

铅胁迫对不同基因型谷子幼苗生理特性及基因组 DNA 多态性的影响

张义贤¹, 付亚萍¹, 肖志华¹, 张喜文², 李 萍²

(1.山西大学生命科学学院, 太原 030006; 2.山西省农业科学院谷子研究所, 山西 长治 046011)

摘 要:以 4 种基因型谷子为供试材料, 采用盆栽土培法, 研究了土壤重金属 Pb^{2+} 胁迫对谷子幼苗基因组 DNA 多态性和可溶性糖、脯氨酸、丙二醛(MDA)含量的影响。结果表明: 经 $50\sim 400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Pb^{2+} 处理 30 d 后, 4 种谷子幼苗体内可溶性糖含量随 Pb^{2+} 浓度上升而逐渐降低, 降幅为对照的 31.45%~49.11%。脯氨酸含量则表现为低浓度 ($\leq 100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的促进和高浓度 ($\geq 200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的抑制效应, MDA 含量均有增加且与对照差异显著。 Pb^{2+} 胁迫下不同基因型谷子幼苗基因组 DNA 的 RAPD 图谱发生明显变化, 表现为单条或多条 RAPD 谱带的缺失、增加及荧光强度的增强或减弱, 表明 Pb^{2+} 明显影响谷子幼苗细胞中基因组模板 DNA 的稳定性, DNA 多态性变化与 Pb^{2+} 浓度之间存在剂量-效应关系。不同基因型谷子对 Pb^{2+} 胁迫的生理和遗传损伤响应存在差异。利用 RAPD 技术获得的 DNA 多态性变化可作为检测 Pb^{2+} 遗传毒性效应的生物标记物。

关键词: 谷子; Pb 胁迫; 生理特性; RAPD; DNA 多态性

中图分类号: X503.231 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)03-0478-07 doi:10.11654/jaes.2013.03.011

Effects of Pb^{2+} Stress on Physiological Characteristics and DNA Polymorphism of Genome in Different Genotypes Foxtail Millet

ZHANG Yi-xian¹, FU Ya-ping¹, XIAO Zhi-hua¹, ZHANG Xi-wen², LI Ping²

(1. College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Millet Research Institute of Shanxi Academy of Agricultural Science, Changzhi 046011, China)

Abstract: Pb^{2+} is one of the major elements in the environment. In order to investigate the physiological characteristics and geno-toxicity effects of foxtail millet [*Setaria italica* (L.) Beauv] under different Pb^{2+} stress, four genotypes of foxtail millet (Zhaogu, Huangmi, An06, D2-8) from Shanxi, China were cultivated for 30 days in a pot filled with soil of different mass concentrations $0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Pb^{2+} stress effects on DNA damage of genome on foxtail millet were studied using random amplified polymorphic DNA (RAPD), and the contents of soluble sugar, proline and MDA were tested. The results showed that the contents of soluble sugar were decreased in the range of 31.45%~49.11% compared to the control group, with the increasing of Pb^{2+} concentration. Also, the contents of proline synthesis were enhanced at low concentrations (less than $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), but inhibited at high concentrations (more than $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The contents of MDA of four genotypes foxtail millet were significantly increased compared with the control group. The changes of random amplified polymorphic DNA profiles of four genotypes foxtail millet following Pb^{2+} treatment included appearance of new bands and loss of normal bands and variation of fluorescence intensity compared to the plantlet without treatment, suggesting that Pb^{2+} significantly affected the stability of the genomic template DNA in cells of millet seedlings. Additionally, the effect of DNA polymorphism changes was dose-dependent with the Pb^{2+} concentration. The physiological and genetic damage under Pb^{2+} stress had significant differences in the different genotypes millet. The change of DNA polymorphism using RAPD technique could be used as the biomarker to detect genotoxic effects of Pb^{2+} .

Keywords: foxtail millet [*Setaria italica* (L.) Beauv]; Pb^{2+} stress; physiological characteristics; RAPD; DNA polymorphism

收稿日期: 2012-10-16

基金项目: 国家农业产业技术体系专项基金项目 (nycyt-13); 山西省自然科学基金项目 (2006011074)

