

硫酸铜对蚕豆根尖细胞有丝分裂的影响

钱晓薇

(温州师范学院生命与环境科学学院, 温州 325003)

摘要:以蚕豆根尖为材料,研究硫酸铜对蚕豆根尖细胞的遗传毒性效应。采用蚕豆根尖细胞的微核试验方法和染色体畸变试验方法,以不同浓度的硫酸铜为诱变剂,测定蚕豆根尖细胞的有丝分裂指数、微核率和染色体畸变率。结果表明:不同浓度的硫酸铜均能使蚕豆根尖细胞有丝分裂指数明显增加,即5个实验组的分裂指数均明显高于对照组($P<0.01$ 或 $P<0.001$);不同浓度的硫酸铜对蚕豆根尖细胞有丝分裂各期百分数的影响各异;能诱发较高频率的微核率,即在一定浓度范围内,其微核率随硫酸铜处理浓度的升高而增加,但随着硫酸铜浓度的进一步升高而呈下降趋势;硫酸铜还能诱导染色体产生多种类型的畸变,染色体畸变率随硫酸铜处理浓度的升高而增加,随着硫酸铜浓度的进一步升高而呈下降趋势,但均明显高于对照组($P<0.001$)。结论是硫酸铜对蚕豆根尖细胞具有明显的遗传毒性效应。

关键词:硫酸铜;蚕豆;有丝分裂指数;微核率;染色体畸变率

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)02-171-06

随着工业、养殖业的发展,以及矿产资源的开发利用,重金属污染的问题日益突出。许多研究表明铝、砷对动、植物具有明显的致突、致畸效应^[1-5]。铜是动、植物生长所必需的一种微量元素。硫酸铜是水产养殖中常用的杀菌、杀藻剂,且硫酸铜可用于防治鱼类小瓜虫病、鱼类纤毛虫病、鞭毛虫病等^[6,7]。在农业上用铜盐作微量元素肥料可使农作物显著增产,但过量的铜会对动、植物产生毒害作用^[8-10]。至今尚未见硫酸铜对植物根尖细胞有丝分裂影响的报告,为此我们进行了这方面的研究,以探明硫酸铜对植物根尖细胞的有丝分裂的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

蚕豆(*Vicia faba* L.)产于洞头,为一年新种。硫酸铜由宜兴县化学试剂厂出品,为分析纯。用蒸馏水将其配制成0.05g/L、0.10g/L、0.25g/L、0.50g/L、1.00g/L 5个不同的浓度。

1.2 方法

选择饱满、大小均匀的蚕豆种子于蒸馏水中浸泡1d,让其吸胀。23℃恒温培养,12h换水1次。待根长至1~2cm时,分别用蒸馏水及0.05g/L、0.10g/L、0.25g/L、0.50g/L、1.00g/L 5种浓度的

表1 分组及处理

组别	根尖数(n)	CuSO ₄ 浓度(g/L)
I (对照组)	10	0
II	10	0.05
III	10	0.10
IV	10	0.25
V	10	0.50
VI	10	1.0

硫酸铜溶液处理4h,恢复培养24h,用卡诺氏固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1, V/V)固定24h,置70%乙醇于4℃冰箱中保存。取根尖的分生组织,常规制片,用改良石炭酸品红染液染色^[3]。压片镜检,观察统计细胞有丝分裂指数、微核百分率、染色体畸变百分率,并对具有畸变的细胞进行显微摄影。实验分组及处理见表1。

1.3 统计方法

均采用SPSS 10.0数据处理系统进行方差分析。

2 结果

2.1 CuSO₄对蚕豆根尖细胞有丝分裂指数的影响

收稿日期: 2003-07-25; 修回日期: 2003-09-08

温州市“551人才工程”基金资助; 温州市科技局基金资助(编号: S2002A015)

E-mail: qxw@mail.wzptt.zj.cn

表2 CuSO₄对蚕豆根尖细胞分裂指数的影响

组别	分裂细胞数/1000个细胞/根尖(x)										分裂指数 % ($\bar{x} \pm s$)
I (对照组)	45	46	41	42	43	48	45	40	43	50	4.43±0.31
II	67	72	68	70	75	70	72	68	69	67	6.98±0.26***
III	105	108	110	94	108	118	120	96	107	111	10.77±0.82***
IV	85	83	88	78	71	74	70	75	65	78	7.67±0.72***
V	57	51	56	50	54	56	61	49	49	52	5.35±0.40***
VI	47	52	48	51	56	50	52	58	49	47	5.10±0.37**

