

重金属胁迫对作物 DNA 胞嘧啶甲基化的影响

葛才林¹, 杨小勇¹, 刘向农², 孙锦荷³, 罗时石¹, 王泽港¹

(1. 扬州大学农学院, 江苏 扬州 225009; 2. 扬州大学测试中心, 江苏 扬州 225009;
3. 浙江大学核农学研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要: 采用水培试验方法, 研究了重金属胁迫对小麦水稻 DNA 胞嘧啶甲基化的影响。结果表明, 和对照相比, Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 能明显使小麦和水稻地上部叶片和幼穗中的 5 – 甲基胞嘧啶 (5mC) 的含量增高, 即引起叶和穗 DNA 高甲基化。0. 1、0. 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 胁迫能使小麦根系 DNA 中的 5 – 甲基胞嘧啶的百分含量显著高于对照, 而各供试浓度的 Hg^{2+} 以及 1. 0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 胁迫则造成小麦根系 DNA 中的 5 – 甲基胞嘧啶的百分含量显著低于对照, 使 DNA 低甲基化。

关键词: 重金属胁迫; 作物; DNA 甲基化

中图分类号: X503. 231 文献标识码: A 文章编号: 1000 – 0267(2002)04 – 0301 – 05

Effect of Heavy Metal Stress on Levels of Methylation in DNA of Crop

GE Cai-lin¹, YANG Xiao-yong¹, LIU Xiang-nong², SUN Jin-he³, LUO Shi-shi¹, WANG Ze-gang¹

(1. Agricultural College, Yangzhou University; 2. Biological Analysis Centre, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu China; 3. Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang China)

Abstract: Protein synthesis in leaf of crops was inhibited obviously by heavy metal stress. The reason may be due, at least in part, to change of DNA methylation pattern caused by heavy metal stress. Comparing with the control, when wheat and rice were treated by heavy metal (Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+}) stress, it was significant that content of 5 – methyl cytosine in the DNA of leaf and ear in wheat or rice was increased. When wheat was treated by 0. 1, 0. 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu^{2+} and Cd^{2+} stress, the content of 5 – methyl cytosine in DNA of root in wheat was much higher than that in control. When it was treated by 0. 1, 0. 5, 1. 0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hg^{2+} or 1. 0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu^{2+} and Cd^{2+} stress, the content of 5 – methyl cytosine in root DNA of wheat was markedly lower than that in control. The results suggested that heavy metal stress could, to a different extent, induce the modification of cytosine methylation in DNA of crops.

Keywords: heavy metal stress; crops; DNA methylation

近年来, 对 DNA 甲基化修饰的研究已成为分子生物学中的一个热点问题。法、英、美、丹麦科学家的联合研究证实, DNA 甲基化是控制基因活力的主要方式, 它对胚胎发育是否正常起着决定性作用。目前认为, DNA 甲基化具有下列生物功能: DNA 甲基化可调控基因表达, 控制胚胎发育。基因中的启动子和编码区的过度甲基化能抑制基因的转录, 而去甲基化则有利于基因表达。DNA 甲基化决定着染色体的结构, DNA 低甲基化可使染色质凝聚发生障碍, 干扰中期染色体的分离, 促进染色体不稳定, 使染色体断裂、易位和丢失^[4]。DNA 甲基化可能还涉及到 DNA 的复制

调控和损伤修复的识别, 如甲基化可能控制复制原始点的识别和利用, 也可能是错配修复系统中模板链和新生链的识别标志^[1-3]。DNA 甲基化可能还与外来基因的识别、转基因沉默、生物防御、人类某些疾病有关。

