

草铵膦对油菜种子萌发和根尖细胞遗传毒性的影响

周文涛^{1,2}, 陈东亮², 任义英², 王倩², 叶桑², 崔明圣², 周清元^{2*}

(1. 西南大学附属中学, 重庆 400716; 2. 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400716)

摘要 [目的] 探讨草铵膦对油菜种子萌发和根尖细胞遗传毒性的影响。[方法] 模拟不同浓度和处理时间下, 低剂量草铵膦残留对甘蓝型油菜萌发后幼苗生长初期的生长发育和根尖细胞分裂活动的影响。[结果] 草铵膦处理对油菜发芽期幼苗下胚轴、初生根等性状的抑制效果随处理浓度的升高和处理时间的延长而增强; 0.000 01% 的草铵膦残留即可对油菜地上部分和地下部分产生明显的抑制效果, 下胚轴对草铵膦的敏感性显著大于初生根; 0.005% 的草铵膦处理根尖 4 h 可显著抑制油菜根尖分生区细胞的有丝分裂, 其抑制作用随浓度的升高和处理时间的延长逐步增强, 并可诱发细胞产生染色体桥、染色体落后、多级分裂、间期微核、染色体浓缩等染色体变异。[结论] 试验结果为草铵膦在油菜田使用的安全性评估提供了理论依据。

关键词 油菜; 草铵膦; 种子萌发; 染色体变异; 有丝分裂

中图分类号 S482.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)02-0120-04

Effects of Herbicide Glufosinate on Seedling Growth and Morphological Root Tips Cell Genetic Toxicity on *Brassica napus*

ZHOU Wen-tao^{1,2}, CHEN Dong-liang², REN Yi-ying² et al (1. Affiliated Middle School of Southwest University, Chongqing 400716; 2. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716)

Abstract [Objective] The aim was to study the effects of herbicide glufosinate on seedling growth and morphological root tips cell genetic toxicity on *Brassica napus*. [Method] Under the conditions of different concentrations and different treatment duration, effects of herbicide glyphosate on seed germination and morphological root tips division activity of *Brassica napus* were studied. [Result] The inhibitive effects of glufosinate treatments on rapeseed hypocoty and primary root morphological characters were enhanced along with the increase of treatment concentrations and durations. The 0.000 01% glufosinate could inhibit the growth of hypocoty significantly. The inhibitive effects of glufosinate treated for hypocoty were significantly greater than primary root; the mitosis in root tip cells treated by the 0.005% glufosinate for 4 h could be significantly inhibited, and its inhibition effects were enhanced along with the increase of treatment concentrations and durations, and induced cells to produce chromosome bridge, chromosome lagging, multi-level division, interphase micronucleus, chromosome enrichment genetic effect, etc. [Conclusion] The results provide reference for safety assessment of glufosinate applied in *Brassica napus* field.

Key words Rapeseed; Glufosinate; Seed germination; Chromosome disorder; Mitosis

油菜是世界主要的经济作物之一。随着高产、优质油菜品种的培育和推广, 油菜种植面积不断扩大, 油菜田杂草发生也呈逐年上升趋势。目前, 油菜田杂草以化学防除为主。草铵膦(Glufosinate)是一种广谱非选择性的除草剂, 其对植物的地上部分和地下部分均有杀死作用^[1], 属灭生性茎叶处理剂^[2], 靶标酶为谷氨酰胺合成酶(GS)^[3], 草铵膦抑制 GS 可以导致植物体内氮代谢失调, 必需氨基酸的合成受阻, 从而降低肽、蛋白质与核苷酸生物合成, 光合作用受抑制, 最终导致植物死亡^[4]。草铵膦由于具有活性高、药效快、非选择性、无土壤活性等优点^[5], 越来越被人们接受, 并广泛应用。正是由于草铵膦的非选择性, 在杀死杂草的同时也影响了农作物的正常生长发育, 所以草铵膦对作物生长的影响的研究显的尤为重要。根尖是萌发种子在土壤中首先接触除草剂的器官, 张帆等^[6]研究发现新型除草剂丙酯草醚抑制发芽期油菜的苗高、根长、侧根数、干物质积累等, 并且抑制根尖细胞的有丝分裂。若要在直播油菜田推广应用, 需要评价其对发芽期油菜幼苗的安全性问题。化学除草虽然高效, 但在实际使用中会对主栽作物产生影响或有药物残留, 如何使其对主栽品种的药害降到最低, 对农业生产的影响减到最小, 成为目前亟待解决的问题^[7]。笔者通过形态学方法研究了微

