

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

刘桂琴¹, 程景胜², 彭永康²

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 天津师范大学生物系, 天津 300074)

摘 要: 利用有机磷除草剂草甘磷(Glyphosate, GPS), 在不同浓度、不同处理时间下, 对作物(黑麦、大麦)根尖分生组织细胞有丝分裂的影响进行了研究。结果表明, 在浓度为 $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、处理时间为 4 h 时, 能引起细胞异常有丝分裂如多极、染色体桥、间期微核形成、细胞有丝分裂指数降低。草甘磷对黑麦、大麦细胞异常有丝分裂的临界浓度和临界时间分别是 $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 4 h。

关键词: 除草剂; 草甘磷; 有丝分裂指数

中图分类号: X839. 2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 – 2043(2004)02 – 0387 – 05

Effects of Organo – Phosphine Herbicide Glyphosate on Cyto – Genetical Toxicity in Grasses

LIU Gui-qin, CHENG Jing-sheng, PENG Yong-kang

(1. College of Life Science, Nankai University, Tianjin, 300071; 2. Department of Biology, Tianjin Normal University, Tianjin 300074)

Abstract: Effects of organophosphine herbicide Glyphosate (GPS) on cyto – genetical toxicology were studied in root tips of *Secale cereale* and *Hordeum vulgare* treated with a series of concentrations of GPS and various durations. The results showed that the plant had abnormal cell mitosis, such as multipolar, chromosomes bridge and formation of micronuclei in interphase. Furthermore, the herbicide also caused reduction in mitotic index when root tips were treated with a dosage of $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GPS for 4 h. We indicated from our test that the treatment concentration of $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and exposure time with 4h by the herbicide were believed to be the threshold concentration and threshold time for causing abnormal cell mitosis in *Secale cereale* and *Hordeum vulgare*, respectively.

Keywords: glyphosate; herbicide; mitotic index

草甘磷(Glyphosate, GPS)属有机磷除草剂, 具有广谱性和良好的内吸传导性能, 高效低残留, 对人畜低毒, 从而被广泛地应用于农业生产上^[1~3], 用于防除单子叶草、多年生恶性杂草如茅草、香附子、狗牙根、芦苇等。草甘磷是 20 世纪 70 年代开发出来的最为成功的 1 个除草剂, 主要是通过抑制植物体内烯醇丙酮基莽草素磷酸合成酶, 从而抑制莽草酸向苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸的转化, 使蛋白质的合成受到干扰, 导致植株死亡。人们对它的作用机理和作用部位^[2]、它在土壤中吸收和降解^[4]以及草甘磷对土壤微

生物群落的影响作过一定的研究^[5], 并已开始抗草甘磷转基因作物的研究和利用^[6], 1990 年我国已培育出抗草甘磷的大豆新品种^[8]。迄今为止, 草甘磷对作物有丝分裂的报道极少, 本研究以黑麦、大麦为材料, 用不同浓度和不同时间, 分别处理萌发的种子, 探讨其对作物根系分生组织细胞有丝分裂影响, 为农业生产上合理、安全使用除草剂提出一些理论依据, 以有益于保护生态环境。

1 材料与方法

1.1 材料处理

将黑麦(*Secale cereale*)、大麦(*Hordeum vulgare*)种子在室温下浸种过夜, 将萌动的种子置于滤纸上分别培养 24 h, 再加入不同浓度的草甘磷溶液, $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm$

收稿日期: 2003 – 07 – 03; 修订日期: 2003 – 11 – 10

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(02010)

作者简介: 刘桂琴(1955—), 女, 天津市人, 工程师, 从事植物生理生化及仪器分析工作。

联系人: 彭永康, E – mail: pykcell@eyou.com

1 ℃ 温箱中分别培养 4 ~ 26 h, 供试验用。

1.2 细胞有丝分裂指数(MI)和异常细胞的检测

取各处理的黑麦、大麦的根尖分生组织, 用 70% 乙醇固定。将固定的根尖用蒸馏水冲洗干净, 置于 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$, 60 ℃ 水浴中解离 6 min 后, 用水冲洗干净, 置于 2.5% 二酶(纤维素酶: 果胶酶 = 1: 1)中酶解 40 min, 取根尖用蒸馏水冲净, 卡宝品红染色, 压片, 在光学显微镜下观察, 记录根尖分生组织细胞有丝分裂指数和各种异常细胞出现频率并照像。

