

# 有机磷除草剂毒性对作物蛋白质组分变化的研究

程景胜, 陈 宏, 王振英, 彭永康

(天津师范大学生物系, 天津 300074)

**摘 要:** 利用有机磷除草剂甲基胺草磷(Amiphrophos – methyl, APM)和草甘膦(Glyphosate, GPS), 研究 APM 和 GPS 对黑麦蛋白质组分变化的影响。实验结果表明, 在 APM 浓度为  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 处理时间为 24 h 时, GPS 为  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 处理时间为 26 h 时, 通过双向 SDS – PAGE 检测, 在黑麦根系中有多种蛋白质组分的增加、减少, 或者其含量发生变化, 在大麦幼苗中诱导出一个 28KD/pI6.4 的特异蛋白质组分, 而在黑麦根系中有一个 31KD/pI6.6 的特异蛋白质组分丢失, 这些蛋白质组分的变化可能与除草剂的毒害作用有关。 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 APM 引起黑麦、大麦蛋白质组分产生变化的临界时间为 24 h, 而草甘膦对黑麦、大麦蛋白质组分产生变化的临界浓度和时间分别是  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和 26 h。

**关键词:** 除草剂; 毒害作用; 蛋白质组分

中图分类号: X503.23      文献标识码: A      文章编号: 1672 – 2043(2003)05 – 0614 – 03

## Toxicity of Organo – Phosphine Herbicide on Changes of Protein Compositions in Crops

CHENG Jing-sheng, CHEN Hong, WANG Zhen-ying, PENG Yong-kang

(Department of Biology, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China)

**Abstract:** The effects of the organophosphine herbicide amiphrophos – methyl (APM) and glyphosate (GPS) were studied by evaluation of change of protein of crops (*Secale cereale* and *Hordeum vulgare*). The results were as follows: in terms of the changes of proteins by 2D/SDS – PAGE, when the treatment concentration and time of APM and GPS were  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 24h and  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 26 h, we found that some proteins appeared, some proteins disappeared, others contents of proteins changed. Especially, one protein (28KD/PI6.4) was induced in seedlings of *Hordeum vulgare*, while the other protein (31KD/PI6.6) was disappeared in roots of *Secale cereale*, suggesting that it was likely connected with herbicide treatment. Above all, protein compositions were changed when root tips and seedlings were treated with  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  APM for 24h. in *Secale cereale* and *Hordeum vulgare*; while the treatment concentration and time ( $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and 26h) of GPS were consequently thought to the threshold concentration and time for bringing about changes of compositions.

**Keywords:** herbicide; toxic effect; protein composition

甲基胺草磷(Amiphrophos – methyl, APM)和草甘膦(Glyphosate, GPS)都属有机磷除草剂。APM 由于分解快, 对环境残留少, GPS 由于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, 不破坏生态环境, 从而它们被广泛地应用于农业生产上<sup>[4、10、11]</sup>。国内外学者曾利用 APM 对小麦、大蒜、蚕豆根尖分生组织细胞有丝分裂中期同步化诱导; 在蒜、蚕豆根尖细胞有丝分裂、小麦根尖的形态超微结构以及微核的形成和染色体加倍等方面都作过有益的探讨和研究<sup>[5–9]</sup>。而 GPS 是 20 世纪 70 年代开发出来的最为成功的一个除草剂, 它为内吸传导型、广谱、灭生性除草剂<sup>[10]</sup>, 人们对它的作用机理和作用部位<sup>[11]</sup>、它在土壤

中吸收和降解<sup>[13]</sup>以及草甘膦对土壤微生物群落的影响作过一定的研究<sup>[14]</sup>, 并已开始抗草甘膦转基因作物的研究和利用<sup>[12]</sup>。但是用 2D/SDS – PAGE 方法来研究 APM 和 GPS 对作物产生毒害作用所引起蛋白质变化的研究报道很少。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, 探讨其对幼苗、根系引起的蛋白质变化, 为农业生产上合理、安全使用这两种除草剂提供一些理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料及培养

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  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 APM、不同浓度的 GPS 溶液,  $23 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  温箱中分别培养 4 ~ 26 h, 供

收稿日期: 2002 – 09 – 17

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(02020)