量浓度草铵膦对油菜幼苗根茎长、侧根数等性状的影响, 并进一步通过根尖压片法对草铵膦的细胞学毒性进行了观察, 研究了草铵膦残留毒性对后茬油菜幼苗生长的影响, 旨在为草铵膦在油菜田使用的安全性评估提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料。甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)中双 11 号, 由西南大学油菜工程技术中心提供。选取种皮光亮、饱满的种子, 播于铺有 2 层定性滤纸的直径 6 mm 的培养皿内, 每皿 30 粒, 置于光照培养箱中使其萌发, 温度 26 ℃, 光照 16 h, 黑暗 8 h。

1.1.2 供试药剂。草铵膦: 永农牌百速顿草铵膦, 永农生物科学有限公司生产(产地: 中国浙江)。有效成分含量为 200 g/L。

1.2 方法

1.2.1 除草剂对地上和地下部分形态性状的影响试验。播种后分别用有效含量为 0.000 01%、0.000 10%、0.001 00%、0.010 00% 的草铵膦水溶液使其萌发, 分别处理 1、2、3、4、5 d, 以去离子水为对照, 每处理设 10 次重复, 6 d 后选取长势均匀的 10 株幼苗, 测量下胚轴和初生根长度, 统计侧根数。

1.2.2 除草剂对根尖细胞分裂的影响试验。用清水进行种子萌发, 待其初生根长至 1.0 cm 左右时分别用有效含量为 0.005%、0.010%、0.050%、0.100%、0.500%、1.000% 的草铵膦溶液浸根, 每个浓度分别处理 4、8、12、16、20、24 h, 以清水作为对照, 采用卡诺氏固定液固定 24 h, 根尖保存于 70% 乙醇中。用去离子水将保存的根尖冲洗干净, 置于 1 mol/L

基金项目 国家科技支撑计划项目(2013BAD01B03-12); 国家农业现代产业技术体系(CARS-12); 重庆市社会事业与民生保障科技创新项目(cstc2016shmszx0756); 西南大学博士启动基金项目(swul13064)。

作者简介 周文涛(2000—), 男, 四川仁寿人。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事作物遗传育种研究。

收稿日期 2017-09-30

HCl 中,60 ℃ 水浴中解离 6 min 后用去离子水冲洗干净,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数并照像,每处理组观察 4 个根尖,每个根尖观察约 2 000 个细胞。

1.3 数据分析 所有数据及制图使用 SPSS 17.0 统计软件和 Excel 2007 软件进行,采用 LSD 法分析差异显著性。有丝分裂指数 (MI) = 分裂期细胞总数/观察细胞总数 × 100%^[8-9]。

2 结果与分析

2.1 草铵膦对油菜幼苗生长发育的影响 草铵膦对油菜幼苗地下和地上部分均有抑制作用(表 1 和图 1),其抑制效果随处理浓度的升高和处理时间的延长而增强;在 0.000 01%

草铵膦处理下,处理后 1 d 地上部分下胚轴的长度受到了显著抑制,而 0.000 01% 草铵膦即使处理 5 d 后也未能引起地下部分初生根根长的显著变化,0.000 10% 草铵膦处理 4 d 后地下部分初生根才受到明显抑制,相比之下,地上部分对草铵膦更敏感;侧根数从处理 1 d 后开始就受到了明显抑制,0.001 00% 草铵膦处理 4 d 后已完全抑制了侧根的发生;下胚轴/初生根长在低浓度(0.000 01% ~ 0.001 00%) 草铵膦短时间(1 ~ 3 d)处理下与对照无显著差异(图 2),表明在试验浓度和处理时间下,草铵膦对地上部分和地下部分的抑制作用大致相同。0.000 10% 草铵膦处理 5 d 后,下胚轴/初生根长达到最大值(2.20),之后随浓度的增加而下降。

表 1 不同浓度草铵膦处理对油菜幼苗形态性状的影响

Table 1 Effect of herbicide glufosinate at different concentrations on morphological characters of *Brassica napus*

