

# 镉诱导拟南芥幼苗 DNA 损伤\*

孙梨宗<sup>1,2</sup> 刘宛<sup>1\*\*</sup> 马珊珊<sup>1,2</sup> 秦秦<sup>1,2</sup> 台培东<sup>1</sup> 李培军<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; <sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要** 采用随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记技术, 并结合幼苗的形态和生理指标, 研究镉 (Cd) 胁迫对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 幼苗基因组 DNA 损伤的影响。结果表明, 不同浓度 (0.25 ~ 5.0 mg · L<sup>-1</sup>) Cd 处理 24 d 后, 拟南芥幼苗根生长受到显著抑制, 地上部分可溶性蛋白质含量呈先升高后降低的趋势, 但对拟南芥幼苗叶片数、鲜重及叶绿素含量影响不大。选用 12 条寡核苷酸引物对拟南芥幼苗地上部分与根系基因组 DNA 进行 PCR (polymerase chain reaction) 扩增, 发现处理组与对照组 RAPD 图谱之间存在明显差异, 且与镉浓度之间存在剂量-效应关系。基因组模板的稳定性 (genomic template stability, GTS) 随着 Cd 浓度的增加而降低。3 个处理组幼苗地上部分 GTS 分别为 91%、89% 和 80%; 相应根部 GTS 分别为 71%、67% 和 60%。研究表明, 利用 RAPD 技术获得的拟南芥 DNA 多态性变化可作为检测镉遗传毒性效应的生物标记物。比照其他几个指标, 拟南芥幼苗根部 RAPD 谱带变化的敏感性更为优异, 具有较好的应用前景。

**关键词** RAPD; DNA 损伤; DNA 多态性; 镉 (Cd); 生物标记物; 拟南芥

**中图分类号** X503.23 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)9-2337-07

**Cadmium-induced DNA damage of arabidopsis seedlings.** SUN Li-zong<sup>1,2</sup>, LIU Wan<sup>1</sup>, MA Shan-shan<sup>1,2</sup>, QIN Qin<sup>1,2</sup>, TAI Pei-dong<sup>1</sup>, LI Pei-jun<sup>1</sup> (<sup>1</sup> Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; <sup>2</sup> Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, **31**(9): 2337–2343.

**Abstract:** By using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique in combining with morphological and physiological observation, this paper studied the genomic DNA damage of *Arabidopsis thaliana* seedlings under the Cd stress. After treated with 0.25, 3.0 and 5.0 mg · L<sup>-1</sup> of Cd for 24 days, the root elongation growth of the seedlings was inhibited, the total soluble protein content in shoots decreased after an initial increase, but the leaf number, fresh weight, and chlorophyll content were less affected. Using 12 oligonucleotide primers (10 bp) to amplify the genomic DNA of the seedlings shoot and root cells by polymerase chain reaction (PCR), it was observed that the RAPD profiles showed obvious differences between the normal and Cd-exposed plantlets, and the change effect was dose-dependent. The genomic template stability (GTS) decreased with increasing Cd stress. The GTS of the shoots in the treatments 0.25, 3.0 and 5.0 mg · L<sup>-1</sup> of Cd was 91%, 89%, and 80%, and that of the roots was 71%, 67%, and 60%, respectively. In sum, the changes in the DNA polymorphism of *A. thaliana* seedlings detected by RAPD technique could be used as a biomarker to detect the genotoxic effect of Cd on plants, and the changes in the RAPD profiles of *A. thaliana* roots were more sensitive than the other indicators, being more suitable for the diagnosis of soil pollutants.

**Key words:** RAPD; DNA damage; DNA polymorphism; cadmium (Cd); biomarker; *Arabidopsis thaliana*.

\* 国家自然科学基金项目 (20977095、21077113 和 40930739) 资助。

\*\* 通讯作者 E-mail: liuwang63@hotmail.com

收稿日期: 2012-03-02 接受日期: 2012-04-13

镉(Cd)是一种半衰期很长的有毒重金属和环境污染物质,随着现代工业的迅速发展,镉污染对人类所造成的危害日益严重。在全国第二次污灌普查中,Cd污染面积达重金属污染超标土壤面积的59.6%(张徽等,2010)。Cd是环境中移动性和生物毒性最强的重金属之一,易在食物链中积累后进入人体,镉可引起DNA单链断裂、形成DNA碱基修饰产物8-羟基脱氧鸟苷,并损害DNA修复系统,DNA损伤如果没有得到正确的修复,可导致DNA突变,进而诱导细胞凋亡,产生多种毒害效应(朱玉芳等,2002)。因此对镉污染土壤的诊断与治理已经引起国内外的广泛重视(周启星等,2004;黄宝圣,2005)。

