

氯酸钾污染对蚕豆根尖细胞的遗传毒性效应

黎华寿, 张修玉

(华南农业大学热带亚热带生态研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 利用蚕豆根尖微核技术研究了氯酸钾细胞遗传毒性和污染效应。结果表明, 不同浓度的氯酸钾均会对蚕豆根尖细胞分裂产生遗传毒性, 在一定浓度处理范围内, 随着氯酸钾处理浓度增大, 其强氧化性能诱导蚕豆根尖细胞有丝分裂指数、微核率、染色体畸变率和污染指数的增加; 但浓度过高时, 反而会抑制蚕豆根尖细胞有丝分裂和微核的数量。氯酸钾具有明显的环境污染效应, 利用蚕豆根尖微核技术对其污染效应进行监测和评价既简便又比较可靠。

关键词: 氯酸盐; 蚕豆根尖微核技术; 遗传毒理; 污染生态

中图分类号: X835 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2005)05-1013-05

Cytogenetic Toxicity of Potassium Chlorate on *Vicia faba* Root Tip Cells.

LI Hua-shou, ZHANG Xiu-yu

(Institute of Tropical and Subtropical Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The genetic toxicity and pollution effects of potassium chlorate on *Vicia faba* root tip cells were studied by means of VAMCN. The results showed that good correlation existed between concentrations of potassium chlorate and indexes that tested, within range of 100 mg·L⁻¹, with the rising of potassium chlorate concentration, mitotic index, rate of micronucleus and chromosome aberration of *Vicia faba* root tip cells, and even pollution index that its powerful oxidation induced all increased. However, beyond concentration of 100 mg·L⁻¹, potassium chlorate restrained the mitotic index and appearance of micronucleus. Undoubtedly, different concentrations of potassium chlorate treatments did pollute environment. Therefore, it can be concluded that potassium chlorate has obvious inducing and teratogenic effects on *Vicia faba* root tip cells and VAMCN is a sensitive and effective method to monitor and evaluate pollutants of potassium chlorate in water and soil.

Keywords: chlorate; VAMCN; genetic toxicity; pollution ecology

氯酸盐是具有强氧化性的有毒物质, 在工农业生产中应用甚广, 而且长期以来由于认识的偏颇其污染未受重视。上个世纪氯酸钠曾作为除草剂和脱叶剂大量应用^[1], 近年来氯酸钾作为龙眼(*Dimocarpous Longana*) 等热带果树的催花和产期调控的生长调节剂^[2-4]大量施用。此外, 氯酸盐应于饮用水、水产养殖、食品保鲜和废水废气处理中会产生 Cl⁻、ClO₂⁻和 ClO₃⁻, 动物毒理试验发现, 水中较高剂量 ClO₃⁻ 和 ClO₂⁻ 与动物的贫血症密切相关而被怀疑是贫血的诱因^[5,6], 为此

ClO₂、ClO₂⁻和 ClO₃⁻被美国等许多国家列为消毒副产物控制指标。

研究表明, 氯酸根在植物细胞内的积累会导致过氧化氢酶含量增加, 提高细胞的呼吸效率^[7], 致使细胞过早衰老^[8,9]。此外, 由于植物细胞对氯酸根离子和硝酸根离子的吸收无选择性, 植物吸收氯酸盐, 还会影响植物体细胞对硝酸盐的吸收和运输^[10,11], 进而影响植物的生理功能。已有研究证明, KClO₃ 对藻类和水稻等有明显的浓度梯度毒害效应^[12,13]。因此, 检测 KClO₃ 及其残留的遗传毒性和污染效应显得颇为重要。

蚕豆根尖细胞微核技术 (*Vicia faba*-root tip cells micronucleus test, VAMCN) 作为一种快速有效的环境保护检测系统和遗传毒物预警系统, 目前在水环境、

收稿日期: 2005-01-17

基金项目: 国家自然科学基金 (30370289); 美国洛克非勒基金资助

作者简介: 黎华寿 (1964—), 男, 副教授, 在读博士生, 研究方向为农业生态和污染生态。

联系人: 张修玉 E-mail: xiuyuzhangxiuyu@126.com

日常生活用品和重金属等污染检测方面的应用研究较多^[14-19],但在评价 KClO₃ 对细胞遗传毒理和污染效应方面的研究未见报道。韩建英等曾应用蚕豆根尖微核技术研究林州市生活饮用水的诱变活性与食管癌死亡率的关系^[20],发现饮用水中所诱发的蚕豆根尖微核效应强弱与居民食管癌死亡率大小一致,表明水中这些诱变剂的存在可能是导致食管癌高发的重要因素。

