

除草剂 APM 对洋葱细胞分裂和微管功能的影响

程罗根¹, 施 新², 彭永康²

(1. 南京师范大学 生命科学学院, 南京 210097; 2. 天津师范大学 生物系, 天津 300074)

摘要: 从细胞毒理学和免疫化学角度对磷酸胺除草剂 APM 对洋葱根尖细胞有丝分裂和微管功能的影响作了初步探讨, 结果表明, 经 $10 \mu\text{mol/L}$ APM 处理 16 h 后, 细胞出现多极分裂和不均等分裂现象, 免疫化学检测表明, 纺锤丝失去正常向两极辐射状排列的功能, 而是凝聚成一团, 故引起细胞的不正常分裂。

关键词: 磷酸胺除草剂; 多极分裂; 遗传毒理学; 免疫化学; 农业环境保护

中图分类号: S482.4⁺6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2002)02-0112-04

APM(Amiprophose-Methyl, 甲酰胺草磷)是一种磷酸胺类除草剂, 由于具有分解快和在土壤中残留少的特点, 因此在农业生产上广为应用。虽然在 20 世纪 90 年代早期, 磷酸胺除草剂尤其是 APM 在诱导植物染色体结构变异等方面陆续有所报道^[1~4], 但对这类除草剂的细胞、遗传毒理学研究相对滞后, 特别是对植物细胞微管功能的影响, 迄今未见系统研究报道。本研究以洋葱为材料, 对 APM 处理后根尖细胞分裂和微管功能的影响作了初步观察, 从细胞和免疫化学角度对磷酸胺除草剂的作用机理作了探讨。

1 材料和方法

1.1 供试材料及培养

将洋葱磷茎洗净后, 置室温下培养, 至长出主根(约 0.5 cm)时移入 $4 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ APM 溶液内, 分别培养 4~16 h。切取根尖分生组织(0.5 cm), 固定于 70% 乙醇中, 供分析中期细胞异常有丝分裂用。

1.2 中期细胞异常有丝分裂检测

将固定根尖用蒸馏水冲洗干净, 然后置 1 mol/L HCl , 60°C 下酸解 6 min, 用蒸馏水冲洗干净, 置 2.5% 纤维素酶 2.5% 果胶酶(1:1)混合液中酶解 30 min, 卡宝品红染色、压片、光镜下观察, 记录结果。

1.3 免疫荧光抗体法检测微管分布与解聚

实验在北京师范大学生物系王永潮先生指导下完成。将洋葱根尖分生组织用 4% 多聚甲醛固定, 用 PBS (pH 7.2~7.4) 冲洗 30 min, 2% 纤维素酶、果胶酶(购自 Sigma) 23°C 下处

收稿日期: 2001-08-07

基金项目: 教育部“高等学校骨干教师资助计划”项目资助(1999-2002)

作者简介: 程罗根(1963-), 男, 副教授, 博士, 主要从事细胞与分子生物学研究工作。施新现在天津市南开中等职业学校工作。

理 30 min 去壁，常规压片，冰冻揭片后室温下干燥。将载玻片置 1% Triton x-100 溶液中(0 ℃) 浸 30 min，进行膜处理，以利于抗体透过细胞膜。4 ℃ PBS 冲洗 10 min，将 I 抗(α 微管蛋白, 1: 400) 滴加在载玻片材料面上, 37 ℃ 下 30 min，取出载玻片，PBS 冲洗 4 次，每次 5 min，吸干 PBS 后，将 II 抗兔抗鸡抗体(1: 400) 滴加在载玻片上，封片后避光，37 ℃ 温育 45 min，荧光显微镜下镜检。