几个经典实验已被用于研究重金属对植物产生的遗传毒性,如微核试验,彗星试验,染色体畸变试验(Singh *et al.*, 2009),但它们无法在DNA水平上对有毒金属的影响提供必要的信息(Conte *et al.*, 1998)。而分子标记技术的发展为重金属污染造成的DNA损伤和突变检测提供了DNA水平的新工具。随机扩增多态DNA技术(RAPD)是基于多聚酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)而发展起来的,它是指以10 bp左右的随机寡核苷酸作为单一引物,以生物基因组DNA进行扩增反应,当细胞DNA发生损伤时,会造成引物结合位点的DNA片段的缺失、插入或碱基突变,使引物无法与结合位点匹配,就会造成扩增中断,使扩增产物大小和数量发生改变,呈现出多态性。由于其快速、简便、灵敏度高,RAPD技术已被应用在医学(Singh & Roy, 2004; Zhang *et al.*, 2010)、水生生态系统中重金属(Conte *et al.*, 1998)、多环芳烃(Castaño & Becerril, 2004)、辐射(常凤起等,2003)、农药(Rong & Yin, 2004)、大麦(刘宛等,2006)、水稻(Liu *et al.*, 2005)等胁迫条件下生物体DNA损伤的检测。

拟南芥因独特的生物学、遗传学以及分子生物学特性而成为当今生物科学研究领域的模式植物。特别是2000年底完成拟南芥全基因组的测序,为拟南芥基因克隆与功能研究提供了更高的平台(刘泓等,2009)。目前,关于Cd胁迫对模式植物拟南芥基因组DNA损伤的研究报道较少,詹振楠等(2011)研究了镉胁迫对拟南芥幼苗叶片基因组DNA多态性的影响,但对其根部损伤的研究未见报道。本文研究了不同浓度Cd胁迫对拟南芥幼苗地上部分叶绿素和可溶性蛋白质含量的影响,用

RAPD技术检测并比较了地上部分与根部基因组DNA多态性的变化,结合形态、生理与分子3个层次的相关指标,以期进一步探索Cd对植物的遗传毒害机理,对环境中Cd污染进行早期预警和评价,为污染土壤的诊断提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子为哥伦比亚生态型(ecotype Columbia)。试验所用CdCl<sub>2</sub>为分析纯(99.9%),用蒸馏水配成含浓度为0(CK)、0.25、3.0和5.0 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> M&S (Murashige and Skoog)培养液(Liu *et al.*, 2007),所有处理均重复3次。

### 1.2 取样

首先用0.1% HgCl<sub>2</sub>溶液对选取好的饱满拟南芥种子进行10 min表面消毒,然后用去离子水清洗3次,每次5 min。洗净后,将种子浸泡于去离子水中,于4℃放置3 d,以打破种子休眠。将相同数量的拟南芥种子(约50~60粒)置于灭菌后的三角瓶中,加入150 mL分别含0、0.25、3.0和5.0 mg·L<sup>-1</sup> Cd(CdCl<sub>2</sub>配制)的M&S营养液,密封。置于摇床中进行光照培养(温度19~20℃,光暗周期14/10 h,光强3000 lx),24 d后取样,用刀片分离拟南芥幼苗叶及其根,经蒸馏水与无菌水分别清洗3次后用滤纸擦干,冷藏于-80℃冰箱中待用。

### 1.3 测定指标与方法

**1.3.1 拟南芥幼苗形态指标的测定** 取镉处理24 d后拟南芥幼苗各30株,用直尺分别测量其根长。根抑制率按下式计算:抑制率=(1-x/y)×100%,式中,y为对照组幼苗根平均根长,x为各处理组幼苗根平均根长。数据结果采用SPSS软件(版本13.0)和Microsoft Excel 2003进行统计分析,表示为平均值±标准差。各处理组的比较采用最小显著差数法(LSD)进行多重比较,显著性水平设为α=0.05。