本实验应用蚕豆根尖微核技术探讨 KClO₃ 对蚕豆根尖细胞的生态毒理,以此评价 KClO₃ 的遗传毒性和污染效应,旨在为监测评价 KClO₃ 及其残留对环境的污染和维护人体健康与生态系统安全提供理论依据,同时也为蚕豆根尖微核技术的发展和完善提供借鉴材料。

1 材料与方法

1.1 材料

青皮蚕豆(*Vicia faba* L.),产自山东;氯酸钾为市售化学纯。

1.2 方法

1.2.1 蚕豆根尖培养

选择颗粒饱满、大小均匀的蚕豆种子用蒸馏水在 23 ℃条件下浸泡 24 h(中间换蒸馏水两次),再将其放入铺有湿润纱布的培养皿中,然后置于 23 ℃的培养箱中进行培养;等到根长长至 1 cm 左右时,分别选取 10 粒初生根发育良好的种子移入盛有 0(CK)、10、20、50、100 和 200 mg·L⁻¹ 共 3 个 KClO₃ 浓度处理的培养皿中染毒 18 h(氯酸钾溶液刚好浸没蚕豆初生根),然后再恢复培养 18 h^[21];切取初生侧根 1 cm 左右置于青霉素空瓶中,加卡诺氏固定液(无水乙醇和

冰醋酸 3:1 比例配制)固定 24 h,然后用 70%乙醇在 4 ℃冰箱中保存备用。

1.2.2 制片镜检

取固定好的初生侧根用蒸馏水浸洗两次,每次 5 min,吸净蒸馏水,加入 1 mol·L⁻¹ 的盐酸在 28 ℃水浴锅中水解软化蚕豆幼根 15 min,再用蒸馏水浸洗两次,每次 5 min,最后用刀片切除含太多淀粉的 1mm 顶部根尖^[22],将剩余部分用碱性品红染色 8 min,压片镜检。

1.2.3 结果分析与统计方法

每个处理观察 10 个根尖切片,每个切片观察 3 个染色清晰的视野,分别统计有丝分裂指数 MI%、微核率 MCN‰、污染指数 PI(污染级别划分见文献[23])和染色体畸变率 CAF%。计算式如下:

$$MI\%=(\text{分裂细胞数}/\text{观察细胞总数})\times 100\%$$

$$MCN\text{‰}=(\text{观察到的微核数}/\text{观察细胞总数})\times 1000\text{‰}$$

$$CAF\%=(\text{染色体畸变数}/\text{分析的染色体总数})\times 100\%$$

$$PI=\text{处理组微核千分率平均值}/\text{对照组微核千分率平均值}$$

所测得数据在 SPSS11.0 系统软件下进行方差分析。图像在 Motic Image Plus 2.0 数码显微镜下拍摄。

2 实验结果

2.1 氯酸钾对蚕豆根尖细胞分裂指数的影响

实验结果表明(表 1),不同浓度的氯酸钾处理均导致蚕豆根尖细胞有丝分裂指数增大,在 0~100 mg·L⁻¹ 浓度处理范围内,随氯酸钾浓度增大,蚕豆根尖细胞分裂指数也随之增大,且 100 mg·L⁻¹ 浓度处理为分

表 1 氯酸钾对蚕豆根尖细胞分裂指数的影响

Table 1 The effect of potassium chlorate on mitotic index of *Vicia faba* root tip cell

处理/mg·L ⁻¹	根尖数/n	各根尖平均分裂指数/%					总平均分裂指数/%
0	10	3.35	4.20	3.18	5.84	4.35	4.15±0.24a
		4.45	3.37	4.47	4.01	4.26	
10	10	6.42	5.13	5.64	4.01	5.80	5.18±0.27b
		4.27	4.39	6.15	5.66	4.53	
20	10	6.00	5.51	6.28	5.57	6.42	5.67±0.17b
		6.24	5.61	5.07	4.85	5.13	
50	10	5.48	6.26	7.12	7.46	5.55	6.57±0.23c
		6.91	6.47	6.08	7.54	6.80	
100	10	8.88	8.05	7.37	6.45	6.49	7.73±0.28d
		7.35	8.24	8.61	8.72	7.14	
200	10	7.78	6.81	8.16	7.02	6.51	6.92±0.24c
		6.21	5.53	7.10	6.63	7.45	

