氮杂胞嘧啶核苷对菊花DNA甲基化和表型性状的影响. *园艺学报*, 36 (12): 1783–1790]
- Wu YJ (2012). Epigenetics mechanism studies of maize seedling root under treatment of nitrogen deficiency and re-adding nitrogen (dissertation). Yangling: Northeast A&F University (in Chinese with English abstract) [武永军(2012). 缺氮复氮处理下玉米幼苗根系的表现遗传机制研究(学位论文). 杨凌: 西北农林科技大学]
- Xiong LZ, Xu CG, Saghai Maroof MA, et al (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 (3): 439–446
- Xu BH (2005). Studies of the effect of DNA methylation on the growth and development of the primary root in the *Triticum aestivum* (dissertation). Beijing: Capital Normal University (in Chinese with English abstract) [徐宝华(2005). DNA甲基化对小麦根系早期生长发育影响的研究(学位论文). 北京: 首都师范大学]

## Effects of DNA methylation level on the nitrate uptake of roots in *Chrysanthemum morifolium*

YU Yuan-Yuan, GUO Yun-Hui, WEN Li-Zhu, SUN Cui-Hui, FAN Hong-Mei, SUN Xian-Zhi, WANG Wen-Li, SUN Xia, ZHENG Cheng-Shu\*

*College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Chrysanthemum Research Center of China, Japan and Korea in Shandong Province, Taian, Shandong 271018, China*

**Abstract:** Using the rooted cuttings of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) as test materials, the chrysanthemum roots system was treated with methylation inhibitor (5-azaC) and methyl donor (SAM) under the condition of nitrogen deficiency and suitable nitrogen hydroponics. The changes of DNA methylation level, root system configuration parameters, the contents of  $\text{NO}_3^-$  and the relative expression levels of  $\text{NO}_3^-$  transporter gene *CmNRT1.1*, *CmNRT2.1* and *CmNAR2.1* were measured. The results showed that the DNA methylation level with 5-azaC treatment was reduced; the total root diameter, total surface area and total volume of root system increased. In addition, the contents of  $\text{NO}_3^-$  was significantly increased and the relative expression levels of *CmNRT1.1*, *CmNRT2.1* and *CmNAR2.1* in root system were also increased. It is conjectured that the reduction of DNA methylation level in the genome of chrysanthemum could increase the expression of  $\text{NO}_3^-$  transport related genes, and then promote the absorption of  $\text{NO}_3^-$  in the root system.

**Key words:** *Chrysanthemum morifolium*; root; DNA methylation; nitrate nitrogen; 5-azaC; SAM; MSAP

Received 2017-11-20 Accepted 2018-04-13

This work was supported by National Science and Technology Support Program Project (2011BAD10B07) and Projects of National Science Foundation of China (31670663).

\*Corresponding author (zcs@sdau.edu.cn).