许多研究表明, 重金属胁迫能对生物体内的生理过程产生严重影响, 其原因不仅与重金属胁迫引起蛋白质损伤有关, 也与 DNA 损伤有关。现已证实重金属胁迫能引起 DNA 断裂、交联和 DNA 期外合成^[5-7]。有关重金属对生物体内 DNA 甲基化水平的影响, 目前的研究报道主要集中在医学领域, 重金属及过渡金属络合物引起的人或实验动物细胞内 DNA 甲基化水平的改变。如 Lee YW, Broday L, Costa M 的研究表明, 重金属镍处理中国仓鼠虽然在短期内使细胞中甲基胞

收稿日期: 2002 – 03 – 26

作者简介: 葛才林(1962—), 男, 江苏扬州人, 副教授, 在读博士, 主要从事生物物理和作物逆境生理研究。

嘧啶转移酶的活性有所降低, 但 5-甲基胞嘧啶含量却迅速升高^[8]。Hix S, Augusto O 认为叔丁基过氧化铁 (Tert-butyl hydroperoxide-iron(II)) 也能引起小牛胸腺 DNA 的甲基化水平提高^[9]。在植物学中也已有一些有关 DNA 甲基化功能^[3, 10-12]、DNA 甲基化遗传^[13]、DNA 甲基化转移酶的类型和结构^[14]、DNA 中甲基胞嘧啶的分布^[15]等的研究报道。一些研究证实改变 DNA 甲基化水平能改变植株形态、影响植株的正常发育^[10]。至于重金属胁迫对作物体内各器官 DNA 甲基化模式有何影响目前还未见报道。作者的研究表明, 一定浓度的重金属胁迫能引起作物体内蛋白质含量持续降低, 一些关键酶的活性也持续下降。这一现象除了与重金属胁迫引起 DNA 损伤有关外, 是否还与 DNA 甲基化模式的改变有关? 为此, 分别测定了不同浓度的 3 种重金属 (Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+}) 胁迫对小麦和水稻各器官 DNA 中 5-甲基胞嘧啶含量 (5mC) 的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

供试重金属: Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Cd^{2+} ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$), Hg^{2+} [$\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$], 均为化学纯。

胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶标样: 色谱纯, 由浙江大学核农学研究所提供 (购自 Sigma 公司)。

供试作物和品种: 水稻 (*Oryza Sativa*) 品种为扬稻 6 号 (籼稻型) 及 9516 (武育梗系列, 粳稻型); 小麦 (*Triticum Aestivum*) 品种为扬麦 10 号。

1.2 方法

1.2.1 供试作物的培养

采用木村 B 培养液将准备移栽的稻苗和越冬后的麦苗分别转移到培养液中进行水培, 培养液中的柠檬酸铁换成相同浓度的 EDTA-铁。在对水稻进行培养时, 培养液中加入一定浓度的硅酸钠, 并将培养液 pH 值调为 5.0 左右。在对小麦进行培养时, 将培养液 pH 值调为 6.8 左右, 并用气泵向培养液增氧。每隔 7 d 换培养液一次。

1.2.2 重金属离子胁迫处理

待进入抽穗开花期, 各选取长势、长相一致的 3 株小麦, 将其转移到分别含有 0、0.05、0.1、0.3、0.5、1.0、2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 的培养液中进行胁迫处理; 同样各选取 3 株水稻, 转移到分别含有 0、0.025、0.05、0.1、0.5、1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 的培养液中进行处理。处理时间均为 7 d。

1.2.3 叶片蛋白质提取和含量测定

分别称取蔗糖 11.98 g, Tris 0.606 g, 抗坏血酸 0.088 g, 半胱氨酸 0.03 g, 氯化镁 0.02 g, 定容至 100 mL, 将 pH 调为 7.4, 作为蛋白质提取研磨介质。

待胁迫处理 7 d 后, 分别称取经处理的小麦和水稻剑叶 0.5 g, 按 1:4 的比例加入上述预冷的研磨介质, 在冰浴上研磨成匀浆, $16\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 冷冻离心 10 min, 取上清液备用。