注:与对照组比较, **代表 $P < 0.01$, ***代表 $P < 0.001$ 。根尖数(n)10。

表3 CuSO₄对各分裂期细胞百分数的影响

组别	前期($\bar{x} \pm s$)%	中期($\bar{x} \pm s$)%	后期($\bar{x} \pm s$)%	末期($\bar{x} \pm s$)%
I (对照组)	52.70±5.29	18.60±2.67	5.90±1.37	22.80±3.58
II	55.20±6.25	18.80±2.39	6.10±1.29	19.90±5.67
III	57.20±2.86*	18.90±1.79	6.30±1.16	17.60±2.67**
IV	56.10±3.07	20.10±2.38	7.60±1.07**	16.20±1.69***
V	53.40±3.78	19.40±1.71	7.30±0.67**	19.90±3.07
VI	57.40±3.06*	22.60±3.10***	3.80±0.79***	16.20±2.97***

注:与对照组比较, *代表 $P < 0.05$, **代表 $P < 0.01$, ***代表 $P < 0.001$ 。

表4 CuSO₄对蚕豆根尖细胞微核率的影响

组别	观察间期细胞数/根尖	微核细胞数/根尖										微核率% ($\bar{x} \pm s$)
I (对照组)	1000	4	3	2	3	4	2	3	4	1	1	2.70±1.16
II	1000	10	11	9	12	10	11	11	13	9	9	10.50±1.35***
III	1000	20	23	23	21	22	21	19	20	20	19	20.80±1.48***
IV	1000	15	17	15	16	16	17	14	17	14	15	15.60±1.17***
V	1000	14	15	17	13	17	14	14	16	15	14	14.90±1.37***
VI	1000	10	8	9	7	9	9	9	10	9	7	8.70±1.06***

注:与对照组比较, ***代表 $P < 0.001$ 。根尖数(n)10。

表2表明, 5个实验组与组I(对照组)比较, 其分裂指数均有显著差异, 即5个实验组的分裂指数均明显高于对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。分裂指数随着CuSO₄浓度的增加而升高, 组III为最大值, 随着CuSO₄浓度的进一步增加分裂指数反而有所下降。组II与III比较、组III与IV比较、组IV与V比较, 差异均极为显著($P < 0.001$)。

2.2 CuSO₄对蚕豆根尖细胞有丝分裂各期百分数的影响

表3表明, 实验组与对照组比较, 其前期、中期细胞百分数均高于对照组, 其中组VI的达显著水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。后期细胞百分数随着CuSO₄浓度的增加而上升, 但随着CuSO₄浓度的进一步增加后期细胞百分数则明显下降, 组IV为最大值。其中组IV、V以及VI与对照组的比较均差异极为显著($P < 0.001$)。5个实验组的末期细胞百分数均低于对照组, 其中组III、IV及VI的均明显低于对照组的($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。

2.3 CuSO₄对蚕豆根尖细胞微核率的影响

由表4可见, CuSO₄能诱发较高频率的微核,

5个实验组的微核率均明显高于对照组($P < 0.001$), 其中组III的微核率为最大值。在实验浓度范围内, 微核率随CuSO₄浓度的升高而增加, 在0.10g/L浓度时达最大值, 随着CuSO₄浓度的进一步增加微核率反而下降。组II与III比较、组III与IV比较、组V与VI比较, 差异均极为显著($P < 0.001$)。

2.4 CuSO₄对蚕豆根尖细胞染色体畸变率的影响

从表5可见, CuSO₄有明显的诱发蚕豆根尖细胞染色体畸变的作用, 5个实验组的染色体畸变率均明显高于对照组($P < 0.001$), 其中组IV的染色体畸变率为最大。畸变率随着CuSO₄浓度的升高而增加, 在0.25g/L浓度时达最大值, 随着浓度的进一步增加染色体畸变率反而下降。组II与III比较、组III与IV比较、组IV与V比较, 差异均极为显著($P < 0.001$); 组V与VI比较差异显著($P < 0.05$)。

2.5 CuSO₄对蚕豆根尖分生组织细胞有丝分裂的影响

硫酸铜处理蚕豆根尖细胞后, 可导致多种类型的染色体畸变。包括间期的单微核、双微核; 前期的微核; 中期的微核、断片、染色体黏连、染色体

表5 CuSO_4 对蚕豆根尖细胞染色体畸变率的影响

组别	观察间期细胞数 / 根尖	染色体畸变细胞数										畸变率 % ($\bar{X} \pm s$)
I (对照组)	400	9	8	7	9	7	6	6	9	8	9	2.10±0.50
II	400	14	15	18	13	12	15	16	17	14	13	3.68±0.47***
III	400	21	18	17	17	21	20	21	18	20	19	4.80±0.40***
IV	400	25	29	26	30	28	32	28	28	29	26	7.03±0.52***
V	400	19	23	25	19	21	21	22	21	17	19	5.18±0.58***
VI	400	22	20	20	19	15	20	19	18	19	17	4.73±0.48***

