

除草剂精禾草克对黄鳝细胞遗传毒性的研究

陈刚^① 耿德贵^① 朱必才^① 张大生^① 马小明^① 赵荣军^{①*} 韩燕^②

(^①徐州师范大学生物学系 徐州 221009; ^②江苏省徐州农业学校土肥教研室 徐州 221006)

摘要 采用红细胞微核和核异常、染色体数目和结构畸变的方法,研究了除草剂精禾草克对黄鳝细胞的遗传毒性。结果表明,不同浓度的精禾草克作用 30 小时,红细胞微核细胞率没有明显变化,核异常细胞率和总核异常细胞率均有所上升,部分组与对照组差异显著。染色体数目畸变率均有所上升,有的组甚至与对照组差异极显著,染色体结构畸变率也明显上升,各组与对照组差异显著或极显著。表明一定浓度范围内的精禾草克作用一定时间对黄鳝有明显的遗传学毒性。本文还对黄鳝作为淡水污染的监测材料的可行性加以探讨。

关键词 精禾草克,黄鳝,微核,核异常,染色体数目和结构畸变

中图分类号:R992 文献标识码:A 文章编号:10250-3263(2000)05-15-05

Genetic Toxicity to the Cells of *Monopterus albus* by the Herbicide NC-302D(+)

CHEN Gang^① GENG De-Gui^① ZHU Bi-Cai^① ZHANG Da-Sheng^①
MA Xiao-Ming^① ZHAO Rong-Jun^① HAN Yan^②

(^①Department of Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221009, China;

^②Department of Soil and Fertilizer, Xuzhou Agriculture School of Jiangsu Province, Xuzhou 221006, China)

Abstract Genetic toxicity of NC-302D(+) in cells of *Monopterus albus* was studied by using micronuclei and nuclear anomalies in the erythrocytes, numerical and structural chromosomal aberrations tests. The results showed that the herbicide can not increase the frequencies of micronuclei. It can increase the frequencies of nuclear anomalies in the erythrocytes, numerical and structural chromosomal aberrations. Under the some concentrations, the frequencies of damage items were significantly different in comparison with the control group. It suggested that the herbicide can cause significant genetic damages to cells of *Monopterus albus*. The possibility of *Monopterus albus* as an index of detecting freshwater pollution was also discussed in the paper.

第一作者介绍 陈刚,男,24岁,学士,现工作单位:江苏省盐城市阜宁县罗桥中学 224422;

* 现工作单位 睢宁县双沟中学 221212;

收稿日期:1999-01-20,修回日期:1999-10-11

Key words :NC-302D(+); *Monopterus albus* ; Micronucleus ; Nuclear anomalies ; Numerical and structural chromosomal aberrations

随着工农业的发展,农田化学除草已成为全球性现代化农业生产的重要组成部分。除草剂从40年代发展起来,我国从50年代开始使用2,4-D进行麦田除草,60年代2,4-D、敌稗等除草剂在稻田大面积使用,到1980年以后,我国生产的除草剂种类和数量直线上升,现已成为农药生产的重要部分^[1]。

由于除草剂的大面积使用,不仅使农田杂草产生抗药性,同时对其它生物也产生直接或间接影响。残留于田间的除草剂,通过地表径流进入池塘、河流等水体中,对水生生物造成直接伤害。我国目前除草剂对环境影响的研究较少,钱颖等^[2]研究了苯磺隆对小鼠生精细胞及组织乳酸脱氢酶同工酶的影响,唐玲芳等^[3]研究了林用除草剂环嗪酮的致突变性,而对鱼类的研究尚未见报道。本文以黄鳝的红细胞微核和核异常、染色体数目和结构畸变为指标对除草剂精禾草克的遗传毒性进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验鱼 黄鳝(*Monopterus albus*)于1998年5月中旬至6月中旬购自徐州市郊区,体重13~23g,体长为25~31cm。暂养一周,实验时挑选外观健康、活泼的正常个体进行处理。

1.1.2 除草剂 精禾草克[NC-302D(+)],有效成分为QUIZALOFOP-P-ETHYL,批号为971127,日产化学工业株式会社(日本国)出品。

1.2 方 法

1.2.1 染毒 实验在水族箱内进行,水量为10L。通过预实验,找出最高染毒浓度为3 μ L/L,高于此浓度作用30小时黄鳝全部死亡。染毒时间为30小时,染毒浓度为3、1.5、0.75、0.375、0.1875、0.09375和0.046875 μ L/L,分别编号为第1~7组,并设不加除草剂的对照

