

丁国华, 郭丹蒂, 关 旻, 等. 重金属铅镉对濒危植物中华水韭(*Isoetes sinensis*) DNA 甲基化的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(2): 246–249.
DING Guo-hua, GUO Dan-di, GUAN Yan, et al. Effect of Pb and Cd on DNA methylation of *Isoetes sinensis*, a rare plant[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(2): 246–249.

重金属铅镉对濒危植物中华水韭(*Isoetes sinensis*) DNA 甲基化的影响

丁国华^{1,2}, 郭丹蒂¹, 关 旻^{1,2}, 刘保东^{1,2}, 池春玉^{1,2*}

(1. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025; 2. 黑龙江省普通高等学校植物生物学重点实验室, 哈尔滨 150025)

摘 要: 为研究古老植物对重金属胁迫的分子水平的响应, 探究重金属对濒危植物 DNA 甲基化影响的特点, 选择两种重金属 Pb 和 Cd 对濒危植物中华水韭进行胁迫处理, 每种重金属设置 3 个处理浓度, 胁迫处理至第 28 d 选取叶片, 采用 MSAP(甲基化敏感扩增多态性)技术测定 DNA 甲基化程度。试验结果表明: 重金属铅和镉均能够对中华水韭 DNA 甲基化产生影响, 甲基化总体水平基本一致(对照、Pb 处理和 Cd 处理分别为 46.96%、48.23%和 48.1%), 但全甲基化水平(Pb 处理是 28.34%, Cd 处理是 20.25%)均低于对照(33.91%), 而半甲基化水平(Pb 处理是 19.89%, Cd 处理是 27.85%)均高于对照(13.04%)。甲基化增强的变化, 以无甲基化或内外侧胞嘧啶半甲基化向内外侧胞嘧啶全甲基化变化的模式为主。去甲基化的变化, 以内外侧胞嘧啶全甲基化向无甲基化或内侧胞嘧啶半甲基化或全甲基化变化的模式为主。铅和镉胁迫在导致中华水韭 DNA 甲基化增强所占比率方面几乎相等(39.04%和 39.71%), 而在去甲基化所占比率方面镉(46.86%)高于铅(33.92%)。

关键词: 中华水韭; DNA 甲基化; 甲基化敏感扩增多态性(MSAP); 铅; 镉

中图分类号: X503.23 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2017)02-0246-04 doi:10.11654/jaes.2016-1141

Effect of Pb and Cd on DNA methylation of *Isoetes sinensis*, a rare plant

DING Guo-hua^{1,2}, GUO Dan-di^{1,2}, GUAN Yan^{1,2}, LIU Bao-dong^{1,2}, CHI Chun-yu^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Plant Biology in Colleges of Heilongjiang Province, Harbin 150025, China; 2. School of Life Science & Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China)

Abstract: To investigate the molecular response of ancient plants to heavy metal stress and to explore the feature of DNA methylation in endangered plants exposure to heavy metals, *Isoetes sinensis*, an endangered plant, was stressed with three different concentrations of two heavy metals Pb and Cd, respectively. Then the degree of DNA methylation in the leaves were measured on the 28th day using Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) technique. The results showed that the DNA methylated profile of *I. sinensis* was affected by heavy metal stress. There was no significant difference in the amount of DNA methylation between the test and control groups (CK, Pb and Cd was 46.96%, 48.23% and 48.1%, respectively), however, full-methylation level (Pb 28.34%, Cd 20.25%) were lower than control (33.91%), in contrast, hemi-methylation level (Pb 19.89%, Cd 27.85%) were higher than control (13.04%). The change of patterns from no methylation or hemi-methylation of inner and outer cytosines into full-methylation of inner and outer cytosines accounted for a large proportion in enhanced methylation aspects and that from full-methylation of inner and outer cytosines into no methylation or hemi- or full-methylation of inner cytosines occupied most of demethylation. The proportion of DNA methylation increased by both Pb and Cd stresses is nearly equal (39.04% and 39.71%), but the proportion of DNA demethylation by Cd is higher than that by Pb (46.86% than 33.92%).