2 结果与讨论

2.1 APM 处理后洋葱根尖中的多极分裂细胞

一个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，纺锤丝附着在这些中期染色体上，然后通过纺锤丝的牵引作用，将中期染色体均等地拉向两极，形成两个后期细胞，但经 APM 处理后，洋葱根尖分生组织细胞中正常的有丝分裂受到影响，纺锤丝不能有规则的将染色体拉向两极，而是出现“多极分裂”或“不均等分裂”。图 1 是我们所观察到的由于纺锤丝功能受到影响后形成的“多极分裂”和“不均等分裂”细胞。从图上可以看到，中期染色体已失去了它们有规则的排列在中期细胞赤道板上的特性，当细胞分裂从中期进入后期时，染色体不是出现两极分离的现象，而是无规则地形成多极分离。一些细胞中，虽然中期染色体也有类似往两极分离的迹象，但出现一极染色体多，另一极少的“不均等分裂”(图 1- A)，一些细胞中则出现“四极分裂和落后染色体”现象(图 1- C)，也有观察到类似“三极分裂”的现象(图 1- B)。

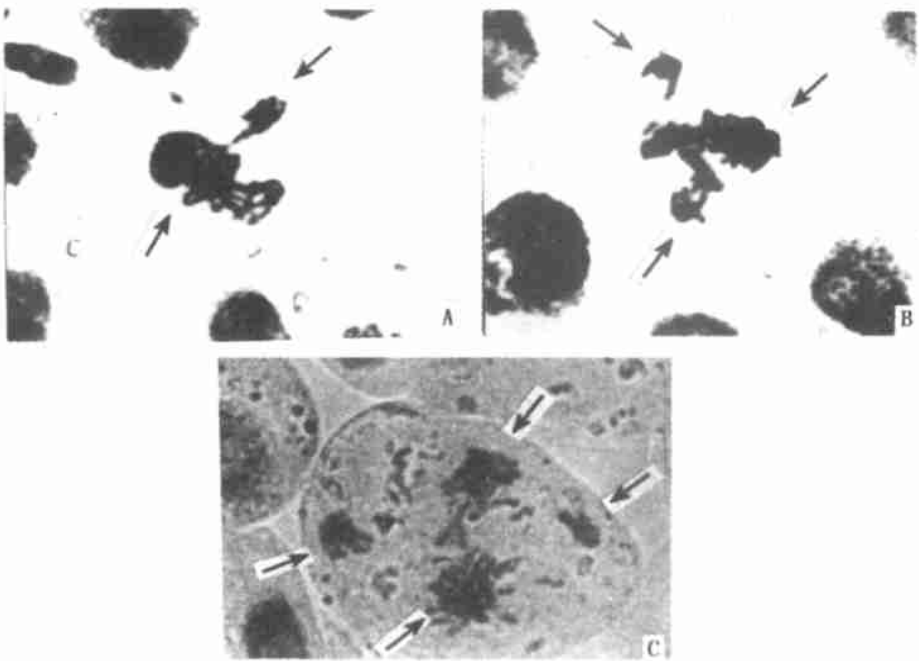


图 1 APM 处理后洋葱根尖的不均等分裂和多极分裂现象

2.2 APM 处理对中期细胞微管功能的影响

我们推测, APM 处理后引起中期细胞进入后期时呈现出的“多极分裂”和“不均等分裂”现象可能与微管的正常功能受到影响, 从而使纺锤丝不能行使正常功能有关, 早期曾有一些研究者^[5]从电镜角度对细胞经 APM 处理后对微管的影响作过一些观察, 但到目前为止, 还没有看到从免疫化学的角度对微管功能的影响作过深入研究的报道。图 2 是我们通过免疫化学方法对 APM 处理后洋葱根尖分生组织细胞的检测结果, 在正常的细胞中, 纺锤丝的分布向两极呈辐射状排列(图 2- A, 箭头所示), 但经 APM 处理后的细胞中, 纺锤丝失去了它原有的排列方式, 而是被凝聚成一团(图 2- B, 箭头所示)。由于纺锤丝不能行使正常的功能, 因此当细胞分裂进入后期时, 不是按常规向两极分裂, 而是呈多极或不均等分裂现象。APM 是一种磷酸胺除草剂, 这类除草剂目前在我国农业上被广泛使用, 但对农作物生长、发育的有害影响研究报道较少。本工作从细胞学和免疫化学两个方面作了初步分析, APM 处理后使根尖细胞形成多极和不均等分裂, 推测可能是微管蛋白的功能受到影响, 最后导致不能组装成功能正常的纺锤丝所致。为了证实这一推测, 我们用 I 抗(微管蛋白)和 II 抗(兔抗鸡)微管蛋白抗体进行免疫化学分析, 实验结果显示, 经 $10\ \mu\text{mol/L}$ APM 处理 16 h 后, 中期细胞中的纺锤丝已经失去正常的向两极呈辐射状排列的功能, 而是凝聚成一团, 证明纺锤丝的正常功能已受到严重抑制, 故引起了不正常的细胞分裂。随着农业现代化技术的提高和农业劳动力的缺乏, 除草剂在农业上的应用越来越广泛, 因此, 深入开展除草剂的细胞与遗传毒理学的研究对于安全、有效使用除草剂, 减少农业环境污染有重要的理论意义与应用价值。

