

Cd 胁迫下不同耐性豆科植物根内活性氧产生与基因组 DNA 多态性变化*

张芬琴¹ 张红晓² 沈振国^{3**}

(¹河西学院农业与生物技术学院, 甘肃张掖 734000; ²河南科技大学农学院, 河南洛阳 471003; ³南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

摘要 采用溶液培养法,研究了镉胁迫对绿豆和箭舌豌豆幼苗根基因组 DNA 多态性和活性氧产生的影响。结果表明: Cd 胁迫降低了 2 种植物根尖基因组 DNA 模板的稳定性,导致 DNA 多态性发生了变化,包括 RAPD 谱带的增加、缺失及其荧光强度的改变;同时, Cd 胁迫抑制了根的伸长生长,促进了根内超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)产生和过氧化氢(H_2O_2)积累; Cd 胁迫下 2 种植物根的伸长与其根内 $O_2^{\cdot-}$ 产生、 H_2O_2 积累以及 DNA 多态性呈负相关, DNA 多态性与 Cd 胁迫下 H_2O_2 积累呈正相关。

关键词 Cd 胁迫; 豆科植物; 活性氧; DNA 多态性

中图分类号 X171 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)9-2330-07

Reactive oxygen production and genome DNA polymorphism change in root tip tissues of two leguminous species with different tolerance under Cd stress. ZHANG Fen-qin¹, ZHANG Hong-xiao², SHEN Zhen-guo^{3**} (¹ College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye 734000, Gansu, China; ² College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China; ³ College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, **31**(9): 2330–2336.

Abstract: The effects of cadmium (Cd) on the reactive oxygen productions and genome DNA polymorphism changes in roots of *Phaseolus aureus* Roxb. cv. VC-3762 (Cd-sensitive species) and *Vicia sativa* L. cv. 333/A (Cd-resistant species) seedlings were investigated using hydropo-
nic solution culture. The results showed that Cd stress decreased the genomic template stability and induced the changes of the genome DNA polymorphism in the root tips of the two species, manifesting the variation of band intensity, loss of normal bands, and appearance of new bands. Meanwhile, Cd stress inhibited the root growth and increased the production of $O_2^{\cdot-}$ and the accumulation of H_2O_2 in the roots. The root length of the two species under Cd stress was negatively correlated with the production of $O_2^{\cdot-}$, accumulation of H_2O_2 , and genome DNA polymorphism in root tip tissues, and the genome DNA polymorphism was positively correlated with the accumulation of H_2O_2 under Cd stress.

Key words: Cd stress; leguminous species; reactive oxygen; DNA polymorphism.

镉(Cd)是毒性较大的重金属之一。目前, Cd 在电镀工业、冶金工业和军事等领域的广泛应用和含 Cd 化肥、农药和农膜等农资的大量施用已对大气、水体和土壤产生了严重污染, 并已成了许多国家的环境问题和社会问题(Fairbrother *et al.*, 2007; Dolenec *et al.*, 2009; Swaddiwudhipong, 2010)。与其

他金属相比, 土壤中的 Cd 更易被植物吸收和富集(董萌等, 2011)。进入土壤的 Cd, 一旦进入农产品将对人体健康产生危害(Arao *et al.*, 2010)。研究已证实, 过量 Cd 对植物有多方面的毒害作用, 包括抑制种子萌发和幼苗生长、影响物质代谢、破坏活性氧的防御系统、诱导活性氧(ROS)产生以及导致膜脂过氧化等(Zhang *et al.*, 2009; Noushina *et al.*, 2010)。研究还发现, Cd 积累于蚕豆叶片导致了其

* 国家自然科学基金项目(30571107 和 31160053)资助。

** 通讯作者 E-mail: zgshen@njau.edu.cn

收稿日期: 2012-02-04 接受日期: 2012-05-22

对叶片细胞 DNA 的损伤 (Lin *et al.*, 2007), 水稻叶片 DNA 受损的程度因 Cd 浓度的增加而加深 (吴庆钰等, 2007)。随着 Cd 浓度的增加, 大麦根尖基因组 DNA 的随机扩增多态性 (RAPD) 图谱发生了明显的变化 (刘宛等, 2006)。

