

除草剂 APM 对小麦野二燕 1 号染色体结构和蛋白质组分的影响

尹凤英, 江 帆, 彭永康

(天津师范大学 化学与生命科学学院, 天津 300387)

摘要:利用农业上广泛使用的酰胺类除草剂甲基胺草磷, 在 1~4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 对野二燕 1 号小麦根尖分生组织细胞染色体结构变异及蛋白质组分变化进行了研究, 结果发现, 随着浓度升高, 染色体结构变异率呈上升趋势。在 3~4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下处理的根尖分生组织细胞中, 多极分裂细胞的出现频率为 0.08%; 染色体桥、断片和滞后染色体的出现频率为 0.434%。双向电泳分析结果表明, 约有 10 个蛋白质斑点产生变化, 2 个蛋白质斑点 (8 kDa/PI 6.5, 10 kDa/PI 7.7) 消失。染色体结构变异和蛋白质组分变化可以认为与甲基胺草磷的处理有关。

关键词:甲基胺草磷; 染色体结构变异; 双向电泳; 蛋白质组分; 小麦

中图分类号:S482.4⁺6 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)01-0032-04

The Effects of Herbicide APM on Chromosome Structure and Protein Compositions in Wheat

YIN Feng-ying, JIANG Fan, PENG Yong-kang

(Department of Biology, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract: The effect of phosphoric amide herbicide amiprophose-methyl (APM), which was used widely in agriculture, on chromosome structure and protein composition of root meristems of wheat were studied by exposure to concentrations of 1~4 $\mu\text{mol/L}$. The results indicated that, as the concentration of APM increased the frequency of chromosomal structure variation increased. Frequencies of multipolar division cells and bridges lagging chromosome were 0.08% and 0.434% respectively when root meristems were treated with 3~4 $\mu\text{mol/L}$ APM. 2D-PAGE analysis showed that about 10 new protein spots were induced and of 2 protein spots (8 kDa/PI 6.5, 10 kDa/PI 7.7) disappeared by 3~4 $\mu\text{mol/L}$ APM in the root meristem. Chromosome structure variation and protein composition changes were thought to be directly related to APM treatment.

Key words: APM; Chromosome structure; 2D-PAGE; Protein composition; Wheat

我们对磷酸胺除草剂甲基胺草磷 (APM) 诱导栽培小麦根尖分生组织细胞的异常有丝分裂做过初步分析, 从细胞学水平上证明, 栽培小麦对 APM 浓度反应的临界浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$, 在该浓度下可诱导栽培小麦分生组织细胞的“不均等分裂”和“多极分裂”现象^[1]。本研究利用野生二粒小麦与燕麦杂交所得后代野二燕 1 号小麦为材料, 从根尖分生组织染色体结构变异和蛋白质组分变化作了探讨, 作为对我们以前工作的补充, 同时也可为生产上合理、安全使

用磷酸胺类除草剂提供一些依据^[2]。

1 材料和方法

1.1 试验材料及处理

野二燕 1 号 (野生二粒小麦 \times 燕麦后代), 由贵州农业大学提供; 酰胺类除草剂甲基胺草磷购于上海普飞生物技术有限公司; 卡宝品红染料配置所需试剂药品均为国产分析纯; 双向电泳试验所用药品均为进口 BBI 原装。

收稿日期: 2007-09-20

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (02010)

作者简介: 尹凤英 (1983-), 女, 天津人, 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。

挑选饱满、健壮小麦种子,用 0.1 % HgCl_2 消毒 5 min,洗净后用蒸馏水常规浸种、催芽 24 h,待种子充分吸胀后,将材料转入铺有滤纸的培养皿,在 23 ~ 25 °C 下培养 18 ~ 24 h,再水培 3 h,然后分别加入 1 ~ 4 $\mu\text{mol/L}$ 甲基胺草磷,在 23 ~ 25 °C 下处理 1 ~ 16 h,切取根尖。

1.2 细胞学观察

切取对照根尖和各组处理后的根尖,用蒸馏水洗净,在 60 °C 下用 1 mol/L HCl 水解 6 min,洗净后浸入 2.5 % (m/V) 纤维素酶和果胶酶的混合液(纤维素酶 RS 果胶酶 Y23 = 1 : 1, 75 mmol/L KCl, 7.5 mmol/L EDTA, pH 4.0), 23 °C 下酶解 30 min,洗净根尖并用卡宝品红染色,常规制片,观察细胞染色体形态和微核的形成。计算染色体结构变异率时,只统计样本中的有丝分裂细胞^[3,4]。各组所观察的细胞样本数量至少为 1 000 个。

