

四种除草剂对中华大蟾蜍蝌蚪 红细胞微核及核异常的影响^{*}

耿德贵 张大生 程伟 陈刚^{**} 温洪宇

(徐州师范大学生物系 徐州 221009)

摘要 研究了除草剂精克草星、苯磺隆、使它隆和乙草胺单独及联合作用时对中华大蟾蜍蝌蚪红细胞微核及核异常的影响。结果表明,处理 24 小时时,单独作用的除草剂均可不同程度地引起微核率及核异常细胞率等遗传指标的上升。而且,在一定的浓度下各指标分别有高峰期,其中微核率与对照组差异极显著($P < 0.01$)或显著($P < 0.05$)。微核率与除草剂浓度之间无显著相关,不表现出剂量-效应关系。四种除草剂联合作用的微核率等指标反而低于单独作用的,呈拮抗作用。这四种除草剂对蝌蚪红细胞具有显著的遗传毒性,其中使它隆的毒性要大于其它三种。

关键词 除草剂;中华大蟾蜍;蝌蚪;微核;核异常

中图分类号:Q291 文献标识码:A 文章编号:10250-3263(2000)01-12-05

目前,水体污染越来越严重,已经对水生生物,特别是水生动物造成了极大的危害。因此,污染物对于水生动物的影响越来越受到人们的关注,其中,遗传毒理学方面的研究一直是个热点。在研究中,关于采用何种水生动物作为理想的试验材料一直尚未定论,有的作者建议采用鱼外周血红细胞^[1],而有些作者则主张采用两栖类动物的蝌蚪红细胞^[2~4]。大多数作者倾向于把蝌蚪红细胞微核试验作为检测水体中污染物的一种理想的方法,一方面是由于蝌蚪的红细胞体积较大,经 Giemsa 染色后,在显微镜下细胞质和细胞核的结构极为清晰,易于对微核的观察^[2~3];另一方面,蝌蚪红细胞本身

正处在旺盛增殖阶段,对水体中的污染物反应灵敏度高于鱼类^[2~4]。

有关污水、药物等诱发蝌蚪红细胞微核率上升的现象已见于报道^[2~4],但是,近年来在田间大量使用的除草剂对于蝌蚪红细胞的影响在国内迄今还没有报道。本文研究了四种除草剂精克草星、苯磺隆、使它隆和乙草胺对中华大蟾蜍蝌蚪红细胞微核及核异常的影响,为探讨

^{*} 徐州师范大学研究生启动基金资助(No. XY9603);

^{**} 徐州师范大学生物系 1998 届毕业生;

第一作者介绍 耿德贵 男 30 岁,讲师,硕士;

收稿日期:1998-06-10,修回日期:1999-07-18

除草剂对于水生动物的遗传毒性提供初步的试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 试验动物 中华大蟾蜍 (*Bufo bufo gargarizans*) 变态期的蝌蚪。处于变态期的蝌蚪由于其身体进行剧烈的变化,对毒物很敏感。1997年4月,在徐州师范大学一分部校园内未受污染的水塘中采到,体重0.4g左右。染毒前一个月,把蝌蚪养在水族箱内,所用水为经曝气后的自来水,水温为15~20℃。每3天换水一次,每天上午投放一次磨细的饵料。试验时挑选处于变态期发育状态良好的个体为材料。

(2) 除草剂 精克草星为浙江乐清市农药厂出品,苯磺隆为河北宣化农药厂出品,使它隆和乙草胺为国外进口分装。精克草星呈颗粒状,不易溶于水,配制时需加热到37℃,并不断搅拌直到完全溶解。

