

VHZ 对玉米分生组织毒害的细胞及生化分析

赵建叶, 彭永康

(天津师范大学 化学与生命科学学院, 细胞遗传与分子调控天津市重点实验室, 天津 300387)

摘要:研究了微管解聚型三唑类化合物 VHZ 对玉米分生组织的影响, 从细胞学及生物化学水平分析了 VHZ 的毒害机理。结果表明, VHZ 能够诱导玉米根尖分生组织细胞前期、中期的同步化以及染色体变异(染色体桥、染色体滞后、染色体凝集)。临界浓度和时间分别为 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 12 h。免疫荧光标记检测表明, 同步化细胞的形成以及染色体结构变异与纺锤丝的功能受到抑制有关。2D/ SDS-PAGE 检测发现, 经 VHZ 处理后玉米根尖蛋白有两种组分消失, 四种蛋白质组分含量有不同程度的降低, 这些蛋白质组分可能对 VHZ 的防御机制有重要作用。

关键词: VHZ; 毒害作用; 细胞分裂; 微管; 蛋白质组分

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 7091(2009)04 - 0235 - 04

Cytological Observation and Biochemical Analysis of Maize Root Meristem Subjected to the VHZ Stress

ZHAO Jian-ye, PENG Yong-kang

(Tianjin Key Lab of Cytogenetical and Molecular Regulation, College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract: Studied the VHZ's toxic effect to maize meristem in cell and biochemistry level. VHZ is a microtubules depolymerization triazole compound. Experiment results revealed that prophase, metaphase synchronization division cells, chromosome structure variation (chromosome bridge, chromosome sluggish, chromosome condensation) could be induced by VHZ in root meristem of maize. The threshold concentration and time were 20 $\mu\text{mol/L}$ for 12 h. Synchronization division cells and chromosome structure variation were thought to be directly related to the disturbance of spindle function by the immunofluorescence test. Two protein species were disappeared and the content of four protein species were reduced in root meristem by 2D SDS-PAGE analysis. They could play an essential role in cell defence mechanisms against VHZ.

Key words: VHZ; Toxic effect; Cell division; Microtubule; Protein composition

随着除草剂使用的大面积推广, 杂草抗药性问题越来越明显, 突出表现是抗性形成速度加快, 范围更广。早期应用的除草剂品种从开始应用到杂草产生抗性约需 10 年以上, 而最近仅用 4~5 年便产生抗药性。另一个重要表现是多抗性与交互抗性增多^[1]。因此, 研制高效、低毒、残留时间短的新型除草剂, 对保证除草效果促进农业的稳产、高产意义重大。

VHZ 是一类三唑化合物, 初步检测表明, 它具有较强的抑制植物生长、发育等毒害作用, 有望成为一种新的除草剂。本研究以玉米分生组织细胞为材料, 从细胞和生物化学角度, 对 VHZ 的毒害机理、临

界浓度等进行了探讨, 为尽快应用于农业生产提供基础性资料。

1 材料和方法

1.1 供试材料及培养处理

玉米 (*Zeamays ceratyna* kulesn.) 垦粘一号种子在室温下浸泡过夜, 萌动后置于铺有滤纸的培养皿中培养, 根据临界浓度试验结果将萌芽后的种子移入含有 20 $\mu\text{mol/L}$ VHZ 的培养皿内, (23 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 下分别培养 4, 8, 12, 16, 20, 24 h, 取分生组织进行细胞学和生化分析, 以蒸馏水培养的材料为空白对照。

收稿日期: 2009 - 03 - 17

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (02010)

作者简介: 赵建叶 (1987 -), 女, 山东人, 在读硕士, 主要从事细胞生物学研究。

通讯作者: 彭永康 (1950 -), 男, 浙江绍兴人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事植物分子生物学研究。

1.2 分生组织中期分裂细胞染色体结构变异分析

取玉米根尖分生组织,切下后以蒸馏水彻底冲洗,于 1 mol/L 的 HCl 中 37℃ 解离 6 min,洗净后浸入浓度为 0.025 g/mL 的纤维素酶(Cellulase R-10)和果胶酶(Pectolase Y-23)的混合液(二者比例为 1:1),23℃ 下酶解 30 min,洗净后用卡宝品红染色,常规压片。观察分生组织细胞染色体结构变异,并统计结果。