采用考马斯亮兰 (G250) 染色法对各处理叶片中的蛋白质含量进行测定。并将测定结果计算成 $\text{mg g}^{-1} \text{FW}$ 。

1.2.4 DNA 提取

DNA 提取采用 CTAB 法进行 (见《现代植物生理学实验指南》, 科学出版社, 1999 年)。最后将沉淀 DNA 溶于 50 μL TE 中, -20°C 保存备用。

1.2.5 DNA 中 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 百分含量测定

样品水解: 取上述 DNA 样品 20 μL , 加入 20 μL 0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl, 在 80°C 水浴上水解 2 h, 再加入 10 μL 0.4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 中和水解液, 离心取上清液备用。

5-甲基胞嘧啶含量测定: 采用高效液相色谱法进行 5-甲基胞嘧啶百分含量的测定。色谱柱为 C18 键合柱 (250 mm $\times$ 16 mm), 流动相由 5% 甲醇、4.75 mmol 己烷基磺酸钠及 0.2% 三乙醇胺组成, 并用磷酸将 pH 值调为 5.5。流速为 0.7 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 273 nm, 进样量为 20 μL 。采用外标准和内标法确定胞嘧啶 (C) 和 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 的峰位。采用外标法, 通过比较样品和标样的峰面积确定胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶的含量。并根据式 $5\text{mC}/(\text{C} + 5\text{mC}) \times 100\%$ 计算 5mC 百分含量。

2 结果与分析

2.1 重金属胁迫对小麦和水稻叶内蛋白质含量的影响

图 1 和图 2 分别表示不同浓度的 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 胁迫对小麦和水稻剑叶中可溶性蛋白含量的影响。从图中可看出: 随 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 浓度的增高小麦和水稻剑叶中可溶性蛋白含量逐步下降, 尤其在较低离子浓度范围内, 小麦和水稻叶中的蛋白质含量随 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 浓度的提高而迅速降低。重金属胁迫引起的小麦和水稻叶内蛋白质含量的降低, 可能源于其对基因表达的抑制, 进而抑制蛋白质合成。一方面可能由于重金属胁迫导致 DNA 的损伤, 另一方面可

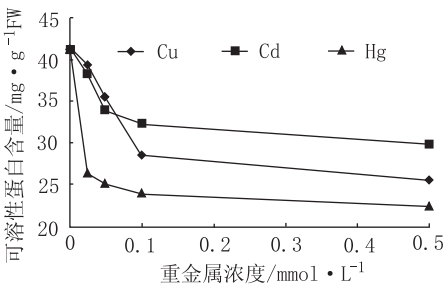


图 1 重金属胁迫对小麦叶片蛋白质含量的影响

Figure1 Effect on the content of protein extracted from leaf of wheat treated by heavy metal stress

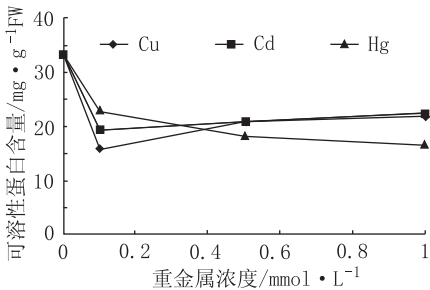


图 2 重金属胁迫对水稻叶片蛋白质含量的影响

Figure 2 Effect on the content of protein extracted from leaf of rice treated by heavy metal stress

能由于基因表达的调控受到重金属胁迫的影响。由于 DNA 甲基化修饰是调节基因活力的主要方式之一，因此，下文主要探讨不同浓度的 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 胁迫对小麦和水稻不同器官 DNA 中甲基化水平的影响。