处理时间 Treatment duration//d	下胚轴长 Hypocotyl length//cm					初生根长 Primary root length//cm				
	0(CK)	0.000 01%	0.000 10%	0.001 00%	0.010 00%	0(CK)	0.000 01%	0.000 10%	0.001 00%	0.010 00%
1	4.45 a	3.63 b	3.35 b	3.35 b	1.75 c	6.40 a	6.12 a	6.45 a	5.63 a	2.03 b
2	4.40 a	3.59 b	3.36 bc	3.01 c	2.00 d	6.23 a	6.24 a	6.00 ab	5.08 b	2.20 c
3	4.56 a	4.08 b	3.44 c	2.65 d	0.75 e	6.60 a	6.44 a	6.21 a	3.62 b	0.39 c
4	4.45 a	3.34 b	2.84 c	1.70 d	0.84 e	6.50 a	5.55 a	4.11 b	2.17 c	0.45 d
5	4.45 a	4.00 b	3.54 b	1.99 c	0.59 d	6.40 a	5.62 a	4.21 b	1.82 c	0.32 d
处理时间 Treatment duration//d	侧根数 Number of lateral root//个					下胚轴/初生根长 Hypocotyl length/primary root length				
	0(CK)	0.000 01%	0.000 10%	0.001 00%	0.010 00%	0(CK)	0.000 01%	0.000 10%	0.001 00%	0.010 00%
1	3.80 a	2.40 b	1.30 c	1.10 cd	0.30 d	0.71 a	0.72 a	0.70 a	0.69 a	0.71 a
2	3.50 a	2.10 b	1.60 b	1.40 b	0.10 c	0.60 b	0.58 b	0.64 b	0.63 b	0.81 a
3	3.70 a	2.40 b	1.40 c	1.20 c	0.00 d	0.53 b	0.58 b	0.57 b	0.75 b	1.09 a
4	3.80 a	1.50 b	1.30 b	0.00 c	0.00 c	0.60 c	0.62 c	0.79 bc	1.00 ab	1.18 a
5	3.80 a	1.50 b	1.20 b	0.00 c	0.00 c	0.96 b	0.98 b	2.20 a	1.94 a	1.98 a

注:各处理样本均重复 10 次;同列数据后不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著(LSD 法检验)

Note:Each value represents the mean of ten replicates of each treatment;the different lowercase letters at the same line represented significant difference at 0.05 level tested by the LSD method



注:照片拍摄于处理后 6 d,1、2、3、4、5 分别代表处理浓度 CK(0)、0.000 01%、0.000 10%、0.001 00%、0.010 00%

Note:Photos were taken at 6 days after treatment and 1,2,3,4,5 referred to concentrations of CK(0),0.000 01%,0.000 10%,0.001 00% and 0.010 00%, respectively

图 1 不同浓度草铵膦处理对油菜幼苗形态性状的影响

Fig.1 Effect of herbicide glufosinate at different concentrations on morphological characters of *Brassica napus*

2.2 草铵膦对油菜根尖细胞遗传毒性的影响

2.2.1 草铵膦处理对油菜幼苗根尖有丝分裂的影响。用不同浓度和不同时间的草铵膦处理油菜幼苗根尖,对其分生组织进行压片观察。结果表明,草甘膦能显著影响根尖细胞的有丝分裂指数,用不同浓度的草铵膦处理后,细胞有丝分裂

指数与对照相比均有不同程度的降低,表明有丝分裂活动受到抑制。当浓度为 0.005% 时,有丝分裂指数在 3.42% ~ 1.63%;浓度为 0.010% 时,有丝分裂指数在 2.29% ~ 0.82%;浓度为 0.050% 时,有丝分裂指数在 1.40% ~ 0.81%;浓度为 0.100% 时,有丝分裂指数在 0.75% ~