取上述拟南芥幼苗30株,统计每株的叶片数及其叶片鲜重。

**1.3.2 拟南芥幼苗生理指标的测定** 可溶性蛋白含量的测定参照Bradford方法以牛血清蛋白为标准(Bradford, 1976)。叶绿素含量采用丙酮乙醇混合液浸提法测定。

**1.3.3 拟南芥幼苗叶及其根基因组DNA的提取与RAPD分析** 选取50~100 mg拟南芥幼苗叶片,用

CTAB 法进行总 DNA 提取,DNA 的浓度和纯度用蛋白-核酸含量测定仪测定。

RAPD 所用 10 bp 随机引物、LA DNA polymerase 和 dNTP 均购于大连宝生物工程技术有限公司。PCR 反应总体积 25 μL,体系中含有 1.7 μmol · L<sup>-1</sup> 随机引物,200 μmol · L<sup>-1</sup> dNTPs (4 种成分均为 50 μmol · L<sup>-1</sup>),PCR Buffer2.5 μL,80 ng 基因组总 DNA 和 2.2U LA DNA polymerase。试验所用引物序列如表 1 所示。

优化后的 RCR 反应程序: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,PCR 产物 4 ℃ 保存待用。PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离。电泳条带采用 Quantity One 软件进行统计分析。

每次 PCR 反应均设 2~3 重复,25 μL PCR 产物中取 5 μL 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,以验证其可重复性。

**1.3.4 基因组模板稳定性 (GTS) 的计算** 基因组模板稳定性 (GTS) 公式:GTS = (1 - A/N) × 100%,式中,A 为处理组幼苗叶片的 RAPD 多态性条带数;N 为对照组的总条带数。多态性条带数为与对照组相比,处理组新出现的和消失的 PCR 条带数之和 (Gichner & Herbette,2006)。

2 结果与分析

2.1 Cd 胁迫对拟南芥幼苗叶片数、叶片鲜重及根长的影响

拟南芥幼苗经 0、0.25、3.0 和 5.0 mg · L<sup>-1</sup> Cd 处理 24 d 后,外观上 Cd 处理组叶片大小、形状与对照之间没有明显差异。从表 2 可以看出,4 个处理的拟南芥幼苗叶片数均为 6,幼苗叶片鲜重随 Cd 浓度的增加略有变化,但处理组与各对照相比差异均不显著。

表 1 试验中所用的 12 条引物的碱基序列 (5'-3')  
Table 1 Sequences of 12 primers used in the experiment (5'-3')

引物 编号	引物碱基序列 (5'-3')	引物 编号	引物碱基序列 (5'-3')
1	CTGGC GAACT	7	TCTCC GCCCT
2	TCCGA TGCTG	8	GCTGG TGATG
3	CTGCG CTGGA	9	AAAGT GCGGC
4	CTGAG GTCT C	10	ACCTT TGCGG
5	CTGGG GCTGA	11	AGACC CAGAG
6	TCATC CGAGG	12	AATGC GGGAG

表 2 Cd 胁迫 24 d 后对拟南芥幼苗叶片数、叶片鲜重及根长的影响  
Table 2 Effects of Cd stress on leaf number, fresh weight and root length of the shoots in *Arabidopsis thaliana* seedlings after 24 days

Cd 浓度 (mg · L <sup>-1</sup> )	幼苗 叶片数	幼苗叶片鲜重 (mg)	幼苗根	
			根长 (cm)	抑制率 (%)
0	6	22.33±0.62 a	7.21±0.53 a	0
0.25	6	22.26±0.72 a	6.53±0.35 b	9.4
3.0	6	23.08±0.54 a	5.24±0.32 c	27.3
5.0	6	21.85±0.81 a	3.55±0.28 d	50.7

同列数据后不同字母表示差异显著 (P<0.05)。

镉处理对拟南芥幼苗根长产生了不同程度的抑制作用,幼苗根长均明显低于对照 (P<0.05),根长的抑制率则随着镉浓度的增加而明显增大,分别为 9.4%、27.3%、50.7%。表明镉胁迫对幼苗根尖细胞的抑制和毒害作用随镉浓度的增大而增强,根长的抑制与镉浓度存在剂量-效应关系。

2.2 Cd 胁迫对拟南芥幼苗叶片叶绿素及可溶性蛋白含量的影响

从表 3 可以看出,幼苗叶片可溶性蛋白质的含量随镉胁迫强度的增加呈现先增加后降低的趋势。0.25 mg · L<sup>-1</sup> Cd 处理 24 d 后,拟南芥幼苗叶片可溶性蛋白含量显著升高,与对照相比增加了 14.6% (P<0.05);在 3.0 mg · L<sup>-1</sup> 与 5.0 mg · L<sup>-1</sup> Cd 处理 24 d 后,可溶性蛋白含量分别比 CK 降低了 12.5% (P<0.05) 和 31.6% (P<0.05)。