组。每组投放15条黄鳝,终止染毒前3~5小时,按10~15 μ g/g鱼体重腹腔注射秋水仙素,实验时随机取3尾进行处理。

1.2.2 标本的制备 (1)血涂片的制备:对黄鳝进行断尾取血,涂片,晾干,甲醇固定15分钟,15%Giemsa染液(用0.2mol/LPBS稀释,pH6.8)染色20分钟,水洗,用电热吹风机吹干。(2)染色体标本的制备:将鱼解剖,取肾脏,用少量0.85%生理盐水冲洗2~3次。加约5ml盐水,剪碎肾脏,将悬浮液转入离心管中,1200r/min离心8分钟。去上清液,加6ml预热至37 $^{\circ}$ C的0.075mol/LKCl,于37 $^{\circ}$ C水浴中低渗15~20分钟,然后再加1ml固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)预固定,随即离心8分钟。去上清液,加固定液8ml,固定20分钟,离心8分钟,如此反复固定2次。视管底细胞多寡加入固定液,制成悬液,在湿冷的载玻片上滴加2~3滴,晾干,10%Giemsa染液(用1/15mol/LPBS稀释,pH6.8)染色15分钟,水洗,用电热吹风机吹干。

1.2.3 标本分析 (1)微核、核异常分析:微核的判定及统计参照楼允东等^[4]方法进行,每个个体计数2000个以上红细胞,观察结果以千分率(‰)表示。红细胞总核异常细胞率为微核细胞率和核异常细胞率之和。(2)染色体数目和结构畸变分析:以《人类染色体与辐射诱变》一书^[5]的标准进行,每个个体至少观察50个处于分裂中期的肾细胞,以百分率(%)表示。

2 结果和讨论

2.1 红细胞的微核和核异常

由表1可知,经过精禾草克处理后,黄鳝红细胞微核细胞率无明显的变化。核异常细胞率和总核异常细胞率均较对照组有所上升,核异常包括核内空泡、无核、双核、核质外凸、核质内凹和核碎裂等(图1~3)。核异常细胞率最低组为对照组的2.35倍,最高组为6.10倍,总核

异常细胞率最低组为对照组的 2.33 倍,最高组为 6.00 倍,且都在第 1、3、5 和 6 组与对照组差异显著。说明红细胞中微核和核异常的出现并不是同步的,这和其他文献一致^[4]。

表 1 各组黄鳝红细胞微核和核异常分析表

序号	细胞数	微核细胞率 (%)	核异常细胞率 (%)	总核异常细胞率 (%)
对照	6 017	0.17	7.82	7.98
1	6 161	0.16	44.75*	45.07*
2	6 120	0.16	18.39	18.56
3	6 300	0.15	47.74*	47.89*
4	6 201	1.10	39.78	40.88
5	6 202	0.16	27.17*	27.33*
6	6 144	0.16	47.37*	47.53*
7	6 369	0.16	23.79	23.95

* : $P < 0.05$

2.2 染色体数目和结构畸变

表 2 各组黄鳝染色体数目畸变率(%)

序号	细胞数	<20	20	21	22	23	24	25	26	27	四倍体
对照	203	3.92	0.64	0.70	2.88	4.76	87.09	0	0	0	0
1	164	12.19	4.27	3.04	9.76	7.90	61.00**	0	0.61	0.62	0.62
2	163	7.49	1.83	3.00	6.12	7.76	70.43	0.60	1.20	0	1.19
3	157	8.33	2.55	4.43	6.40	8.30	69.33	0	0	0	0.65
4	163	13.51	3.04	3.09	8.03	11.06	52.70**	0.62	0	0	7.96*
5	187	11.71	0.62	0.89	2.78	8.18	60.39**	1.77	0	0	12.51
6	154	5.19	0	2.57	10.47	9.80	60.79**	3.33	1.33	0	13.85*
7	166	6.68	1.92	2.30	4.68	13.90	66.34**	0	0	0	4.64