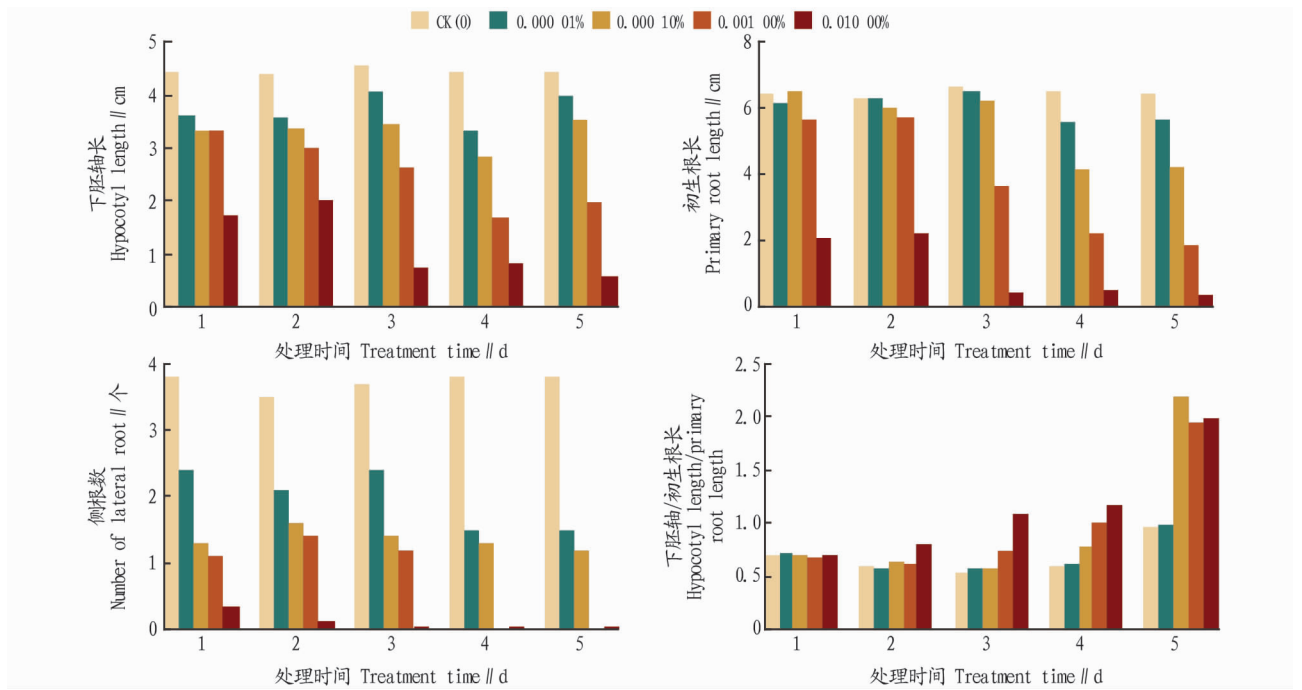


图2 草铵膦处理对油菜幼苗下胚轴/初生根长性状的影响

Fig.2 Effect of herbicide glufosinate on hypocotyl length/primary root length on morphological characters of *Brassica napus*

0.29% ;浓度为0.500%时,有丝分裂指数在0.30% ~ 0.05% ;随着处理浓度的增加,有丝分裂指数逐渐下降,也就是说,有丝分裂活动受到的抑制作用更明显(图3)。