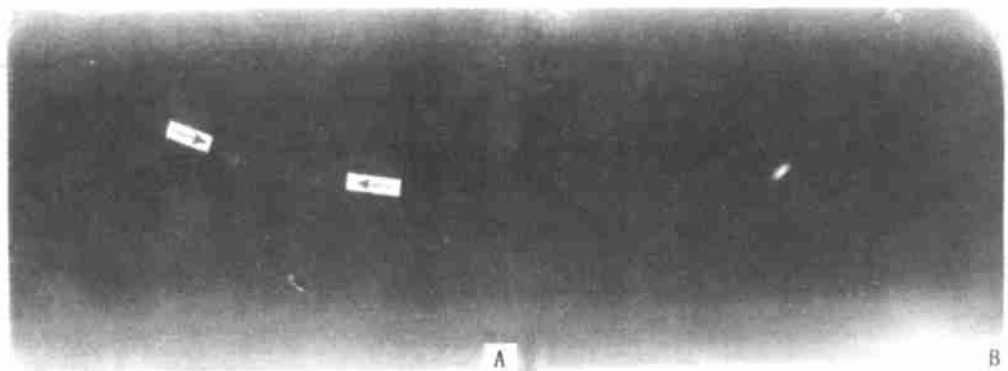


图 2 APM 处理对洋葱根尖细胞微管功能的影响

参考文献:

- [1] 陈宏, 靳阳, 赵谨, 等. 不同浓度磷酸胺除草剂胺草磷(APM)对蚕豆根尖细胞有丝分裂及一些生化性状的影响[J]. 农业环境保护, 2000, 19(5): 271-273.
- [2] 彭永康, 于建春, 赵建, 等. APM 对小麦根尖分生组织异常有丝分裂的影响[J]. 应用与环境生物学报, 1997, 3(3): 204-207.

- [3] 王振英, 陈 宏, 陈文龙, 等. 甲胺磷对蒜根尖细胞有丝分裂的影响[J]. 西南农业大学学报, 1999, 21(1): 81–83.
- [4] 李 岩, 王秀珍, 付民先. APM 对小麦根尖细胞形态及超微结构的影响[J]. 农业生物技术学报, 1995, 3(3): 39–42.
- [5] Morejohn L C, Fosket D E. Inhibition of plant microtubule polymerization *in vitro* by the phosphoric amide herbicide amiprofos-methy[J]. Science, 1984, 224: 874–876.

The Effect of Phosphoric Amide Herbicide APM on Cell Division and Function of Microtubule in *Allium Cepa*

CHENG Luo-gen¹, SHI Xin², PENG Yong-kang²

(1. Life Science College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

2. Department of Biology, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China)

Abstract: The effect of APM on cell division and microtubule function at cytological and Immunobiochemical level were studied. The experiment results indicated that multipolar cell division, unequal cell division could be induced when root meristems were treated by 10 $\mu\text{mol/L}$ APM for 16 h. Immunobiochemical testing showed that spindle fibers were condensed and lost their regular arrangement toward the two poles. Abnormal cell division was induced because the function of spindle fibers was disturbed. It was necessary to further study the genetic toxicity mechanism of APM on the cell division. It could be valuable in agriculture using phosphoric amide herbicide safely.

Key words: Phosphoric amide herbicide; Multipolar cell division; Genetic toxicity; Immunobiochemistry; Agro-environmental protection