1.2 方法

(1) 染毒 染毒时间全为24小时,CK为自来水对照组。首先进行四种除草剂单独作用时的染毒试验,精克草星的染毒浓度分别为0.09375、0.1875、0.375、0.75、1.5、3和6mg/L。为田间除草正常使用浓度的1/2、1、2、4、8、16和32倍。苯磺隆染毒浓度分别为0.625、1.25、2.5、5、10、20和40mg/L。为正常使用浓度1/64、1/32、1/16、1/8、1/4、1/2和1倍。使它隆染毒浓度分别为0.15625、0.3125、0.625、1.25、2.5、5和10 μ L/L,为正常使用浓度1/4096、1/2048、1/1024、1/512、1/256、1/128和1/64倍。乙草胺染毒浓度分别为0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5和1 μ L/L,为正常使用浓度的1/32768、1/16384、1/8192、1/4096、1/2048和1/1024倍。确定除草剂最高染毒浓度时以染毒时间内蝌蚪不出现死亡和明显异常(如形态、行为异常等)为标准。接着再进行四种除草剂联合作用的染毒试验,根据第一次染毒试验,确定使用时每种除草剂的低浓度和高浓度。精克草星、苯磺隆、使它隆、乙草胺的低

浓度和高浓度分别为0.375和3mg/L、0.625和5mg/L、0.3125和2.5 μ L/L、0.03125和0.25 μ L/L。联合作用的染毒试验设计见表3。CK1到CK8表示四种除草剂单独作用时的低浓度组和高浓度组,表中的精、苯、使和乙分别表示精克草星、苯磺隆、使它隆和乙草胺,高和低分别表示每种除草剂的高浓度和低浓度。每组水量相等,都为2L,每组投放30只蝌蚪,试验时随机取3只进行处理。

(2) 标本的制备 取蝌蚪,用纱布将体表水分擦干,在前肢和身体连接处断肢,取血涂片,晾干,甲醇固定15分钟,15%Giemsa染液[用0.2mol/L的磷酸盐缓冲液(PBS)稀释,pH6.8]染色15分钟,水洗,用电热吹风机吹干。

观察时预先于目镜上垂直放置二根细线,这样将整个视野分为四个大小相等的区域,便于观察,计数。每张片子观察2000个以上细胞,记录具有微核及核异常的细胞数。观察结果以千分率(‰)表示。

微核细胞率 = 具有微核的细胞总数 / 观察细胞总数 \times 1000‰

微核率 = 微核总数 / 观察细胞总数 \times 1000‰,

核异常细胞率 = 具有核异常(除微核)的细胞总数 / 观察细胞总数 \times 1000‰

总核异常细胞率 = 微核细胞率 + 核异常细胞率。

2 结果与讨论

2.1 四种除草剂单独作用时的影响 四种除草剂单独作用时对中华大蟾蜍蝌蚪红细胞的影响见表1。

由表1可知,处理24小时时精克草星有5个浓度组可引起蝌蚪红细胞微核率的上升,4个浓度组引起核异常细胞率的上升,而其它的浓度组反而使微核率和核异常细胞率下降。在浓度为3mg/L时,微核率达到最大值,为10.55‰,在浓度为1.5mg/L时,核异常细胞率达到最大值,为8.57‰。苯磺隆有4个浓度组可引起微核率上升,有3个引起下降,7个浓度组全部可引起核异常细胞率的上升。在浓度为

表 1 四种除草剂单独作用时对蝌蚪红细胞的影

除草剂	浓度 编号 (mg 或 $\mu\text{l/L}$)	微核细胞 率(‰)	微核率 (‰)	核异常细 胞率(‰)	总核异常 细胞率 (‰)	
对照组	0	5.16	5.16	5.17	10.33	
精克	1	0.09375	7.41	7.41	4.44	11.85
草星	2	0.1875	2.62	2.78	6.69	9.31
	3	0.375	2.82	2.82	4.15	6.97
	4	0.75	5.55	5.55	5.23	10.78
	5	1.5	7.41	8.07	8.57	15.98
	6	3	10.55	10.55	8.41	18.96
	7	6	5.76	5.93	4.62	10.38
苯磺隆	1	0.625	4.42	4.58	12.73	17.15
	2	1.25	5.25	5.42	11.00	16.25
	3	2.5	4.49	4.49	14.64	19.13
	4	5	10.89	11.22	15.87	26.76
	5	10	9.35	9.51	19.54	28.89
	6	20	4.96	5.13	16.20	21.16
	7	40	8.01	8.67	13.10	21.11
使它隆	1	0.15625	7.33	7.33	9.33	16.66
	2	0.3125	5.08	5.24	14.12	19.20
	3	0.625	9.84	10.00	20.70	30.54
	4	1.25	9.01	9.17	21.94	30.95
	5	2.5	18.56	19.38	18.36	36.92
	6	5	7.27	7.60	15.68	22.95
	7	10	8.24	8.57	14.46	22.70
乙草胺	1	0.03125	5.76	5.76	21.10	26.86
	2	0.0625	8.83	9.32	33.98	42.81
	3	0.125	4.66	4.66	15.26	19.92
	4	0.25	9.49	9.49	31.72	41.21
	5	0.5	4.40	4.56	14.73	19.13
	6	1	4.71	4.71	14.77	19.48

