

根系急性吸收 1,2,4-三氯苯诱发 大蒜根尖细胞染色体异常^{*}

杜青平^{1,2,3}, 贾晓珊^{1,3}

(1 中山大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510275;

2 山西大学生命科学与技术学院, 山西 太原 030006

3 广东省环境污染控制与修复技术重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 通过 1,2,4-三氯苯 (1,2,4-TCB) 对大蒜幼苗的水培试验, 研究了不同浓度 1,2,4-TCB 对大蒜根尖分生细胞染色体异常的诱变作用。结果表明: 1,2,4-TCB 能抑制大蒜根尖分生细胞进入分裂态, 有丝分裂指数与 1,2,4-TCB 作用的剂量和时间之间呈现显著的负相关; 1,2,4-TCB 诱发大蒜根尖分生细胞产生微核、双核、核固缩、核崩解、染色体分裂不同步、赤道板偏转、不等分裂等染色体异常。这些异常细胞率与 1,2,4-TCB 的处理浓度成正相关。在各种染色体异常中, 核固缩异常居首位, 且呈现浓度和时间依赖性。结果表明 1,2,4-TCB 对大蒜根尖分生细胞具有有丝分裂抑制和染色体损伤作用, 具有明显的遗传毒性。

关键词: 关键词: 1,2,4-三氯苯; 大蒜; 染色体异常; 有丝分裂指数; 核固缩

中图分类号: X592 R9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 05 0118-05

1,2,4-三氯苯 (1,2,4-TCB) 是生产苯胺、染料、医药的重要原料及有机合成中间体, 也是农用杀虫剂如林丹、六六六等的降解产物, 以未经适当处理的废水、垃圾、废气和废渣等形式广泛存在于自然环境中^[1-2]。对 1,2,4-TCB 的毒性研究表明: 1,2,4-TCB 在动物体内代谢差异比较大, 能形成氧化中间产物^[3], 且在体内有明显的蓄积作用^[4]。尽管很多研究涉及到了 1,2,4-TCB 的遗传毒性和致突变性^[5], 但结果不尽一致。Sofuni 等研究发现 1,2,4-TCB 不具致突变性, 不引起染色体畸变和动物肿瘤; 但 Kerster 等研究发现 1,2,4-TCB 对盐水虾具致畸形^[6]。有关 1,2,4-TCB 对高等植物的遗传毒性和生态效应的研究甚少。本文初步研究了根系急性吸收 1,2,4-TCB 对大蒜幼苗根尖分生细胞染色体异常的诱发作用, 以探讨 1,2,4-TCB 胁迫对大蒜根尖细胞染色体的毒性效应, 为探索 1,2,4-TCB 的毒性作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 大蒜 (*Allium sativum*)

大蒜去皮, 水冲洗后随机分组, 基部浸入水中, 25℃恒温培养。每 12h 换水一次, 约 38~48h 后大蒜萌生新根, 可用于药物的监测处理。

1.2 被监测液处理根尖

1.2.1 溶液配制 1,2,4-TCB 纯度为 99.5%,

购自 Flukachemie AG 公司。1,2,4-TCB 用丙酮促溶后, 用双蒸水配制成 1 000 mg·L⁻¹。本试验中使用的丙酮浓度不超过 1 mg·L⁻¹。

1.2.2 大蒜实验分组与处理 大蒜萌生的新根生长到约 0.5~1.0 cm 时, 随机分成 5 组, 每组 50 株。其中 4 组分别用于不同浓度 1,2,4-TCB 处理, 第 5 组用自来水作阴性对照。阴性对照组和处理组大蒜分别用自来水或处理液浸没基部连续染毒。每 24h 更换自来水或者处理液。

1.2.3 根尖固定与染色 分别在染毒处理 24、48、72h 后, 从不同植株上随机剪取大蒜幼根, 以卡诺氏液固定 24h 后转入 70%乙醇中 4℃保存, 对已固定的所有根尖采用 Feulgen 法染色^[7]。

1.2.4 制片 切取根尖, 常规压片后进行光学显微镜观察并收集有关数据。每个处理组观察 10 棵植株的根尖约 4000 个细胞。

1.3 实验数据的统计与分析

对镜检所得数据进行方差分析, 采用 *t* 检验, 检测不同浓度处理组与阴性对照组间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 大蒜根尖细胞有丝分裂指数与 1,2,4-TCB 处理浓度和时间的关系