作者简介: 程景胜(1972—), 男, 硕士, 工程师。

通讯作者: 彭永康, pykcell@eyou.com

试验用。

## 1.2 材料处理

蛋白质双向 SDS-PAGE 测定参照 O'Farrell<sup>[1]</sup>的方法:第一向等电聚焦凝胶浓度为 3% [9 mol · L<sup>-1</sup> 尿素、2% Np40、两性离子 (pH5 ~ 7, pH3 ~ 10, 2:1)、四甲基乙二胺、过硫酸胺]。将凝胶灌入凝胶管 (120 mm × 3 mm), 预聚焦 (150 V, 15 min; 300 V, 30 min; 400 V, 60 min)。预电泳结束后, 每管加蛋白样品 50 μL, 400 V 下等电聚焦 16 h。等电聚焦结束后, 将样品胶放入平衡液 (6 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH6.8, 2% SDS, 5% β 巯基乙醇, 10% 甘油) 中平衡 20 min。第二向 SDS-PAGE 根据 Laemmli<sup>[4]</sup>的方法, 分离胶的浓度为 12.5%, 浓缩胶的浓度为 5%, 采用 Wary<sup>[2]</sup>介绍的氨银染法染色, 实验结果照像记录。

## 2 结果与分析

### 2.1 APM 诱导黑麦根、大麦幼苗蛋白质的变化

图 1 a、b 是黑麦根系经 1.2 mg · L<sup>-1</sup> 的 APM 处理 24 h 时检测到的蛋白质 2D/SDS-PAGE 的结果, 约有 200 种蛋白质组分存在, 其中含量较丰富的蛋白质组分有 20 余种, 有较为广泛的分子量范围 (10 ~ 120KD), 与对照 (图 1a) 相比较, 经 1.2 mg · L<sup>-1</sup> 的 APM 处理 24 h 后, 黑麦根系中有 4 种蛋白质组分消失 (图 1a 中箭头所示), 这些蛋白质组分的分子量和等电点分别为: 33KD/pI5.9; 31KD/pI6.6; 12KD/pI6.7; 10KD/pI6.8。与对照相比, 有一些蛋白质组分被诱导产生 (图 1b 中箭头所示), 这些蛋白质组分的分子量和 pI 分别为: 110KD/pI4.7; 89KD/pI6.0; 87KD/pI6.0; 另外还有一些蛋白质组分在经 APM 处理后其含量在不同程度上有的减少 (斑点着色变浅) 或增加 (斑点着色变深) 如 33KD/pI4.5; 24KD/pI6.0; 15KD/pI6.7 (图 1a 中箭头所示); 73KD/

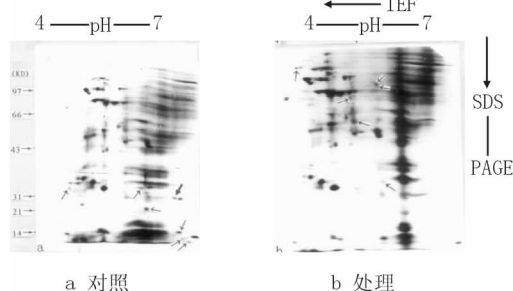


图 1 黑麦经 1.2 mg · L<sup>-1</sup> 的 APM 处理 24 h 后叶片蛋白质 2D/SDS-PAGE 分析

Figure 1 2D/SDS-PAGE analysis of leaf proteins of *Secale cerea* treated by 1.2 mg · L<sup>-1</sup> APM for 24 h

pI5.6; 57KD/pI5.6; 34KD/pI6.0 (图 1b 中箭头所示)。

图 2 a、b 是大麦叶片经 1.2 mg · L<sup>-1</sup> APM 处理 24 h 时, 检测到的蛋白质 2D/SDS-PAGE 的结果, 约有 250 余种蛋白质组分存在, 其中含量较丰富的蛋白质组分有 20 余种, 有较为广泛的分子量范围 (10 ~ 120 KD), 与对照 (图 2a) 相比较, 经 1.2 mg · L<sup>-1</sup> APM 处理 24 h 后, 大麦幼苗中有 4 种蛋白质组分消失 (图 2a 中箭头所示), 这些蛋白质组分的分子量和 pI 分别为: 110KD/pI6.1; 107KD/pI 5.0; 97KD/pI5.5; 12KD/pI6.8; 与对照相比, 另有一些蛋白质组分被诱导产生 (图 2b 中箭头所示), 这些蛋白质组分的分子量和 PI 分别为: 80KD/pI6.1; 82KD/pI6.2; 80KD/pI6.3; 最为明显的是 28KD/pI6.4; 另外也有一些蛋白质组分在经 APM 处理后其含量在不同程度上有的减少或增加。