Keywords: *Isoetes sinensis* Palm; DNA methylation; MSAP; Pb; Cd

收稿日期: 2016-09-05

作者简介: 丁国华(1963—), 男, 山东梁山人, 教授, 从事植物分子生理研究。E-mail: hsdgh@hrbnu.edu.cn

* 通信作者: 池春玉 E-mail: chichunyu2006@126.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170294); 哈尔滨师范大学首批预研项目

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(31170294); The First Pre-research Project of Harbin Normal University

随着工业的发展,重金属已成为环境污染的重要因素之一。重金属对植物的伤害主要表现为植物DNA的损伤,包括碱基改变、DNA单双链断裂、与蛋白质的交联和DNA的期外合成等^[1],这些不可逆的损伤,还可能遗传给后代,造成严重后果。重金属能够导致植物DNA甲基化的改变^[2],这种对胁迫做出的迅速反应可以弥补高度稳定的DNA序列对逆境响应的不足^[3-5]。中华水韭(*Isoetes sinensis* Palm)是孑遗古老的活化石植物,因生存环境的变迁和生存区域的减少成为濒危物种,被列为国家一级重点保护野生植物^[6]。本文主要报道重金属镉和铅对中华水韭DNA甲基化的影响情况,为深入研究古老植物适应环境和响应重金属胁迫分子调控特殊机制提供材料。

试材中华水韭来自浙江大学,并由哈尔滨师范大学蕨类研究室繁殖。胁迫处理前由温室移栽至实验室。经30 d恢复培养后,分别用500 mg·L⁻¹(Pb-1)、2000 mg·L⁻¹(Pb-2)和5000 mg·L⁻¹(Pb-3)浓度的硝酸铅和100 mg·L⁻¹(Cd-1)、250 mg·L⁻¹(Cd-2)和500 mg·L⁻¹(Cd-3)浓度的氯化镉溶液直接浇灌,至第7 d和第14 d再浇灌2次,3次共计100 mL。至第28 d随机选取不同植株相同生长部位的叶片进行DNA甲基化水平测定,测定方法采用MSAP(甲基化敏感扩增多态性)技术,参考Xiong等^[7]方法进行。

结果表明,Pb-2处理组全甲基化水平略低于半甲基化水平,对照组CK、Pb-1和Pb-3处理组的全甲基化水平均明显高于半甲基化水平(图1)。Pb-2处理组的总甲基化水平和半甲基化水平明显高于对照组,3个处理组的全甲基化水平均低于对照组。由此可以分析得出,重金属铅能够对中华水韭DNA甲基化产生影响,并且不同浓度的铅胁迫对中华水韭DNA甲基化的影响不同,其中2000 mg·L⁻¹浓度的铅胁迫的影响作用最大。铅胁迫对中华水韭甲基化模式

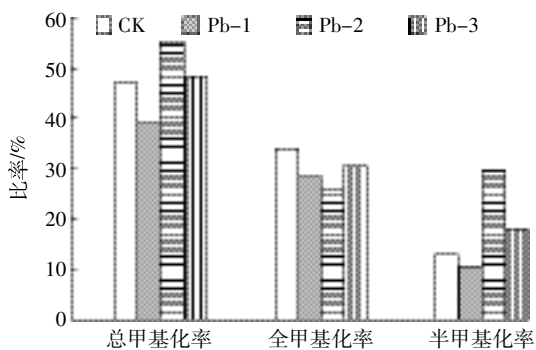


图1 铅胁迫下中华水韭基因组DNA甲基化水平
Figure 1 The methylation level of *Isoetes sinensis* DNA under Pb stress

的影响主要表现在半甲基化的增强。

3种浓度镉胁迫下中华水韭基因组DNA的半甲基化水平均高于对照,但全甲基化水平均低于对照,而总甲基化水平表现为Cd-1低于对照,Cd-2和Cd-3高于对照(图2)。在对照中,全甲基化占优势,Cd-3处理组全甲基化略微占优势,Cd-2则半甲基化明显占优势。半甲基化在镉胁迫下中华水韭DNA甲基化的变化模式中以增强为主,而全甲基化以减弱为主。

