

文章编号 :1003- 8701(2012)02- 0014- 03

# 重金属铬对小麦根系 DNA 甲基化水平的影响

黑淑梅

(延安大学生命科学学院,陕西 延安 716000)

**摘要:**采用紫外分光光度法和高效液相色谱法对不同浓度  $\text{Cr}^{6+}$  对小麦幼苗根系的 DNA 含量和 DNA 胞嘧啶甲基化进行了研究。结果表明:(1) $\text{Cr}^{6+}$  导致小麦幼苗根系 DNA 含量显著降低,3 d 龄幼苗根系 DNA 含量下降的幅度大于 10 d 龄幼苗。(2)5~80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和 5~100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cr}^{6+}$  依次引发了 3 d 和 10 d 龄小麦幼苗根系 DNA 胞嘧啶甲基化水平的提高,而 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cr}^{6+}$  则导致了 3d 龄幼苗根系 DNA 胞嘧啶甲基化水平的降低。说明  $\text{Cr}^{6+}$  可通过影响小麦幼苗根系 DNA 甲基化的水平,进而影响小麦的正常生长发育。

**关键词:**Cr;小麦;DNA 含量;DNA 甲基化

中图分类号:S512.1

文献标识码:A

## Effects of Heavy Metal Chromium on the DNA Methylation in Roots of Wheat Seedlings

HEI Shu- mei

(College of Life Science, Yanan University, Yanan 716000, China)

**Abstract:** The effects of  $\text{Cr}^{6+}$  on the DNA contents and DNA methylation in roots of wheat seedlings were studied. The results indicated that: (1) DNA contents in roots of seedlings were all markedly reduced by  $\text{Cr}^{6+}$ , and the declining extent of DNA content in roots of 3- day- old seedlings was bigger than that of 10- day- old seedlings. (2) The 5- MeC content in the roots DNA of 3- day- old seedlings with 5- 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cr}^{6+}$  treatment were higher than that of control seedlings. But in the roots DNA of 3- day- old seedlings, exception that the 5- MeC content with 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cr}^{6+}$  treatment was lower than that of control seedlings, 5- MeC contents with the 5- 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cr}^{6+}$  tested concentrations were still higher than that of control seedlings.  $\text{Cr}^{6+}$  can affect DNA methylation level in wheat seedling roots, thereby affecting the normal growth and development of wheat.

**Keywords:** Cr ;wheat ;DNA contents ;DNA methylation

植物基因组中的启动子和编码区的过度甲基化能抑制基因的转录,从而调控基因的表达,调节植物的生长发育<sup>[1]</sup>。对植物 DNA 甲基化功能等的研究已有一些报道<sup>[2-5]</sup>,但重金属胁迫对植物体内 DNA 甲基化水平的影响很少见报道。为此,本实验分别测定不同浓度的重金属  $\text{Cr}^{6+}$  对小麦根系 DNA 中甲基胞嘧啶水平的变化,为重金属污染影响小麦生长发育及其产量提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料培养和处理

供试小麦品种为小偃 22 (*Triticum aestivum* cv. Xiaoyan No.22)。经 5%次氯酸钠灭菌处理后置于光照培养箱((25± 0.5)°C,每日光照 13h,光强为 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )中培养。分别以 1/2 Hoagland 营养液配制的浓度为 5、10、20、40、60、80、100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{Cr}^{6+}$  处理 3d 龄和 10 d 龄幼苗 72 h,每处理重复 3 次。以 1/2Hoagland 营养液处理的幼苗为对照。

### 1.2 DNA 提取与其含量测定

采用 CTAB 法<sup>[6]</sup>分别提取 3 d 龄和 10 d 龄幼苗根系 DNA。取 10 $\mu\text{L}$  DNA 提取液,用 TE 缓冲

收稿日期:2011- 12- 02

基金项目:延安市科学技术研究发展计划项目(2010kn- 18);延安大学科研计划项目(YD2010- 16)

作者简介:黑淑梅(1976-),女,硕士,讲师,从事植物抗性生理生化研究。

液稀释到 2.0 mL, 采用紫外分光光度法测定  $A_{260}$  和  $A_{280}$ , 以  $A_{260}$  估算 DNA 产率,  $A_{260}/A_{280}$  判断 DNA 样品纯度。DNA 含量以  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$  表示。