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

2.2.2 染色体结构畸变 染色体结构畸变分为染色体型畸变和染色单体型畸变,染色体型畸变主要包括染色体断裂、裂隙、着丝粒环、着丝粒融合、染色单体交叉和粘连等,染色单体型畸变主要包括单体断裂、裂隙等,本文共统计以上 8 种畸变类型(图 4~6)。由表 3 可知,除了染色单体裂隙和染色体粘连外,其他 6 种畸变类型中,各组的畸变细胞所占比率均比相应的对照组高,且部分与对照组差异显著或极显著。其中着丝粒环这一类型结构畸变,第 5 组与对照组差异极显著,第 1、2、4、6 和 7 组与对照组差异显著,在精禾草克浓度为 $0.1875 \mu\text{L/L}$ 时

2.2.1 染色体数目畸变 由表 2 可知,不同浓度精禾草克作用 30 小时,各处理组 $2n = 24$ 的细胞所占比率均低于对照组,最低组为对照组的 0.61 倍,最高组也只有对照组的 0.81 倍,且第 1、4、5、6 和 7 组与对照组差异极显著($P < 0.01$),跟染毒的浓度没有相关性。处理组的四倍体所占比率均高于对照组,第 4 和 6 组与对照组差异显著($P < 0.05$)。从表 2 中可以看出,发生染色体数目畸变多数表现为染色体数目的减少,这可能是细胞在有丝分裂过程中,精禾草克作用于分裂细胞的纺锤体微管,导致微管断裂,从而使部分染色体在分裂过程中丢失,引起子细胞染色体数目减少。说明精禾草克可作用于纺锤体微管而产生染色体数目畸变,具有纺锤体毒剂作用。

着丝粒环有一高峰值,高峰两边有下降并趋于平稳的趋势。结构畸变细胞率与对照组差异均极显著,结构畸变率第 6 组与对照组差异显著,其他都极显著。结构畸变细胞率最低组是对照组的 3.81 倍,最高组为 5.34 倍,结构畸变率最低组是对照组的 3.72 倍,最高组为 5.42 倍。说明精禾草克也可直接作用于染色体而产生结构畸变,具有染色体断裂剂作用。

不同浓度的精禾草克作用 30 小时可引起黄鳝染色体结构和数目畸变率的显著上升,说明该除草剂对黄鳝染色体具有明显的直接损伤作用。

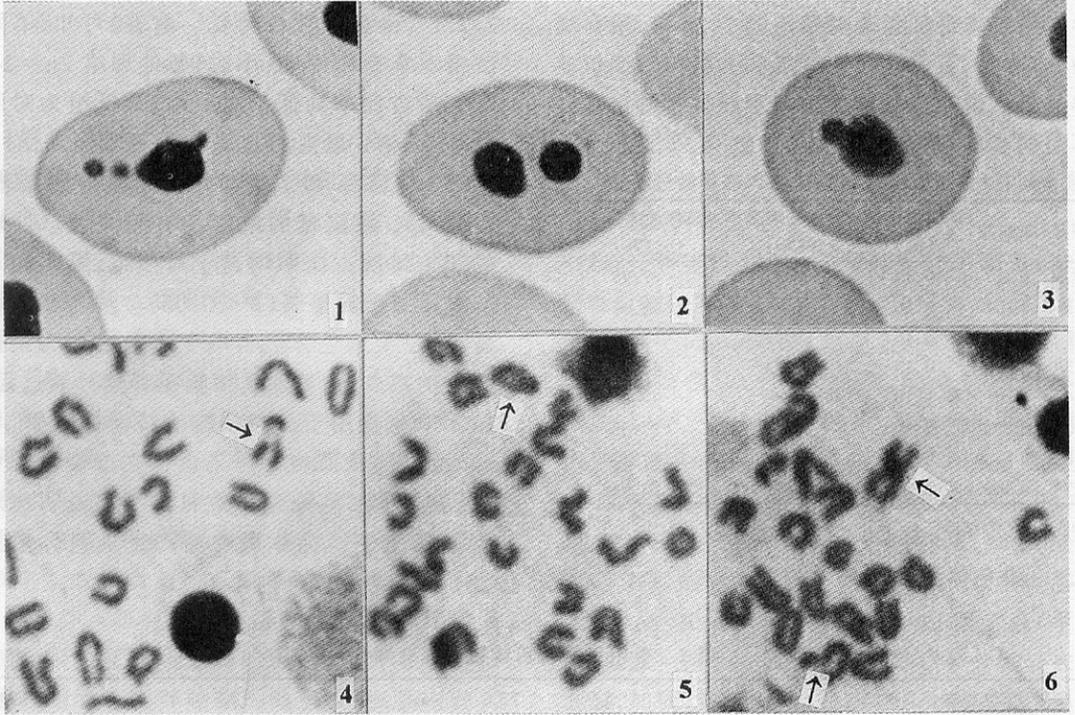


图1 双微核红细胞 图2 双核红细胞 图3 核质外凸红细胞 图4 染色体裂隙(箭头所示)
图5 着丝粒环(箭头所示) 图6 着丝粒融合和染色单体裂隙(箭头所示)