镉处理 24 d 后,拟南芥幼苗叶片的叶绿素含量均略有降低,但各处理与对照相比差异均不显著。

2.3 Cd 胁迫对拟南芥幼苗地上部分及根系基因组 RAPD 图谱的影响

采用 CTAB 方法提取拟南芥幼苗地上部分及根系基因组 DNA,经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。所提取的 DNA 再通过蛋白-核酸含量测定仪检测,其 260 nm/280 nm 比值均在 1.80~1.85,符合 RAPD

表 3 Cd 胁迫 24 d 后对拟南芥幼苗叶片中叶绿素、可溶性蛋白质含量的影响  
Table 3 Effects of Cd stress on chlorophyll and total soluble protein content of the shoots in *Arabidopsis thaliana* seedlings after 24 days

Cd 浓度 (mg · L <sup>-1</sup> )	幼苗叶片 叶绿素含量 (mg · g <sup>-1</sup> )	幼苗叶片可溶性蛋白质	
		可溶性蛋白含量 (mg · g <sup>-1</sup> )	抑制率 (%)
0	0.1924±0.02 a	73.547±1.88 b	0
0.25	0.1882±0.02 a	84.262±2.28 a	-14.6
3.0	0.1905±0.04 a	64.343±1.22 c	12.5
5.0	0.1888±0.01 a	50.276±0.95 d	31.6

同列数据后不同字母间表示差异显著 (P<0.05)。

分析的要求。

根据优化后的 PCR 条件对拟南芥幼苗地上部分与根系细胞基因组 DNA 进行 PCR 扩增,每次扩增均设 2 次重复,由图 1 可看出采用 1.3.3 小节的方法可得到较好的重复结果。

选用 12 条寡核苷酸引物 (10 bp) 对拟南芥幼苗地上部分与根系细胞基因组 DNA 进行 PCR 扩增,

其中前者有 5 个引物 (Primer 4、5、7、11、12)、后者有 6 个引物 (Primer 2、4、5、7、11、12) 产生特异性 PCR 产物,表明 Cd 胁迫下根部 DNA 损伤比较敏感。与对照相比,0.25 ~ 5.0 mg · L<sup>-1</sup> Cd 处理拟南芥幼苗后,幼苗叶片及其根部基因组 DNA 的 RAPD 图谱在谱带条数和荧光强度上发生了明显变化,表现为 RAPD 谱带的缺失、增加,或荧光强度的减弱或增加 (图 2)。

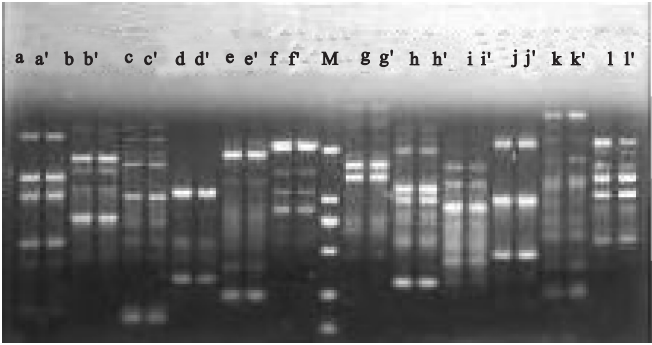


图 1 3.0 mg · L<sup>-1</sup> Cd 胁迫 24 d 后拟南芥幼苗地上部分基因组 RAPD 谱带  
Fig. 1 Reproducibility of RAPD profiles of *Arabidopsis thaliana* seedlings under Cd stress of 3.0 mg · L<sup>-1</sup> after 24 days  
其中 a, a'—l, l' 分别代表引物 1 ~ 12 号; a 与 a' 是重复, 其他同理; M: Marker DL 2000。