作者简介: 张义贤 (1955—), 男, 教授, 主要从事污染生态学和遗传毒理学研究。E-mail: zhangyx@sxu.edu.cn

Pb 是生物毒性较强的重金属元素之一。由于工业化、城市化规模的不断扩大和工业“三废”及汽车废气的大量排放,致使土壤-生态环境中的 Pb 含量不断增加,直接影响作物的生长发育和产量品质^[1]。研究表明,外源 Pb 主要通过植物的根系和叶片等器官进入植物体内。由于 Pb 不是植物生长的必需元素,也不参与细胞的生理代谢过程,如在体内积累过量,会严重抑制植株生长,降低细胞分裂速率,使细胞膜结构受损,诱发染色体畸变,酶活性降低,从而引起植物光合作用、呼吸作用、核酸代谢等一系列生理生化过程紊乱,生物量合成减少,严重时导致植株死亡^[2-3],Pb 还可通过食物链的传递危害人体健康。

谷子[*Setaria italica*(L.)Beauv]是我国北方地区重要的粗粮作物之一,具有适应性广、耐干旱、耐贫瘠、籽粒营养丰富等特点^[4]。近年来,我国部分谷子种植区由于重金属污染加重,致使谷子的产量和品质降低^[5]。国内外有关 Pb 对谷子生理生化毒害效应的研究报道甚少,Samantaray 等^[6]和 Rout 等^[7]分别研究了 Ni、Zn 对谷子愈伤组织叶绿素含量及抗氧化酶活性损伤的影响。本课题组^[8-9]研究了 Pb、Cr 等胁迫对谷子幼苗的生物量、株高、可溶性蛋白质含量、叶绿素含量、DNA 增色效应等的影响及体内积累迁移变化特性,但 Pb 对谷子基因组 DNA 多态性的影响鲜见报道。本文在前期研究的基础上^[8-9],以山西省栽培的 4 种基因型谷子为试验材料,采用 RAPD 技术,研究了不同浓度 Pb 胁迫下谷子幼苗基因组 DNA 多态性变化,并测定了可溶性糖、脯氨酸和丙二醛(MDA)含量,旨在为探明 Pb 污染对谷子的生理及遗传毒害机理以及为农业生产上筛选重金属耐性品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试谷子品种为 D2-8、安 06、黄米、朝谷,由山西省农科院谷子研究所提供。供试土壤为褐土,取自山西省农科院试验田的表层土(0~20 cm)。土壤 pH

值为 7.2,有机质含量为 8.3 g·kg⁻¹,总铅含量 11.62 mg·kg⁻¹。试验所用外源铅为 PbCl₂(分析纯)。

1.2 试验设计

参照我国农田土壤环境质量标准中 Pb²⁺临界指标范围^[10],供试土壤 Pb²⁺浓度设置 50、100、200、400 mg·kg⁻¹(重金属浓度以纯金属离子计)4 个处理组,对照组不添加重金属。将配置的 PbCl₂溶液分别加入装有 6 kg 土壤的陶瓷盆(25 cm×28 cm)中,充分混匀后平衡 35 d 备用。谷子种子经 5% NaClO 消毒 30 min 后洗净,置于 26℃培养箱中避光发芽。每盆种植萌发的种子 20 粒,在室内条件下培养 30 d,昼/夜温度为 27℃/20℃,湿度为 35%~50%,每日定时补充水分,每处理设置 3 个重复。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 谷子幼苗可溶性糖、丙二醛和脯氨酸含量的测定

培养 30 d 后不同处理谷子幼苗均长出 4 片子叶,植株外观正常。可溶性糖含量的测定采用蒽酮比色法^[11],单位 mg·g⁻¹FW;脯氨酸含量的测定采用磺基水杨酸法^[11],单位 μg·g⁻¹FW;丙二醛含量的测定采用硫代巴比妥酸加热显色法,单位 μmol·g⁻¹·FW^[11]。

1.3.2 谷子幼苗 DNA 的提取和 RAPD 分析

采用 CTAB 法^[12]提取幼苗基因组 DNA,DNA 粗提取液用 RNaseA 37℃消化 60 min,去除 RNA 污染,所得 DNA 浓度和纯度用蛋白-核酸含量测定仪(Eppendorf Biophotometer plus)检测。

RAPD 分析所用的 8 条 10 bp 随机引物(表 1)及 RNaseA、Taq DNA polymerase 和 dNTP 均购自大连宝生物工程技术有限公司。每个引物制备反应混合物,以去离子水代替模板作为负对照,25 μL PCR 反应混合液中各成分分别为:2 μL 20 μmol·L⁻¹ 随机引物,2.5 μL 200 μmol·L⁻¹ dNTPs,2.5 μL 10×缓冲液,3 U Taq DNA polymerases,100 ng 基因组总 DNA。PCR 扩增程序为:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,38℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,35 个循环,最后在 72℃保温 10 min。RAPD 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳

表 1 试验中所用的 8 条引物序列(5'—3')

Table 1 Sequences of 8 primers used in the experiment(5'—3')

引物编号 Primer No.	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences	引物编号 Primer No.	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences
1	S30	GTGATCGCAG	5	S1050	GTTACCGCGA
2	S45	TGAGCGGACA	6	S1426	CCAGAACGGA
3	S1042	TCGCACAGTC	7	S1471	AAGACCGGGA
4	S1048	GTGCTCCCTC	8	S1485	CCCGATCAGA

分离,EB 染色后,经凝胶成像分析系统 (TMW-20 Transilluminator,美国)进行观察保存。

1.3.3 基因组模板稳定性(GTS)的计算

$$GTS(\%)=(1-P/n)$$

式中: P 为处理组 RAPD 多态性谱带,即为处理组比对照组新出现的和消失的谱带; n 为对照组的总谱带数。

1.4 统计分析方法

实验数据采用 Excel 软件进行处理,差异显著性分析采用 SPSS16.0 软件进行 Duncan 检验。

2 结果与分析

2.1 Pb^{2+} 胁迫对不同基因型谷子幼苗可溶性糖含量的影响

由表 2 可知, Pb^{2+} 对谷子幼苗可溶性糖的合成有明显的抑制作用,随着 Pb^{2+} 浓度的增大,4 种基因型谷子幼苗可溶性糖含量逐渐下降,在 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时降至最低值,各处理组均与对照差异显著($P<0.05$),其中朝谷和黄米的可溶性糖含量降幅最大,其平均值分别比对照降低 49.11%和 42.97%,安 06 (41.51%)和 D2-8(31.45%)次之。可见朝谷和黄米的可溶性糖含

量对 Pb^{2+} 胁迫最为敏感。

2.2 Pb^{2+} 胁迫对不同基因型谷子幼苗 MDA 含量的影响

Pb^{2+} 处理 30 d 后,谷子幼苗体内 MDA 含量及其变化趋势见表 2。在所试 Pb^{2+} 浓度范围内,4 种谷子幼苗体内 MDA 含量均随处理浓度增高而不断上升,至 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时达到最大值,与对照均有显著差异($P<0.05$)。在相同处理条件下,4 种基因型谷子幼苗 MDA 含量对 Pb^{2+} 胁迫的响应存在明显差异,其中 D2-8、黄米的平均 MDA 含量分别为对照的 2.61 倍和 3.39 倍,而安 06 和朝谷分别为对照的 3.69 倍和 4.57 倍。

2.3 Pb^{2+} 胁迫对不同基因型谷子幼苗脯氨酸含量的影响

不同浓度 Pb^{2+} 胁迫下,4 种谷子幼苗体内的脯氨酸含量均表现为先升高后下降的趋势(表 2)。在低浓度($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)处理组中,4 种谷子幼苗的脯氨酸含量与对照相比均有增加,增幅最大的为安 06 (25.43%)和黄米(23.47%),表明低浓度的 Pb^{2+} 对脯氨酸的生成具有刺激作用。当 Pb^{2+} 浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以上时,4 种谷子体内的脯氨酸含量均比对照组显著下降,降幅顺序为黄米(61.73%)>安 06(53.45%)>朝谷(52.96%)>D2-8(49.23%)。

表 2 Pb^{2+} 对不同基因型谷子幼苗可溶性糖、MDA 和脯氨酸含量的影响

Table 2 Effects on content of soluble suger, malondialdehyde and proline in different genotypes foxtail millet seedlings under Pb^{2+} stress