研究指出, 一些重金属诱导的动、植物和微生物 DNA 损伤可能与其诱导活性氧的产生有关 (Mittler, 2002; Mancini *et al.*, 2006)。迄今也有一些关于重金属污染胁迫对高等植物细胞基因组 DNA 多态性影响的研究 (Mengoni *et al.*, 2000; 刘宛等, 2006), 但 DNA 多态性与重金属污染胁迫下的活性氧产生有无相关性的研究目前未曾见到。由此, 本试验选取了耐 Cd 性不同的绿豆 (对 Cd 敏感型) 和箭舌豌豆 (对 Cd 较耐型) 2 种豆科植物, 对 Cd 胁迫下绿豆和箭舌豌豆基因组 DNA 多态性的变化与活性氧产生相关性进行了研究, 以期 Cd 毒害机理的进一步探讨、为农业生产早期预报 Cd 对植物的遗传毒理效应, 以及为 Cd 污染预警与评价提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养

分别挑选大小一致且饱满的绿豆 (*Phaseolus aureus* Roxh. VC-3762) 和箭舌豌豆 (*Vicia sativa* L. cv. 333/A) 种子若干浸泡在 0.1% 的 HgCl₂ 溶液中表面消毒 5 min, 之后用去离子水冲洗 3 次, 每次 5 min; 洗净后, 于 25 ℃ 的温度下用去离子水浸种 12 h 后, 将种子置于 25 ℃ 黑暗条件下使其发芽; 待出芽后, 挑选发芽一致的种子播于装有石英砂的塑料网篮中, 网篮置于盛有营养液 [组成浓度为 (mmol · L⁻¹): 0.51 NH₄NO₃, 0.03 (NH₄)₂SO₄, 0.097 K₂HPO₄, 0.088 K₂SO₄, 0.38 KNO₃, 1.0 Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 0.27 Mg(NO₃)₂, 6.6 × 10⁻³ H₃BO₄, 5.1 × 10⁻³ MnCl₂, 0.3 × 10⁻³ ZnSO₄ · 7H₂O, 0.16 × 10⁻³ CuSO₄ · 5H₂O, 0.1 × 10⁻³ Na₂MoO₄ · H₂O 和 45 × 10⁻³ Fe-EDTA] 的培养钵中培养。培养期间, 每日通气 1 次, 每 2 天更换 1 次营养液。待幼苗长至第 1 对真叶完全展开时, 选长势良好且较为一致的幼苗移栽到含 1 L 上述营养液的培养钵中继续培养至第 2 对真叶长出时, 对 2 种植物幼苗进行 Cd (CdCl₂) 胁迫处理, 设其浓度为 0、5、10 和 50 μmol · L⁻¹, 每处理设 3 个重复。于处理 3 d 后采取根尖, 提取基因组 DNA、测定有关指标。

1.2 测定方法

采用 SDS 法 (王关林和方红筠, 2009) 提取、纯化基因组 DNA。采取 0.5 g 新鲜根, 置液氮中研磨成粉, 将冻粉平均分配到 2 个 1.5 mL 的离心管中, 各加入提取缓冲液 900 μL, 轻轻搅动, 使粉末充分散开。然后分别加入 100 μL 10% SDS, 充分混匀, 于 65 ℃ 水浴中保温 10 ~ 15 min (间隔晃动 2 ~ 3 次)。各加入 160 μL 5 mol · L⁻¹ 乙酸钾, 充分混匀, 冰浴中放置 30 min。4 ℃ 下 12000 r · min⁻¹ 离心 10 min。上清液转入备用的离心管中, 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 轻轻颠倒离心管数次 (约 10 s), 放置片刻 (3 min)。于 4 ℃ 下 8000 r · min⁻¹ 离心 10 min。上清液转入另一离心管中, 加入 2/3 倍体积、-20 ℃ 预冷的异丙醇, 混匀后, -20 ℃ 放置 30 min 后, 于 4 ℃ 下 8000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 弃去上清液, 用 80% 的乙醇洗涤沉淀, 于 12000 r · min⁻¹ 离心 1 min, 吹干后将 300 μL TE 与 3 μL RNase 酶液混合, 于 37 ℃ 保温 1 h。加入等体积的氯仿/异戊醇, 混匀后于 10000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液并量出体积, 加入 1/5 倍体积的 3 mol · L⁻¹ NaAc, 混匀后再加入 2.5 倍体积的无水乙醇, 于 10000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 弃去上清液, 用 80% 乙醇洗涤沉淀, 在超净工作台上吹干。用一定量的 ddH₂O 溶解吹干后的 DNA, 存于 -20 ℃, 以备用。将总 DNA 在 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳结束后经 EB 染色, 用凝胶成像分析系统观察结果并拍照。