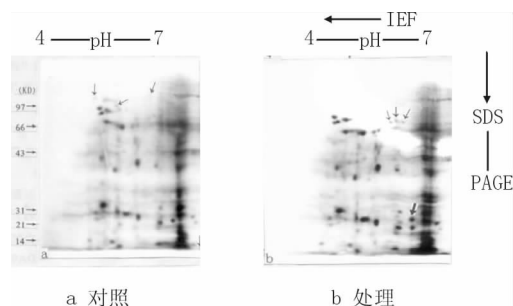


图 2 大麦经 1.2 mg · L<sup>-1</sup> 的 APM 处理 24 h 后叶片蛋白质 2D/SDS-PAGE 分析

Figure 2 2D/SDS-PAGE analysis of leaf proteins of *Hordeum vulgare* treated by 1.2 mg · L<sup>-1</sup> APM for 24 h

### 2.2 GPS 诱导黑麦根系蛋白质的变化

图 3 a、b 是黑麦根系经 1 000 mg · L<sup>-1</sup> 的 GPS 处理 26 h 时, 检测到的蛋白质 2D/SDS-PAGE 的结果, 共有 200 余种蛋白质组分存在, 其中含量较丰富的蛋白质组分有 20 余种, 有较为广泛的分子量范围 (10 ~ 110KD), 与对照 (图 3a) 相比较, 经 1 000 mg · L<sup>-1</sup> 的 GPS 处理 26 h 后, 大麦幼苗中有 2 种蛋白质组分消失 (图 3a 中箭头所示), 这些蛋白质组分的分子量和 pI 分别为: 40KD/pI 5.1; 26KD/pI6.0; 与对照相比, 另有一些蛋白质组分被诱导产生 (图 3b 中箭头所示), 这些蛋白质组分的分子量和 PI 分别为: 83KD/pI5.3; 55KD/pI6.0; 48KD/pI5.2, 另处也有一些蛋白质组分在经 GPS 处理后其含量在不同程度上有的减少 (斑点着色变浅) 或增加 (斑点着色变深), 这些蛋白质组分的分子量和 pI 分别为: 51KD/pI5.1; 35KD/pI4.6; 35KD/pI4.4; 14KD/pI6.0; 14KD/pI5.1 (图 3

a 中箭头所示); 77KD/pH4. 9; 49KD/pI5. 4; 49KD/pI5. 5; 48KD/pI5. 6(图 3 b 中箭头所示)。

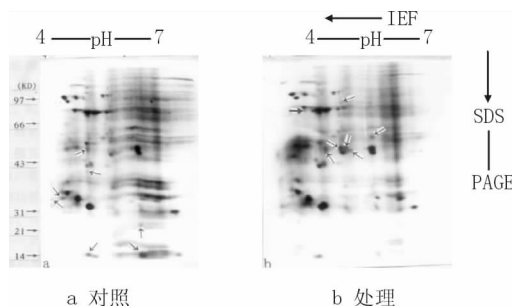


图 3 黑麦经  $1\,000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  GPS 处理 26 h 后根系蛋白质 2D/SDS - PAGE 分析

Figure 3 2D/SDS - PAGE analysis of root proteins of *Secale cereal* treated by  $1\,000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  GPS for 24 h

### 3 讨论

通过 2D/SDS - PAGE 分析表明, APM、GPS 处理黑麦、大麦后, 蛋白质组分产生明显变化, 诱导产生一些新的蛋白质组分或者部分蛋白质组分的缺失, 而且 2D/SDS - PAGE 还能检测到部分蛋白质组分含量的变化, 对于 APM 而言无论是在处理黑麦还是大麦时, 当处理浓度低于  $1.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、处理时间小于 24 h 时, 而对于 GPS 而言, 当处理浓度低于  $1\,000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、处理时间低于 26 h 时, 黑麦、大麦根尖、幼苗蛋白质组分均没有检测出明显的变化。对于这些差异蛋白质组分还需要从结构和功能上进一步进行研究, 从而最终搞清楚 APM、GPS 对植物毒害作用间的关系。蛋白质组分的变化, 也反映了它自身的一些保护性反应。