裂高峰,达到了 7.30%,比对照高 3.50%;与对照相比,10 mg·L⁻¹ 和 20 mg·L⁻¹ 两个浓度处理差异显著,其余 3 个浓度处理差异极显著。这说明 0~100 mg·L⁻¹ 浓度处理范围内,氯酸钾的强氧化性会诱导蚕豆根尖细胞的分裂,但随其处理浓度增大导致强氧化性增强,反而抑制了蚕豆根尖细胞的分裂。

2.2 氯酸钾对蚕豆根尖细胞微核率和染色体畸变率的影响

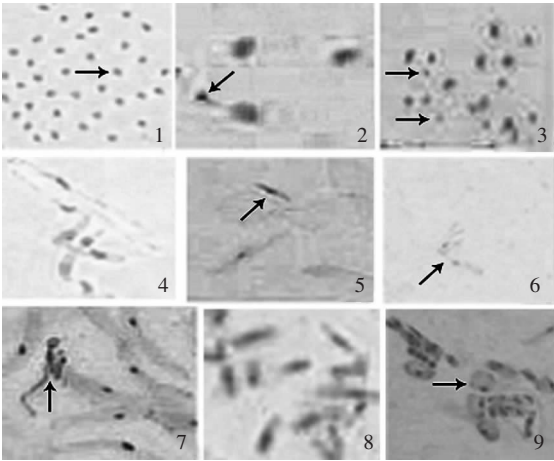
由表 2 可知,不同浓度的氯酸钾均能使蚕豆根尖细胞微核率和染色体畸变率增大,在 0~100 mg·L⁻¹ 浓

度处理范围内,随氯酸钾浓度增大,蚕豆根尖细胞微核率和染色体畸变率也随之增大,且 100 mg·L⁻¹ 浓度处理时微核率达到高峰为 15.30‰, 是对照的 8.05 倍;微核率和染色体畸变率与对照相比,10 mg·L⁻¹ 浓度处理差异显著,其余各浓度处理差异极显著。这说明在一定浓度处理范围内,氯酸钾的强氧化性会诱导蚕豆根尖细胞微核率的增加,同时会导致染色体畸变率的增加,包括染色体断片、染色体裂隙、染色体环以及粉碎性和滞后染色体增多(见图 1);但氯酸钾浓度过大时,反而会抑制蚕豆根尖细胞微核的产生。

表 2 氯酸钾对蚕豆根尖细胞微核率和染色体畸变率的影响

Table 2 The effects of potassium chlorate on rate of micronucleus and chromosome aberration of <i>Vicia faba</i> root tip cell			
处理/mg · L ⁻¹	根尖数/n	微核率/‰	染色体畸变率/%
0	10	1.90±0. 31a	0.75±0. 34a
10	10	6.10±0. 46b	3.59±0. 76b
20	10	8.60±0. 31c	5.33±1. 24c
50	10	11.00±0. 47d	5.57±1. 06c
100	10	15.30±0. 47f	6.43±1. 13c
200	10	12.30±0. 60e	6.67±1. 35c

注:表中数据为平均值±标准差,同列数据中后面字母不同者为差异显著(P<0.05)。



1.正常的蚕豆根尖细胞核;2.微核;3.100 mg·L⁻¹ 浓度处理下的较多微核;4.200 mg·L⁻¹ 浓度处理下的粉碎性染色体;
5.染色体断片;6.染色体桥和滞后染色体;7.染色体裂隙;8.蚕豆根尖正常的六对染色体;9.染色体环和断片

图 1 氯酸钾污染对蚕豆根尖细胞的遗传毒性效应

Figure 1 Cytogenetic toxicity of potassium chlorate on *Vicia faba* root tip cells

1. normal nucleus of *Vicia faba* root tip cells; 2. micronucleus; 3. high frequency of micronucleus induced with 100 mg·L⁻¹ potassium chlorate; 4. fracture chromosomes induced with 200 mg·L⁻¹ potassium chlorate; 5. chromosome fragments; 6. chromosome bridge and lagging chromosomes; 7. chromosome crevice; 8. normal chromosomes; 9. chromosome rings and fragments