试验所用引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司 (表 1)。按 2 × Taq PCR Mix 的使用说明, 建立扩增的反应体系: 反应体系总体积为 12.5 μL, 其中含有 1.7 μmol · L⁻¹ 随机引物, 200 μmol · L⁻¹ dNTPs, 70 ng 基因组总 DNA 和 2.2 U DNA 聚合酶。

表 1 试验中所用的 10 条引物的碱基序列 (5'-3')
Table 1 Sequences of 10 primers used in the experiment (5'-3')

编号	序列	编号	序列
S37	GACCGCTTGT	S257	ACCTGGGGAG
S79	GTTGCCAGCC	S361	CATTCGAGCC
S86	GTGCCTAACC	S416	GTAACCAGCC
S93	CTCTCCGCCA	S463	CTGATACGCC
S127	CCGATATCCC	S495	GGGTAACGTG
S149	CTTCACCCGA	S506	GTCTACGGCA
S158	GGA CTGCAGA	S509	TGAGCACGAG
S164	CCGCCTAGTC	S1100	AGGAGTCGGA
S167	CAGCGACAAG	S1387	CTACGCTCAC
S177	GGTGGTGATG	S1461	TGAGGGCCGT

反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 3 min,38 ℃ 退火 60 s,72 ℃ 延伸 60 s,35 个循环,最后 72 ℃ 保温 10 min。RAPD 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离经 EB 染色,用凝胶成像分析系统观察染色结果并拍照。由此,从以上引物中筛选出适合 2 种材料扩增的引物。

基因组模板稳定性(GTS)按 Atienzar 等(2002)之法计算。公式为: $GTS=(1-a/n) \times 100\%$ 。式中, a 为处理组的 RAPD 多态性谱带数,即与对照组相比,处理组新出现和消失的 PCR 谱带数之和, n 为对照组的总谱带数。

H₂O₂ 含量的测定参照 Loreto 和 Velikova (2001) 方法。O₂⁻ 产生速率的测定参照 Jiang 和 Zhang(2001) 的方法。用学生用直尺于 Cd 胁迫前测出根的长度,再于胁迫 3 d 后测其长度,两者相减而得其净伸长量。

1.3 数据处理

采用 SPSS 统计分析软件 13.0 对数据进行单因素方差分析,采用最小显著差数法(LSD)进行显著性检验,采用 Microsoft Excel 2003 软件作图。

2 结果与分析

2.1 2 种植物根尖细胞基因组 DNA 的纯化结果

采用 CTAB 之法获取的 2 种植物根尖细胞基因组 DNA,纯化后测得其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值均在 1.75~1.85,说明本试验所得的 DNA 比较纯净。由琼脂糖电泳后的图谱(图 1)可见,来自 2 种植物根尖细胞的基因组模板 DNA,其分子量均较大且大小近似,约为 23 kb,无论是来自对照的还是来自 Cd 胁迫

的 2 种植物根尖细胞的基因组 DNA,其电泳条带均较清晰,无拖尾现象,说明均可用于 RAPD 扩增。

2.2 引物筛选的结果

由图 2 可见,在 20 种随机引物中,能使 2 种植物 DNA 都能扩增出多态性条带的有 S93、S149、S164、S167、S463 和 S506。所以,本研究选用此 6 种引物进行有关研究。

2.3 Cd 胁迫 3 d 后 2 种植物根尖细胞基因组 DNA 的 RAPD 图谱

由图 3 可见,与对照相比,不同浓度 Cd 胁迫 3 d 后,2 种植物根尖细胞基因组 DNA 的 RAPD 谱发生了一定的变化,包括有新带的出现、原带的消失以及原谱带发生强弱的变化。如表 2 和 3 所示,绿豆和箭舌豌豆对照组的 RAPD 图谱中共有 36 条和 40 条谱带。与各自的对照相比,5、10 和 50 μmol·L⁻¹ 的 Cd 胁迫 3 d 后,绿豆 RAPD 图谱分别发生了 44%、53% 和 67% 的变化(表 2),箭舌豌豆的发生了 20%、35% 和 40% 的变化(表 3)。绿豆幼苗根的基因组 DNA 多态性(谱带的增出与消失)随浓度的增加而明显增加。

2.4 Cd 胁迫下 2 种植物根尖细胞基因组模板的稳定性

与对照相比,随 Cd 胁迫浓度增加,2 种植物根尖细胞基因组模板稳定性降低(图 4)。在 5、10 和 50 μmol·L⁻¹ Cd 胁迫 3 d 后,绿豆的基因组模板稳定性分别降低到其对照的 88.9%、80.6% 和 77.8%,箭舌豌豆的分别降低到其对照的 92.5%、90.0% 和 87.5%。2 种植物相比,绿豆的基因组模板稳定性受到的影响较大。