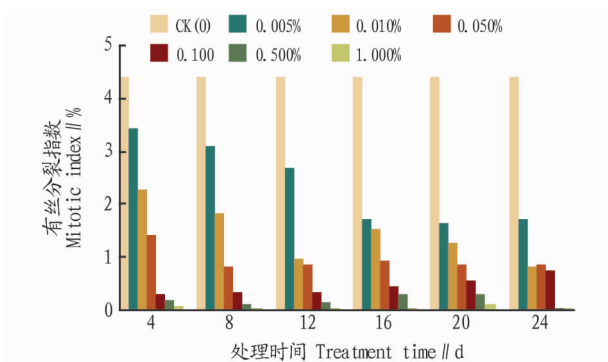


图3 草铵膦处理对油菜幼苗根尖有丝分裂指数的影响

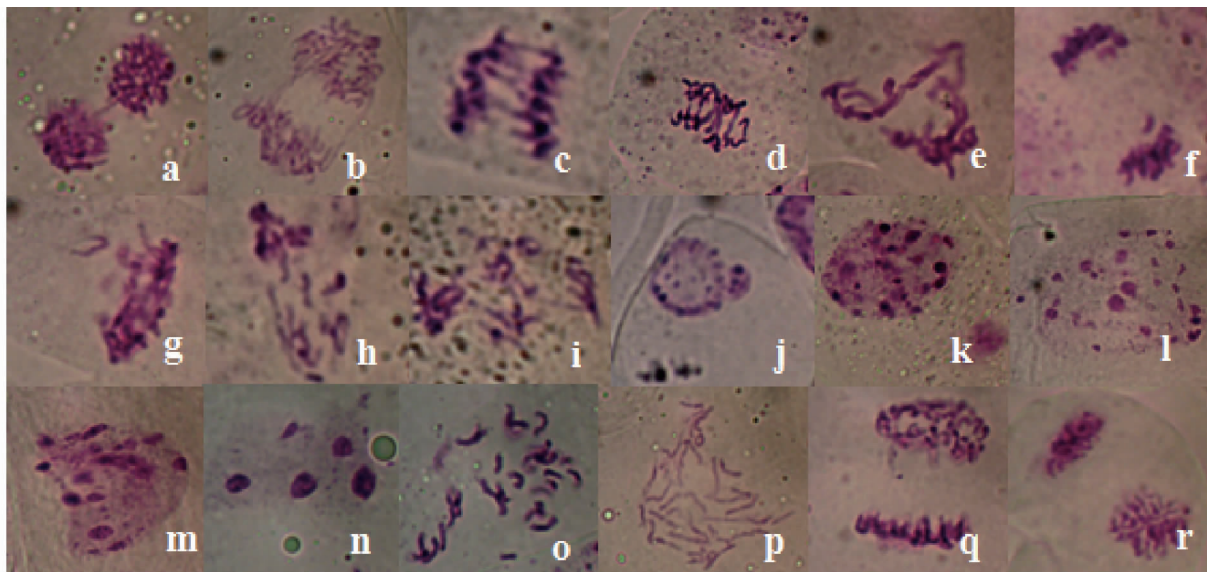
Fig.3 Effect of herbicide glufosinate at different concentrations on morphological root tips mitotic index of *Brassica napus*

2.2.2 草铵膦对油菜根尖细胞毒害作用的异常细胞形态观察。油菜幼苗期根尖经草甘膦处理后,在处理组均检测到了多种异常有丝分裂^[10]的细胞,如染色体桥、滞后染色体、微核、断裂染色体、多级、染色体黏连、染色体浓缩等现象,其中染色体桥是最容易观察到的现象(图4)。桥是由于2条染色体断裂后融合形成的,当2条染色体的着丝粒已经分别移向相对的两极时,二者的臂仍然黏连在一起,形成后期的桥,染色体桥可以导致染色体结构的变异,该试验中观察到的染色体桥有单桥、双桥、三桥和多桥等类型。该研究发现,0.005%草铵膦处理4h即可引起染色体畸变,当浓度增大到1.000%时,各处理时间段均未在分裂期细胞里观察到畸变染色体,染色体畸变率在0~15.63%,这些异常有丝分裂的

细胞在CK中均未观察到。

3 结论与讨论

草铵膦是广谱、苗后、非选择性除草剂,它通过对GS不可逆抑制,造成植物氮代谢失调,必需氨基酸缺乏,最终导致细胞内氨的含量过量而中毒,随之叶绿素解体,植物死亡^[11]。草铵膦的传导性较差,但草铵膦既可以在植物体内随蒸腾流在木质部内向上运输,也可以在韧皮部内向地下部分运输^[12]。该研究用不同浓度的草铵膦处理萌发期的油菜种子,发现草铵膦对萌发期油菜下胚轴和初生根都有抑制作用,且地上部分下胚轴对草铵膦更敏感。通过对不同浓度草铵膦处理的根尖分生区细胞进行压片观察还发现,除草剂草铵膦能抑制油菜根尖细胞的有丝分裂,推断可能是由于草铵膦抑制了细胞分裂过程中一些芳香氨基酸的合成,进而使细胞分裂过程中某些蛋白质的合成受阻,如抑制G2期DNA的合成^[13],从而抑制了细胞分裂,进而抑制了油菜幼苗的生长发育。也有研究表明,除草剂抑制细胞分裂与微管蛋白的合成有关^[14]。此外,在压片观察时还发现了异常分裂的细胞,如落后染色体、染色体桥、多级分裂、微核等。细胞经辐射或化学药物的作用易导致分裂过程滞留染色体形成落后染色体、染色体桥、染色体断片、环状染色体等染色体畸变。由于末端黏连而出现双着丝粒染色体,在其以后分离时就形成了染色体桥。除草剂还可能破坏了纺锤丝的正常结构和功能^[15],使个别染色体分离滞后或出现多极分裂现象。微核的形成存在多种学说^[16],而草铵膦最倾向于化学诱变学说,当细胞受到草铵膦作用后造成纺锤丝损伤或染色体断片,在细胞分裂后期,这些断片或落后的染色体不能进入细胞核而凝聚形成微核游离在细胞质中。除草剂影响细胞遗传毒性的分子机制有待进一步研究。