### 1.3 DNA 中 5- 甲基胞嘧啶(5- MeC)百分含量的测定

取上述 DNA 提取液  $20\mu\text{L}$ , 加  $20\mu\text{L}$   $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ , 在  $80^\circ\text{C}$  水浴中水解 2h, 再加入  $10\mu\text{L}$   $4\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$  中和, 离心取上清液备用。采用高效液相色谱法进行 5- 甲基胞嘧啶百分含量的测定。色谱柱: Hypersil BDS- C18 键合柱 ( $5\mu\text{m}$ ,  $150\times 4.6\text{mm I.D.}$ )。流动相: 5% 甲醇,  $4.75\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  己烷磺酸钠, 0.2% 三乙醇胺组成, 用三蒸水配制, 并用磷酸将 pH 值调为 5.5。流速:  $0.7\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 检测波长:  $273\text{nm}$ , 进样量:  $25\mu\text{L}$ 。采用外标法, 通过比较样品和标准品的峰面积确定胞嘧啶(C)和 5- 甲基胞嘧啶 (5- MeC) 的含量, 并根据公式  $[5\text{-MeC}/(\text{C}+5\text{-MeC})]\times 100\%$  计算 5- MeC 的百分含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 重金属 $\text{Cr}^{6+}$ 对小麦根系 DNA 含量的影响

图 1 可见,  $0\sim 20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内  $\text{Cr}^{6+}$  胁迫使 DNA 含量迅速下降, 此后则缓慢下降。 $\text{Cr}^{6+}\geq 5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  均极显著( $P<0.01$ )降低 3 d 龄和 10 d 龄幼苗根系 DNA 含量。 $5\sim 20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cr}^{6+}$  浓度范围内, 3 d 龄幼苗根系 DNA 含量下降幅度明显大于 10 d 龄幼苗,  $\text{Cr}^{6+}>20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  对 3 d 龄幼苗根系 DNA 含量低于 10 d 龄幼苗, 表明 3 d 龄幼苗根系对  $\text{Cr}^{6+}$  胁迫更敏感。

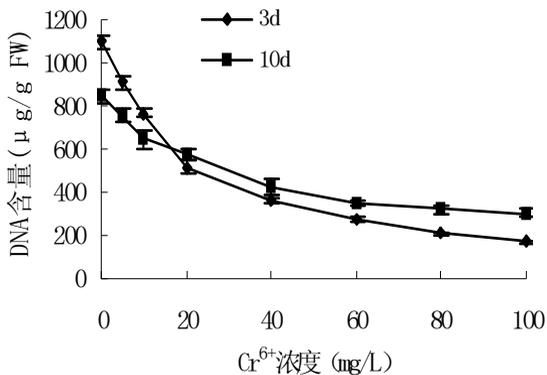


图 1  $\text{Cr}^{6+}$  对小麦幼苗根系 DNA 含量的影响

### 2.2 重金属 $\text{Cr}^{6+}$ 对小麦幼苗根系 5- 甲基胞嘧啶百分含量的影响

实验测定 10 d 龄小麦幼苗根系对照组 DNA 的 5- MeC 为 25.32%, 3 d 龄小麦幼苗根系对照组 DNA 的 5- MeC 为 26.33%。图 2 可见,  $5\sim 40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

$\text{L}^{-1}\text{Cr}^{6+}$  范围内, 10 d 龄幼苗根系 DNA 的 5- MeC 逐步升高,  $40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  处达到最高(37.91%),  $>40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  后逐步下降,  $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时降到 31.20%, 但仍然高于对照值。对于 3 d 龄幼苗根系而言,  $5\sim 20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cr}^{6+}$  范围内 DNA 的 5- MeC 含量上升,  $20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  达到最高(39.39%)。

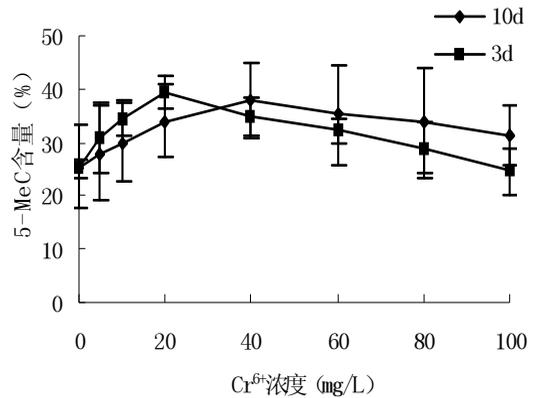


图 2  $\text{Cr}^{6+}$  对小麦幼苗根系 DNA 中的 5- MeC 的影响

从根系对照组 DNA 的 5- MeC 含量的差异说明植物不同龄期同一植株部位的 DNA 的 5- MeC 含量的差异, 也说明了小麦幼苗在不同的生长阶段体内的甲基化水平有差异。10 d 龄和 3 d 龄小麦幼苗根系 DNA 中 5- MeC 百分含量均表现随  $\text{Cr}^{6+}$  浓度增大先升高后降低的趋势。