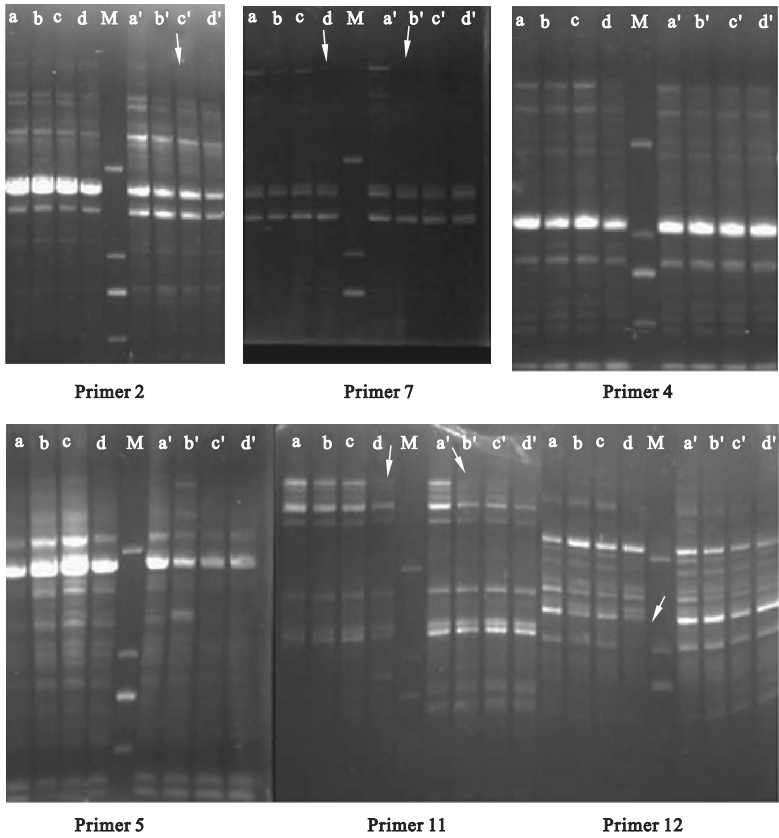


图 2 不同 Cd 浓度胁迫 24 d 拟南芥幼苗地上部分及其根基因组的 RAPD 图谱  
Fig. 2 RAPD profiles of genomic DNA from shoots and roots of *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to various Cd concentration after 24 days  
泳道 a 代表对照; 泳道 b, c, d 代表处理组, Cd 处理浓度分别是为 0.25、3.0 和 5.0 mg · L<sup>-1</sup>; a, b, c, d 代表幼苗地上部分基因组 RAPD 图谱, a', b', c', d' 代表幼苗根基因组 RAPD 图谱; M 为 DL 2000 maker。



对图 2 的 RAPD 图谱的条带数量和分子量(碱基对数目)通过 Quantity One 软件进行统计分析。由表 4 可以看出,随着 Cd 处理浓度的增加,拟南芥幼苗 DNA 多态性增加,基因组模板稳定性(GTS)减小,这一趋势在图 2 中也充分体现;从图 2 各引物对应的地上部分与根系对照组(即谱带 a)的相似性可以看出,RAPD 谱带变化稳定,与模板 DNA 的浓度、PCR 反应的中的试剂如 dNTP、Taq polymerase 浓度无关。另外,由图 2、表 4 可以看出,Cd 胁迫的拟南芥幼苗 DNA 多态性主要表现为较大分子量 RAPD 条带的改变。

2.4 Cd 胁迫下拟南芥幼苗地上部分与根系 GTS 的比较

基因组模板稳定性(GTS)可以定性地衡量 RAPD 图谱的变化趋势(Gichner *et al.*, 2006)。根据 1.3.4 小节 GTS 公式计算得出表 5,结果表明,

0.25~5.0 mg·L<sup>-1</sup> Cd 处理 24 d 后,拟南芥幼苗地上部分 RAPD 多态性条带数分别为 6、8、14;相应的根部 RAPD 多态性条带数为 20、23、28。基因组模板的稳定性随着 Cd 浓度的增加而降低,地上部分 GTS 分别为 91.4%、88.6% 和 80%;根部 GTS 分别为 71.4%、67.1% 和 60%。另外,相同 Cd 处理条件下,根部 GTS 均小于地上部分。例如,4 号、7 号、11 号引物,地上部分在 Cd 浓度 5.0 mg·L<sup>-1</sup> 时发生 RAPD 谱带变化,而根部 RAPD 谱带在 Cd 浓度 0.25 mg·L<sup>-1</sup> 时即发生变化,且变化的谱带与地上部分一致;同样,对于 2 号引物,根部 RAPD 谱带在 Cd 浓度 0.25 mg·L<sup>-1</sup> 时发生变化,而地上部分并无变化。表明与地上部分相比,根部对低剂量的 Cd 胁迫更敏感。因此,在低浓度的 Cd 污染环境中,根部 RAPD 图谱多态性的变化更具明显性与可靠性。

表 4 Cd 胁迫 24 d 拟南芥地上部分和根系基因组 RAPD 图谱中谱带的变化及其分子量(碱基对数目)  
Table 4 Changes and molecular sizes of RAPD profiles of genome in shoots and roots of *Arabidopsis thaliana* seedlings under Cd stress after 24 days