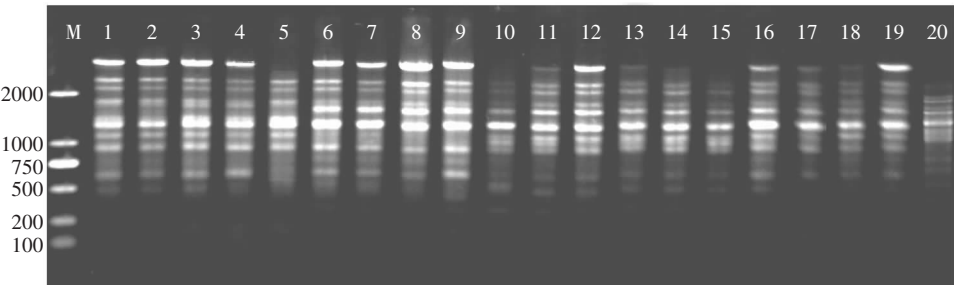
品种 Varieties	浓度 Concentration/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	可溶性糖含量 Soluble suger contents/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{FW}$	MDA 含量 MDA contents/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{FW}$	脯氨酸含量 Content of proline/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{FW}$
D2-8	CK	51.74±3.41eB	5.62±0.11aD	2.41±0.02dC
	50	44.92±2.79dC	8.77±0.17bA	2.53±0.00eA
	100	42.97±4.11cD	11.51±1.16cC	1.49±0.01cC
	200	31.97±3.14bD	19.02±2.44dB	1.07±0.01bB
	400	22.03±2.10aD	19.44±3.05eA	1.00±0.01aD
安 06	CK	54.36±4.78eC	4.07±0.77aA	2.32±0.00dB
	50	46.55±2.89dD	9.12±1.04bB	2.91±0.07eB
	100	38.71±3.56cC	11.13±0.98cA	1.27±0.02cB
	200	24.61±4.21bB	18.72±2.13dA	1.02±0.00bA
	400	17.31±4.44aC	21.13±0.79eB	0.95±0.01aB
黄米	CK	60.73±3.07eD	4.77±0.99aC	2.77±0.00dD
	50	51.57±3.17dB	11.13±1.06bC	3.42±0.04eD
	100	41.26±2.09cB	16.15±1.45cA	1.13±0.02cA
	200	30.99±2.11bC	20.19±2.07dD	1.07±0.01bB
	400	14.72±1.77aB	27.14±2.38eC	0.97±0.01aC
朝谷	CK	50.34±2.35eA	4.12±0.77aB	2.19±0.31dA
	50	41.21±6.07dA	11.42±0.75bD	2.29±0.01eC
	100	27.78±3.11cA	17.57±1.06cB	1.50±0.02cD
	200	22.13±2.34bA	19.17±2.09dC	1.10±0.01bC
	400	11.35±1.56aA	27.19±3.11eC	0.49±0.01aA

注:同列相同基因型不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);相同浓度不同基因型不同大写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.4 Pb²⁺胁迫对不同基因型谷子幼苗 RAPD 图谱的影响

在所用的 8 条 10 bp 寡核苷酸序列引物中,有 3 条(引物 1、引物 2 和引物 5)能扩增出特异、稳定的 PCR 产物(图 1、表 3)。经 3 条引物扩增后,D2-8、安 06、黄米和朝谷基因组 DNA 的 RAPD 图谱中分别扩增出 27、33、32 条和 34 条谱带,其分子量在 220~2340 bp 之间,并且条带清晰,表明在此 PCR 条件下的扩增较为理想。

由图 1 和表 3 可知,与对照相比,50~400 mg·kg⁻¹ Pb²⁺处理 30 d 后,4 种谷子幼苗基因组 DNA 的 RAPD 图谱发生明显变化,表现为单条或多条 RAPD 谱带的缺失、增加,荧光强度的改变(增强或减弱)。随着 Pb²⁺处理浓度的增加,产生的多态性谱带数(*P* 值)和变化的谱带数(*C* 值)均逐渐增多,呈现明显的正相关效应。Pb²⁺胁迫下谷子幼苗 DNA 多态性变化主要表现为高浓度(200~400 mg·kg⁻¹)时大分子量(大于 1500 bp)



M: DL2000 marker; 1~5: D2-8; 0~400 mg·kg⁻¹; 6~10: 安 06; 0~400 mg·kg⁻¹; 11~15: 黄米; 0~400 mg·kg⁻¹; 16~20: 朝谷; 0~400 mg·kg⁻¹

图 1 不同浓度 Pb²⁺胁迫下谷子幼苗基因组 DNA 的 RAPD 图谱(引物 1 为例)

Figure 1 RAPD profiles of genome DNA from foxtail millet seedlings under Pb²⁺ stress