对 1,2,4-TCB 处理后的各组大蒜根尖分生细

* 收稿日期: 2005 11 15

基金项目: 国家“985”工程二期项目 (32000-3253282); 中山大学重点资助项目

作者简介: 杜青平 (1973 年生), 女, 讲师, 博士后, 通讯联系人: 贾晓珊; E-mail: jeesjcs@sysu.edu.cn

胞有丝分裂指数进行统计, 并用 1,2,4-TCB 浓度和有丝分裂指数作图, 结果见图 1。

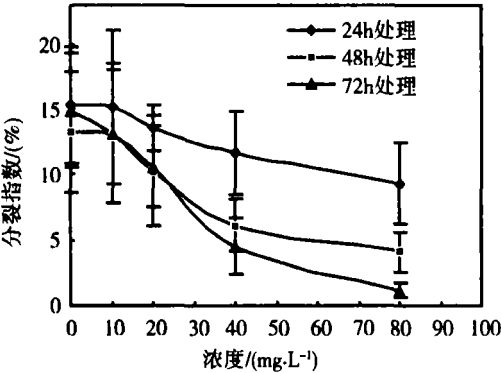


图 1 1,2,4-三氯苯对大蒜根尖分裂指数的影响
Fig. 1 Effects of 1,2,4-TCB on mitotic index of root meristematic cells of *Allium sativum* seedlings

从图 1 可见, 1,2,4-TCB 对大蒜根尖分生细胞有丝分裂指数有明显的抑制作用。这种抑制作用与 1,2,4-TCB 之间表现出一定的时间——效应和浓度——效应的关系。对 1,2,4-TCB 处理浓度和处理时间分别与根尖细胞有丝分裂指数进行相关分析, 求出回归方程并作图, 结果见图 2 图 3。

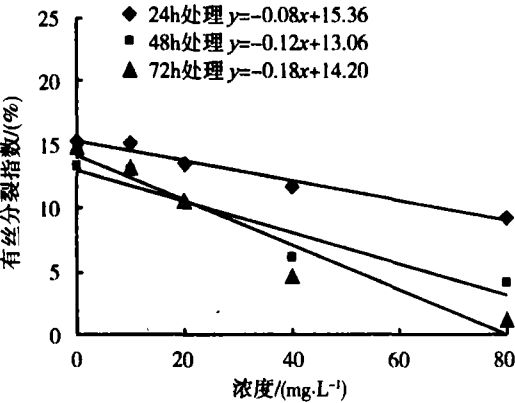


图 2 大蒜根尖细胞分裂指数与 1,2,4-三氯苯处理浓度的相关性
Fig. 2 Correlation between mitotic index of root meristematic cells of *Allium sativum* seedlings and 1,2,4-TCB concentrations

经相关分析, 24、48、72h 处理组大蒜根尖分生细胞有丝分裂指数与 1,2,4-TCB 处理浓度之间的相关系数 r 分别为 0.986 ($P < 0.01$)、0.952 ($P < 0.01$)、0.967 ($P < 0.01$)。这表明 1,2,4-TCB 处理浓度与大蒜根尖分生细胞有丝分裂指数之间呈现极显著的负相关 (图 2)。从图 3 中可见, 大蒜根尖有丝分裂指数与处理时间之间呈现明显的时间——效应关系, 在 40 和 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组, 有丝分裂指数和处理时间的相关系数 r 分别为 0.952

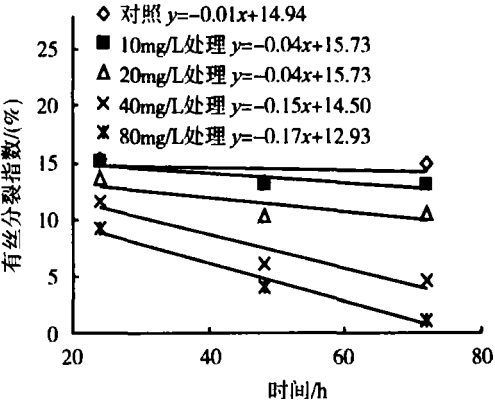


图 3 大蒜根尖有丝分裂指数与处理时间的相关性
Fig. 3 Correlation between mitotic index in root meristematic cells of *Allium sativum* seedlings and 1,2,4-TCB treated time