2.2 重金属胁迫对小麦和水稻叶片 DNA 中 5 - 甲基胞嘧啶含量的影响

表 1 和表 2 分别为不同浓度的 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 胁迫对扬麦 10 号(小麦)和扬稻 6 号、武育梗 9516(水稻)叶内 DNA 中 5mC 含量的影响。从表中 5mC 的百分含量可以看出：(1) 正常情况下(对照中)，小麦剑叶 DNA 中的 5mC 百分含量为 22.4，高于水稻剑叶 DNA 中的 5mC 百分含量(平均为 18.3)。这和 Ramon Messegaur 等 (1997) 测得的小麦和水稻成熟叶 DNA 中 5mC 百分含量分别为 22.4 和 18.6 的结果基本一致^[1]。(2) 随 Cu^{2+} 胁迫浓度的增大，小麦和水稻叶内 DNA 中 5mC 的百分含量均呈现先迅速上升再逐步下降的规律。当 Cu^{2+} 胁迫浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，3 个供试品种叶内 DNA 中 5mC 百分含量达最高，分别是对照的 1.463 倍(扬麦 10 号)、1.286 倍(扬稻 6 号)、1.396 倍 (武育梗 9516)。当 Cu^{2+} 胁迫浓度 > 0.1

表 1 重金属胁迫对小麦叶 DNA 中 5mC 百分含量 [% 5mC/(C + 5mC)] 的影响

Table 1 Effect of heavy metal stress on 5mC content of DNA in leaf of wheat

重金属种类	重金属浓度 /mmol · L ⁻¹						
	0	0.05	0.1	0.3	0.5	1.0	2.0
Cu 处理	22.40	31.52	32.77	29.50	30.76	30.79	23.75
Cd 处理	22.40	28.34	30.17	32.26	34.57	31.53	27.30
Hg 处理	22.40	29.72	30.18	31.44	33.70	36.27	30.89

表 2 重金属胁迫对扬稻 6 号(籼稻) 和 9516(粳稻)叶片 DNA 中 5mC 百分含量 [% 5mC/(C + 5mC)] 的影响

Table 2 Effect of heavy metal stress on 5mC content of DNA in leaf of Yang - Dao NO. 6 and 9516 (rice)

水稻品种及重金属种类		重金属浓度 (/mmol · L ⁻¹)					
		0	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0
扬稻 6 号	Cu	18.32	21.95	23.21	23.56	21.81	—
	Cd	18.32	20.60	22.13	22.91	24.81	30.91
	Hg	18.32	23.91	24.92	27.90	28.18	31.75
武育梗 9516	Cu	18.23	22.64	23.68	25.44	18.34	—
	Cd	18.23	17.96	18.91	21.35	24.89	26.51
	Hg	18.23	22.64	24.10	27.28	—	33.06

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，3 个品种叶内 DNA 中 5mC 百分含量开始下降，但即使 Cu^{2+} 浓度达最高浓度 (水稻： $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，小麦： $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)，DNA 中 5mC 百分含量仍略高于对照。(3) 对于 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 胁迫而言，在 $0-1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度范围内，随两者浓度的增大，不论是小麦还是水稻，3 个供试品种叶片 DNA 中的 5mC 百分含量持续升高。当 Cd^{2+} 浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，扬麦 10 号、扬稻 6 号和武育梗 9516 叶片 DNA 中 5mC 百分含量分别为对照的 1.545、1.687 和 1.454 倍；当 Hg^{2+} 浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，扬麦 10 号、扬稻 6 号和武育梗 9516 叶片 DNA 中 5mC 百分含量分别为对照的 1.619、1.733 和 1.813 倍；即使当 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 浓度达 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，小麦(扬麦 10 号)叶片 DNA 中 5mC 分含量仍显著高于对照，分别为对照小麦叶片的 1.219 倍(Cd^{2+} 胁迫)和 1.379 倍(Hg^{2+} 胁迫)。

由此可知，重金属 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 胁迫能导致小麦和水稻叶片 DNA 中胞嘧啶高甲基化。重金属胁迫对小麦和水稻叶片 DNA 中胞嘧啶甲基化水平的影响程度主要与重金属离子种类及浓度有关，较低浓度的 Cu^{2+} 能使小麦和水稻叶片 DNA 中 5mC 含量迅速增大，而 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 胁迫使小麦和水稻叶片 DNA 的 5mC 含量持续增高，直至 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 浓度达 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时才达最大值。