5mg/L 时,微核率达到最大值,为 11.22‰;在浓度为 10mg/L 时,核异常细胞率达到最大值,为 19.54‰。使它隆的 7 个浓度组全部可引起微核率及核异常细胞率的上升,其中,在浓度为 2.5 $\mu\text{l/L}$ 时,微核率达到最大值,为 19.38‰;在浓度为 1.25 $\mu\text{l/L}$ 时,核异常细胞率达到最大值,为 21.94‰。乙草胺有 3 个浓度组可引起微核率上升,有 3 个引起下降,7 个浓度组全部可引起核异常细胞率的上升。在浓度为 0.25 $\mu\text{l/L}$ 时,微核率达到最大值,为 9.49‰;在浓度为 0.0625 $\mu\text{l/L}$ 时,核异常细胞率达到最

大值,为 33.98‰。由表 1 中还可知,四种除草剂微核细胞率与核异常细胞率出现高峰时的浓度是不同步的,核异常细胞率出现高峰的浓度低于或高于微核细胞率。

对四种除草剂单独作用时的处理组与对照组微核率之间进行了 *t* 检验,结果见表 2。

表 2 四种除草剂单独作用时的处理组与对照组微核率之间的 *t* 检验

组别	1	2	3	4	5	6	7
精克草星	0.80	2.95*	3.36	0.35	1.90	4.10*	0.56
苯磺隆	0.42	0.11	0.45	2.95*	1.44	0.01	1.02
使它隆	0.95	0.04	2.26	1.84	7.21**	1.80	1.21
乙草胺	0.52	1.90	0.47	3.45*	0.36	0.61	—

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

精克草星、苯磺隆和乙草胺只有分别在浓度为 3、5 和 0.25mg 或 $\mu\text{l/L}$ 时才引起微核率上升到与对照组差异显著($P < 0.05$)水平,使它隆只有在浓度为 2.5 $\mu\text{l/L}$ 时才引起微核率上升到差异极显著($P < 0.01$)的水平,而其它浓度组并不会引起微核率上升到差异显著的水平。由表 1 和 2 可知,使它隆引起微核率上升的能力要大于其它三种除草剂,精克草星、苯磺隆和乙草胺引起上升的能力基本上是相同的。即使它隆对蝌蚪红细胞的遗传毒性要大于其它三种除草剂,精克草星、苯磺隆和乙草胺的遗传毒性基本上是相同的。

分析了四种除草剂浓度与微核率之间及微核细胞率与核异常细胞率之间的相关系数,结果表明,精克草星、苯磺隆、使它隆和乙草胺的浓度与微核率之间的相关系数分别为 0.343、0.278、0.019 和 -0.441;微核细胞率与核异常细胞率之间相关系数分别为 0.529、0.520、0.407 和 0.981。0.981 的 $P < 0.01$,呈极显著正相关关系。由此可知,随着四种除草剂浓度的增大,红细胞的微核率并不增大,而且,除了乙草胺外,其它三种除草剂诱发的微核细胞率与核异常细胞率之间的变化并不是显著相关的。由表 1 可知,四种除草剂诱发的微核率分别在一定的浓度时有一个高峰,在高峰前后都处于低水平,甚至于在某些浓度时还低于对照组。可见浓度与微核率之间无显著相关,不表