引物 编号	0.25 mg·L <sup>-1</sup>		3.0 mg·L <sup>-1</sup>		5.0 mg·L <sup>-1</sup>	
	地上部分	根	地上部分	根	地上部分	根
2	0	+4529;+3929; % 3469;% 3260	0	+4529;+3929; % 3469;% 3260	0	+4529;+3929; % 4529;% 3929; % 2413;% 1659
4	0	% 3174;% 2647	0	% 3174;% 2647	% 3174;% 2647	% 3174;% 2647; % 2151;% 1919
5	* 2417; * 2244; * 2084	-2244;% 2084; % 1738;% 1498	* 2417; * 2244; * 2084; * 1738	-3122;-2417; -2244;-1498; % 2084;% 1738	* 2084; * 1738; * 1498; * 1368	-3970;-3122; -2417;-2244; -1498;% 2084; % 1738
7	-3174;-2894; % 3878	-3878;-3703; -3174;-2894	-3703;-3174; -2894;% 3878	-3878;-3703; -3174;-2894	-3878;-3703; -3174;-2894	-3878;-3703; -3174;-2894
11	0	% 3955;% 3789; % 3537;% 3270	0	% 3955;% 3789; % 3537;% 3270	-3789;% 3955	-3955;-3789; % 3537;% 3270
12	0	% 3230;% 2765	0	-3230;-2765; % 1895	-1895;% 2765	-3230;-2765; -1895

+,增加条带;- ,缺失条带;\* ,带强增加的条带;% ,带强减弱的条带;0,无差异。

表 5 Cd 胁迫 24 d 拟南芥幼苗地上部分与根系基因组模板稳定性(GTS)比较  
Table 5 Comparison of genomic DNA template stability in shoots and roots of *Arabidopsis thaliana* seedlings under Cd stress after 24 days

Cd 处理浓度(mg·L <sup>-1</sup> )	类型	P2	P4	P5	P7	P11	P12	条带总数	GTS(%)
0	N	13	12	16	7	11	11	70	100.0
0.25	S(A)	0	0	3	3	0	0	6	91.4
	R(A)	4	2	4	4	4	2	20	71.4
3.0	S(A)	0	0	4	4	0	0	8	88.6
	R(A)	4	2	6	4	4	3	23	67.1
5.0	S(A)	0	2	4	4	2	2	14	80.0
	R(A)	6	4	7	4	4	3	28	60.0

N,对照 RAPD 图谱总条带数;S(A),地上部分多态性条带总数;R(A),根部多态性条带总数。

### 3 讨论

DNA 指纹技术 (DNA fingerprinting) 如 PCR-RFLP(限制性片段长度多态性)、SSCP(单链构象多态性)、DDRT、RAPD、RT-PCR 等,是最近十几年来随着分子生物学技术的发展,而建立起来的一种快速分析方法。RAPD 技术的最大优势是可以潜在地识别正常与受胁迫基因组位点之间的变化 (Singh & Roy, 2001)。Atienzar 等 (2000) 研究表明,环境污染物诱导生物体细胞内的 DNA 损伤和突变,后者导致引物结合位点的核苷酸缺失或增加,最终影响 DNA 片段的图谱。Theodorakis 和 Shugart (1997) 还深入研究了核素污染胁迫对蚊鱼 (mosquitofish) 的 DNA 损伤效应,发现暴露组的 RAPD 谱带明显增加,而且某些 RAPD 谱带的出现频率很高,这些谱带被称为污染指示带;并以 Southern 杂交进一步分析认为这些污染指示带在长度和序列上是保守的。表明 RAPD 谱带变化对污染胁迫具有预警作用,故可作为检测污染物遗传毒性效应的生物标记物。