($P < 0.01$) 和 0.987 ($P < 0.01$), 这表明高浓度 1,2,4-TCB 处理 (40、80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组大蒜根尖有丝分裂指数与处理时间之间呈现显著的负相关。这些结果表明 1,2,4-TCB 能明显抑制大蒜根尖进入有丝分裂状态, 该抑制有时间依赖性和浓度依赖性。

2.2 1,2,4-TCB 诱发大蒜根尖分生细胞染色体异常现象

1,2,4-TCB 处理后不但引起大蒜根尖有丝分裂指数的改变, 还引起根尖分生细胞出现微核、双核、核固缩、赤道板偏转、不等分裂、染色体分裂不同步、核崩解等异常现象。

正常根尖细胞具有稀疏的细胞质, 并有均匀的染色质。经 1,2,4-TCB 处理后, 在镜检中发现, 有些细胞核核浆减少、核体积缩小、核边缘增厚, 网状核染色质凝集至完全固缩而致密, 且着色很深, 这样的核即为固缩核 (见图 4a)。

同样经 1,2,4-TCB 处理后, 有些根尖分生细胞中期细胞的染色体排列于细胞质的非中央区; 或与细胞中央赤道板成大小不同的夹角。有的细胞在分裂后期时, 两组子染色体中一组正常向极方向运动, 另一组却在细胞中央赤道板附近形成染色质, 细胞板在母细胞的非中央形成, 导致细胞质不均等分裂。(见图 4b、4c)

正常分裂的细胞, 两组子细胞的染色体一般同时进入中期、后期和末期, 然后在赤道板的位置形成细胞壁, 形成两个子细胞。而观察 1,2,4-TCB 处理后的细胞中, 有些细胞两组子染色体不同步进行有丝分裂 (图 4d), 一组染色体已经解螺旋, 变为染色质, 而另一组染色体还处于螺旋状态, 且图 4d 的根尖细胞经过有丝分裂没有形成两个子细胞, 却形成了双核细胞。

还有一些 1,2,4-TCB 处理后的细胞没有主核,

在核区内有数目不等的几个大小不同的小核,核之间相互游离,呈现均匀着色。还有的细胞中核膜消失,染色质分散在整个细胞质中,呈不均匀疏散网状核,这现象称为核崩解(图 4e)。