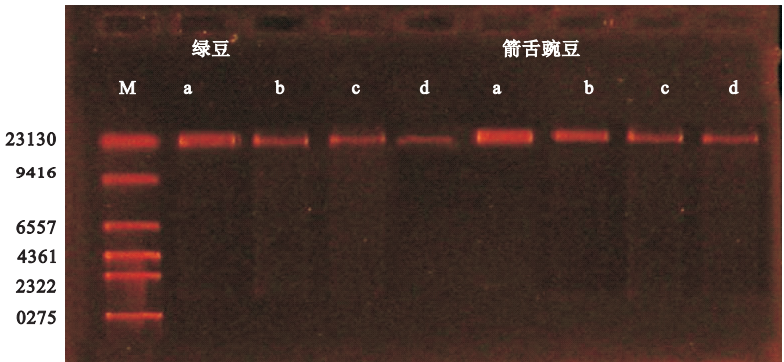


图 1 2 种植物根尖细胞基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig.1 Agarose gel electrophoresis profiles of genomic DNA from two plants species
条带 a、b、c 和 d 的 Cd 胁迫浓度分别为 0、5、10 和 50 μmol·L⁻¹。

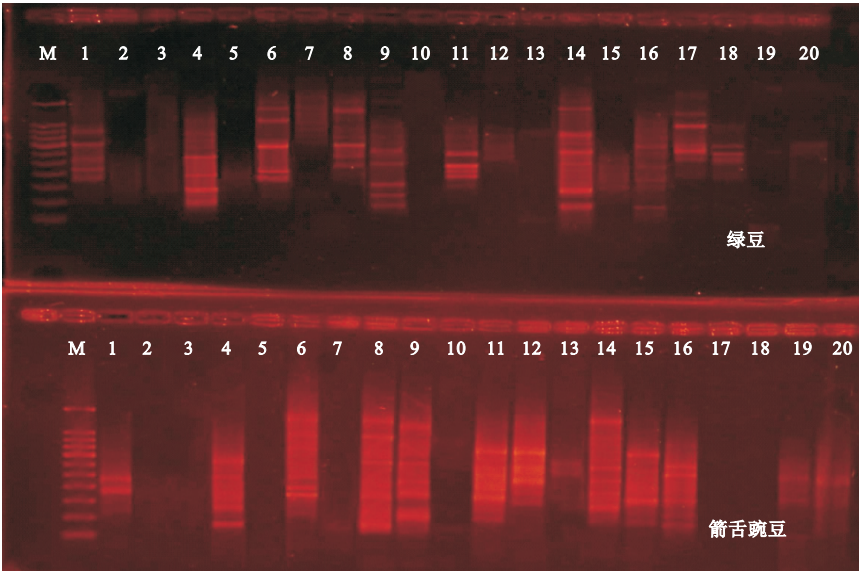


图 2 以来自 2 种植物对照组的 DNA 为模板,用 20 种引物扩增的结果

Fig. 2 Results of RAPD of the DNA from control plants

M;marker, 自上而下分别为 1200、1000、900、800、700、600、500、400、300、200 和 100;1-S37;2-S79;3-S86;4-S93;5-S127;6-S149;7-S158; 8-S164; 9-S167;10-S177;11-S257;12-S361;13-S416;14-S463;15-S495;16-S506;17-S509;18-S1100;19-S1387;20-S1461。