本研究采用 RAPD 技术在 DNA 水平上直接对基因组的多态性进行检测,利用一系列的随机引物进行 PCR 扩增,检测区域几乎覆盖了整个基因组。每次处理采用 30 株拟南芥幼苗测定其生理、分子指标,以消除拟南芥种间的遗传多态性 (Singh & Roy, 2008; Cambier *et al.*, 2010)。结果表明,在生理指标方面,不同浓度 Cd 胁迫条件下,拟南芥幼苗叶片数、鲜重及叶绿素含量变化不显著,但 Cd 对地上部可溶性蛋白质含量产生了很大的影响。在  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 处理下,可溶性蛋白质含量升高;在  $3.0$  和  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,幼苗地上部可溶性蛋白质含量迅速降低。可溶性蛋白质含量反映了机体内代谢酶的变化,实验中可溶性蛋白质含量的变化趋势是由于在一定 Cd 强度胁迫下,叶片组织为适应 Cd 胁迫而进行的蛋白质合成反应优于分解反应 (Nia *et al.*, 2001),因此表现出蛋白质含量升高,但是随着 Cd 浓度的增大,合成反应受到不同程度的抑制,因而可溶性蛋白质含量又出现了下降。类似的研究结果在其他报道中亦得到证实 (韩艳萍等, 2009; 李立芹等, 2010)。

在分子指标方面, Cd 胁迫条件下,由系列引物扩增得到的拟南芥幼苗地上部分与根系基因组 RAPD 谱带显示出明显的差异 (RAPD 谱带的增加或减少、荧光强度的增强或减弱),而这些变化与 Cd

剂量有关 (图 2、表 5)。表明, Cd 胁迫诱导基因模板稳定性 (GTS) 发生了较大的改变 (表 5)。拟南芥幼苗基因组 DNA 的 RAPD 谱带发生变化可能是由于基因组重排引起了寡核苷酸引发位点变化,或是由于镉胁迫诱导了生物体细胞内单链或双链 DNA 的断裂、插入或缺失片段、DNA 加合物、DNA-蛋白质交联甲基化等多种形式的 DNA 损伤,引起 DNA 构象的改变,形成了新的 RAPD 图谱。

同一植物的不同器官,由于外部形态和内部结构不一,吸收重金属元素的生理生化机制各异,故其重金属元素的累积量差异较大。镉从溶液或土壤中被植物吸收后,大部分累积在根部。Cd 首先破坏植物根部,如伤害根细胞核仁,改变 RNA 合成,阻抑 RNase、硝酸还原酶及质子泵的活性 (张军和束文圣, 2006)。Cd 可与酶活性中心或蛋白质中巯基结合,还可取代金属硫蛋白中的必需元素 ( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{M}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ ),导致生物大分子构相改变,必需元素缺乏,干扰细胞正常代谢过程 (Ansche & Cluster, 1990)。Schutzendubel 等 (2001) 研究表明,经 Cd 处理后,苏格兰松 (*Pinus sylvestris*) 幼苗  $\text{H}_2\text{O}_2$  的产生增加,抗氧化系统活性及根的伸长受到抑制,根尖细胞的老化加速。很多研究均证实 Cd 在根部的累积显著高于叶片部位 (Herbette *et al.*, 2006),王兴明等 (2006) 与韩艳萍等 (2009) 证实了 Cd 胁迫对拟南芥根系具有较明显抑制和毒害作用。本研究表明, Cd 处理 24 d 后,拟南芥幼苗根系生长均明显低于对照,根长抑制率则随着 Cd 浓度的增加而增加。另外,从地上部分与根部 GTS 的比较可以看出,相应的 Cd 处理条件下,根系的 GTS 均小于地上部分,表明与地上部分相比,根部对低剂量的 Cd 胁迫更敏感。在低浓度的 Cd 污染环境中,根部 RAPD 图谱多态性的变化更具明显性与可靠性。本研究中,拟南芥幼苗根系生长的显著抑制作用与其 RAPD 图谱的变化之间具有较好的相关性,说明幼苗根尖大多数细胞中 DNA 的损伤程度可能比较严重, Cd 亦明显影响基因组模板的稳定性,表明利用 RAPD 分析获得的 DNA 多态性变化可作为检测 Cd 污染对植物遗传毒性效应的生物标记物。

本研究中,发生根部 RAPD 谱带变化的 6 条引物中, Primer 7 和 Primer 11 对 Cd 污染胁迫表现出较好的相关性,表明这 2 个引物所对应的拟南芥基因序列与 Cd 污染有密切关系。进一步研究分析变化谱带的序列与功能有助于深入地探索 Cd 对植物