## 3 结论与讨论

本实验表明,  $\text{Cr}^{6+}$  导致小麦幼苗根系 DNA 含量显著降低, 3 d 龄幼苗根系 DNA 含量的下降幅度大于 10 d 龄幼苗(图 1)。Ge 等<sup>[7]</sup>报道,  $\text{Cd}^{2+}$  污染导致水稻和小麦叶片 DNA 提出量降低。我们推测 DNA 含量可能与  $\text{Cr}^{6+}$  促进 DNA 和蛋白质交联有关, 也可能与 DNA 降解加速或 DNA 合成下降等原因有关。 $\text{Cr}^{6+}$  影响 DNA 的含量, 进一步可影响到 RNA 的含量, 以及蛋白质合成与表达, 因此影响了小麦幼苗的正常生长发育和表型。

我们的结果显示,  $\text{Cr}^{6+}$  胁迫下 10 d 和 3 d 龄幼苗根系 DNA 的 5- MeC 最高含量分别为 37.91% 和 39.39%, 10d 和 3d 龄幼苗根系 DNA 的 5- MeC 最高值分别出现在  $\text{Cr}^{6+}$  浓度为  $40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 这些均说明 3 d 龄幼苗对  $\text{Cr}^{6+}$  胁迫比 10 d 龄幼苗更敏感。这与前述  $\text{Cr}^{6+}$  对两苗龄幼苗 DNA 含量影响的结果一致。 $\text{Cr}^{6+}$  能明显改变小麦幼苗 DNA 中胞嘧啶的甲基化水平。Hix 等<sup>[8]</sup>报道, 认为甲基自由基直接攻击 DNA 中的鸟嘌呤产生 C8- 甲基鸟嘌呤, 而 N7- 甲基(下转第 26 页)

- 及土壤肥力的影响[J]. 生态学杂志, 2004, 23(6): 33-36.
- [8] 柯玉诗, 黄小红, 张壮塔, 等. 硅肥对水稻氮磷钾营养的影响及增产原因分析[J]. 广东农业科学, 1997(5): 25-27.
- [9] 茅国芳, 汪传炳. 上海地区农田土壤有效硅含量状况及水稻施硅效应研究[J]. 土壤, 2002, 34(5): 270-274.
- [10] 江立庚, 曹卫星, 甘秀芹, 等. 水稻氮素吸收、利用与硅素营养的关系[J]. 中国农业科学, 2004, 37(5): 648-655.
- [11] 周青, 潘国庆, 施作家, 等. 不同时期施用硅肥对水稻群体质量及产量的影响[J]. 耕作与栽培, 2001(3): 25-27.
- [12] 陶龙兴, 袁小荣, 符冠富, 等. 硅肥对国稻 6 号的生理影响及增产效果[J]. 中国稻米, 2008(3): 57-59.
- [13] 邓文, 青先国, 王思哲, 等. 施硅对超级杂交稻抗倒性的影响[J]. 杂交水稻, 2009, 24(1): 56-61.
- [14] Dantoff L E, Deren C W, Snyder C H. Silicon fertilization for disease management of rice in Florida [J]. Crop Protect, 1997, 16(6): 525-531.
- [15] 水茂兴, 陈德富, 秦遂初, 等. 水稻新嫩组织的硅质化及其与稻瘟病抗性的关系 [J]. 植物营养与肥料学报, 1999(4): 352-358.
- [16] 张国良, 戴其根, 张洪程, 等. 硅肥和接种纹枯病菌对水稻膜脂过氧化和防御酶活性的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2006, 27(1): 49-53.
- [17] 慕永红, 郑桂萍, 王安东, 等. 水稻施用速效硅肥的方法及效果研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2007, 19(4): 32-36.
- [18] 王安东, 连长伟, 徐立佳, 等. 硅肥对水稻抗病增产效果研究[J]. 现代化农业, 2008, 24(12): 8-9.
- [19] 李克仁. 硅肥对水稻生产的增产作用 [J]. 作物杂志, 2004 (5): 24-25.
- [20] Deren C W, Datnoff L E, Snyder G H et al. Silicon content ration, disease response and yield components of rice genotype grown on flooded organic histols[J]. Crop Sci, 1994, 34 (3): 733-737.
- [21] 张翠珍, 邵长泉, 孟凯, 等. 山东省水稻土有效硅含量及硅肥效应研究[J]. 山东农业科学, 1999(6): 11-14.
- [22] 薛碧秀, 孙佩芳. 四川省水稻施用硅肥的增产效果[J]. 土壤肥料, 1991(2): 40-41.
- [23] 李玉影, 刘颖, 刘双全, 等. 黑龙江省水稻硅肥效果研究 [J]. 黑龙江农业科学, 2009(3): 60-63.
- [24] 蔡德龙, 陈常友, 小林均. 硅肥对水稻镉吸收影响初探[J]. 地域研究与开发, 2000, 19(4): 69-71.
- [25] 林匡飞, 项雅玲. 钙镁磷肥和硅肥对水稻产量及镉吸收的影响[J]. 土壤肥料, 1994(6): 26-29.
- [26] 张国良, 戴其根, 王建武. 施硅量对粳稻品种武育粳 3 号产量和品质的影响[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(3): 299-303.
- [27] 吴英, 魏丹, 高洪生. 硅对水稻的营养功能和有效条件的研究[J]. 土壤肥料, 1992(3): 25-27.
- [28] 罗宝君. 黑龙江省苏打盐渍土种植水稻硅肥效应 [J]. 内蒙古农业科技, 2004(4): 31, 33.
- [29] 张学军, 冯卫东, 宋德印, 等. 施用硅钙磷肥对水稻生长、产量及品质研究初报[J]. 宁夏农业科技, 2000(1): 37-38.
- [30] 李小小, 任学坤, 殷微微, 等. 白浆土型水稻土施硅肥对水稻产量及品质的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2008(6): 67-69.