2.3 重金属胁迫对小麦幼穗和根系 DNA 中 5 - 甲基胞嘧啶含量的影响

表 3 列出了不同浓度的 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 胁迫对扬麦 10 号幼穗和根系 DNA 中 5mC 含量的影响动态。从表中可看出: (1) 和对照相比较, 0. 1、0. 5、1. 0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 胁迫均能促使小麦幼穗 DNA 中 5mC 百分含量显著增大, 且随 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 浓度的增大幼穗 DNA 中 5mC 的百分含量逐步升高。表明重金属 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 胁迫亦能明显引起小麦幼穗 DNA 高甲基化。(2) 本试验测得对照小麦根系 DNA 中 5mC 的百分含量为 25. 82, 显著高于地上部叶和穗, 也高于其它学者所报道的数值。这可能由于小麦根系长期被置于培养液中培养, 很大程度上改变了小麦根系生长发育的环境条件, 导致对照根系 DNA 中的 5mC 含量增高。(3) 较低浓度 (0. 1、0. 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 胁迫促使小麦根系 DNA 中的 5mC 含量显著高于对照; 而较高浓度 (1. 0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 胁迫促使小麦根系 DNA 中的 5mC 含量显著低于对照。这表明较低浓度的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 胁迫也能明显促使小麦根系 DNA 高甲基化。而较高浓度的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 胁迫则对小麦根系 DNA 的甲基化修饰有显著的抑制作用, 即造成根系 DNA 低甲基化。(4) 0. 1、0. 5 和 1. 0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Hg^{2+} 胁迫均使小麦根系 DNA 中 5mC 的百分含量显著低于对照, 并且 Hg^{2+} 胁迫浓度越高根系 DNA 中 5mC 的百分含量越低。这表明 Hg^{2+} 胁迫对小麦根系 DNA 的甲基化修饰有明显的抑制作用, 引起根系 DNA 的低甲基化, 并且随 Hg^{2+} 胁迫浓度的增高抑制程度增强。

表 3 重金属胁迫对小麦幼穗和根系 DNA 中 5mC 百分含量 [% 5mC / (C + 5mC)] 的影响

水稻品种及重金属种类		重金属浓度 (/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)			
		0	0. 1	0. 5	1. 0
幼穗	Cu	18. 01	20. 36	23. 32	27. 18
	Cd	18. 01	28. 60	26. 18	31. 73
	Hg	18. 01	23. 21	25. 52	27. 05
根系	Cu	25. 82	37. 10	34. 12	20. 11
	Cd	25. 82	34. 36	32. 04	20. 94
	Hg	25. 82	21. 40	18. 21	13. 13

3 讨论

综上所述, 重金属 (Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+}) 胁迫能明显

改变作物各器官 DNA 中胞嘧啶的甲基化模式和水平。各浓度的 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 胁迫均能明显促使作物地上部叶和穗 DNA 中胞嘧啶的高甲基化。较低浓度的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 胁迫也会促使小麦根系 DNA 中胞嘧啶的高甲基化, 但所有浓度的 Hg^{2+} 胁迫以及较高浓度的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 胁迫则导致小麦根系 DNA 低甲基化。

