

# 胺磺灵诱导小麦根尖染色体结构的变异

张竞秋, 李 卓

(天津师范大学 化学与生命科学学院, 天津 300387)

**摘要:** 用不同浓度的胺磺灵 (Oryzalin) 处理小麦种子, 观察小麦根尖细胞染色体结构的变异情况。结果表明, 胺磺灵的不同处理浓度及处理时间均能引起染色体的异常分裂, 在光学显微镜下检测到桥、多极染色体、环状染色体、滞后染色体、染色体加倍、染色体凝集、微核等异常现象, 以染色体加倍、微核的发生频率最高; 处理时间对染色体结构变异的影响明显高于处理浓度。

**关键词:** 小麦; 根尖; 胺磺灵; 染色体变异

**中图分类号:** S482.4<sup>+</sup>5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)02-0080-04

## Chromosomal Aberration of Wheat Root Induced by Oryzalin

ZHANG Jing - qiu, LI Zhuo

(College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

**Abstract:** In this study, the wheat root meristems were treated by different concentrations and treatment times of Oryzalin. Experiment results revealed that each concentration and treatment time could induce the cells to abnormal metaphase division. Chromosome - bridge, multipolar, rings, laggards, chromosome doubling, polymerization and micronuclei were observed. In these treatments, the rate of chromosome doubling and micronuclei were highest; The influence of treatment time inducing chromosomal aberration was more significantly than that of concentration.

**Key words:** Wheat; Root; Oryzalin; Chromosomal aberration

胺磺灵 (Oryzalin) 是一种二硝基苯胺类化合物, 作为一种除草剂已广泛应用于农业生产。近年来, 国内外学者对胺磺灵的研究主要集中在诱导多倍体方面, 韩毅科等<sup>[1]</sup>用胺磺灵成功诱导了黄瓜离体茎尖四倍体, 并用流式细胞仪进行了倍性分析试验; 黄权军等<sup>[2]</sup>用胺磺灵等 4 种抗微管物质对毛新杨 2n 花粉粒进行了研究; 目前, 用胺磺灵在不同植物染色体加倍诱导方面报道很多<sup>[3-9]</sup>, 但胺磺灵对农作物毒害作用的研究文献并不多见。本试验首次用羟基脲 (Hydroxyurea, HU) 和胺磺灵双阻断法处理小麦种子, 探讨其对根尖细胞染色体结构的影响, 为生产上合理使用胺磺灵提供一些理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料处理

将小麦种子在常温下浸泡 12 h 后播种, 加 HU 恒温 (25℃) 生长 16 h, 蒸馏水冲洗干净后加蒸馏水培养 3 h, 再分别加入 200, 300, 400, 500  $\mu\text{mol/L}$  的胺

磺灵处理 12, 24, 36, 48 h, 经不同浓度和不同时间处理后, 在 4℃ 蒸馏水中冷处理 12 h, 将根尖固定于 70% 乙醇中。

### 1.2 试验方法

将固定的根尖用蒸馏水冲洗干净, 置于 1 mol/L HCl, 60℃ 下酸解 6 min, 蒸馏水冲洗干净后放入 2.5% 纤维素酶 2.5% 果胶酶 = 1:1 的酶液中, 20~25℃ 恒温酶解 20 min, 卡宝品红染色, 压片, 镜检记录结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 胺磺灵处理后小麦根尖染色体的畸变现象

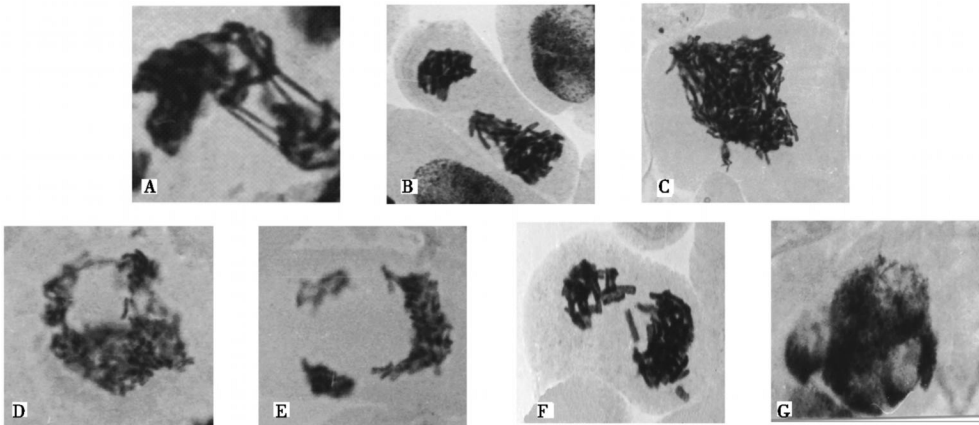
经过 HU 和胺磺灵的处理后, 每个浓度每个时间段的小麦根尖分生组织细胞的有丝分裂均受到影响, 染色体出现不同程度的畸变现象 (图 1), 除了发生频率较高的染色体加倍现象外, 还观察到桥、不均等分裂、凝集、成环、多极、滞后等染色体畸变现象, 这些都是纺锤丝不均等地将染色体拉向细胞两极而