1.3 根尖分生组织染色体结构变异细胞免疫荧光定位分析

玉米根尖细胞的制备参考 Susaa 等^[2]的方法,某些步骤做了改动^[3,4]。将培养好的新鲜玉米根尖洗净,置于 0.04 g/mL 的多聚甲醛溶液中固定 30 min,洗净后置于酶液中 37℃ 酶解。酶解液组成为:0.012 5 g/mL 纤维素酶,0.012 5 g/mL 果胶酶,0.1 g/mL 甘露醇。在酶解过程中随时镜检,直到有大量的球形原生质体产生时停止酶解。此过程需要 40~90 min。将解离过的根尖洗净后进行普通生物学压片、揭片、风干,备用。

细胞核及微管骨架的标记参考 Susaa^[2],Yemets 等^[5]的方法:将风干的玉米根尖细胞用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 10 min。滤纸吸干后,用 0.5% 的 Triton X-100 通透 30 min,PBS 缓冲液洗涤 3 次,滤纸吸干后用 2% 的 BSA(PBS 配制)封闭 30 min,然后用微管蛋白的一抗(Monoclonal Anti- α -Tubulin,稀释度 1/700),在室温下孵育 2 h,以 PBS 缓冲液洗涤 3 次,然后用荧光标记的二抗羊抗鼠(Anti-Mouse IgG,稀释浓度 1/700),37℃ 孵育 1 h,PBS 缓冲液洗涤 3 次,用稀释度为 1/1 000 的 DAPI 进行细胞核染色 10 min,然后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,最后用 50% 甘油封片,在 Nikon ECLIPSE 80i 荧光显微镜下观察。

1.4 蛋白质双向电泳

蛋白质 2D/SDS-PAGE 测定参照 O Farrell^[6]的方法:第一向等电聚焦凝胶浓度为 0.03 g/mL (9 mol/L 尿素,2% Np40,两性离子(pH 5~7,pH 3~10,2:1)、四甲基乙二胺、10%过硫酸铵),将凝胶灌入凝胶管(120 mm×3 mm),预聚焦(200 V,15 min;300 V,30 min;400 V,90 min),预电泳结束后,每管加蛋白质样品 65 μ L,500 V 下等电聚焦 14 h,等电聚焦结束后,将样品胶放入平衡液(6 mmol/L Tris-HCl,pH 6.8,2% SDS,5% β -巯基乙醇,10%甘油)中平衡 20 min。第二向 SDS-PAGE 根据 Laemmli^[7]的方法,分离胶的浓度为 0.12 g/mL,浓缩胶的浓度为 0.05 g/mL,采用 Wary^[8]介绍的银氨染色法,以 GS800 凝胶成像分析仪扫描记录试验结果。

2 结果与分析

2.1 细胞同步化分裂

表 1 是在 20 μ mol/L VHZ 浓度下,经过 4~24 h 处理后所得到的根尖分生组织细胞有丝分裂结果,表明 VHZ 有明显的促进细胞分裂的效果。其中,前期最为明显,对中期细胞也有明显的促进分裂的效果,但处于分裂中期的细胞大量累积可能是因为有高频率的前期细胞进入到中期的结果。在试验中,处于分裂后-末期细胞数量很少,除后-末期分裂过程的时间相对较短,较难观察到以外,也可能因为有大量的中期细胞受 VHZ 的药物处理后,干扰了细胞的正常分裂过程,因而没有能够进入后-末期。

表 1 VHZ 诱导前期和中期细胞的同步化分裂

Tab. 1 Frequencies of cell synchrony mitotic of prophase and metaphases in root meristems treated with 20 μ mol/L for 4-24 h

处理时间/h	0	4	8	12	16	20	24
前期 Prophases	28	125	150	324	146	143	160
中期 Metaphases	19	46	57	113	75	37	55
后末期 Ana-telophases	6	7	4	3	2	1	2

2.2 中期细胞染色体结构变异

为了进一步研究后-末期细胞减少的原因,我们对 VHZ 处理 12 h 后出现的中期分裂细胞染色体形态结构进行了观察,发现在中期分裂细胞中,有部分细胞已产生了典型的结构变异,其中染色体桥、滞后染色体和中期凝集染色体三种畸变类型最为常见(图 1)。