重金属胁迫对作物各器官 DNA 中胞嘧啶甲基化水平的影响程度可能主要取决于重金属的种类和浓度。就重金属种类而言, Hg^{2+} 对作物地上部叶片 DNA 中胞嘧啶甲基化的促进作用最大, Cd^{2+} 次之, Cu^{2+} 最小。而对地下部根系 DNA 中胞嘧啶甲基化的抑制作用也以 Hg^{2+} 最强。就重金属浓度而言, 对作物 DNA 甲基化的影响可能主要取决于进入细胞内的重金属浓度。当进入细胞内的重金属浓度较低时, 可能会对相应细胞 DNA 中胞嘧啶的甲基化起促进作用, 相反, 当进入细胞内的重金属浓度较高时, 可能会对相应细胞 DNA 中胞嘧啶的甲基化起抑制作用。细胞内的重金属浓度除取决于培养液中的重金属胁迫浓度外, 还与重金属种类和细胞所在器官有关。根系由于直接被置于含重金属的培养液中, 根细胞内必定含有较地上部器官细胞内高的重金属浓度, 这就导致了当培养液中 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 浓度为 1. 0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及 Hg^{2+} 浓度 $\geq 0. 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 小麦根系 DNA 中的胞嘧啶甲基化受到抑制。此外由于细胞膜对 Cu^{2+} 的透性以及 Cu^{2+} 在作物体内的移动性明显高于 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} , 故当 Cu^{2+} 胁迫浓度 $> 0. 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 作物叶细胞内就可能含有较 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 高得多的 Cu^{2+} 浓度, 这可能造成了随培养液中 Cu^{2+} 胁迫浓度的进一步上升作物叶片 DNA 中胞嘧啶甲基化水平开始逐步下降的现象。

Finnegan E J, Kovac K A (2000) 认为植物体内甲基化模式的建立和维持需要三类酶的参与。一类是维持 DNA 甲基化的 Dnmt1 甲基转移酶, 它主要是维持 DNA 甲基化的半保留复制, 但也能促使 DNA 重新甲基化。第二类是染色体 DNA 甲基转移酶, 它是植物所特有的, 这类酶优先催化异染色质 DNA 甲基化。第三类是 DNA 重新甲基化酶 (Dnmt3), 它和哺乳动物的 Dnmt3 类似, 主要催化 DNA 重新甲基化^[14]。较低浓度的重金属胁迫是否会通过某种机制激活植物 DNA 甲基转移酶, 还未见确切报道。Lee Y W 等 (1998) 以中国仓鼠作材料的研究结果表明, 重金属 Ni 能在处理后的短时间内抑制细胞内的 5 - 甲基胞嘧啶转移酶

活性,而随时间的推移其活性有所恢复,但基因组中的 5mC 含量却先于 5-甲基胞嘧啶转移酶活性的恢复而迅速提高^[8]。因此,重金属胁迫引起的作物地上部叶和穗的高甲基化,可能不是通过激活叶或穗内的 5-甲基胞嘧啶甲基转移酶来实现,而是通过其它机制所导致。首先,低浓度的重金属可能会部分或选择性地抑制细胞内的许多除胞嘧啶甲基转移酶外的其它 SAM-依赖性甲基转移酶活性,造成其它生化途径对 SAM(S-腺苷甲硫氨酸)的利用率下降,因而促使 5-甲基胞嘧啶甲基转移酶催化产生大量的 5mC。另外,Hix 和 Augusto O(1999)报道,将小牛胸腺 DNA 和叔丁基过氧化物及 Fe^{3+} 一起温育,发现有高产额的甲基自由基和 DNA 高度甲基化的发生,并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^[9]。按照此观点,重金属胁迫引起作物地上部叶和穗 DNA 中胞嘧啶的高甲基化还可能由于甲基自由基的产生所致。

这种重金属胁迫引起的作物地上部叶和穗 DNA 中胞嘧啶的高甲基化肯定会造成相当数量的处于基因启动子或编码区的胞嘧啶被甲基化,导致 DNA 高甲基化。从而造成相应基因活力下降,细胞内蛋白质合成速率下降。但当细胞内金属离子浓度进一步增高时,DNA 甲基转移酶的活性开始受到抑制,从而导致 DNA 中胞嘧啶甲基化水平开始逐步下降。尤其当根系中的金属离子浓度很高时,维持 DNA 甲基化的甲基转移酶活性受到明显的抑制,就不能维持 DNA 甲基化的半保留复制,从而造成根系 DNA 中胞嘧啶甲基化水平明显低于对照,即导致 DNA 低甲基化。其后果会造成大量根系中的 DNA 断裂,干扰细胞分裂过程中染色体凝聚,严重影响细胞的分裂。