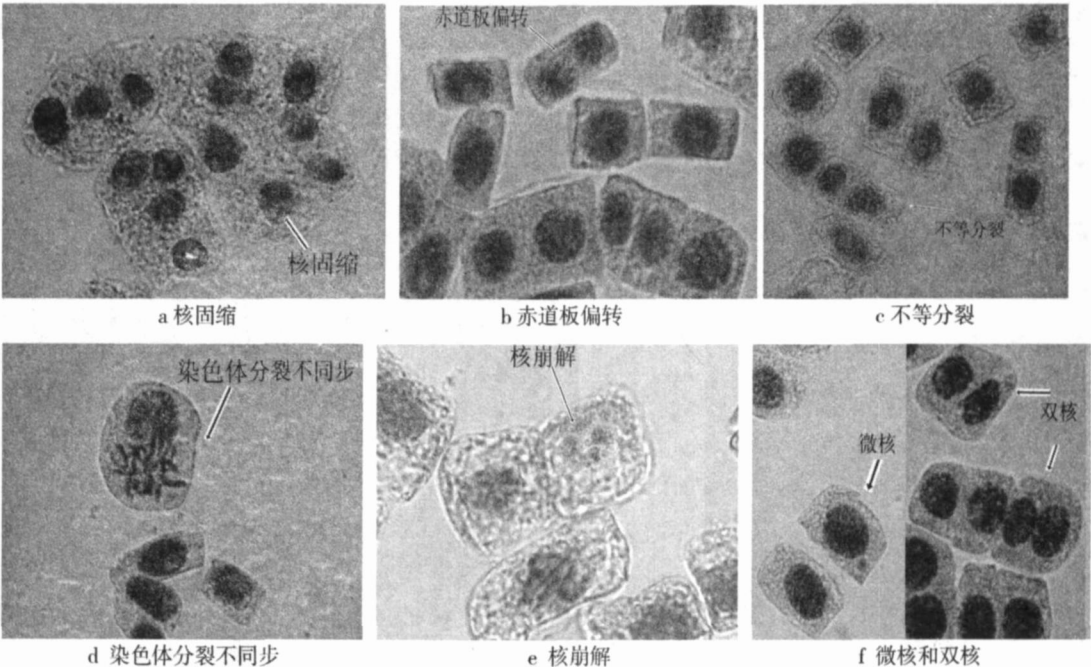


图 4 1 2 4-TCB 诱发大蒜根尖染色体异常

Fig. 4 1, 2, 4-TCB induced kinds of chromosome abnormalities in root meristematic cells of *A. sativum* seedlings

微核和双核是常见的染色体变异现象。如图 4f 所示,若细胞内两核相互游离,大小接近,细胞核呈网状或固缩,称为双核细胞。若一核是主核大小的 1/4 以下,着色与主核相当或稍浅并与主核分离的小核,称为微核。1, 2, 4-TCB 处理后的大蒜幼苗根尖细胞中有的有两个或三个微核。

2.3 1, 2, 4-TCB 与大蒜根尖分生细胞染色体异常性的相关性

观察 1, 2, 4-TCB 72h 处理根尖分生细胞有丝分裂的各种异常现象,记录结果见表 1。

一种染色体异常可在细胞中单独发生,或者一个细胞中同时有 2 种以上的异常发生。如图 4a 既发生核固缩,还有一个细胞内有微核异常。在镜检

记录时,多种异常现象并发时按一种异常计算。从表 1 中可见,随着 1, 2, 4-TCB 处理浓度的升高,大蒜根尖分生细胞各种异常细胞增加,总异常细胞数和细胞异常率升高。高浓度的 1, 2, 4-TCB (40、80 mg·L⁻¹) 引起大蒜根尖分生细胞核异常中以核固缩和双核为主。40 mg/L 组根尖分生细胞中核固缩和双核率分别为所观察细胞的 4.084% 和 0.297%; 80 mg·L⁻¹ 组根尖分生细胞核固缩和双核率分别为所观察细胞的 10.498% 和 0.365%。随着 1, 2, 4-TCB 处理浓度的提高,核崩解和赤道板偏转异常也逐渐增加。总异常细胞数目比对照组成倍或几十倍增多。40、80 mg/L 1, 2, 4-TCB 处理组总异常细胞率比对照组分别高 14.07 和 34.21 倍。

表 1 1, 2, 4-TCB 诱发大蒜根尖分生细胞染色体异常

Tab. 1 1, 2, 4-TCB induced chromosome abnormalities in root meristematic cells of *A. sativum* seedlings

浓度 (mg·L ⁻¹)	观察细胞 数	有丝分裂异常细胞							总异常 细胞数	细胞异 常率/(%)
		双 核	微 核	核固 缩	赤道板 偏转	不等 分裂	核崩 解	不同步 分裂		
0	4412	6	6	0	1	1	0	0	14	0.317
10	4478	6	6	5	2	1	0	0	20	0.447
20	4040	8	7	30	6	3	0	1	55	1.361
40	4040	12	6	165	8	4	2	0	197	4.876
80	4115	15	8	432	14	4	5	1	479	12.831

用 1,2,4-TCB 的处理剂量和染色体总畸变率作图, 并求回归方程:

$$y = 1.646x - 9.705$$

其中, y 表示异常细胞率; x 表示 1,2,4-TCB 的浓度。这表明 1,2,4-TCB 浓度与染色体异常率之间存在正相关性, 其相关系数 $r=0.984$ ($P<0.01$)。

表 2 1,2,4-TCB 诱导的大蒜根尖分生细胞核固缩
Tab.2 1,2,4-TCB induced the pycnosis of root meristematic cells of *A. sativum* seedlings %

处理	浓度 (mg L ⁻¹)	处理时间 h		
		24	48	72
阴性对照	0	0	0	0
1,2,4-三氯苯	10	0	0.058±0.024	0.112±0.033
	20	0.034±0.019	0.299±0.035	0.743±0.128
	40	1.356±0.638	4.051±0.872	4.084±1.259
	80	2.917±0.814	9.682±2.017	10.498±3.659