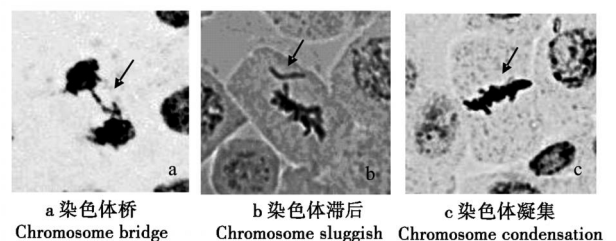


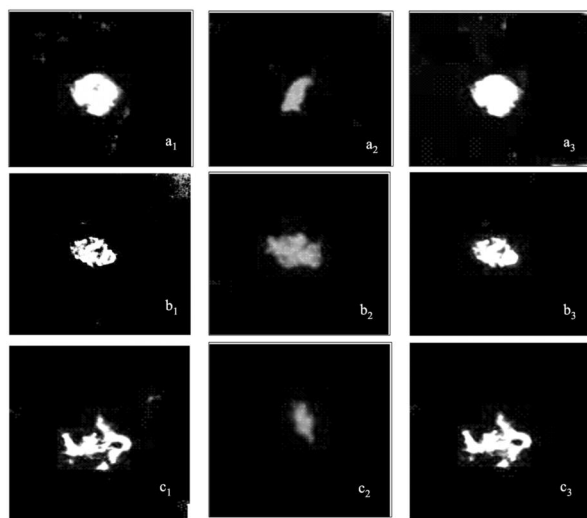
图 1 20 μ mol/L VHZ 处理 12 h 后根尖分生组织细胞染色体结构变异(500 \times)

Fig. 1 The chromosomes structure variation in root meristems treated with 20 μ mol/L VHZ for 12 h

2.3 免疫荧光定位

在用磷酸胺除草剂甲酰胺草磷(APM)处理作物时,根尖分生组织中也有中期分裂细胞的累积与中期染色体的结构变异出现^[9,10]。已知,APM 的作用机理是干扰中期分裂细胞中纺锤丝的形成,使中期细胞不能正常进入后-末期,造成中期分裂细胞的积累,部分中期细胞由于纺锤丝被破坏,因而造成多极分裂、桥和断片等现象。本试验中,VHZ 处理后,

也观察到前期、中期同步化细胞的大量积累和染色体的结构变异。为研究 VHZ 的作用机理,我们利用微管蛋白免疫印迹方法,对中期分裂细胞中的纺锤丝的变化进行了荧光定位分析。



a. 对照;b,c. 处理。

a. Control;b,c. Treatment.

图 2 VHZ 对中期细胞纺锤丝形成的影响(500 ×)

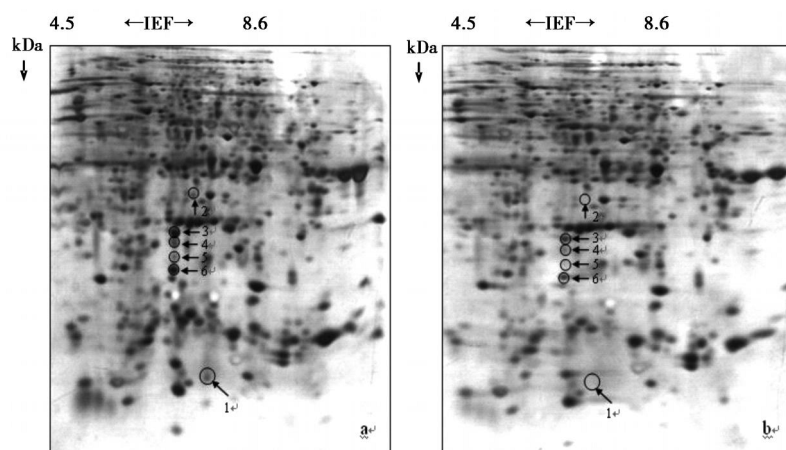
Fig.2 The effects of VHZ on spindle formation in metaphase cells

图 2 为 20 $\mu\text{mol/L}$ VHZ 处理 12 h 后玉米根尖分裂细胞中微管的免疫荧光照片。可以看出,常细胞运行至中期时,纺锤丝牵拉着染色体的着丝粒,排列

在赤道板上(图 2-a 所示)。经 VHZ 处理后,出现了两种异常情况,有些中期细胞的染色体虽然已经缩短变粗,形成中期染色体,但是却散乱的分布于细胞核中,免疫荧光标记后可观察到微管被分解成明显的颗粒状,没有组装成有功能的纺锤丝(图 2-b 所示);另一种异常情况为图 2-c 所示,分裂细胞运行至中期时,染色体被牵拉至赤道板上,但此时纺锤丝不是有规律的牵引染色体向两极运动,而是向四周牵引,造成细胞分裂不能进入后-末期。从这一结果可以看出,VHZ 处理后,造成中期细胞的累积和染色体结构变异,都是由于纺锤丝的正常功能受到抑制。因此,VHZ 主要作用于微管的解聚不能形成纺锤丝方面。