现出显著的剂量-效应关系。这和有的学者的观点不一致,其在蝌蚪试验中发现微核率表现出剂量-效应关系^[4]。其原因尚不清楚,可能是剂量过高会抑制或终止细胞的分裂,反而导致微核率下降^[1]。

精克草星用于稻田,苯磺隆用于小麦田,使它隆适用于小麦及大麦等禾谷类作物,乙草胺可用于玉米、大豆、花生、棉花、小麦及油菜等旱地作物。该四种除草剂均可诱发中华大蟾蜍蝌蚪红细胞微核及核异常的增多。一般认为染色体断裂产生的无着丝粒断片可形成小微核,纺锤丝的断裂造成的一条或一组染色体滞后可形成大微核^[2]。我们发现该四种除草剂均会导致红细胞小微核与大微核的产生(图版 I :1,见封 3 上,下同),从而初步认为该四种除草剂既具有染色体断裂剂的作用又具有纺锤体毒剂的作用。

核异常包括双核、无核、核内空泡、核质外凸、核内凹、小核和核碎裂等(图版 I 2~6),其中小核为一种特殊的现象。陈军建等^[4]把在青蛙蝌蚪微核试验中发现的这种特殊现象称为“小体 M”,我们把它称为小核。在一种特殊的细胞中只含一个小核,小核大小不等,为正常细胞核的 1/2 以下,圆形或椭圆形,染色程度和正常细胞核相同,且含有小核的细胞大小和正常细胞相等或略小于正常细胞(图版 I 2)。关于小核形成的原因尚不清楚,陈军建等^[4]认为其可能是一种发育不正常的异常细胞,也可能是微核红细胞的一种代谢产物,但真正的原因还有待于进一步研究。

2.2 四种除草剂联合作用时的影响 四种除草剂联合作用时对蝌蚪红细胞的影响见表 3。

四种除草剂低浓度联合作用时,除了个别处理组(如第 13 组)可显著地使微核率上升外,其它处理组与单独作用时相比并不会引起微核率的显著上升,甚至大多数处理组微核率还低于单独作用的,低浓度联合作用时的核异常细胞率大多数不同程度地高于单独作用。四种除草剂高浓度联合作用时,除第 22 组外,其它所有处理组与单独作用时相比,微核率均有不同

程度的降低,高浓度联合作用时的核异常细胞率接近一半的处理组不同程度地高于单独作用,而另一半则低于单独作用。另外,大多数联合作用的高浓度处理组和低浓度处理组之间微核率和核异常细胞率接近相等。

表 3 四种除草剂联合作用时对蝌蚪红细胞的影响

编号	除草剂	浓度 (mg 或 $\mu\text{L/L}$)	微核细胞率 (%)	微核率 (%)	核异常细胞率 (%)	总核异常细胞率 (%)
CK		0	5.16	5.16	5.17	10.33
CK1	精克草星	0.375	2.82	2.82	4.15	6.97
CK2	精克草星	3	10.55	10.55	8.41	18.96
CK3	苯磺隆	0.625	4.42	4.58	12.73	17.15
CK4	苯磺隆	5	10.89	11.22	15.87	26.76
CK5	使它隆	0.3125	5.08	5.24	14.12	19.20
CK6	使它隆	2.5	18.56	19.38	18.36	36.92
CK7	乙草胺	0.03125	5.76	5.76	21.10	26.86
CK8	乙草胺	0.25	9.49	9.49	31.72	41.21
1	精+苯	低+低	3.66	3.66	32.56	36.22
2	精+苯	高+高	6.56	6.56	31.26	37.82
3	精+使	低+低	4.29	4.62	18.38	22.67
4	精+使	高+高	4.98	5.14	23.05	28.03
5	精+乙	低+低	2.81	2.81	13.23	16.04
6	精+乙	高+高	3.79	3.79	15.46	19.25
7	苯+使	低+低	3.15	3.32	34.33	37.48
8	苯+使	高+高	3.14	3.31	12.25	15.39
9	苯+乙	低+低	2.92	2.92	11.37	14.29
10	苯+乙	高+高	3.87	3.87	14.00	17.87
11	使+乙	低+低	6.55	6.55	10.67	17.22
12	使+乙	高+高	8.51	8.51	17.66	26.17
13	精+苯+使	低+低+低	16.44	16.77	33.63	50.07
14	精+苯+使	高+高+高	7.42	7.42	52.31	59.73
15	精+苯+乙	低+低+低	3.28	3.28	18.20	21.48
16	精+苯+乙	高+高+高	4.62	4.79	18.34	22.96
17	精+使+乙	低+低+低	7.27	7.60	49.05	56.32
18	精+使+乙	高+高+高	8.59	8.59	40.35	48.94
19	苯+使+乙	低+低+低	1.48	1.65	16.33	17.81
20	苯+使+乙	高+高+高	1.66	1.82	15.08	16.74
21	精+苯+使+乙	低+低+低+低	4.76	4.92	34.80	39.56
22	精+苯+使+乙	高+高+高+高	9.89	10.38	47.70	57.59