表 2 数据显示, 1,2,4-TCB 诱导大蒜根尖分生细胞细胞核固缩具有一定的时间效应和剂量效应关系, 随着 1,2,4-TCB 处理浓度增大和作用时间延长, 大蒜幼根分生细胞核固缩率增高。且对大蒜培养过程生长状况的观察发现, 高浓度处理组中, 大蒜的部分根尖颜色发灰, 甚至腐烂。所以在选择用于镜检的根尖时, 尽可能选择没有表现伤害的根尖。但在试验中发现, 不同的大蒜根尖中细胞核固缩的细胞数目相差较大, 有的根尖只有很少的细胞发生核固缩, 有的根尖却有很多的细胞发生核固缩, 甚至大部分根尖发生细胞核固缩。

3 讨论

1,2,4-TCB 作为其它氯苯类化合物的降解产物, 及一些化工材料和农药的原料和中间体广泛存在于环境介质中。在我国, 1,2,4-TCB 的污染非常严重, 在沈阳、广州等城市及其周边地区土壤和地下水中检测浓度均很高^[8,9], 这将导致农产品中该类化合物的积累, 进而通过食物链危害人类健康。而无性繁殖系植物大蒜, 适于在我国大部分农业地区种植, 是主要的蔬菜作物之一, 其产量和质量对农业生产具有重要意义。细胞有丝分裂及染色体异常是环境污染监测中常用的两项指标。本文用大蒜根尖分生细胞为研究对象, 对 1,2,4-TCB 的有丝分裂和染色体毒性展开研究。结果发现: 1,2,4-TCB 能抑制大蒜根尖分生细胞进入分裂态, 有丝分裂指数与 1,2,4-TCB 作用剂量和时间之间呈现显著的负相关。1,2,4-TCB 诱发大蒜根细胞产

2.4 1,2,4-TCB 诱发大蒜根尖分生细胞核固缩异常

在镜检中发现, 核固缩异常占总染色体异常的首位, 所以, 对 1,2,4-TCB 处理 24h、48h、72h 的各组大蒜根尖分生细胞的核固缩异常进行统计分析, 结果见表 2

生微核、双核、核固缩、核崩解、染色体不同步分裂、赤道板偏转、不等分裂等染色体异常。这些异常细胞率与 1,2,4-TCB 的处理浓度成正相关。这表明大蒜根尖分生细胞染色体异常与根尖细胞有丝分裂指数之间存在着一定的关系。如果大蒜根尖细胞染色体异常, 使遗传物质的稳定性破坏, 细胞就无法进入有丝分裂期, 从而使分裂细胞减少, 有丝分裂指数降低。

试验中还发现, 在大蒜根尖分生细胞的各种染色体异常中, 核固缩异常居首位, 且核固缩异常比率随着 1,2,4-TCB 的处理浓度升高和处理时间延长而升高。核固缩是细胞凋亡或即将坏死的特征形态^[10]。细胞凋亡在形态学上表现为细胞萎缩, 核固缩, 染色体凝集等, 是生物体在长期进化过程中处理有害或损害细胞的一种机能。当细胞的 DNA 损伤严重, 修复无望时, 细胞即走向凋亡或死亡^[11]。这表明高浓度的 1,2,4-TCB 会导致大蒜根尖细胞急性中毒, 出现根尖组织坏死、细胞死亡。试验中高浓度组部分根尖细胞几乎全部固缩, 部分细胞核解体, 而有的大蒜根尖细胞中核固缩细胞比较少, 这种情形可能是因为不同大蒜根尖个体对环境的适应性不同, 有的个体对 1,2,4-TCB 的作用适应较强, 能继续分裂生长; 而有的个体不能适应 1,2,4-TCB 的毒理作用, 致使细胞停止分裂并逐步死亡。

1,2,4-TCB 对大蒜根尖分生细胞有丝分裂指数及染色体损伤效应的结果表明: 1,2,4-TCB 能够对大蒜造成明显遗传损伤, 从而对其它农作物也

具有潜在的遗传损伤效应, 对于农产品的质量和产量的稳定性存在威胁。

4 结 论

1, 2, 4-TCB 能抑制大蒜根尖分生细胞有丝分裂过程, 该效应具有 1, 2, 4-TCB 处理时间和浓度依赖性; 1, 2, 4-TCB 诱发大蒜根尖分生细胞产生各种染色体异常; 总的细胞染色体异常率与 1, 2, 4-TCB 浓度之间呈现正相关。在各种染色体异常效应中, 核固缩居首位, 这表明高浓度的 1, 2, 4-TCB 能引起大蒜根尖细胞急性毒性并坏死。因此, 1, 2, 4-TCB 对大蒜幼苗具有遗传毒性作用。