2 结果与分析

2.1 GPS 对黑麦、大麦根尖细胞毒害作用的异常细胞形态观察

黑麦、大麦经 GPS 处理后, 检测到多种异常有丝分裂细胞: “多极”分裂是最容易被观察到的现象, 见图 1e. f. g。在多极分裂的细胞中, 可以明显地观察到染色体无规则地向多极方向的移动, 同时在间期也可以观察到“多核”, 见图 1h 及“微核”, 见图 1d。微核出现的频率随着处理时间的延长而逐渐增加, 微核的形成可能是在分裂过程中滞后染色体或者染色体断裂造成的。染色体加倍(与秋水仙素诱发植物多倍体类似), 尽管对染色体不能确切计数, 但明显已不是原来的 $2N = 14$, 在对照组中都没有检测到这种细胞, 染色体加倍主要是由于染色体已经复制而细胞不分裂^[9]; 粘连中期被认为是除草剂在植物中突出的生理效应, 是染色体纤维不合理的折叠; 染色体桥、染色体断片, 见图 1a、b、c, 是属于特殊的染色体粘连, 不规则的染色体伸展会导致染色体螺旋结构的紊乱, 这 2 种变异会导致染色体结构的变异; 多极是由于细胞正常的有丝分裂受到影响, 纺锤丝不能有规则地将染色体拉向两极而出现的, 这些均与国内外学者^[10, 11]的研究相吻

合, 同时, 这些异常有丝分裂的细胞在 CK 中均没有观察到。

2.2 GPS 对根尖细胞分生组织细胞有丝分裂指数的影响

用不同浓度和不同时间 GPS 处理黑麦、大麦, 对它们根尖分生组织进行压片观察, 结果表明 GPS 能显著影响黑麦、大麦根尖细胞的有丝分裂指数。用不同浓度的 GPS 处理后, 细胞有丝分裂指数与对照(CK)相比有不同程度的降低, 表明有丝分裂活动受到抑制; 随着处理浓度的增加、处理时间的延长, 有丝分裂指数下降就更明显, 也就是说, 有丝分裂活动受到的抑制作用就更明显, 在黑麦中, 处理时间为 4 h 时, 随着 GPS 浓度的增加, 有丝分裂指数变动的范围为 1.99% ~ 3.15%, 此时对照(CK)的有丝分裂指数为 2.66%; 而当处理时间为 12 h 时, 有丝分裂指数变动的范围为 1.72% ~ 1.66%, 此时对照(CK)的有丝分裂指数为 2.41%, 见表 1。在大麦中, 处理时间为 4h 时, 随着 GPS 浓度的增加, 有丝分裂指数变动的范围为: 2.68% ~ 2.28%, 此时对照(CK)的有丝分裂指数为 2.60%; 而当处理时间为 12 h 时, 有丝分裂指数变动的范围为 1.56% ~ 1.12%, 此时对照(CK)的有丝分裂指数为 2.55%, 见表 2。黑麦、大麦经 GPS 处理后, 它们的有丝分裂指数降低, 有丝分裂活动减少, 主要是由于正常有丝分裂程序受到影响, 阻止大量细胞进入前期而停留在间期, 这些有丝分裂活动减少可能是由于 DNA 合成受到抑制。除草剂抑制有丝分裂可能是由于它扰乱有丝分裂周期, 延长间期的 G2 期或者抑制 DNA 的合成^[12]。从细胞有丝分裂指数来看, GPS 干扰了有丝分裂的正常分裂程序, 从而实现它对细胞的毒害作用。

2.3 GPS 对黑麦、大麦根尖分裂期细胞的毒害作用

用 50 ~ 10 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的有机磷除草剂 GPS 对黑麦、大麦根尖处理 4, 6, 8, 10, 12 h 后, 发现它抑制细胞正常有丝分裂使有丝分裂指数明显降低, 同时还诱导产生一系列畸变的有丝分裂细胞。经 GPS 处理 4h 即可以观察到异常有丝分裂细胞的出现, 在早中期

出现滞后染色体、粘连中期和分生组织细胞染色体加倍, 在对照组中都没有检测到。滞后染色体、粘连中期、加倍染色体出现的频率很高, 在黑麦根尖细胞中滞后染色体变动的范围为 0.95% ~ 13.15%, 粘连中期为 3.14% ~ 17.14%, 加倍染色体为 1.43% ~ 10.00%。另外还有 1 种异常分裂细胞是染色体桥, 它

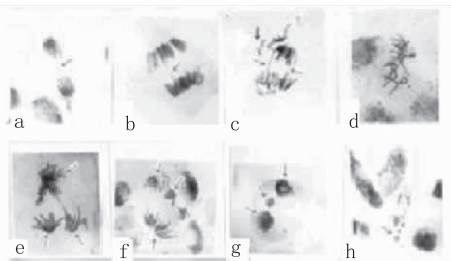


图 1 GPS 对黑麦和大麦的细胞学效应

(说明: a. 染色体断裂; b, c. 染色体桥; d. 滞后染色体; e, f. 多极; g. 多核; h. 微核)