金玉等^[5]发现镉、铬、砷、铅离子共存时诱变作用的活性小于它们单存时诱变作用的活性,其联合作用呈拮抗作用,从而认为可能是混合液中某些离子浓度降低所致。我们的试验结果也表明,四种除草剂联合作用时微核率反而比单独作用时的要低,也出现了拮抗现象。其

原因尚不清楚,也许是由于除草剂之间发生了反应,从而导致遗传毒性降低。

参 考 文 献

- [1] 楼允东,吴 萍.亚硝基胍对泥鳅红细胞微核及核异常的诱发.中国环境科学,1996,16(4):275~278.
- [2] 贺维顺,王蕊芳.污水和污水土地处理系统中各种水质对华西蟾蜍蝌蚪红细胞微核率的影响.动物学研究,1992,13(3):275~279.

- [3] 王蕊芳,贺维顺,吴世芳等.昆明水源水和自来水水质致突变性及化学背景值Ⅱ.蝌蚪红细胞微核和 CHO 细胞染色体畸变及 SCE 试验.动物学研究,1996,17(4):469~475.
- [4] 陈军建,夏宜琮.青蛙蝌蚪微核试验——一种水体诱变剂检测系统的建立.水生生物学报,1993,17(4):298~308.
- [5] 金志玉,马松科,杨儒道等.镉、铬、砷、铅离子单存与共存时诱变作用的特性及其机理初探.癌变·畸变·突变,1994,6(3):4-9.

Effects of Four Herbicides on Micronuclei and Nuclear Anomalies in Tadpole Erythrocytes of *Bufo bufo gargarizans*

GENG De-Gui ZHANG Da-Sheng CHENG Wei CHEN Gang WEN Hong-Yu

(Department of Biology, Xuzhou Normal University Xuzhou 221009, China)

Abstract: Effects of four herbicides: Jing Ke Cao Xing, Ben Huang Long, STARANE 2 and Yi Cao An, on micronuclei and nuclear anomalies in tadpole erythrocytes of *Bufo bufo gargarizans* were studied. The results showed that any one of four herbicides treating alone can increase the frequencies of micronuclei and nuclear anomalies. The frequencies of the damaged items were significantly different in comparison with control group at certain herbicide concentrations. There are not significant correlation between micronuclei and concentrations. Four herbicides treating together can decrease the frequencies of the damaged items. All results suggested that four herbicides can cause significant genetic damages to the erythrocytes of *Bufo bufo gargarizans*. We found out that genotoxic effect of STARANE2 is higher than the other three herbicides.