1.3 SDS-PAGE 双向电泳

双向电泳时参考了 O Farrell^[5]的方法,试验过程中作了一些修改。

第一向等电聚焦:凝胶浓度为 3 %,含 9 mol/L 尿素,2 % NP40 40 μL ,30 % 聚丙烯酰胺凝胶 340 μL ,pH 3 ~ 10 两性电解质 30 μL ,pH 5 ~ 7 两性电解质 60 μL ,双蒸水 1.09 mL,四甲基乙烯二胺 2 μL ,10 % 过硫酸胺 10 μL 。将制成的第一向凝胶溶液用注射器注入玻璃凝胶管(120 mm \times 3 mm),静置 5 h 后进行预聚焦(200 V 15 min 300 V 30 min 400 V 90 min),预聚焦结束后,每管加样 60 μL ,进行等电聚焦 14 ~ 16 h(400 V)。等电聚焦结束后,用注射器将胶条从凝胶管内脱出,置入平衡液(0.06 mol/L Tris-HCl

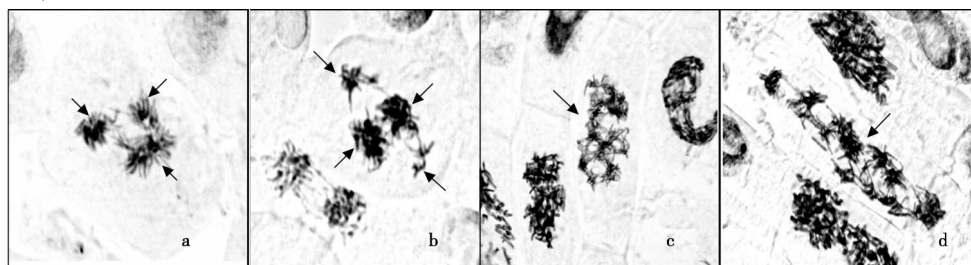
pH 6.8,5 % β -巯基乙醇、10 % 甘油、2 % SDS) 平衡 20 min。二向电泳参考 Laemmli^[6]的方法,将胶条平铺于二向胶(12.5 % 聚丙烯酰胺凝胶)上,用 1 % 琼脂糖包埋。80 V 恒压电泳 5.5 h,结束电泳后,用 0.4 % 硝酸银染液染色^[7]。

2 结果与分析

2.1 甲基胺草磷诱导小麦分生组织细胞染色体结构变异

甲基胺草磷是一种细胞分裂抑制剂^[8,9],通过作用于 α -微管蛋白而阻止微管的形成,甚至会将微管解聚。因此,甲基胺草磷实质上干扰了植物细胞中的纺锤丝行使正常功能,并且可以诱导中期分裂细胞染色体出现多种结构变异^[10,11]。在本试验中,至少有下列几种类型的结构变异被观察到。

2.1.1 多极分裂细胞 在正常细胞中,中期染色体结构沿着细胞赤道板排列,依靠纺锤丝的牵引,姐妹染色单体向两极运动,最后形成 2 个后期细胞,然而,在受到甲基胺草磷处理的中期细胞中,纺锤丝的正常功能受到影响,在这些细胞中,虽然细胞仍能够分裂,但纺锤丝不能正常地将姐妹染色单体拉向两极,而是诱导成无规则的多极分裂细胞,在我们的试验中,带有 3 极和 4 极分裂的中期细胞以很高的频率出现,甚至出现了多极分裂(图 1)。1 ~ 2 $\mu\text{mol/L}$ 甲基胺草磷处理 6 h 后,均观察不到多极分裂细胞,随着处理浓度的增加,多极分裂细胞的频率呈增大趋势,当浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ 时,3 极分裂的频率为 0.047 %,当浓度增至 4 $\mu\text{mol/L}$ 时为 0.08 % (表 1)。



a. 三极;b. 四极;c. d. 多极
a. 3-polar spindle;b. 4-polar spindle;c. d. Multi-polar spindle

图 1 3 ~ 4 $\mu\text{mol/L}$ APM 处理(16 h)后野二燕 1 号根尖分生组织细胞的多极分裂(500 \times)

Fig. 1 Multipolar division cells of root meristems with 3 - 4 $\mu\text{mol/L}$ APM(16 h) treatment in wheat Yeeryan1