Figure 1 Effects of glyphosate on cells of the both grasses Notice: a, breakage of chromosomes; b, c, chromosome bridge; d, lag chromosome; e, f, multi - polarity; g, multinuclei; and h, micronuclei

表 2 草甘磷处理大麦后不同类型的异常细胞的频率

Table 2 Percentage of abnormal cells in the grass <i>Hordeum vulgare</i> after treatment with glyphosate									
处理时间 /h	处理浓度 /mg · L ⁻¹	观察细胞总数	异常细胞的频率/%						有丝分裂指数
			滞后染色体	粘连中期	C - 有丝分裂	染色体桥	多极后期	* 微核	/%
4	CK	5607	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.60
	50	4589	1.62	0.81	0.00	0.00	0.00	0.02	2.68
	100	5336	3.75	4.51	3.01	1.50	2.25	0.19	2.47
	500	4565	4.41	5.14	5.88	2.94	3.67	0.20	2.98
	1000	6096	4.54	4.04	1.01	1.51	3.03	0.21	2.23
	5000	6343	7.29	4.04	4.76	2.52	2.02	0.27	2.03
	10000	5216	2.43	5.20	4.87	0.00	1.21	0.12	2.28
6	CK	5158	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.95
	50	4831	2.31	6.15	3.07	1.53	1.53	0.08	3.29
	100	4704	3.28	5.29	2.63	1.97	1.97	0.24	3.23
	500	4064	4.96	7.80	2.83	4.25	3.54	0.28	2.47
	1000	4001	2.66	6.00	4.00	3.33	2.66	0.31	2.75
	5000	6724	4.14	3.62	3.62	1.55	2.59	0.38	2.87
	10000	5561	1.29	2.59	0.64	0.64	0.64	0.17	2.77
8	CK	4825	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.23
	50	4735	3.12	4.16	3.12	1.04	1.04	0.18	2.25
	100	5860	3.44	6.20	2.75	1.37	2.75	0.23	1.47
	500	5453	5.71	7.14	5.00	2.85	4.28	0.32	1.55
	1000	5818	6.53	7.84	4.57	2.61	3.92	0.33	1.63
	5000	5597	5.00	6.66	2.50	1.66	1.66	0.39	1.78
	10000	5738	1.96	4.90	3.92	0.98	0.98	0.19	1.16
10	CK	6308	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
	50	5291	3.80	6.66	3.80	2.85	1.85	0.21	1.98
	100	5414	4.54	4.54	3.03	1.51	2.27	0.30	1.44
	500	5566	2.38	4.16	1.78	1.19	1.78	0.38	2.02
	1000	5466	1.32	3.97	3.31	1.32	0.66	0.40	1.76
	5000	5058	2.08	8.53	6.25	1.04	2.08	0.41	1.90
	10000	5954	1.78	3.57	3.57	0.89	0.89	0.21	1.88
12	CK	4826	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.55
	50	4665	3.12	4.16	1.04	1.04	2.08	0.11	1.56
	100	6104	2.64	5.28	2.64	1.32	1.32	0.18	1.47
	500	6312	2.72	3.63	3.63	0.00	0.00	0.20	1.74
	1000	5579	1.63	2.45	3.26	0.81	0.81	0.22	1.19
	5000	4988	2.32	4.65	0.00	0.00	0.00	0.25	1.02
	10000	5585	2.08	4.16	2.08	1.04	0.00	0.15	1.12

染色体环在细胞分裂后期不能定向移动,因而遗留在细胞质中;二是有丝分裂毒物的作用使个别染色体或带着丝粒的染色体环和断片在细胞分裂后期被留在细胞质中^[14]。研究 GPS 对澳大利亚青蛙的毒害作用^[13],研究 GPS 对水生生物的毒性效应时,他们都发现 GPS 能促使生物间期细胞形成微核,本研究发现它对植物同样也能促使微核的形成,产生毒害作用。

据研究^[7],草甘磷是与一个约 65KD 的蛋白结合(这种蛋白是涉及微管稳定性的蛋白),从而导致出现短微管的存在;这些短微管的存在,使染色体发生了无意义移动,无法集中于赤道板上。在该研究中,经草甘磷处理后,黑麦、大麦分生组织有丝分裂指数与对