2.4 蛋白质 2D/ SDS- PAGE 分析

为了进一步从生物化学水平探讨 VHZ 的作用机理,我们对根尖分生组织的蛋白质做了双向电泳分析。图 3 是玉米根尖经 20 $\mu\text{mol/L}$ VHZ 处理 12 h 时检测到的蛋白质 2D/ SDS- PAGE 的结果,约有 200 种蛋白质组分存在,其中含量较丰富的蛋白质组分有 20 余种,有较为广泛的分子质量范围。与对照(图 3-a)相比较,经 VHZ 处理的玉米根尖中有两种蛋白质组分消失(斑点 1、2),还有一些蛋白质组分的含量在不同程度上有所减少,表现为着色变浅,如斑点 3、4、5、6。



a. 对照;b. 处理。

a. Control;b. Treatment

图 3 玉米根尖经 20 $\mu\text{mol/L}$ VHZ 处理 12 h 后蛋白质变化

Fig. 3 The changes in protein compositions of root meristem treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ VHZ for 12 h

3 讨论

VHZ 是由天津师范大学化生学院合成的一种三唑类化合物,目的是为农业上研制出效果理想、对农作物毒害作用小、对农业环境污染少的新型除草剂,以替代杂草产生抗性的除草剂。为此,从细胞与

生化水平对 VHZ 的作用机理及造成农作物毒害作用的临界浓度进行了比较分析。利用不同的浓度和不同处理时间所得结果表明,20 $\mu\text{mol/L}$ 是 VHZ 对玉米根尖分生组织造成毒害作用的临界浓度,其中在该浓度下的 12 h 处理时间,可明显看到有大量的前期和中期细胞的累积。在中期分裂细胞中,可以

明显看到染色体的结构变异(染色体桥、滞后染色体、凝集染色体)。当用微管蛋白免疫印迹标记时,可以明显看到,中期染色体的累积,是由于纺锤丝的正常功能受到抑制,纺锤丝不能将中期细胞中的染色体牵引到两极,完成中期细胞进入后-末期细胞的时相转换。而染色体的结构变异也同样表明是由于纺锤体的功能受抑引起的,纺锤丝杂乱的向四周运动,造成染色体无规则的运动,因而引起染色体桥、滞后和凝集现象。从这些初步的试验结果看,VHZ与磷酸胺除草剂甲酰胺草磷相类似,是一种微管蛋白解聚型三唑类化合物,有可能成为一种新的除草剂,其施用浓度不应超过 20 $\mu\text{mol/L}$ 。这是初步的毒理检测结果,而且是仅从玉米一种作物中得到的试验数据,但对于 VHZ 的进一步开发利用具有一定价值。

本试验中,生化分析结果表明,玉米根尖分生组织细胞中,VHZ 可引起蛋白质组分的变化,如表达量的增减和个别蛋白质组分的缺失,但由于我们没有对这些变化的蛋白质进行质谱分析,难以确定其归属,对于它们确切的功能较难讨论,因此,有待深入研究分析。

参考文献:

- [1] 许晓路,申秀英.谈除草剂的科学合理使用[J].农业环境保护,1995,14(4):187-189.
- [2] Susan M,Robert W. Immunofluorescence microscopy of organized microtubule arrays in structurally stabilized meristematic plant cells[J]. Cell Biol,1981,89:685-690.
- [3] 党磊,王冬梅,刘娟,等.小麦叶片原生质体微管骨架的免疫荧光标记及其影响因素[J].河北农业大学学报,2002,25(3):23-27.
- [4] 程罗根,施新,彭永康.除草剂 APM 对洋葱细胞分裂和微管功能的影响[J].华北农学报,2002,17(2):112-115.
- [5] Alla Yemets, Yaroslav B. Effects of the herbicide isopropyl-N-phenyl carbamate on microtubules and MTOCs in lines of *Nicotiana sylvestris* resistant and sensitive to its action[J]. Cell Biology International,2008,32(6):623-629.
- [6] O Farrell P H. High resolution of two-dimensional electrophoresis of protein[J]. J Biochem,1975,250:4007-4021.
- [7] Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4[J]. Nature(London),1970,227:680-685.
- [8] Wary W,Boulikas T,Wary V P. Silver staining of protein in polyacrylamide gels[J]. Annal Biochem,1981,118:198-203.
- [9] Yong-kang Peng,Zhen-ying Wang,Luo-gen Cheng, et al. Effect of phosphoric amide herbicide APM on the structure and protein composition of chromosome in *Triticum durum* [J]. Plant production Science,2003,6(2):107-111.
- [10] Zhen-ying Wang,Ling-zhi Zou,Bao-li Fan, et al. Abnormal metaphase cell division induced by microtubules depolymerization and photosystem inhibiting herbicides[J]. Cytologia,2006,73(6):289-295.