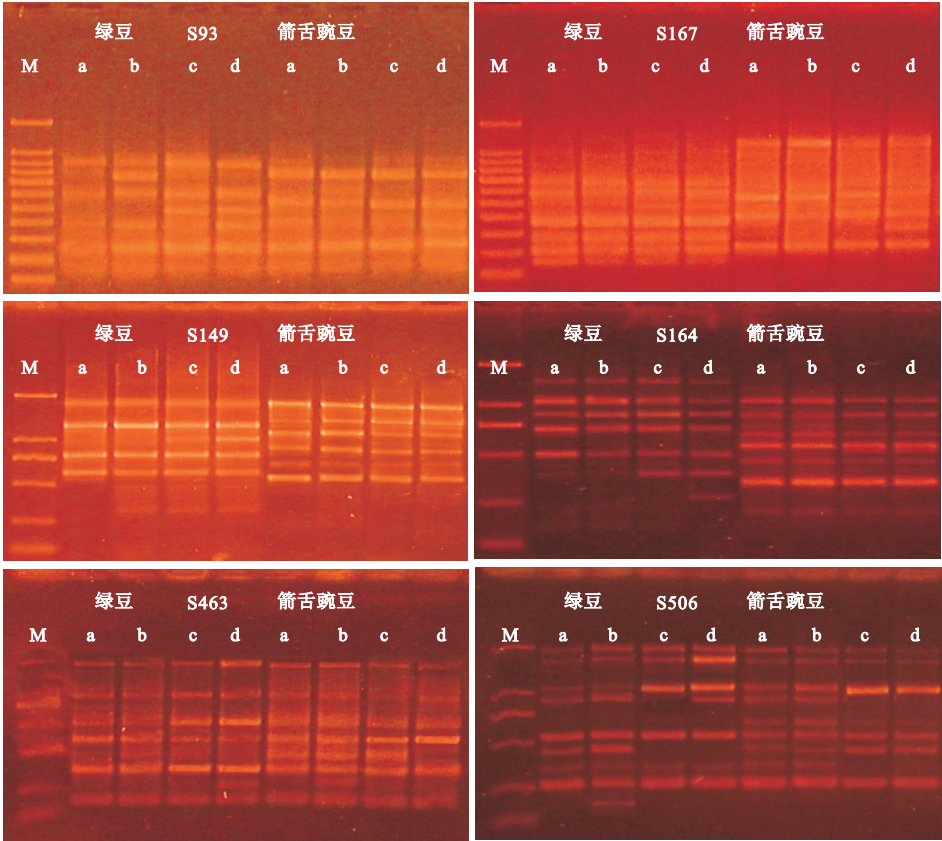


图 3 Cd胁迫下 2 种植物基因组 DNA 的 RAPD 图谱

Fig. 3 RAPD profiles of genomic DNA from root-tip cells of two plants species after the different concentrations Cd stress for 3 days

M;marker, S93 和 S167 的 marker 自上而下分别为 1200、1000、900、800、700、600、500、400、300、200 和 100; S149、S164、S463 和 S506 的 marker 自上而下分别为 1200、900、700、500、300、和 100;泳道 a、b、c 和 d 的 Cd 胁迫浓度分别为 0、5、10 和 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 2 Cd 胁迫 3 d 后绿豆根尖细胞基因组 DNA 的多态性变化
Table 2 Polymorphic bands in root-tip cells of mung bean after Cd stress for 3 days

引物	0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$				10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$				50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
		N	V	↑	↓	N	V	↑	↓	N	V	↑	↓
S93	5	1	0	1	1	1	0	4	0	1	0	4	0
S167	6	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	2
S149	4	1	0	0	1	2	0	0	0	2	0	0	0
S164	7	0	0	1	4	0	0	1	3	1	1	0	4
S463	6	0	0	0	1	0	0	2	1	2	0	3	1
S506	8	1	0	1	1	0	2	1	0	0	1	2	0
T	36	4	0	3	9	4	2	8	5	6	2	9	7
P		4				6			8				
C			16				19				24		

N 代表新出现的条带数;V 代表消失了的条带数;↑ 代表条带的强度增加;↓ 代表条带的强度减弱;T 代表对照组的总条带数;P 代表多态性条带数,即新出现的和消失的条带总数;C 代表增加、消失和条带的荧光强度发生了变化的条带总数。下同。

表 3 Cd 胁迫 3 d 后箭舌豌豆根尖细胞基因组 DNA 的多态性变化
Table 3 Polymorphic bands in root-tip cells of common vetch after Cd stress for 3 days

引物	0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$				10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$				50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
		N	V	↑	↓	N	V	↑	↓	N	V	↑	↓
S93	5	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1
S167	5	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	2
S149	6	0	0	2	0	0	0	1	2	0	0	0	1
S164	8	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	2
S463	7	1	0	0	0	0	0	1	2	0	1	1	1
S506	9	0	0	1	0	0	2	1	0	0	2	1	3
T	40	2	0	4	2	0	3	5	6	1	4	2	10
P		2				3			5				
C			8				14				16		