表 3 Pb²⁺胁迫下谷子幼苗基因组 RAPD 图谱的变化

Table 3 RAPD profile changes in foxtail millet seedlings under Pb²⁺ stress

品种浓度		D2-8					安 06					黄米					朝谷				
		CK	50	100	200	400	CK	50	100	200	400	CK	50	100	200	400	CK	50	100	200	400
引物 1	+		0	0	0	0		0	0	1	0		0	0	1	0		0	0	0	1
	-		0	0	1	2		0	1	0	2		0	1	0	2		0	1	2	4
	I	11	1	1	0	1	10	0	0	2	0	11	2	2	1	0	11	0	1	1	0
	D		0	0	1	0		1	1	0	5		0	0	2	4		3	4	4	3
	P		0	0	1	2		0	1	1	2		1	1	1	2		0	1	2	5
	C		1	1	2	3		1	2	3	7		3	3	4	6		3	6	7	8
	T		7					13					16					24			
引物 2	+		0	0	1	2		0	1	0	0		1	0	0	0		0	0	0	0
	-		0	1	0	1		0	0	2	1		0	0	2	3		0	0	2	3
	I	10	0	0	0	0	11	1	0	0	0	10	1	1	0	2	11	0	0	1	2
	D		1	2	4	2		0	0	0	3		1	2	5	0		1	3	3	2
	P		0	1	1	3		0	1	2	1		1	0	2	3		0	0	2	3
	C		2	3	5	5		1	1	2	4		3	3	7	5		1	3	6	7
	T		15					8					18					17			
引物 5	+		0	0	0	0		0	0	0	2		0	0	0	0		0	0	0	1
	-		0	0	1	3		0	0	1	3		1	2	4	4		0	1	2	3
	I	6	0	2	1	0	12	1	3	1	0	11	0	0	0	0	12	1	0	0	3
	D		2	2	2	3		1	0	2	3		0	0	3	3		0	2	4	0
	P		0	0	2	3		0	0	1	3		1	2	4	4		0	1	2	4
	C		2	4	4	6		2	3	4	8		1	2	7	7		1	3	6	7
	T		16					17					17					17			

注: + 新增的谱带; - 减少的谱带; I 荧光强度增加的谱带; D 荧光强度减弱的谱带; P 多态性谱带; C 变化的谱带; T 各品种在 50~400 mg·kg⁻¹ 范围内共产生变化的谱带。

RAPD 谱带的消失。如 D2-8、安 06、黄米和朝谷在 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Pb}^{2+}$ 处理下,经 3 条引物扩增后共产生多态性谱带 8、8、9 条和 12 条,其中消失的谱带分别占 75%、75%、100% 和 83.3%,说明高浓度的 Pb^{2+} 处理对基因组 DNA 的损伤更为显著。

由表 3、图 2 可知,低浓度 ($50 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) Pb^{2+} 处理组中,4 种谷子幼苗基因组模板稳定性(GTS 值)与对照差别不大。高浓度 ($200 \sim 400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 处理组中基因组模板稳定性明显下降,且不同基因型谷子幼苗基因组模板稳定性的降幅出现差异,如 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理后,朝谷、D2-8、黄米和安 06 基因组模板稳定性分别为对照的 64.71%、70.37%、71.88% 和 81.82%,表明 Pb^{2+} 胁迫对朝谷和 D2-8 基因组 DNA 损伤效应强于黄米和安 06。

3 讨论

作物体内可溶性糖在细胞中起着维持细胞膨压、酶活性和细胞膜系统稳定性及植株光合作用等重要的生理功能,可溶性糖含量代表体内碳水化合物的合成、转化与输出代谢状况,亦可作为生理指标之一反映 Pb 污染对作物的毒害情况。曹莹等^[13]的研究证明,在 $27 \sim 540 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Pb}^{2+}$ 浓度范围内,玉米开花期植株体内可溶性糖含量随浓度升高而逐渐下降。张义贤等^[14]在大麦 Pb 试验中也得到类似的结果。刘秀梅等^[15]的研究则发现,小麦、水稻幼苗体内可溶性糖含量随 Pb 胁迫浓度增大呈现先升后降趋势。本试验结果与前两者相似,表明 Pb 胁迫对不同作物体内可溶性糖合成的影响存在差异。 Pb^{2+} 作为作物的非必需元素,在体内积累后可造成叶绿体结构损伤,破坏作物的光合系统,造成体内碳水化合物的合成路径相对受阻,使同化产物的合成速率小于转化、运输速率^[2,13]。

MDA 的形成是膜脂过氧化作用的产物,可与蛋白质、核酸、氨基酸等活性物质交联,形成不溶性化合物沉积,干扰细胞的正常生命活动。MDA 含量可以反映机体内膜脂过氧化的程度,间接地反映细胞的损伤程度^[2]。本研究结果显示,4 种谷子幼苗体内 MDA 含量均随 Pb^{2+} 处理浓度增加而逐渐增大,表明 Pb^{2+} 胁迫下谷子幼苗膜脂过氧化加剧,导致膜系统受到损伤。其原因可能是过量的 Pb^{2+} 会导致植物体内活性氧(AOS)积累,使植物体内过氧羟自由基不断增加,细胞内的脂肪酸转化成膜脂过氧化物。AOS 还能破坏细胞蛋白质、细胞色素及核酸等,使植物生活力大幅下降,生长发育异常^[16-17]。Pb 胁迫下谷子幼苗体内 MDA 的变化趋势与我们在大麦中的研究结果相一致^[18]。