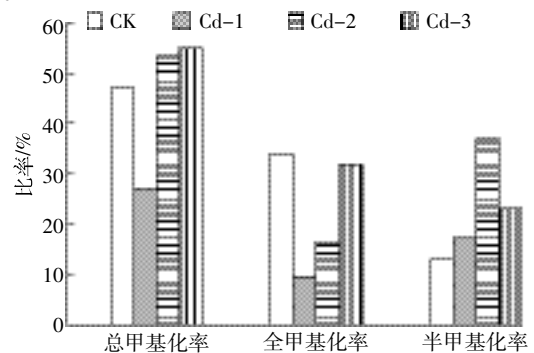


图2 镉胁迫下中华水韭基因组DNA的甲基化水平
Figure 2 The methylation level of *Isoetes sinensis* DNA under Cd stress

对铅、镉胁迫下的中华水韭DNA甲基化水平进行比较分析(图3),发现中华水韭DNA甲基化总体水平基本一致,分别为48.23%和48.10%,与对照46.96%相比略有增加,但全甲基化水平均明显低于对照,而半甲基化水平均明显高于对照。与对照相比,铅处理组全甲基化水平高于半甲基化水平,而镉处理组则相反,推测重金属铅、镉胁迫中华水韭后存在不同的DNA甲基化模式变化。

MSAP甲基化结果有4种类型^[8],I类型:Hap II和Msp I都有带,即(1,1);II类型:Hap II有带,Msp I无带,即(1,0);III类型:Hap II无带,Msp I有带,即(0,1);IV类型:Hap II和Msp I都无带,即(0,0)(表1)。

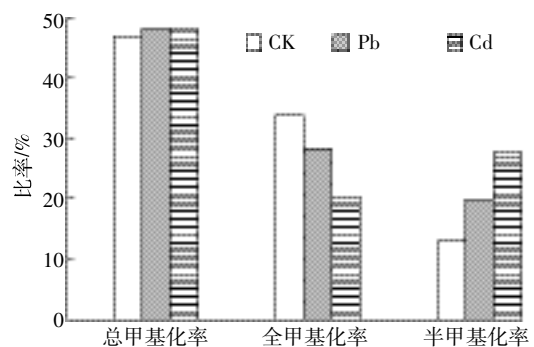


图3 铅、镉胁迫下中华水韭基因组DNA甲基化水平比较
Figure 3 The comparison on methylation level of *Isoetes sinensis* DNA under Pb and Cd stress

分析表 2 可以看出,在 A 型(甲基化增强)的 5 种甲基化模式中,所占比率最高的是对照 I 型胁迫 IV 型(1,1;0,0),3 种浓度铅和镉胁迫平均所占比率分别为 15.96%和 15.08%。其次是对照 II 型胁迫 IV 型(1,0;0,0),平均所占比率分别为 9.57%和 7.26%。平

均所占比率最低的是对照 I 型胁迫 III 型(1,1;0,1),分别为 0.87%和 2.51%。该数据说明,铅和镉胁迫下的中华水韭基因组 DNA 甲基化以无甲基化或内外侧胞嘧啶半甲基化向内外侧胞嘧啶全甲基化变化的模式为主,由无甲基化或内侧胞嘧啶半甲基化向仅发生

表 1 酶切类型及所代表的 DNA 甲基化模式
Table 1 Restriction type and represent DNA methylation patterns

酶切类型 Restriction type		DNA 甲基化模式 DNA methylation patterns	DNA 甲基化类型 Type of DNA methylation
Hap II	Msp I		
1	1	无甲基化或内侧胞嘧啶半甲基化 No methylated or semi-methylated cytosine inner	I
1	0	胞嘧啶外侧半甲基化 Semi-methylated cytosine outside	II
0	1	胞嘧啶内侧全甲基化 Full-methylated cytosine inner	III
0	0	内外侧胞嘧啶全甲基化或序列变异 Full methylation or sequence variation of inner and outer cytosine	IV

表 2 铅、镉胁迫下中华水韭基因组 DNA 甲基化模式分析
Table 2 The analysis of methylation status in *Isoetes sinensis* genomic DNA under Pb and Cd stress