注:a.染色体单桥;b.染色体双桥;c.染色体多桥;d,e.染色体黏连;f,g,h.染色体落后;h,i.多级分裂;j,k.微核;l,m.染色体浓缩;n.无主核;o、p.染色体断裂;q,r.染色体不均等分裂

Note:a. Single chromosome bridge;b. Double chromosome bridges;c. Multi-chromosome bridges;d,e. Chromosome conglutination;f,g,h. Chromosome lag; h,i. Multi-polarity;j,k. Micronuclei;l,m. Chromosome of inspissation;n. No big nuclear;o,p. Chromosomal fragments;q,r. Unequal division

图 4 草铵膦处理对油菜根尖组织的细胞学效应

Fig. 4 Effects of glufosinate on cells in root tips of *Brassica napus*

该研究发现,即使百万分之一的草铵膦也会对油菜幼苗生长产生明显抑制作用,虽然草铵膦在土壤中易通过各种形式降解^[4],但若有微量草铵膦飘逸到附近农作物、果树、蔬菜^[17-18]等绿色植物上,也会给生产者带来较大损失,甚至危害农田生态。

参考文献

- [1] 王萍,管娟娟,冯远航,等. 草铵膦对大豆胚尖不定芽形成的影响[J]. 作物杂志,2011(6):60-63.
- [2] SCHWERDTLE F, BIERINGER H, FINKE M. Hoe 39866—ein neues nicht selektives Blatterbizid. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz[M]// AHRENS W H. Herbicide Hand - book. 7th ed. Champaign, IL: Weed Science Society of America, 1981.
- [3] LEA P J, JOY K W, RAMOS J L, et al. The action of the 2-amino-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid(phosphinothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants[J]. Phytochemistry, 1984, 23(1):1-6.
- [4] 苏少泉. 草铵膦述评[J]. 农药, 2005, 44(12):529-532.
- [5] VASIL I K. Phosphinothricin-Resistant Crops[M]// DUCK S O. Herbicide-resistant crops. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1996:85-89.
- [6] 张帆,田甜,金宗来,等. 新型除草剂丙酯草醚对油菜幼苗生长与根尖细胞活性的影响[J]. 中国农业科学, 2009, 42(10):3522-3529.
- [7] 任卫东,杨云彭. 化学除草剂发展近况[J]. 化学工程师, 1997(4):25-26.

- [8] JAWORSKI E G. Mode of action of N-phosphono-Methyl-glycine: Inhibition of aromatic amino acid biosynthesis[J]. J Agric Food Chem, 1972, 20:1195-1198.
- [9] 李集临,徐香玲. 细胞遗传学[M]. 北京:科学出版社, 2006:211-216.
- [10] 黎杰强,黄海琳,李丹霞,等. 3种常用农药对蚕豆根尖细胞的遗传毒性[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2008(1):112-117.
- [11] 杨逢玉,张宏军,倪汉文. 灭生性除草剂草铵膦的作用机理及其应用[J]. 北京农学院学报, 2002, 17(4):100-105.
- [12] 张宏军,刘学,张佳,等. 草铵膦的作用机理及其应用[J]. 农药科学与管理, 2004, 25(4):23-27.
- [13] CHAND S, ROY S C. Effects of herbicide 2,4-dinitrophenol on mitosis, DNA, RNA and protein synthesis in *Nigella sativa* L. [J]. Biologia plantarum, 1981, 23(39):198-202.
- [14] 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.
- [15] 陈丽萍,曹慕岚,马丹炜. 入侵植物加拿大蓬遗传毒性的初步研究[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2008, 31(3):372-375.
- [16] 杜峰涛,李林. 细胞微核形成机理探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(4):19-22.
- [17] 孙凯,宋述尧,温涛,等. 农田除草剂飘移对蔬菜作物的危害[J]. 当代生态农业, 2012(1):99-102.
- [18] 姜俊凤,丁伟,黄岩波,等. 飘移控制剂对草甘膦飘移及其除草效果的影响[J]. 作物杂志, 2014, 10(2):146-150.

科技论文写作规范

工作单位 在圆括号内书写作者的工作单位(用全称)、城市名及邮政编码。若为外国的工作单位,则加国名。多个作者不同工作单位时,在名字的右上角分别加注“1”“2”,和地址前注“1.”“2.”。

结果 利用图、表及文字进行合乎逻辑的分析。务求精练通顺。不需在文字上重复图或表中所具有的数据,只需强调或阐述其重要发现及趋势。