脯氨酸是细胞内重要的渗透调节物质,具有调节细胞渗透平衡、增强细胞结构稳定性和阻止氧自由基产生的作用。本研究表明, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Pb}^{2+}$ 处理下,谷子幼苗体内游离脯氨酸含量与对照相比均有增加,这可能是谷子幼苗对 Pb^{2+} 毒害的一种保护性生理反应,它与植物体内活性氧自由基的清除以及膜脂过氧化的减轻有关,类似的结果在其他作物研究中也得到证实^[13-14]。脯氨酸作为细胞质渗透调节物质具有很强的亲水性,重金属胁迫使植物细胞膜脂过氧化水平升高,细胞渗透势降低,导致植物体细胞水分失衡和产生大量活性氧,脯氨酸的积累可防止植物细胞结构和功能受损伤,保证植物体内水分平衡和清除活性氧。同时,脯氨酸的积累需要碳水化合物的氧化磷酸化提供氧化还原动力,但随着 Pb^{2+} 处理浓度的增高,谷子幼苗体内脯氨酸含量下降,这可能与幼苗体内碳源不足有关,在植物水分胁迫中也有类似现象^[9]。

生物基因组 DNA 是遗传信息的载体,具有稳定性的特点。重金属污染会对细胞 DNA 造成损伤,影响

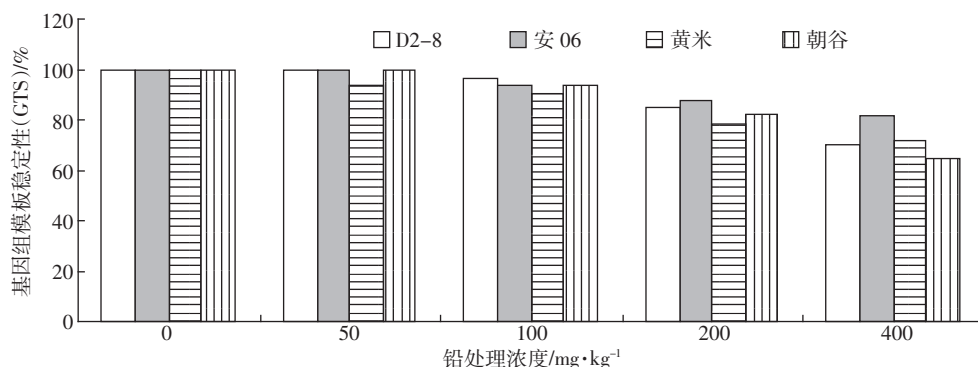


图 2 Pb^{2+} 胁迫下谷子幼苗基因组模板稳定性

Figure 2 The stability of genome template of foxtail millet seedlings under Pb^{2+} stress

到基因表达调控和细胞信号转导途径,从而干扰遗传信息的传递^[20]。Atienza等^[21]的研究发现,环境重金属污染物能诱导生物细胞内的DNA损伤和突变,导致引物结合位点的核苷酸缺失或增加,从而影响RAPD谱带。Mengoni等^[22]的研究表明,Cu污染使奇异花瓶草RAPD谱带增加,经鉴定增加的两条谱带为Cu污染所特有的。Liu等^[23]和詹振楠等^[24]的研究指出,Cd可造成大麦、拟南芥RAPD谱带的增加、缺失及荧光强度的改变,基因组模板稳定性下降。本研究结果与上述现象类似,Pb²⁺胁迫后4种谷子幼苗RAPD谱带亦表现为原谱带的增加、消失或谱带强度的改变,尤其是高浓度处理组中一些大分子谱带的消失,表明Pb²⁺胁迫对DNA的损伤比较严重,对基因组模板的稳定性产生较大影响。谷子幼苗DNA多态性产生的可能原因有三方面:一是由于Pb²⁺胁迫使细胞内单链或双链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^[23];二是由于与引物互补结合的模板DNA的位点序列发生了改变,导致互补位点增加或减少,从而使扩增片段数增加或减少^[24];三是由于在多拷贝引物结合位点上,某些位置的碱基发生了突变,导致引物结合量增加或减少,扩增的DNA量也随之变化,使RAPD谱带强度发生改变^[25-26],最终导致幼苗基因组模板的稳定性下降。