(上接第 15 页)鸟嘌呤和 3- 甲基腺嘌呤的产生很可能是由于甲基自由基借助于过渡重金属的作用攻击 DNA 而引起。据此, 本文推测  $\text{Cr}^{6+}$  引起两苗龄小麦幼苗根系 DNA 甲基化水平提高, 可能是由于  $\text{Cr}^{6+}$  引起了小麦体内大量甲基自由基的产生, 导致 5- MeC 水平提高。Lee 等<sup>[9]</sup>和 Pfohl- Leszkowicz 等<sup>[10]</sup>发现许多二价离子能影响 5- 甲基胞嘧啶甲基转移酶的活性, 如  $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  等。本实验的结果显示,  $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cr}^{6+}$  导致 3d 龄幼苗根系 5- 甲基胞嘧啶含量降低, 这可能与降低根系 5- 甲基胞嘧啶甲基转移酶活性有关。

关于  $\text{Cr}^{6+}$  降低两苗龄小麦幼苗根系 DNA 含量和提高 DNA 甲基化水平的确切机制, 有待进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Finnegan EJ, Genger RK, Kovac K, et al. DNA methylation and the promotion by vernalization [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998 (95): 5824-5829.
- [2] Richards EJ. DNA methylation and plant development [J]. Trends Genet, 1997, 13(8): 319-322.
- [3] Martienssen RA, Colot V. DNA methylation and epigenetic

- inheritance in plants and filamentous fungi [J]. science, 2001, 293: 1070-1074.
- [4] Finnegan EJ, Kovac KA. Plant DNA methyltransferases [J]. Plant Mol Biol, 2000(43): 189-201.
- [5] Ashikawa I. Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars [J]. Plant Mol Biol, 2001 (45): 31-39.
- [6] Hei Shu-mei, SHE Xiao-ping. Inhibition of Root Growth and DNA Damage Caused by  $\text{Cr}^{6+}$  Stress in Wheat Seedlings [J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2005(3): 541-545.
- [7] Ge CL, Yang XY, Sun JH, et al. DNA damage caused by heavy metal stress in wheat and rice seedlings [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2002, 28(6): 419-424.
- [8] Hix S, Augusto O. DNA methylation by tertbutylhydroperoxide-iron (II): a role for the transition metal ion in production of DNA base adducts [J]. Chem Biol Interact, 1999 (18): 141-149.
- [9] Lee Y W, Broday L, Costa M. Effects of nickel on DNA methyltransferase activity and genomic DNA methylation levels [J]. Mutat Res, 1998(31): 213-218.
- [10] Pfohl-Leszkowicz A, Baldacini O, Keith G, et al. Stimulation of rat kidney, spleen and brain DNA-(cytosine-5-)-methyltransferases by divalent cobalt ions [J]. Biochimie, 1987(69): 1235-1242.