的遗传毒害机理,为污染生态毒理诊断提供依据。

## 参考文献

- 常凤起,刘选明,李银心,等. 2003. 低能  $N^+$  辐照拟南芥诱导基因组 DNA 碱基变异分析. *中国科学*, **33**(2): 117–122.
- 韩艳萍,刘宛,李艳芝,等. 2009. 镉胁迫对拟南芥幼苗形态生理和错配修复相关基因表达的影响研究. *农业环境科学学报*, **28**(6): 1246–1252.
- 黄宝圣. 2005. 镉的生物毒性及其防治策略. *生物学通报*, **40**(11): 26–28.
- 李立芹,鲁黎明,卜贵鲜. 2010. 镉胁迫对烟草幼苗生长和生理指标的影响. *贵州农业科学*, **38**(5): 35–37.
- 刘泓,崔波,叶媛蓓,等. 2009. 拟南芥对多环芳烃菲胁迫的早期响应. *中国生态农业学报*, **17**(5): 949–953.
- 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.
- 王兴明,李晶,涂俊芳,等. 2006. Cd 对油菜种子发芽与幼苗生长的生态毒性. *土壤通报*, **37**(6): 1218–1222.
- 詹振楠,刘宛,孙梨宗,等. 2011. 镉胁迫对拟南芥幼苗基因组 DNA 多态性影响. *生态学杂志*, **30**(6): 1234–1239.
- 张徽,吕金印,柳玲. 2010. 不同基因型番茄幼苗对镉胁迫的生理响应及镉吸收差异. *农业环境科学学报*, **29**(6): 1065–1071.
- 张军,束文圣. 2006. 植物对重金属镉的耐受机制. *植物生理与分子生物学学报*, **32**(1): 1–8.
- 周启星,孔繁祥,朱琳. 2004. *生态毒理学*. 北京: 科学出版社.
- 朱玉芳,吴康,崔勇华,等. 2002. 镉、铅对家蚕茧质及血细胞 DNA 损伤的影响. *农业环境科学学报*, **21**(6): 502–504.
- Ansche F, Cluster H. 1990. Effects of metal on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment*, **13**: 195–206.
- Atienzar FA, Cordi B, Donkin ME. 2000. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palnaria palnata*. *Aquatic Toxicology*, **50**: 1–12.
- Bradford A. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248–254.
- Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, et al. 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**: 312–319.
- Castaño A, Becerril C. 2004. In vitro assessment of DNA damage after short and long term exposure to benzo(a)pyrene using RAPD and the RTG-2 fish cell line. *Mutation Research*, **552**: 141–151.
- Conte C, Mutti I, Puglisi P, et al. 1998. DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere*, **37**: 2739–2749.
- Giehner T, Patkova Z, Szakova J, et al. 2006. Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **65**: 420–426.
- Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, et al. 2006. Genome wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots. *Biochimie*, **88**: 1751–1765.
- Liu W, Li PJ, Qi XM, et al. 2005. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere*, **61**: 158–167.
- Liu W, Yang YS, Zhou QX, et al. 2007. Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. *Chemosphere*, **67**: 1155–1163.
- Nia AB, van Schooten FJ, Schilderman P, et al. 2001. A multi-biomarker approach to study the effects of smoking on oxidative DNA damage and repair and antioxidative defense mechanisms. *Carcinogenesis*, **22**: 395–401.
- Rong ZY, Yin HW. 2004. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **58**: 96–103.
- Schutzendubel A, Schwanz P, Teichmann T, et al. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiology*, **127**: 887–898.
- Singh K, Kumari R, Pevey C, et al. 2009. Long duration exposure to cadmium leads to increased cell survival, decreased DNA repair capacity, and genomic instability in mouse testicular Leydig cells. *Cancer Letters*, **279**: 84–92.
- Singh KP, Roy D. 2001. Identification of novel breast tumor-specific mutation(s) in the q11.2 region of chromosome 17 by RAPD/AP-PCR fingerprinting. *Gene*, **269**: 33–43.
- Singh KP, Roy D. 2004. Somatic mutations in stilbene estrogen-induced Syrian hamster kidney tumors identified by DNA fingerprinting. *Journal of Carcinogenesis*, **3**: 4–14.
- Singh KP, Roy D. 2008. Allelic loss and mutations in a new ETRG-1 gene are early events in diethylstilbestrol-induced renal carcinogenesis in Syrian hamsters. *Gene*, **408**: 18–26.
- Theodorakis CW, Shugart L. 1997. Genetic ecotoxicology. II: Population genetic structure in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. *Ecotoxicology*, **6**: 335–354.
- Zhang XL, Zhang ZY, Zhang XX, et al. 2010. Effects of Yangtze River source water on genomic polymorphisms of male mice detected by RAPD. *Human and Experimental Toxicology*, **29**: 113–120.

作者简介 孙梨宗,男,1985 年生,硕士研究生,主要从事污染生态毒理学研究。E-mail: sunlizong88@163.com  
责任编辑 魏中青