综合本研究结果,不同浓度的Pb²⁺处理均使谷子幼苗可溶性糖和脯氨酸含量下降,使碳水化合物合成受阻和防御系统受损,MDA含量的升高则表明膜系统受到损伤,直接或间接地影响到细胞内DNA结构的稳定性,造成RAPD谱带发生改变,但不同基因型谷子在生理生化和分子水平上对Pb²⁺胁迫的响应存在差异。利用RAPD技术获得的DNA多态性变化与生理生化指标相结合,能更全面地评价Pb²⁺污染对作物造成的早期毒害效应,并为作物重金属抗性品种选育提供实验依据。

4 结论

(1)不同浓度Pb²⁺胁迫下,4种基因型谷子幼苗体内可溶性糖含量随浓度升高逐渐下降,脯氨酸含量则表现为低浓度的促进和高浓度的抑制效应,而MDA含量则有显著增加,证明谷子幼苗对Pb²⁺胁迫的生理响应较为敏感。

(2)不同浓度Pb²⁺胁迫下4种谷子幼苗基因组DNA的RAPD图谱发生明显变化,表现为RAPD谱带的

增加、缺失和荧光强度的改变,表明基因组模板DNA的稳定性下降。尤其是高浓度(200 mg·kg⁻¹以上)Pb²⁺胁迫对DNA的损伤效应更为显著。

(3)不同基因型谷子对Pb²⁺胁迫的生理和遗传损伤响应存在差异。4种基因型谷子中,朝谷和黄米对Pb²⁺胁迫的生理响应较为敏感,朝谷和D2-8对Pb²⁺胁迫的遗传损伤响应强于黄米和安06。

参考文献:

- [1] 周启星,孔繁翔,朱琳.生态毒理学[M].北京:科学出版社,2004:306-350.
ZHOU Qi-xing, KONG Fan-xiang, ZHU Lin. Ecotoxicology: principles and methods[M]. Beijing: Science Press, 2004: 306-350.
- [2] 杨刚,伍钧,唐亚.铅胁迫下植物抗性机制的研究进展[J].生态学报,2005,24(12):1507-1512.
YANG Gang, WU Jun, TANG Ya. Research advances in plant resistance mechanisms under lead stress[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(12): 1507-1512.
- [3] 杨世勇,王方,谢建春.重金属对植物的毒害及植物的耐性机制[J].安徽师范大学学报(自然科学版),2004,27(1):71-74.
YANG Shi-yong, WANG Fang, XIE Jian-chun. Plant toxicity of heavy metals and the tolerant mechanisms of plants[J]. *Journal of Anhui Normal University(Natural Science)*, 2004, 27(1): 71-74.
- [4] 张喜文,武钊.谷子栽培生理[M].北京:中国农业科学技术出版社,1993:1-15.
ZHANG Xi-wen, WU Zhao. Foxtail millet cultivation and physiology [M]. Beijing: China Agriculture Science and Technology Press, 1993: 1-15.
- [5] 王存宝,宁安荣,常晓冰,等.太原市汾河流域五大粮食作物污染监测评价[J].农业环境保护,1993,12(5):208-212.
WANG Cun-bao, NING An-rong, CHANG Xiao-bing, et al. A monitoring assessment on the pollution of five mail crops in Fenhe River Valley in Taiyuan[J]. *Agro-Environment Protection*, 1993, 12(5): 208-212.
- [6] Samantaray S, Rout G R, Das P. In vitro selection and regeneration of zinc tolerant calli from *Setaria italica* L.[J]. *Plant Science*, 1999, 143: 201-209.
- [7] Rout G R, Samantaray S, Das P. In vitro selection and characterization of Ni-tolerant callus linws of *Setaria italica* L.[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 1998, 20(3): 269-275.
- [8] 肖志华,张义贤,张喜文,等.外源铅、铜胁迫对不同基因型谷子幼苗生理生态特性的影响[J].生态学报,2012,32(3):889-897.
XIAO Zhi-hua, ZHANG Yi-xian, ZHANG Xi-wen, et al. Effects of exogenous Pb and Cu stress on eco-physiological characteristics on foxtail millet seedlings of different genotypes[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(3): 889-897.
- [9] 张喜文,张义贤,李萍,等.谷子幼苗对土壤铅、铬的生长响应及吸收积累的差异性[J].植物研究,2011,31(6):739-743.
ZHANG Xi-wen, ZHANG Yi-xian, LI Ping, et al. Differences in growth response to Pb, Cr stress and their uptake and accumulation of foxtail