参考文献:

- [1] JONES K G, VOOGT P De. Persistent organic pollutants (POPs): State of the science [J]. *Environmental Pollution* 1999 100: 209-211.
- [2] HENRIK S, NOELLE E. Science, politics and persistent organic pollutants: the role of scientific assessments in international environmental co-operation [C] // *International Environmental Agreements: Politics, Law and Economics* 2003(3): 17-42.
- [3] KATO Y, YAMADA S, SATO M, et al. Role of 2, 3, 5-trichlorophenyl methyl sulfone, a metabolite of 1, 2, 4-trichlorobenzene, in the induction of hepatic microsomal drug metabolizing enzymes by 1, 2, 4-trichlorobenzene in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993 122(2): 214-220.
- [4] NICHOL A W, ELSBURY S, ROUSSEAU C G. Porphyrin accumulation in sheep bones associated with 1, 2, 4-trichlorobenzene [J]. *Bull Environ Contam Toxicol* 1981 27: 72-78.
- [5] SOFUNIT, HAYASHIM, MATSUOKA A, et al. Mutagenicity tests on organic chemical contaminants in city water and related compounds II. chromosome aberration tests in cultured mammalian cells [J]. *Eisei Shikenjo Hokoku* 1985 103: 64-70.
- [6] KERSTER H W, SCHAEFFER D J. Brine shrimp (*Artemia salina*) nauplii as a teratogen test system. [J]. *Ecotoxicol Environ Saf* 1983 7(3): 342-349.
- [7] 金波, 陈光荣. 遗传毒理与环境检测, 第 1 版 [M]. 武汉: 华中师范大学出版社, 1998: 276-278.
- [8] 张丽珊, 于殿臣. 慢速渗漏土地系统对沈阳西部城市污水中有机污染物的净化效果 [J]. *应用生态学报*, 1992 3(4): 355-363.
- [9] 万大娟, 贾晓珊. 耕作土壤中多氯代有机污染物的含量与分布特征—以珠江三角洲部分地区为例 [J]. *环境科学学报*, 2005 25(8): 1078-1084.
- [10] 张贵友, 田瑞华, 戴尧仁. 植物细胞凋亡的研究进展 [J]. *生物工程进展*, 2001 21(6): 22-27.
- [11] 黄长晖, 傅继梁. 从 DNA 修复机理看细胞癌变的发生机制. *生物化学与生物物理进展*, 1996 23(5): 413-417.

Effects of 1, 2, 4-Trichlorobenzene on the Chromosome Abnormalities in Root Meristematic Cells of *Allium sativum* Seedlings

DU Qing-ping^{1, 2, 3}, JIA Xiao-shan^{1, 3}

(1. School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

2. College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Guangdong Provincial Key Lab of Environmental Pollution Control and Remediation Technology, Guangzhou 510275, China)

Abstract The damage effects of 1, 2, 4-trichlorobenzene (1, 2, 4-TCB) on the chromosome abnormalities in root meristematic cells of *Allium sativum* seedlings were studied. The results show that 1, 2, 4-TCB inhibited the mitosis of root meristematic cells of *Allium sativum* seedlings. The mitotic index in root meristematic cells decreased in treated time-response and dose-response manners. Kinds of chromosome abnormalities were induced in root meristematic cells by 1, 2, 4-TCB such as micronuclei, binucleated cells, pycnosis, nuclear fragmentation, lagging in division cells, equatorial plate deflexion, unequal division. The ratio of chromosome abnormalities increased in dose-response manner. Pycnosis dominated among various kinds of chromosome abnormalities. Conclusion is that 1, 2, 4-TCB could inhibit the mitosis and damage the chromosomes of root meristematic cells of *Allium sativum* seedlings, suggesting that 1, 2, 4-trichlorobenzene has clear genetic toxic effects on plant cells.

Key words 1, 2, 4-trichlorobenzene; *Allium sativum*; chromosome abnormality; mitosis index; pycnosis