酶切带型 Type of bands					甲基化模式 Methylation status		各种模式甲基化所占比率 Number and frequency of methylation pattern					
对照 Control		胁迫 Stress			对照 Control	胁迫 Stress	Pb-1	Pb-2	Pb-3	Cd-1	Cd-2	Cd-3
Hap II	Map I	Hap II	Map I									
A	1	1	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	0.00	0.00	2.62	2.07	2.92	2.55
	1	1	1	0	CCGG GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	5.84	2.19	4.19	1.38	3.51	2.55
	1	1	0	0	CCGG GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	14.29	14.21	19.37	17.93	15.20	12.10
	0	1	0	0	CCGG GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	6.49	8.20	10.99	2.07	4.09	7.01
	1	0	0	0	CCGG CCGG GGCC GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	4.55	14.75	9.42	0.69	13.45	7.64
B	0	1	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	0.00	0.55	1.05	0.00	2.92	5.10
	1	0	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	0.65	2.19	4.19	2.76	5.85	1.91
	0	0	1	1	CCGG CCGG GGCC GGCC	CCGG GGCC	21.43	17.49	12.04	34.48	20.47	25.48
	0	0	0	1	CCGG CCGG GGCC GGCC	CCGG GGCC	16.23	12.57	5.76	21.38	9.94	17.83
	0	0	1	0	CCGG CCGG GGCC GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	0.65	3.83	3.14	8.28	4.68	5.10
C	1	1	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	17.53	13.11	14.66	4.83	6.43	6.37
	0	1	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	9.09	0.55	12.04	0.69	2.92	3.18
	1	0	1	0	CCGG CCGG GGCC GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	1.30	2.19	0.52	0.00	0.58	0.64
D	0	1	1	0	CCGG GGCC	CCGG GGCC	1.95	0.00	0.00	0.69	0.00	1.27
	1	0	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	0.00	0.55	0.00	2.76	1.75	1.27

注:下划线“_”指示发生甲基化的碱基。
Note: Underline “_”indicated methylated bases.

内侧胞嘧啶全甲基化变化的模式最为少见。在B型(甲基化减弱)的5种甲基化模式中,所占比率最高的是对照Ⅳ型胁迫Ⅰ型(0,0;1,1),3种浓度铅和镉胁迫平均所占比率分别为16.99%和26.81%。其次是对照Ⅳ型胁迫Ⅲ型(0,0;0,1),平均所占比率分别为11.52%和16.38%。平均所占比率最低的是对照Ⅲ型胁迫Ⅰ型,分别为0.53%和2.67%。该数据说明,在去甲基化的变化模式中,还是以内外侧胞嘧啶全甲基化向无甲基化或内侧胞嘧啶半甲基化或全甲基化变化的模式为主,仅发生内侧胞嘧啶全甲基化向无甲基化或内侧胞嘧啶半甲基化变化的模式最为少见。另外,各种DNA甲基化模式所占比率与铅和镉的处理浓度没有表现出显著相关。铅和镉胁迫在导致中华水韭DNA甲基化增强所占比率方面几乎相等,而在去甲基化所占比率方面镉高于铅。

很多研究显示重金属胁迫下植物总甲基化水平有明显提高^[9-12],但也有报道与本研究结果相似,即重金属胁迫后DNA总甲基化水平有所提高但幅度不大^[13]。有些研究还显示重金属处理后DNA甲基化水平有升高也有降低,与处理的浓度相关^[14]。所以,根据本实验结果分析认为,重金属胁迫所引起的中华水韭DNA甲基化水平的变化,主要表现为全甲基化水平的降低和半甲基化水平的升高,综合而言,在总甲基化水平上的变化不够明显。但在DNA甲基化变化的模式上,铅和镉胁迫下的中华水韭表现出显著特征,因此分析植物响应重金属胁迫的遗传可塑性机制,从DNA甲基化变化模式进行更加合理,而不是简单比较甲基化水平的变化程度^[15]。

参考文献:

- [1] Gjorgieva D, Kadifkova P T, Ruskovska T, et al. Influence of heavy metal stress on antioxidant status and DNA damage in *Urtica dioica*[J]. *Biomed Research International*, 2013. doi:10.1155/2013/276417.
- [2] 彭海,席婷,张静,等.胁迫条件下植物DNA甲基化的稳定性[J]. 中国农业科学, 2011, 44(12):2431-2438.
PENG Hai, XI Ting, ZHANG Jing, et al. Stability of stress-induced DNA methylation in plant[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(12): 2431-2438.
- [3] 赵云雷,叶武威,王俊娟,等. DNA甲基化与植物抗逆性研究进展[J]. 西北植物学报, 2009, 29(7):1479-1489.
ZHAO Yun-lei, YE Wu-wei, WANG Jun-juan, et al. Review of DNA methylation and plant stress-tolerance[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, 29(7):1479-1489.
- [4] 葛才林,杨小勇,刘向农,等. 重金属胁迫对作物DNA胞嘧啶甲基化的影响[J]. 农业环境保护, 2002, 21(4):301-305.
GE Cai-lin, YANG Xiao-yong, LIU Xiang-nong, et al. Effect of heavy metal stress on levels of methylation in DNA of crop[J]. *Agro-environmental Protection*, 2002, 21(4):301-305.
- [5] 王晓凤,曾凡锁,詹亚光. 植物DNA甲基化变异对生物和非生物胁迫的响应机制[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(1):108-112.
WANG Xiao-feng, ZENG Fan-suo, ZHAN Ya-guang. DNA methylation variation of biological and abiotic stress response mechanism in plant[J]. *Letters in Biotechnology*, 2011, 22(1):108-112.
- [6] 彭旻晟,刘虹,王青锋. 中华水韭[J]. 生物学通报, 2005, 40(11):16.
PENG Min-sheng, LIU Hong, WANG Qing-feng. *Isoetes sinensis*[J]. *Bulletin of Biology*, 2005, 40(11):16.
- [7] Xiong L Z, Xu C G, Maroof M A, et al. Patterns of cytosine methylation in an elicits hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1999, 261(3):439-446.
- [8] Ashikawa I. Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 45(1):31-39.
- [9] 何玲莉,沈虹,王燕,等. 铅胁迫下萝卜基因组DNA甲基化分析[J]. 核农学报, 2015, 29(7):1278-1284.
HE Ling-li, SHEN Hong, WANG Yan, et al. Analysis of genomic DNA methylation level in radish under lead stress[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(7):1278-1284.
- [10] 王子成,马洪霞,何艳霞. 重金属镉对拟南芥DNA甲基化的影响[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(2):115-118.
WANG Zi-cheng, MA Hong-xia, HE Yan-xia. Effects of cadmium on *Arabidopsis thaliana* DNA methylation[J]. *Plant Physiology Communication*, 2009, 45(2):115-118.
- [11] 李照令,王鹤潼,陈瑞娟,等. 运用MSAP研究镉胁迫对拟南芥幼苗基因甲基化的影响[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(1):28-36.
LI Zhao-ling, WANG He-tong, CHEN Rui-juan, et al. Studying genomic methylation of *Arabidopsis thaliana* seedlings under cadmium stress using MSAP[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(1):28-36.
- [12] 张凯凯,陈兴银,杨鹏,等. 不同浓度镉胁迫对孔雀草DNA甲基化的影响[J]. 草业科学, 2016, 33(9):1673-1680.
ZHANG Kai-kai, CHEN Xing-yin, YANG Peng, et al. Effects of different concentrations Cd stress on DNA methylation of *Tagetes patula* [J]. *Pratacultural Science*, 2016, 33(9):1673-1680.
- [13] 杨金兰,柳李旺,龚义勤,等. 镉胁迫下萝卜基因组DNA甲基化敏感扩增多态性分析[J]. 植物生理与分子生物学报, 2007, 33(3):219-226.
YANG Jin-lan, LIU Li-wang, GONG Yi-qin, et al. Analysis of genomic DNA methylation level in radish under cadmium stress by methylation sensitive amplicated polymorphism technique[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2007, 33(3):219-226.
- [14] 黑淑梅. 重金属铬对小麦DNA甲基化水平的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 13:7589-7591.
HEI Shu-mei. Effects of heavy metal chromium on the DNA methylation in wheat seedlings[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 13:7589-7591.
- [15] Cruceanu C, Kutsarova E, Chen E S, et al. DNA hypomethylation of Synapsin II CpG islands associates with increased gene expression in bipolar disorder and major depression[J]. *Bmc Psychiatry*, 2016, 16(1):286-291.