- millet seedling[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2011, 31(6):739-743.
- [10] 中华人民共和国国家标准. GB 15618—1995, 土壤环境质量标准[S]. 1995.
- GB 15618—1995, Standard of Peoples Republic of China. Environmental quality standard for soil[S]. 1995.
- [11] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000:184-217.
- LI He-sheng. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000:184-217.
- [12] 魏 群. 分子生物学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2007:110-115.
- WEI Qun. Laboratory manual for molecular biology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2007:110-115.
- [13] 曹 莹, 黄瑞冬, 曹志强. 铅胁迫对玉米生理生化特性的影响[J]. 玉米科学, 2005, 13(3):61-64.
- CAO Ying, HUANG Rui-dong, CAO Zhi-qiang. Effects of Pb stress on the physiological and biochemical traits of maize[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2005, 13(3):61-64.
- [14] 张义贤, 李晓科. 镉、铅及其复合污染对大麦幼苗部分生理指标的影响[J]. 植物研究, 2008, 28(1):43-46.
- ZHANG Yi-xian, LI Xiao-ke. Effects of Cd, Pb and their combined pollution on physiological indexes on leaf of the *Hordeum vulgare* seedling[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2008, 28(1):43-46.
- [15] 刘秀梅, 聂俊华, 王庆仁. Pb对农作物的生理生态效应[J]. 农业环境保护, 2002, 21(3):201-203.
- LIU Xiu-mei, NIE Jun-hua, WANG Qing-ren. Eco-physiological response of several crops to lead[J]. *Agro-Environmental Protection*, 2002, 21(3):201-203.
- [16] Pinto E, Sigaud-Kutner T C S, Leitao M A S, et al. Heavy metal induced oxidative stress in algae[J]. *Phycol*, 2003, 39:1008-1018.
- [17] 晁 雷, 周启星, 陈 苏, 等. 小麦对 Pb 胁迫的生理生化反应研究[J]. 生态科学, 2007, 26(1):6-9.
- CHAO Lei, ZHOU Qi-xing, CHEN Su, et al. Effects of Pb on physiological mechanisms in wheat[J]. *Ecological Science*, 2007, 26(1):6-9.
- [18] 张义贤, 张丽萍. 重金属对大麦幼苗膜脂过氧化及脯氨酸和可溶性糖含量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(4):857-860.
- ZHANG Yi-xian, ZHANG Li-ping. Effects of heavy metals on membrane lipid peroxidation, proline and soluble sugar in roots of *Hordeum vulgare*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(4):857-860.
- [19] 曹仪植, 吕忠恕. 水分胁迫下植物体内脯氨酸的累积及 ABA 在其中的作用[J]. 植物生理学报, 1985, 11(1):9-16.
- CAO Yi-zhi, LÜ Zhong-shu. The accumulation of free proline and the role of ABA in water-stressed plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 1985, 11(1):9-16.
- [20] Aydin H H, Celik H A, Deveci R, et al. Characterization of the cellular response during Apoptosis induction in cadmium-treated hep G2 human hepatoma cells[J]. *Biological Trace Element Research*, 2003, 95(2):139-153.
- [21] Atienza F A, Vehier P, Jha A N, et al. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations[J]. *Mutant Res*, 2002, 521:151-163.
- [22] Mengoni A, Gonnelli C, Galardi F. Genetic diversity and heavy metal tolerance in population of *Silene paradoxa* L.: A random amplified polymorphic DNA analysis[J]. *Mol Ecol*, 2009, 9(9):1319-1324.
- [23] Liu Wan, Li Pei-Jun, Qi Xue-Mei, et al. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis[J]. *Chemosphere*, 2005, 61:158-167.
- [24] 詹振楠, 刘 宛, 孙梨宗, 等. 镉胁迫对拟南芥幼苗基因组 DNA 多态性的影响[J]. 生态学杂志, 2011, 30(6):1234-1239.
- ZHAN Zhen-nan, LIU Wan, SUN Li-zong, et al. Effects of cadmium stress on DNA polymorphism of genome in *Arabidopsis thaliana* seedlings[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(6):1234-1239.
- [25] Jones C, Kortenkamp L. RAPD library fingerprinting of bacterial and human DNA: Application in mutation detection[J]. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 2000, 20:49-63.
- [26] Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, et al. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73:312-319.