照相比明显降低,同时异常细胞高频率地出现,可以认为这些都是正常有丝分裂程序受到影响的结果,这也进一步证明草甘磷是一种扰乱作物正常有丝分裂的药物。尽管草甘磷除草剂为根除田间杂草提供了一些方便,但它对农作物的生长、发育也存在一些潜在的危害,还没有有效的检测方法,在本研究中 50 mg · L⁻¹ 就能检测到畸变的染色体。在 10 000 mg · L⁻¹ 浓度时染色体畸变非常高,而该浓度还远低于农业上使用的浓度。目前农业生产上使用的有机磷类除草剂的种类比较多,不同种类的除草剂对不同作物生长发育的毒害有个体差异,这种差异目前尚不是很清楚,而且生产所使用的浓度却远远高于此浓度,因此,可以

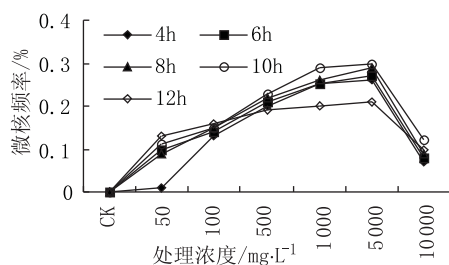


图 2 GPS 处理黑麦后微核频率

Figure 2 Percentage of micronuclei in the plant *Hordeum vulgare* after treatment with glyphosate

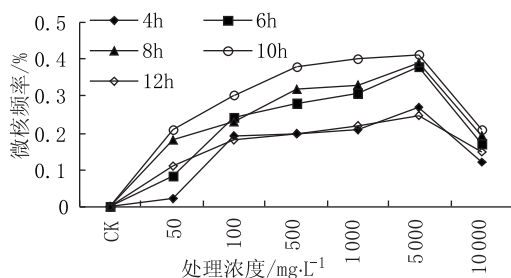


图 3 GPS 处理大麦后微核频率

Figure 3 Percentage of micronuclei in the plant *Secale cereale* after treatment with glyphosate

认为草甘磷对黑麦、大麦产生细胞遗传毒性效应的临界浓度和临界时间是 $c = 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $t \geq 4 \text{ h}$ 。本研究所得结果从细胞学水平上为农业生产中安全、合理使用这种有机磷类除草剂 (GPS) 提供了一定的理论依据。

参考文献:

[1] 陈虎保, 朱惠香, 等. 广谱高效低毒除草剂与抗除草剂作物新品种 [A]. 植物细胞工程与育种 [C]. 北京: 北京大学出版社, 1990. 403 - 406.

[2] 陈虎保, 朱惠香. 草甘磷的作用机理及部位 [J]. 林业科技通讯, 1997, (1): 23 - 25.

[3] Aya M, Takase I, Kishino S, et al. Amiprofos methyl, a new herbicide in up - land crop [J]. *Pro Asia 5th Pac Weed Sci Conf*, 1975. 138 - 141.

[4] Piccolo A, Celano G, Arienzo M, Mirabella A. Adsorption and desorption of glyphosate in some European soils [J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 1994, 29(6): 1105 - 1115.

[5] Busse Matt D, Ratcliff Alice W, Shestak Carol J, Powers Robert F. Glyphosate toxicity and the effects of long - term vegetation control on soil microbial communities [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 1777 - 1789.

[6] Owen Micheal D K. Current use of transgenic herbicide - resistant soybean and corn in the USA [J]. *Crop Protection*, 2000, 19: 765 - 771.

[7] 慕小倩, 赵 毓, 曹 薇. 除草剂对植物细胞有丝分裂的影响 [J]. 杂草科学, 1999(1): 11 - 13.

[8] 陈梁鸿, 王新望, 张文俊, 等. 抗除草剂草甘磷 EPSPS 基因在小麦中的转化 [J]. 遗传学报, 1999, 26(3): 239 - 243.

[9] Ayse Nihal G (m(rgen. Cytological Effect of the Herbicide 2, 4 - D isooctylester 48% on Root Mitosis of *Allium cepa* [J]. *Cytologia*, 2000, 65: 383 - 388.

[10] 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诱导 [J]. 应用与环境生物学报, 1997, 3(3): 204 - 207.

[11] 陈 宏, 靳 阳, 赵 谨, 彭永康. 不同浓度磷酰胺除草剂胺草磷 (APM) 对蚕豆根系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.

[12] Chand S And Roy S C. Effects of herbicide 2, 4 - dinitrophenol on mitosis, DNA, RNA and protein synthesis in *Nigella sativa* L [J]. *Biol Plant (Parha)* 1981, 23: 198 - 202. 39.

[13] 朱国念, 楼正云, 孙锦荷. 草甘磷对水生生物的毒性效应及环境安全性研究 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2000, 26(3): 309 - 312.

[14] Mann R M, Bidwell J R. The Toxicity of Glyphosate and Several Glyphosate Formulations to Four Species of Southwestern Australian Frogs [J]. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 1999, 36(2): 193 - 199.