因此, 可以认为 APM 对黑麦、大麦产生毒害作用所引起蛋白质组分变化的临界浓度和临界时间分别是  $1.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $t \geq 24\text{ h}$ ; 而 GPS 产生毒害作用所引起蛋白质组分变化的临界浓度和临界时间分别是  $1\,000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $t \geq 26\text{ h}$ 。目前, 我国已培养出  $1\,000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  抗草甘膦大豆新品种, 对 GPS 毒害作用的研究结果不仅可以为抗 GPS 作物基因工程提供一些生化理论依据, 而且在生产上还有一定的实际意义。

APM 和 GPS 都是以影响细胞有丝分裂为作用方式的除草剂, APM 直接与微管蛋白结合, 阻止微管的形成, GPS 却是与一个约 65KD 的涉及微管稳定性的蛋白相结合。它们对植物的毒害作用在蛋白质水平上表现出组分的增减和含量的变化。同时植物都有自身的保护机制, 有些植物对除草剂天生具有耐性, 能通过一系列酶促反应代谢和解除除草剂的毒害作用。王俊儒 (1997) 研究表明, 涉及植物对除草剂解毒机制的

有细胞色素 P450、葡萄糖基转移酶和谷胱甘肽转移酶等。细胞色素 P450 是血红素 - 巯基蛋白质, 分子量为 55KD; 葡萄糖基转移酶是水溶性的或与膜结合, 分子量为 40 ~ 62KD; 谷胱甘肽转移酶常以同二聚体或异二聚体形式存在, 亚基的分子量为 24 ~ 30KD。在 APM 和 GPS 对植物毒害作用的生化分析中, 检测到变化的蛋白质组分中有部分蛋白质组分的分子量在上述蛋白或酶的分子量范围内, 有些诱导产生或缺失的蛋白质组分却与这些酶或蛋白的分子量一致, 说明 APM 和 GPS 对作物的毒害作用可能与这些蛋白质或酶的变化有关, 但是由于对这些蛋白质组分没有进行测序和结构与功能的鉴定, 尚不能确定它们的关系, 还有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] O'Farrell P H. High resolution of two - dimensional electrophoresis of protein[J]. *J Biochem*, 1975, 250: 4007 - 4021.
- [2] Wary W, Boulikas T, Wary V P and Hancock R. Silver staining of protein in polyacrylamide gels[J]. *Annal Biochem*, 1981, 118: 198 - 203.
- [3] Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4[J]. *Nature (London)*, 1970, 227: 680 - 685.
- [4] Aya M, Takase I, Kishino S, et al. Amiprophos methyl, a new herbicide in up - land crop[A]. *Pro Asia 5th Pac Weed Sci Conf*. 138 - 141.
- [5] 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.
- [6] 陈宏, 靳阳, 赵谨, 彭永康. 不同浓度磷酸酯除草剂胺草磷 (APM) 对蚕豆根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.
- [7] 王振英, 陈宏, 陈文龙. 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, (1): 81 - 83.
- [8] Ramulu K S, Verhoeven H A, Dijkhuis P. Mitotic blocking, micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprophos - methyl, and colchicine, in potato[J]. *Protoplasma*, 1991, 160: 2 - 3, 65 - 71.
- [9] Hansen A L, Gertz A, Joersbo M, et al. Chromosome Doubling in vitro with Amiprophos - Methyl in *Beta ulgaris* Ovule Culture[J]. *Acta Agriculturae Scandinavica. Section B: soil*. 2000, 50(2): 89 - 95.
- [10] 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.
- [11] 陈虎保, 朱惠香. 草甘膦的作用机理及部位[J]. *林业科技通讯*, 1997, (1): 23 - 25.
- [12] 陈梁鸿, 王新望, 张文俊, 等. 抗除草剂草甘膦 EPSPS 基因在小麦中的转化[J]. *遗传学报*, 1999, 26(3): 239 - 243.
- [13] Piccolo A, Celano G, Arienzo M, et al. 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.
- [14] Busse Matt D, Ratcliff Alice W, Shestak Carol J, et al. Glyphosate toxicity and the effects of long - term vegetation control on soil microbial communities[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 1777 - 1789.
- [15] Owen, Micheal D K. Current use of transgenic herbicide - resistant soybean and corn in the USA[J]. *Crop Protection*, 2000, 19: 765 - 771.