2.3 氯酸钾对蚕豆根尖细胞污染指数的影响

根据国家环保总局的行业标准^[23]进行评价,氯酸钾浓度为 10 mg·L⁻¹ 时,为中度污染,其他各处理均为重度污染,而且 100 mg·L⁻¹ 时,污染指数最高,达到 8.05(表 3)。

3 结论与讨论

3.1 讨论

细胞质中的微核来源有二:一是断片或无着丝粒

表 3 氯酸钾对蚕豆根尖细胞污染指数的影响

Table 3 The effects of potassium chlorate on pollution index of Vicia faba root tip cell

处理/mg · L ⁻¹	处理微核率/%	对照微核率/%	污染指数
0	1.90±0. 31	1.90±0. 31	1
10	6.10±0. 46	1.90±0. 31	3.21
20	8.60±0. 31	1.90±0. 31	4.53
50	11.00±0. 47	1.90±0. 31	5.79
100	15.30±0. 47	1.90±0. 31	8.05
200	12.30±0. 60	1.90±0. 31	6.47

染色体环在细胞分裂后期不能定向移动,遗留在细胞质中;二是有丝分裂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。即微核试验既能检出断裂剂又能检出有丝分裂毒物。氯酸钾对蚕豆根尖细胞的遗传毒性是在细胞分裂间期 DNA 和染色体的复制合成中由其强氧化性所造成的,其途径可能是直接的^[23],即氯酸钾强氧化性直接作用于 DNA 分子,造成 DNA 断裂或损伤,进而引起微核增多和染色体畸变;也可能是间接的^[24、25],即氯酸钾干扰了 DNA 和蛋白质的合成甚至 RNA 的转录,从而影响了染色体畸变和某些损伤的正常修复。其作用机制可以结合蚕豆生长的生理功能变化如光合作用、呼吸作用和有关酶活性、物质合成与传输等进行印证,也可利用染色体畸变技术、非预定 DNA 合成(UDS) 技术对污染物的细胞遗传毒性的机理进行直接印证^[25],还可以利用定量 PCR 等现代分子生物学方法进行进一步探讨。

VAMCN 技术作为一种短期植物微核检测技术,与其他物理化学方法相比,不但取材方便,培养简单,而且可靠灵敏,经济实用,不易受季节和实验条件的影响。但某些方面还存在不足,例如按照国家环保局污染等级的划分^[25、26],诱变剂浓度越大,污染指数应该越高,但本试验中,氯酸钾 100 mg · L⁻¹ 浓度处理的污染指数却比 200 mg · L⁻¹ 浓度处理的污染指数还大,这说明用微核率来表示污染指数存在缺陷,即只有微核率与诱变剂的浓度呈线性关系时才可以用微核率来表示污染指数,当二者不呈线性关系时,用染色体畸变率代替微核率来表示污染指数更有说服力。也有研究表明,蚕豆根尖细胞存在应激性,常温下在接触低剂量的诱变因子后,会对更高剂量的诱变因子产生适应性,从而减弱诱变剂对细胞的损伤^[27],因此,积极探讨低温或非应激条件下 VAMCN 技术的应用显得更有前途。

3.2 结论

氯酸钾是一种无机强氧化剂,其强氧化性产生的遗传毒害效应对蚕豆根尖细胞影响甚大,不同浓度的氯酸钾均会诱导蚕豆根尖细胞有丝分裂、微核率、染色体畸变率和污染指数的增加,并且在 0~200 mg · L⁻¹ 浓度处理范围内,随氯酸钾处理浓度增大,蚕豆根尖细胞染色体畸变率呈增加趋势,而有丝分裂指数、微核率和污染指数均在 100 mg · L⁻¹ 时达到最大值。

可以肯定,氯酸钾在一定浓度范围内对蚕豆根尖细胞有致畸和诱导效应,但氯酸钾对蚕豆根尖细胞分裂间期 DNA 和染色体复制影响的具体机理还有待深入研究。

参考文献:

[1] Crafts A S, Robbins W W. Weed control[M]. McGraw-Hill, New York, USA, 1962.

[2] Subhadrabandhu S, Yapwattanaphun C. Regulation off-season flowering of longan in Thailand[J]. *Acta Horticulturae*, 2001, 558:193-198.

[3] 曾祥有,黎华寿,陆宏谋. KClO₃ 对龙眼产期的调控效应[J]. *应用与环境生物学报*, 2004,10(5):573-576.