表3 各组黄鳍染色体结构畸变率

序号	观察细胞数	结构畸变细胞率(%)	染色体型畸变率(%)						单体畸变率(%)		结构畸变率(%)
			断裂	裂隙	着丝粒环	着丝粒融合	染色单体交叉	粘连	断裂	裂隙	
对照	217	7.55	0	0	3.20	0	0	1.13	1.81	2.29	8.42
1	256	38.75**	10.44	7.62*	10.25*	1.24	3.18	1.65	6.84	4.41	45.61**
2	236	31.65**	7.55**	1.21	13.19*	0.82	1.18	2.90	6.89*	0	33.73**
3	251	37.02**	11.38	4.50*	11.40	1.67	0.42	0.42	9.43*	0.77	39.98**
4	279	40.34**	4.04	3.15	23.13*	1.50*	1.10**	2.52	5.67	2.59	43.81**
5	295	38.01**	0.75	2.53*	24.13**	0.35	1.38*	1.50	5.77	2.59	39.05**
6	217	28.77**	3.16*	1.33	16.12**	0.44	2.30	3.60	4.61**	3.16	34.72*
7	236	29.69**	3.40	4.21*	16.09*	0.43	1.25	0	3.83	2.14	31.36**

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

2.3 黄鳍染色体畸变技术应用于淡水污染监测的可行性

多年来人们利用蝌蚪的红细胞微核率在淡水污染生物学监测方面有过一些应用^[6-8]。但蝌蚪的个体小、血量少,且它的红细胞属终端分化细胞,不能用作染色体畸变分析。而且有人提出红细胞微核和染色体畸变是相互独立的遗传学指标体系^[9],因此蝌蚪的红细胞微核技术不能全面反映淡水的污染程度,而黄鳍能很好的避免这一点。

目前,也有人利用泥鳅的红细胞微核和核异常监测淡水污染^[4]。但是泥鳅种类多,染色体数目也较多且小^[10]。黄鳍属合鳃目合鳃科,在我国只有一个种,在已研究过染色体的我国淡水鱼中,是染色体数目($2n=24$)最少的种类之一^[10],形态相对较大,且都是端着丝粒染色体,有利于观察统计畸变类型。

黄鳍染色体数目和结构畸变、红细胞微核和核异常技术本身具有经济、简便、可靠、全面等优点,而且对实验条件要求不高,有利于在一

定范围内推广使用。因此我们认为作为水生动物的黄鳝是用于淡水污染监测的好材料。

致谢 本文得到徐州师范大学生物学系遗传教研室全体人员的大力协助,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 李孙荣. 作物草害及其防除. 北京: 农业出版社, 1982. 52~53.
- [2] 钱颖, 彭永康. 苯黄隆对小鼠生精细胞及组织乳酸脱氢酶同工酶的影响. 华北农学报, 1994, 9(4): 116~118.
- [3] 唐玲芳, 张珍玲, 宋玲等. 新型林用除草剂环嗪酮的诱变性观察. 南京医科大学学报, 1995, 15(4): 743~745.
- [4] 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.
- [5] 周焱庚, 郑斯英. 人类染色体与辐射诱变. 北京: 原子能出版社, 1978. 163~180.
- [6] 贺维顺, 王蕊芳. 蝌蚪(*Bufo bufo andrewsi*) 血红细胞微核和核异常监测水质污染的研究. 动物学研究, 1990, 11(1): 1~5.
- [7] 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.
- [8] 陈军建, 夏宜玲. 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.
- [9] Evans, H. J. Mutation cytogenetics for hazardous matters inspection. *Mutation Research*, 1988, 240: 355~363.
- [10] 余先觉, 周喙, 李渝成等. 中国淡水鱼类染色体. 北京: 科学出版社, 1989. 4~125.