2.1.2 染色体桥、滞后染色体和断片 小麦在甲基胺草磷处理后,分生组织细胞也出现了桥和滞后染色体等染色体畸变类型。表 1 是在不同浓度甲基胺草磷处理后小麦中桥和滞后染色体的统计结果,桥的形成是由于染色体断裂再融合形成双着丝粒和无着丝粒的染色体片段的结果,所以染色体桥的形成往往伴有染色体断片的出现,本试验表明,桥与滞后

染色体的出现频率与处理浓度呈正相关。

2.1.3 微核 小麦分生组织细胞中微核是极易被观察到的,尤其是多个微核出现在同一细胞中的现象较常见,并且微核的出现频率与浓度呈正相关(表 1)。研究表明,微核的形成途径有两条:一条途径是由于前一分裂周期 G_2 期后产生的染色体断片在分裂过程中不能与正常染色体协调活动,在进入

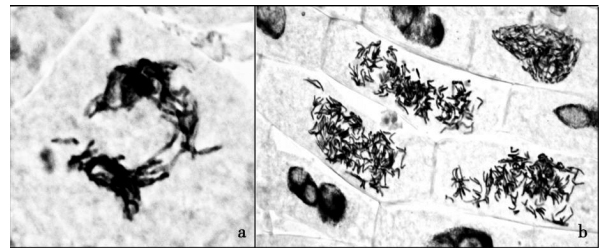
间期时,即被排斥于核外形成的;另一条途径是由于各种形式的落后染色体、未及中板集合染色体以及染色体分组造成的^[12]。因此,微核率的大小可以直接反映染色体的受损程度。微核是真核细胞 DNA 损伤的直观体现^[13],本试验结果显示,除草剂甲基

胺草磷在 3~4 μmol/L 浓度范围内有较高的微核出现。

2.1.4 成环与加倍染色体 4 μmol/L APM 处理小麦后,出现了成环和加倍染色体(图 2)。

表 1 甲基胺草磷诱导小麦分生组织染色体变异结果

甲基胺草磷浓度 / (μmol/L) Concent of APM	染色体变异得率/ %			
	多极分裂得率 Frequency of multipolar division cells	桥 Briges	滞后染色体 Lagging chromosome	微核出现频率 Frequeny of micronuclei
CK	0	0	0	0
1	0	0.17	0	0.28
2	0	0.18	0	0.28
3	0.047	0.23	0.047	2.47
4	0.080	0.33	0.060	2.61



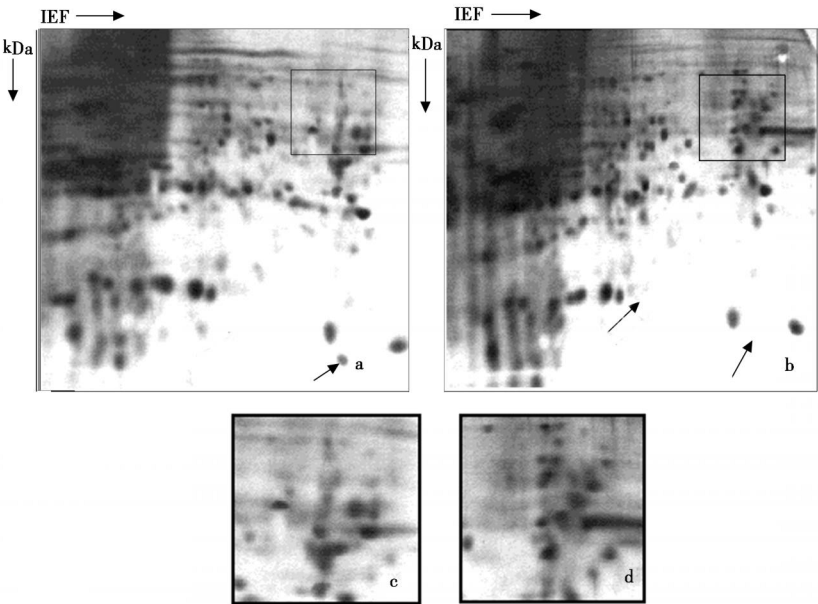
a. 成环;b. 加倍染色体
a. Chromosome ring;b. Doubling chromosome
图 2 成环与加倍染色体 (500 ×)