Key words: Herbicide; *Bufo bufo gargarizans*; Tadpole; Micronucleus; Nuclear anomalies

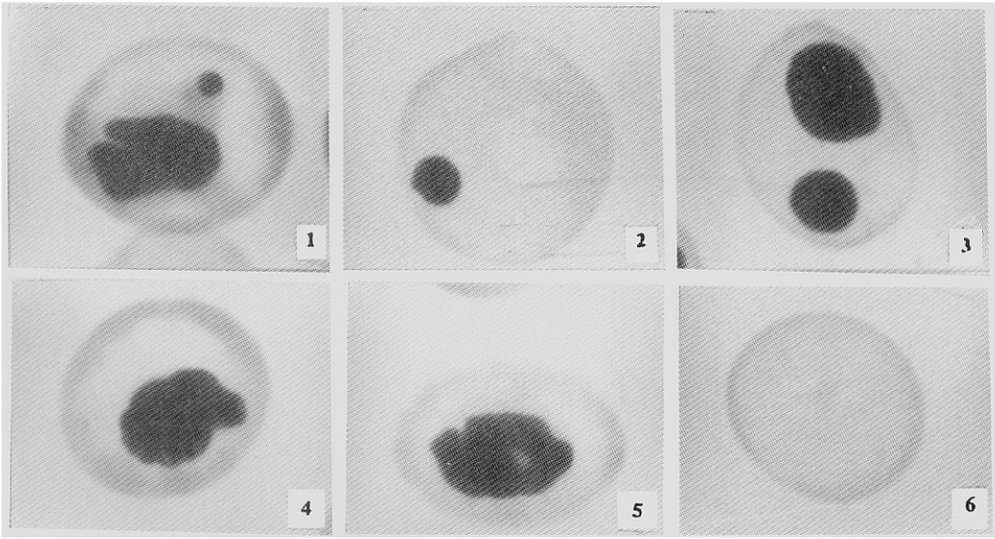
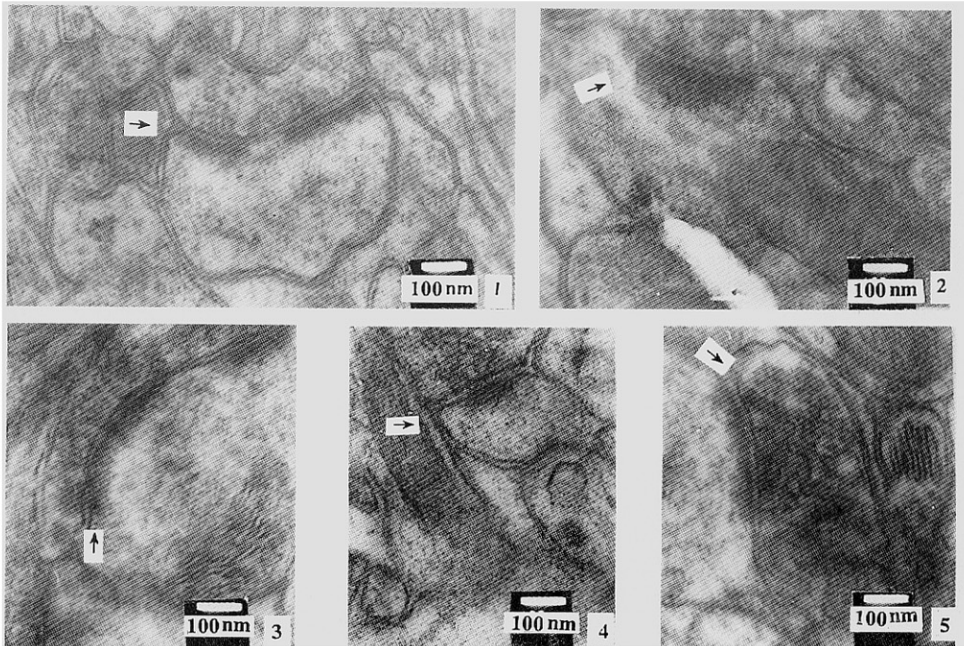


图1 单微核红细胞; 图2 小核红细胞; 图3 双核红细胞; 图4 核质外凸红细胞;
图5 核内空泡红细胞; 图6 无核红细胞



1. 示 Gray I 型突触(兴奋型); 2. 示电击后海马 CA₃ 区,突触后膜致密物质; 3. 示未电击海马 CA₃ 区,突触后膜致密物质; 4. 示电击后海马 CA₃ 区,突触间隙; 5. 示未经电击海马 CA₃ 区,突触间隙
图 1~5 放大倍数均为 ×60000 “↑”所指为观察测量的突触