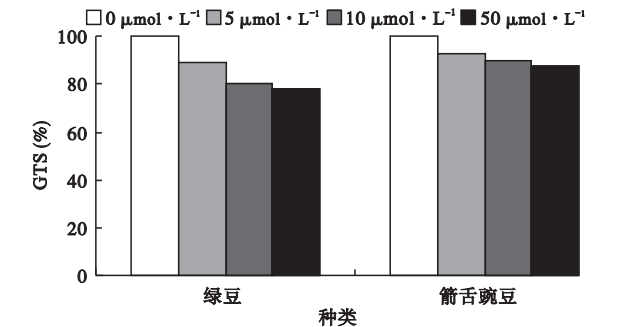


图 4 Cd 胁迫 3 d 后 2 种植物根尖细胞基因组模板的稳定性
Fig. 4 Genomic template stability of two plant species root-tip cells after Cd stress for 3 days

2.5 Cd 胁迫下 2 种植物根尖组织内 O₂⁻ 的产生和 H₂O₂ 积累

由表 4 可见,与对照相比,Cd 胁迫 3 d 后,随 Cd 浓度增加,2 种植物根尖组织内 O₂⁻ 的产生速率和 H₂O₂ 积累量显著增加 ($P<0.05$)。当胁迫浓度达 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,绿豆和箭舌豌豆根尖组织内的 O₂⁻ 的产生速率分别达其对照的 1.6 和 1.2 倍、H₂O₂ 积累

量分别是其对照的 2.4 和 1.7 倍。2 种植物相比,在绿豆根中产生较多的 O₂⁻、积累较多的 H₂O₂。

2.6 Cd 胁迫下 2 种植物主根的净伸长量

与对照相比,Cd 胁迫 3 d 后,2 种植物主根的净伸长量随胁迫浓度的增加而显著减少(表 5)。当胁迫浓度达 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,绿豆和箭舌豌豆的主根净伸长量分别是其对照的 19.0% 和 28.5%。

2.7 Cd 胁迫下 2 种植物根内所测指标间的相关性

Cd 胁迫 3 d 后,2 种植物根净伸长量与其内 O₂⁻ 产生速率、H₂O₂ 含量、DNA 多态性条带数和发生了变化的条带总数间呈显著负相关 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$,表 6 和表 7)。在绿豆根中,DNA 多态性条带数和发生了变化的条带总数均与 H₂O₂ 含量呈显著的正相关 ($P<0.05$),但与 O₂⁻ 产生速率间无显著相关(表 6);在箭舌豌豆根中,只有 DNA 多态性条带数与 H₂O₂ 含量间呈显著正相关 ($P<0.05$,表 7);与绿豆的相似,DNA 多态性条带数和发生了变化的条带总数与 O₂⁻ 产生速率间也无显著相关。

表 4 Cd 胁迫 3 d 后 2 种植物根尖组织内 O₂^{·-} 的产生和 H₂O₂ 积累

Table 4 The O₂^{·-} production rate and H₂O₂ accumulation in the root-tip tissues of two plant species after Cd stress for 3 days

Cd 浓度 (μmol · L ⁻¹)	O ₂ ^{·-} (nmol · g ⁻¹ · min ⁻¹)		H ₂ O ₂ (nmol · g ⁻¹)	
	绿豆	箭舌豌豆	绿豆	箭舌豌豆
0	214. 50±16. 89 a	206. 50±14. 70 a	199. 43±11. 32 a	197. 43±11. 02 a
5	231. 5±19. 62 a	218. 75±6. 76 ab	331. 71±24. 71 b	243. 14±28. 74 b
10	301. 25±17. 51 b	238. 25±22. 93 b	401. 71±27. 46 c	314. 00±9. 86 c
50	343. 25±24. 49 c	242. 25±15. 06 b	478. 86±39. 43 d	340. 29±19. 85 d

数据是 3 次重复的平均值±SE;以鲜重计;同列内不同字母代表在 P<0. 05 水平上的差异显著性。

表 5 Cd 胁迫 3 d 后 2 种植物主根的净伸长量 (cm)

Table 5 The net length of the main roots of two plant species after Cd stress for 3 days

Cd 浓度 (μmol · L ⁻¹)	绿豆	箭舌豌豆
0	2. 63±0. 12 a	3. 90±0. 19 a
5	1. 75±0. 15 b	3. 03±0. 14 b
10	0. 99±0. 09 c	1. 87±0. 15 c
50	0. 50±0. 04 d	1. 11±0. 09 d

数据是 3 次重复的平均值±SE;同列内不同字母代表在 P<0. 05 水平上的差异显著性。

表 6 绿豆幼苗根中所测各指标间的相关性

Table 6 Correlation between the parameters in the roots of mung bean after Cd stress for 3 days