Fig. 2 Chromosome ring and doubling chromosome

2.2 甲基胺草磷诱导小麦分生组织细胞的蛋白质组分变化

尽管在细胞学水平上我们已经明显观察到除草剂甲基胺草磷对小麦的毒害效应,但分生组织细胞

内蛋白质的变化可以从生化水平上了解除草剂对农作物的毒理学效应,这对进一步探讨甲基胺草磷对农作物生长、发育、毒害作用的机理是非常重要的。为此,我们选择了细胞染色体结构变异最为明显的 4 μmol/L 甲基胺草磷处理小麦对分生组织蛋白质组分变化分析,结果表明:4 μmol/L 的甲基胺草磷处理后,根尖分生组织细胞中蛋白质组分有明显变化,有 2 个蛋白质组分 10 kDa/ PI 7.7 和 8 kDa/ PI 6.5 消失,在分子量区的酸性端有多个蛋白质含量明显增加,甚至有个别蛋白质斑点可能是新诱导产生的(图 3),但这一试验结果需进一步验证,然而,甲基胺草磷可诱导野二燕 1 号根尖分生组织蛋白质组分变化这一结果是客观的。



a. 对照;b. 处理;c. a 图部分放大;d. b 图部分放大
a. Control;b. Treatment;c. Amplified area of a;d. Amplified area of b

图 3 小麦根尖分生组织经甲基胺草磷处理后蛋白质组分变化

Fig. 3 Protein composition changes in root meristems with APM treatment in wheat

3 讨论

磷酰胺除草剂由于易分解,在土地中停留时间短、残留少。因此,在我国农业上已广泛被应用,这对于防止农田杂草,提高农作物产量以及促进农业生产的现代化有重要作用。虽然我们已经知道,磷酰胺类除草剂主要是通过抑制细胞中微管的形成,干扰细胞分裂过程中纺锤丝的正常功能而达到除草目的,但它是否对农作物的正常生长也会产生毒害作用,这方面的研究偏少。本研究中,我们从细胞结构和蛋白质变化两个方面对这一问题作了初步探讨,发现 $3 \sim 4 \mu\text{mol/L}$ 磷酰胺除草剂甲基胺草磷处理野二燕 1 号后,根尖分生组织细胞染色体的结构和蛋白质组分产生变化,并且,随着处理浓度的增加,细胞中染色体变异和蛋白质组分变化的频率增加,存在着明显的相关性。 $3 \sim 4 \mu\text{mol/L}$ 是小麦中甲基胺草磷使用的临界浓度。本结果为生产上合理、安全使用磷酰胺除草剂提供一定依据。

参考文献:

- [1] 彭永康,于建春,赵建,等. APM 对小麦根尖分生组织细胞异常有丝分裂的诱导[J]. 应用与环境生物学报, 1997, 3(3): 204 - 207.
- [2] 秦瑞香,于世涛,刘福胜,等. 酰胺类除草剂的研究进展[J]. 青岛科技大学学报, 2003, 24(1): 21 - 23.
- [3] Peng Yongkang, Wang Zhenying, Cheng Luogen, *et al.* Effect of phosphoric amide herbicide APM on the structure and protein composition of chromosome in *Triticum durum* [J]. Plant Prod Sci, 2003, 6(2): 134 - 138.
- [4] Holmsen J D, Hess F D. Growth inhibition and disruption of mitosis by DCPA in oat (*Avena sativa*) roots [J]. Weed Sci, 1984, 32: 732 - 738.
- [5] O 'Farrell P H. High resolution of two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. J Biochem, 1975, 250: 4007 - 4021.
- [6] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 100: 680 - 685.
- [7] Wary W, Boulikas T, Wary V P, *et al.* Silver staining of proteins in polyacrylamide gel [J]. Anal Biochem, 1981, 118: 197 - 203.
- [8] Morejohn L C, Fosket D E. Inhibition of microtubule polymerization in vitro by the phosphoricamide herbicide aniprofos-methyl [J]. Science, 1984, 224: 874 - 876.
- [9] 王振英, 郑津辉, 金慧玲, 等. 磷酰胺除草剂 APM 对大麦、黑麦 POD 和蛋白质组分的影响[J]. 西北植物学报, 2001, 21(4): 662 - 667.
- [10] 刘桂琴, 程景胜, 彭永康. 有机磷除草剂草甘磷 (GPS) 对作物细胞遗传学毒性效应的研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(2): 387 - 291.
- [11] Oettmeier W. Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II [J]. Cell Mol Life Sci, 1999, 55: 1255 - 1277.
- [12] 钱晓薇. 重铬酸钾对蚕豆根尖细胞致畸效应的研究[J]. 遗传学报, 2004, 26(3): 337 - 342.
- [13] 段昌群, 王焕校. 重金属对蚕豆的细胞遗传学毒理作用和对蚕豆根尖微核技术的探讨[J]. 植物学报, 1995, 37(1): 14 - 24.