收稿日期: 2007-10-15

基金项目: 天津市科委应用基础研究项目 (07JCYBJC08300)

作者简介: 张竞秋 (1969-), 女, 山西霍州人, 硕士, 副教授, 主要从事细胞与分子生物学研究工作。

形成的结果。另外,还观察到微核现象,说明细胞已 开始调亡。



A. Bridges; B. Unequal division; C. Chromosome condensation; D. Rings; E. Multipolar; F. Laggards; G. Micronuclei  
图1 染色体畸变现象

Fig.1 Chromosomal aberration phenomenon

2.2 不同处理对小麦根尖染色体畸变的影响

每个浓度每个时间段处理随机选取约 5 000 个细胞,统计小麦根尖分生组织细胞的畸变率,并把所统计结果用 Excel 和 SAS 统计软件进行单因子方差分析,平均值比较采用  $p = 0.05$  标准。

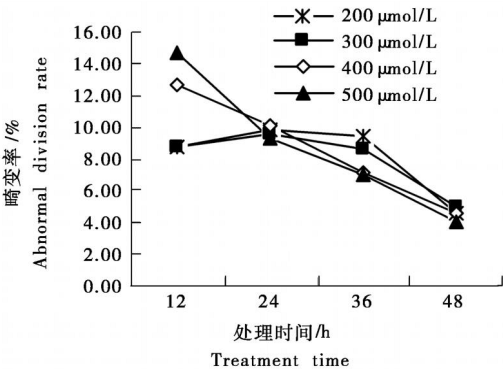


图2 胺磺灵处理对小麦根尖染色体畸变的影响

Fig.2 The influence of oryzalin on chromosome abnormal division rate from wheat root meristems

由图2可以看出,随着处理时间的延长,低浓度胺磺灵处理(200,300  $\mu\text{mol/L}$ )的根尖细胞畸变率表

现为先上升后下降的趋势,但上升过程较平缓,12 h时2种浓度引起的细胞畸变率几乎相等,畸变频率最高均出现在24 h;而高浓度胺磺灵处理(400,500  $\mu\text{mol/L}$ )的根尖细胞畸变率则一直呈下降趋势,处理12 h时2种浓度引起的细胞畸变率相差最大,之后差异缩小。诱导小麦根尖分生组织细胞最高畸变率的处理条件为500  $\mu\text{mol/L}$ ,12 h。

统计结果显示(表1),相同处理浓度不同处理时间比较,低浓度200,300  $\mu\text{mol/L}$ 处理12~36 h,染色体畸变率差异不显著,48 h处理与其他时间段间的差异显著,且变异频率明显降低;在400,500  $\mu\text{mol/L}$ 胺磺灵处理下,24~48 h处理的畸变率均低于12 h处理,且差异显著,特别是400  $\mu\text{mol/L}$ 处理,时间越长畸变率越低,差异越显著。

当处理时间相同而浓度不同时,12 h的处理,200,300  $\mu\text{mol/L}$ 的畸变率要比400,500  $\mu\text{mol/L}$ 处理低且差异显著;而处理时间为24,48 h时,各个处理浓度之间几乎没有差异。