	根长	O ₂ ^{·-} 产生 速率	H ₂ O ₂ 含量	P	C
根长	1				
O ₂ ^{·-} 产生速率	-0. 959 *	1			
H ₂ O ₂ 含量	-0. 996 **	0. 937	1		
P	-0. 994 **	0. 927	0. 999 *	1	
C	-0. 960 *	0. 844	0. 978 *	0. 983 * 1	

n=4;P 代表多态性条带数,即新出现的和消失的条带总数;C 代表增加、消失和条带的强弱发生了变化的条带总数。* P<0. 05; ** P<0. 01。

表 7 箭舌豌豆幼苗根中所测各指标间的相关性

Table 7 Correlation between the parameters in the roots of common vetch after the different concentrations Cd stress for 3 days

	根长	O ₂ ^{·-} 产生 速率	H ₂ O ₂ 含量	P	C
根长	1				
O ₂ ^{·-} 产生速率	-0. 988 *	1			
H ₂ O ₂ 含量	-0. 979 *	0. 938	1		
P	-0. 980 *	0. 945	0. 978 *	1	
C	-0. 976 *	0. 935	0. 917	0. 958 * 1	

n=4;P 代表多态性条带数,即新出现的和消失的条带总数;C 代表增加、消失和条带的强弱发生了变化的条带总数。* P<0. 05; ** P<0. 01。

3 讨 论

植物根系是其吸收和利用营养物质的器官,根的生长情况直接影响地上部的生长和营养状况及产

量水平。本研究表明,在不同浓度 Cd 胁迫下,绿豆和箭舌豌豆根的伸长生长明显受抑,且与其根细胞内 O₂^{·-} 产生速率、H₂O₂ 含量、DNA 多态性条带数和发生了变化的条带总数间呈显著正相关 (P<0. 05 或 P<0. 01,表 6 和 7)。

O₂^{·-} 是 O₂ 的单电子还原产物,是生物体内最初形成的活性氧 (ROS) 自由基,其歧化可生成强氧化剂 H₂O₂。本研究证实,Cd 诱导了供试 2 种植物根组织内产生了 O₂^{·-} 和 H₂O₂ (表 4),这与在其他植物中所得的结果相似 (Maksymiec & Krupa, 2006; Yeh *et al.* , 2007; 邵小杰和杨洪强, 2010)。许多研究也证实,过多的活性氧可攻击细胞内 DNA 碱基 (Lopez *et al.* , 2006)。一些重金属诱导动、植物和微生物 DNA 的损伤可能与重金属诱导活性氧的产生有关 (Mancini *et al.* , 2006; Lin *et al.* , 2007; 李慧等, 2010)。

迄今为止,人们已用 RAPD 技术成功地检测出了多种污染物在低剂量暴露条件下对微生物、动物、植物细胞 DNA 造成的损伤和突变,如 Conte 等 (1998) 以拟南芥幼苗为材料的研究发现,在水溶液和原位工业污染土壤中的重金属暴露条件下,拟南芥基因组的 RAPD 谱带明显增加,并且随处理时间的延长,重金属污染胁迫所造成的 DNA 损伤变化也越明显。刘宛等 (2006) 发现,随着 Cd 浓度的增加,大麦根尖基因组 DNA 的 RAPD 图谱发生明显的变化,包括 RAPD 谱带的增加、缺失和其荧光强度的变化。本研究发现,不同浓度 Cd 胁迫后,2 种植物的 RAPD 均发生了变化。对绿豆来说,随 Cd 处理浓度的增加,新增谱带数随之增加 (表 2),这不仅与 Conte 等 (1998) 的结果一致,而且与 Mengoni 等 (2000) 的结果也是相似的;对箭舌豌豆来说,随着 Cd 处理浓度的增加,消失的谱带数增加 (表 3)。Cd 处理引起了 2 种植物 RAPD 谱带中原有谱带的强度增或减 (表 2、表 3),根据 RAPD 技术的原理,无论谱带增

加还是减少,均说明 Cd 处理导致了模板 DNA 的变化,使其受到了一定的损伤。

本研究中,不同浓度 Cd 胁迫后,2 种植物 RAPD 新带的出现和原带的消失以及原带荧光强弱的变化不尽相同,绿豆的 DNA 多态性显于箭舌豌豆的(表 2、表 3)。Atienzar 等(2002)研究表明,环境污染诱导生物体细胞 RAPD 谱带的变化与 DNA 变化之间具有相互关系。由此可推测,不同浓度的 Cd 处理均会导致 2 种植物基因组 DNA 结构发生变化而使两者的 DNA 受到一定程度的损伤,但这种损伤是 Cd 处理导致了 DNA 单链或双链 DNA 的断裂还是引起了片段的插入或缺失等尚需进一步的研究。