[4] 李建光,潘学文,李 荣. 氯酸钾对龙眼催花技术的进展[J]. *果树学报*, 2003, 20(5):410-414.

[5] David C Lee, MD. Methemoglobinemia. <http://www.emedicine.com/emer/topic313.htm>. January 21, 2002.

[6] WHO, IPCS, ILO. International chemical safety cards: potassium chlorate. Available: <http://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0548.html> (May 26, 2000).

[7] Klingman G C, Ashton F M. Principles and Practices[M]. Weed Science, 1975.

[8] Brown K M. Ethylene and abscission[J]. *Plant Physiol*, 1997, 100:567-576.

[9] Wright D L, Sprenkel R K. Defoliating Cotton, Department of Agronomy, Florida Cooperative Extension Service [M]. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.Publication SS-AGR-21, 1996.

[10] Balch W M. Studies of nitrate transport by marine phytoplankton using ³⁶Cl-ClO₃⁻ as a transport analogue[J]. *Phycol*, 1987, 23: 107-118.

[11] Solomonsson L P, Vennesland B. Nitrate reductase and chlorate toxicity in *Chlorella vulgaris* Beijerinck[J]. *Plant Physiol*, 1972, 50: 421-424.

[12] Stauber J L. Toxicity of chlorate to marine microalgae[J]. *Oceanograph-*

ic Literature Review, 1998, 45(7):1220–1221.

- [13] Regis Borges, Miguel E C, Janice M R. Ultrastructural, physiological and biochemical analyses of chlorate toxicity on rice seedlings[J]. *Plant Science*, 2004, 166:1057–1062.
- [14] Chen G R, Li Jin, Qu G J. A preliminary study on the utilization of micronucleus test technique in *Vicia faba* root tips to detect the pollution of Qing Shan Lake[J]. *China Environmental Science*, 1985, 5(4):1–7.
- [15] Marco Rizzoni, Bianca Gustavino, Cristina Feffari, et al. An integrated approach to the assessment of the environmental quality of the Tiber river in the urban area of Rome: A mutagenesis assay (micronucleus test) and an analysis of macrobenthic community structure[J]. *The Science of the Total Environment*, 1995, 162:127–137.
- [16] Qing Ji, Yifeng Chen. *Vicia faba* root tip micronucleus test on the mutagenicity of water-soluble contents of cigarette smoke [J]. *Mutation Research*, 1996, 359:1–6.
- [17] Sandra Minissi, Enzo Lombi. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments[J]. *Mutation Research*, 1997, 393:17–21.
- [18] Duan C Q, Wang H X. Cytogenetical toxic effects of heavy metals on *Vicia faba* and inquires into the *Vicia*-MCN[J]. *Acta Bot Sin*, 1995, 37:14–24.
- [19] 张莉,刘登义,王友保. 利用蚕豆根尖细胞微核技术检测 Cu、As 污染的诱变性[J]. 应用生态学报, 2001, 12(5):777–779.
- [20] 韩建英,王民宪,马英,等. 林州市饮用水诱变效应与食管癌死亡率的关系[J]. 中国慢性病预防与控制, 2000, 8(2):79–80.
- [21] 张自立,俞新大. 植物细胞和体细胞遗传学技术与原理[M]. 北京:高等教育出版社,1990.
- [22] Ma Te-Hsiu, Zhidong Xu, Chengen Xu, et al. The improved *Allium*//*Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants[J]. *Mutation Research*, 1995, 334:185–195.
- [23] Frankel D C, Charlien Middleton. Effects of lead acetate on DNA and RNA synthesis by intact HeLa cells, isolated nuclei and purified polymerases[J]. *Biochemical Pharmacol*, 1987, 36:265–268.
- [24] Shahin S A, El-Amoodi K H. Induction of numerical chromosome aberrations during DNA synthesis using the fungicides nimrod and rubigan-4 in root tips of *Vicia faba* L[J]. *Mutat Res*, 1991, 261:169–176.
- [25] 王焕校. 污染生态学[M]. 北京:高等教育出版社,2000.136–137.
- [26] 国家环境保护总局. 水和废水检测分析方法(第四版)[M]. 北京:中国环境科学出版社,2002.
- [27] Riger R. Low temperature between conditioning and challenge treatment prevents the "adaptive response" of *Vicia faba* root tip meristem cells[J]. *Mutat res*, 1992, 282:69.