总之,重金属胁迫不仅能造成 DNA 的损伤,而且

能引起甲基化模式的改变,进而造成基因调控的紊乱,导致作物的生长发育受到严重影响。因此进一步研究环境条件对作物 DNA 甲基化模式的影响必定有着重要的理论和实践意义。

参考文献:

- [1] Ramon Messegaur, Martin W Ganal, John C Steffens, et al. Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA[J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, 16: 753-770.
- [2] Finnegan E J, Genger R K, Peacock W J, et al. DNA methylation in plants[J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 223-247.
- [3] Zluvova J, Janousek B, Vyskot B. Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development[J]. *J Exp Bot*, 2001, 52(365): 2 265-2 263.
- [4] Goelz S E, Vogestein B. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasia[J]. *Science*, 1995, 228: 187-291.
- [5] Marsha C B, Jennifer R F, Rence C H. DNA strand breakage in freshwater Mussels (*Anodonta Grandis*) exposed to lead in the laboratory and field[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996, 15(5): 802-808.
- [6] Wedrychowski A, Schmidt WN, Hnilica LS. The in vivo cross-linking of proteins and DNA by heavy metal[J]. *J Biol Chem*, 1986, 261(7): 3 370-3 376.
- [7] Fruhauf S, Zeller WJ. New platinum, titanium, and ruthenium complexes with different patterns of DNA damage in rat ovarian tumor cells[J]. *Cancer Res*, 1991, 51(11): 2 943-2 948.
- [8] Lee YW, Broday L, Costa M. Effects of nickel on DNA methyltransferase activity and genomic DNA methylation levels[J]. *Mutat Res*, 1998, 31: 213-218.
- [9] Hix S, Augusto O. DNA methylation by tert-butyl hydroperoxide-iron(II): a role for the transition metal ion in production of DNA base adducts[J]. *Chen Biol Interact*, 1999, 118(2): 141-149.
- [10] Eric J Ridhards. DNA methylation and plant development[J]. *Tig August*, 1997, 13(8): 319-323.
- [11] Morel JB, Mourrain P, Beclin C, et al. DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional silencing in *Arabidopsis*[J]. *Curr Biol*, 2000, 10(24): 1 591-1 594.
- [12] Paszkowski J, Whitham SA. Gene silencing and DNA methylation[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(2): 123-129.
- [13] Martienssen RA, Colot V. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi[J]. *Science*, 2001, 1 070-1 074.
- [14] Finnegan EJ, Kovac KA. Plant DNA methyltransferases[J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 43(2): 189-201.
- [15] Ashikawa I. Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars[J]. *Plant Mol Biol*, 2001, 45(1): 31-39.

欢迎订阅《农业环境与发展》2000 年增刊

——无公害农产品生产、开发与管理专辑

农产品的环境安全问题越来越受到人们的关注,为了总结我国无公害农产品的生产、开发与管理经验,促进全国无公害农产品事业的发展,中国农业生态环境保护协会于 2000 年 11 月编辑出版了《农业环境与发展》增刊——无公害农产品生产、开发与管理专辑。该书收录了全国各地无公害农产品的开发与管理经验、生产技术与评价;部分省、自治区、市已颁布的无公害农产品(蔬菜)管理办法;无公害农产品及生产资料企业名录。本书的出版将为我国无公害农产品的生产技术人员、管理工作者提供有益的参考。全书 20 万字,每册 12 元。欢迎业内外人士积极订阅。

汇款地址:天津市南开区复康路 31 号 《农业环境与发展》编辑部 邮编:300191

联系人:潘淑君 胡梅 电话:022-23674336 传真:022-23367139 E-mail: caed@public.tpt.tj.cn