本研究发现,绿豆根尖细胞基因组 DNA 多态性条带数和发生了变化的条带总数均与 H_2O_2 含量呈显著的正相关($P < 0.05$),说明 Cd 胁迫下 H_2O_2 积累可能不仅导致了 DNA 多态性变化,而且还影响了其原有谱带强弱。在箭舌豌豆根中,发生了变化的条带总数与 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量间呈显著正相关, DNA 多态性与此不相关($P < 0.05$),说明 Cd 胁迫没有直接导致其 DNA 多态性变化,推测二者间的这种差异可能与它们的 Cd 耐性不同有关,因此表现出在相同浓度 Cd 胁迫时其根的净伸长量不同。综上所述, Cd 胁迫导致 2 种植物根尖细胞基因组 DNA RAPD 图谱的变化与 Cd 诱导 H_2O_2 等活性氧产生或积累有关。

参考文献

董 萌, 赵运林, 库文珍, 等. 2011. 洞庭湖湿地 8 种优势植物对镉的富集特征. 生态学杂志, **30**(12): 2783–2789.

李 慧, 丛 郁, 王宏伟, 等. 2010. 镉对草莓幼苗根尖氧化系统和基因组 DNA 多态性的影响. 园艺学报, **37**(5): 721–730.

刘 宛, 郑 乐, 李培军, 等. 2006. 镉胁迫对大麦幼苗基因组 DNA 多态性影响. 农业环境科学学报, **25**(1): 19–24.

邵小杰, 杨洪强. 2010. 氯化镉胁迫下葡萄根、叶内源一氧化氮和活性氧的生成. 应用生态学报, **21**(10): 2666–2670.

王关林, 方红筠. 2009. 植物基因工程. 北京: 科学出版社

吴庆钰, 杨俊诚, 张建峰, 等. 2007. 镉与苄嘧磺隆复合污染对水稻细胞、DNA 的毒害作用. 农业环境科学学报, **26**(6): 2216–2220.

Arao T, Ishikawa S, Murakami M, et al. 2010. Heavy metal contamination of agricultural soil and countermeasures in Japan. *Paddy and Water Environment*, **8**: 247–257.

Atienzar FA, Venier P, Jha AN. 2002. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutation Research*, **521**: 151–163.

Conte C, Mutti I, Puglisi P. 1998. DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effect of heavy metals pollution. *Chemosphere*, **37**: 2739–2749.

Dolenec T, Rogan N, Serafimovski T, et al. 2009. Heavy metal contamination of paddy soils and rice (*Oryza sativa* L.) from Kocani Field (Macedonia). *Environmental Geochemistry and Health*, **31**: 421–430.

Fairbrother A, Wenstel R, Sappington K, et al. 2007. Framework for metals risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **68**: 145–227.

Jiang MY, Zhang JH. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology*, **11**: 1265–1273.

Lin AJ, Shang XH, Chen MM, et al. 2007. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Sciences*, **19**: 596–602.

Loreto F, Velikova V. 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology*, **127**: 1781–1787.

Lopez E, Arce C, Oset-Gasque MJ, et al. 2006. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radical Biology & Medicine*, **40**: 940–951.

Maksymiec W, Krupa Z. 2006. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, **57**: 187–194.

Mancini A, Buschini A, Restivo FM, et al. 2006. Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. *Plant Science*, **170**: 845–852.

Mengoni A, Gonnelli C, Galardi F. 2000. Genetic diversity and heavy metal tolerance in populations of *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): A random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology*, **9**: 1319–1324.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**: 405–411.

Noushina I, Asim M, Rahat I, et al. 2010. Photosynthesis, growth and antioxidant metabolism in mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in cadmium tolerance. *Agricultural Sciences in China*, **9**: 519–527.

Swaddiwudhipong W. 2010. Changes in cadmium exposure among persons living in cadmium-contaminated areas in northwestern Thailand: A five-year follow-up. *Journal of the Medical Association of Thailand*, **93**: 1217–1222.

Yeh CM, Chien PS, Huang HJ. 2007. Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *Journal of Experimental Botany*, **58**: 659–671.

Zhang FQ, Zhang HX, Wang GP, et al. 2009. Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *Journal of Hazardous Materials*, **168**: 76–84.

作者简介 张芬琴,女,1963年生,博士,教授,主要从事植物抗性生理生化和环境保护方面的教学与科研工作。
E-mail: fenqinzh@hxxu.edu.cn
责任编辑 魏中青