表1 胺磺灵处理浓度和时间对染色体畸变率的影响

Tab.1 Effect of treatment concentration and time of oryzalin on chromosome abnormal division rate												
浓度/ Concentration	畸变率/ % Abnormal division rate				加倍率/ % Chromosome doubling rate				微核率/ % Micronuclei rate			
	200	300	400	500	200	300	400	500	200	300	400	500
12 h	8.74	8.74	12.59	14.60	3.54	4.19	5.35	7.05	0.65	0.45	0.54	0.47
	a(b)	a(b)	a(a)	a(a)	a(c)	a(bc)	a(b)	a(a)	c(a)	b(a)	b(a)	b(a)
24 h	9.80	9.48	10.11	9.29	5.19	5.42	6.27	6.55	0.60	0.69	0.55	0.65
	a(a)	a(a)	b(a)	b(a)	a(a)	a(a)	a(a)	a(a)	c(a)	b(a)	b(a)	b(a)
36 h	9.43	8.61	7.06	6.94	5.25	4.15	3.27	2.99	1.18	1.86	1.79	1.81
	a(a)	a(a)	c(a)	b(a)	a(a)	a(ab)	b(b)	b(b)	b(b)	a(a)	a(ab)	a(ab)
48 h	4.54	4.94	4.63	4.00	1.37	1.90	1.32	1.37	1.81	1.95	2.11	2.19
	b(a)	b(a)	d(a)	c(a)	b(a)	b(a)	c(a)	c(a)	a(a)	a(a)	a(a)	a(a)

注:括号内字母为相同时间不同浓度的比较。  
Note:The letters in each bracket are the contrast of different concentrations and the same time.

### 2.3 不同处理对小麦根尖细胞染色体加倍率的影响

在所有变异现象中,加倍染色体出现的频率最高,最高可达 7.05 % (500  $\mu\text{mol/L}$ , 12 h)。随着处理时间的延长,200,300,400  $\mu\text{mol/L}$  浓度使小麦根尖细胞染色体加倍水平呈先上升后下降的趋势,其中 200  $\mu\text{mol/L}$  处理加倍率最高出现在 36 h,而 300,400  $\mu\text{mol/L}$  处理加倍率变化一致,最高均出现在 24 h;500  $\mu\text{mol/L}$  处理导致细胞的加倍率在 12 h 达到最高之后,一直呈下降趋势(图 3)。

统计结果显示(表 1),相同浓度不同处理时间比较,加倍率的差异程度与畸变率趋势一致;相同时间不同浓度比较,加倍率的差异程度主要出现在 12 h,其他时间段不同浓度之间的差异不显著。

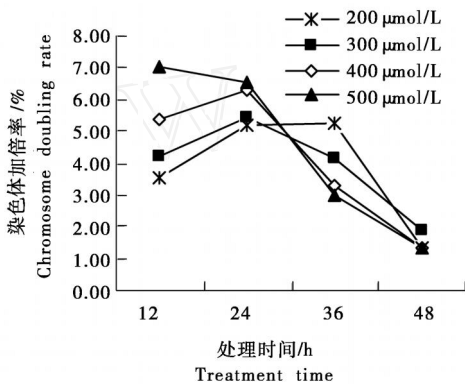


图 3 胺磺灵处理后小麦根尖细胞染色体加倍情况

Fig.3 The influence of oryzalin on chromosome doubling rate from wheat root meristems

### 2.4 不同处理对小麦根尖细胞微核率的影响

在变异的小麦根尖分生组织细胞中,明显观察到了微核现象,最高频率可达 2.19 % (500  $\mu\text{mol/L}$ , 48 h)。随着时间的延长,各个浓度处理所诱导的细胞微核率均呈上升趋势,24 h 以前上升平缓,之后则急剧上升,48 h 达到最高,且呈现浓度越高微核出现频率越高的趋势(图 4)。

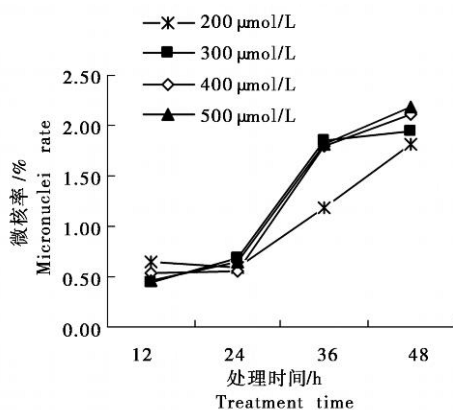


图 4 胺磺灵处理后小麦根尖细胞染色体微核发生情况

Fig.4 The influence of oryzalin on micronuclei rate from wheat root meristems

统计结果显示(表 1),对于微核的发生情况,各

个浓度下均是短时间处理比长时间处理差异显著,而在相同时间下各浓度之间的差异不显著。

### 2.5 不同处理对小麦根尖细胞染色体其他畸变现象的影响

除了加倍和微核现象以外,其他畸变现象出现频率较小,范围在 0.01 % ~ 2 %,短时间处理时可观察到,当长时间处理后,随着小麦根尖细胞有丝分裂活动减弱,畸变现象发生频率急剧降低,甚至不再出现,考虑到缺乏对比性,没有把它们单独列为考察指标。

## 3 讨论

正常细胞在进行有丝分裂过程中,中期细胞的染色体排列在赤道板上,纺锤丝附着在染色体上,通过它们的牵引,将染色体均等地拉向细胞两极,形成 2 个后期细胞。经过胺磺灵处理后,纺锤丝不能正常形成,或者纺锤丝的运动方向无规则,使染色体不能均等地分向两极,扰乱了染色体的行为,从而导致细胞分裂异常,多种畸变现象出现,小麦根尖生长受到抑制。

用 HU 对小麦种子进行前期预处理的目的是为了得到高频率、分裂一致的前期细胞。因为 HU 的作用是将细胞分裂阻止在  $G_1 - S$  期,用其对材料预处理有大量分裂细胞积累在前期,由于我们使用的 HU 浓度低、处理时间短,不足以引起细胞生理功能的损伤和染色体变异,当停止处理后细胞会恢复正常的周期运行<sup>[10]</sup>。这样,当根尖再移入不同浓度的胺磺灵处理液中可得到大量分裂一致的中期细胞,便于试验分析,因此,我们检测到的染色体变异情况可认为是胺磺灵的作用所致。

在低浓度短时间处理下,胺磺灵就能明显引起细胞发生畸变,在所有畸变现象中加倍出现的频率最高,可推测胺磺灵的主要诱导效应是使染色体加倍。随着处理浓度的增加和时间的延长,细胞出现较高频率的微核现象,微核是真核细胞 DNA 损伤的直观体现,与染色体畸变的产生有一定的相关性,可推测胺磺灵能加速细胞凋亡。

以上几个方面分析可看出,浓度和时间均是胺磺灵诱导小麦根尖分生组织染色体结构变异的影响因素,时间的影响比浓度的影响更为显著,外观上表现为根尖膨大变粗,生长延缓或停滞,时间越长,抑制生长效应越强。处理浓度高且时间短(500  $\mu\text{mol/L}$ , 12 h)时,细胞的畸变率和加倍率高,处理浓度高但时间长(500  $\mu\text{mol/L}$ , 48 h)时,微核比率高,说明胺磺灵对小麦根尖细胞具有较强的毒害作用。如

果处理时间过长,胺磺灵的积累可能破坏了纺锤丝的形成及功能发挥,干扰了染色体自身运动规律,有丝分裂受到严重影响,导致细胞不能正常进行下一个分裂周期而趋近凋亡,致使畸变率下降,微核率升高。

研究结果表明,在农业生产中要合理使用除草剂胺磺灵的浓度,特别注意使用时间的控制,以避免对农作物造成损害。

#### 参考文献:

- [1] 韩毅科,杜胜利,张桂华,等. 利用抗微管除草剂胺磺灵诱导黄瓜四倍体[J]. 华北农学报, 2006, 21(4): 27 - 30.
- [2] 黄权军,张志毅,康向阳. 四种抗微管物质诱导毛新杨 2n 花粉粒的研究[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(1): 12 - 15.
- [3] Bouvier L, Fillon F R, Leapinasse Y. Oryzalin as an efficient agent for chromosome doubling of haploid apple shoots *in vitro* [J]. Plant Breeding, 1994, 113: 343 - 346.
- [4] Hansen N J P, Andersen S B. *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture[J]. Euphytica, 1996, 88: 159 - 164.
- [5] Hansen A L, Gertz A, Joersbo M. Antimicrotubule herbicides for *in vitro* chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture[J]. Euphytica, 1998, 101: 231 - 237.
- [6] Lin ying, Whitesides J F, Rhodes B. *In vitro* generation of tetraploid watermelon with tow dinotranilines and colchicine [J]. Cucurbit Genetics Coop Rpt, 1999, 22: 43 - 46.
- [7] Lydie, Philippe, Mirsada, *et al.* Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite marks[J]. Euphytica, 2002, 123: 255 - 262.
- [8] Petersen K K, Hagberg P, Kristiasen K. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*[J]. Plant Cell, Issue and Organ Culture, 2003, 73: 137 - 146.
- [9] 谭素英, 黄秀强, 刘济伟. 提高西瓜四倍体育种及其生产利用研究[J]. 华北农学报, 1993, 8(4): 12 - 15.
- [10] 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.