注：与对照组比较，*** $P < 0.001$ 。根尖数(n)10。

分散等畸变类型；后期出现滞后染色体、断片、染色体桥、染色体移动不同步等畸变类型。末期出现染色体桥、染色体滞留、解螺旋不同步等现象。

2.5.1 间期 细胞分裂间期的异常主要出现微核，各组间期微核占间期异常的百分比均为100%。其中有单微核(图1-1)、双微核(图1-2)。

2.5.2 前期 此期的异常表现主要是微核(图1-3、4)，组I、II、III、IV、V、VI前期微核占前期异常的百分比分别为80.0%、82.5%、81.0%、75.8%、77.0%、78.0%。前期的微核是上次有丝分裂过程中染色体受损或染色体活动异常而形成的^[8]。

2.5.3 中期 中期染色体异常包括微核(图1-5)、断片的出现(图1-6)、即有断片又有染色体的黏连(图1-7)、染色体的粘连(图1-8)、染色体的滞留(图1-9)、染色体的分散(图1-10)等畸变类型。

2.5.4 后期 与正常分裂相比较，后期出现染色体向两极移动时的严重不同步性而导致后期出现部分染色体的滞后现象、断片以及微核的形成等。

(1) 染色体的滞后现象 绝大多数染色体正常移向两极，仅个别染色体或片段滞留于两极之间(图1-11)。这反映了个别染色体移向两极的速度和进程是不同的。

(2) 染色体移动不同步及微核的出现 由于染色体的损伤或由于纺锤丝的破坏而造成后期个别子染色体移动不同步，并形成微核(图1-12、13)。

(3) 染色体桥的形成 染色体桥的形成是细胞分裂异常和染色体畸变的主要特征之一。桥的形成是由于染色体断裂再融合形成双着丝粒和无着丝粒的染色体片段的结果。所以染色体桥的形成往往伴有染色体断片的出现，有单桥、双桥和多桥(图1-11、14、15、16)。

(4) 染色体数目的加倍 由于有丝分裂过程中纺锤丝被破坏，两组子染色体不能移向两极而停留在一个细胞内，导致染色体数目的加倍(图1-17)。

2.5.5 末期 末期的异常情况主要有染色体断片、落

后染色体、末期染色体桥及染色体解螺旋不同步等。

(1) 染色体桥的出现 末期出现的染色体桥主要为有单桥(图1-18)。

(2) 染色体的滞留现象 由于个别染色体受损或活动异常，从而导致了染色体或染色体断片滞后现象(图1-19)。

(3) 染色体的解螺旋不同步 有丝分裂的末期实际上是一子核重建过程，当染色体到达两极后就开始解螺旋。由于个别染色体活动异常而出现解螺旋不同步，即大部分染色体已解螺旋形成染色质、个别未解螺旋仍以染色体状态存在(图1-20)。

3 讨论

蚕豆根尖微核及染色体畸变实验技术近年来逐渐应用于监测环境污染(包括重金属污染)，进行遗传毒理学研究或筛选诱变剂等工作。蚕豆根尖细胞染色体大而数量少，细胞分生组织增殖周期短，诱变剂进入植物体后通过切断DNA分子或干扰DNA合成与修复，造成染色体损伤，或引起纺锤体丝断裂及其他畸变而导致微核及各种染色体畸变的形成，其结果能阐明污染物对生物及人体的危害程度和损伤机制^[12]。

本实验发现，不同浓度 CuSO_4 均能使蚕豆根尖分生组织细胞分裂指数增加，即5个实验浓度 CuSO_4 的分裂指数均明显高于对照组的。 CuSO_4 还能诱发较高频率的微核率，5个实验组的微核率均明显高于对照组；并且微核率随着 CuSO_4 浓度的增加而升高，在0.10g/L浓度时微核率的值为最大，随着 CuSO_4 浓度的进一步升高微核率则出现下降。有关资料表明，微核的形成途径有两条：一条途径是由于前一分裂周期 G_2 期后产生的染色体断片在分裂过程中不能与正常染色体协调活动，在进入间期时，即被排斥于核外形成的；另一条途径是由于各种形式的落后染色体、未及中板集合染色体以及染色体分组造成的^[10]。

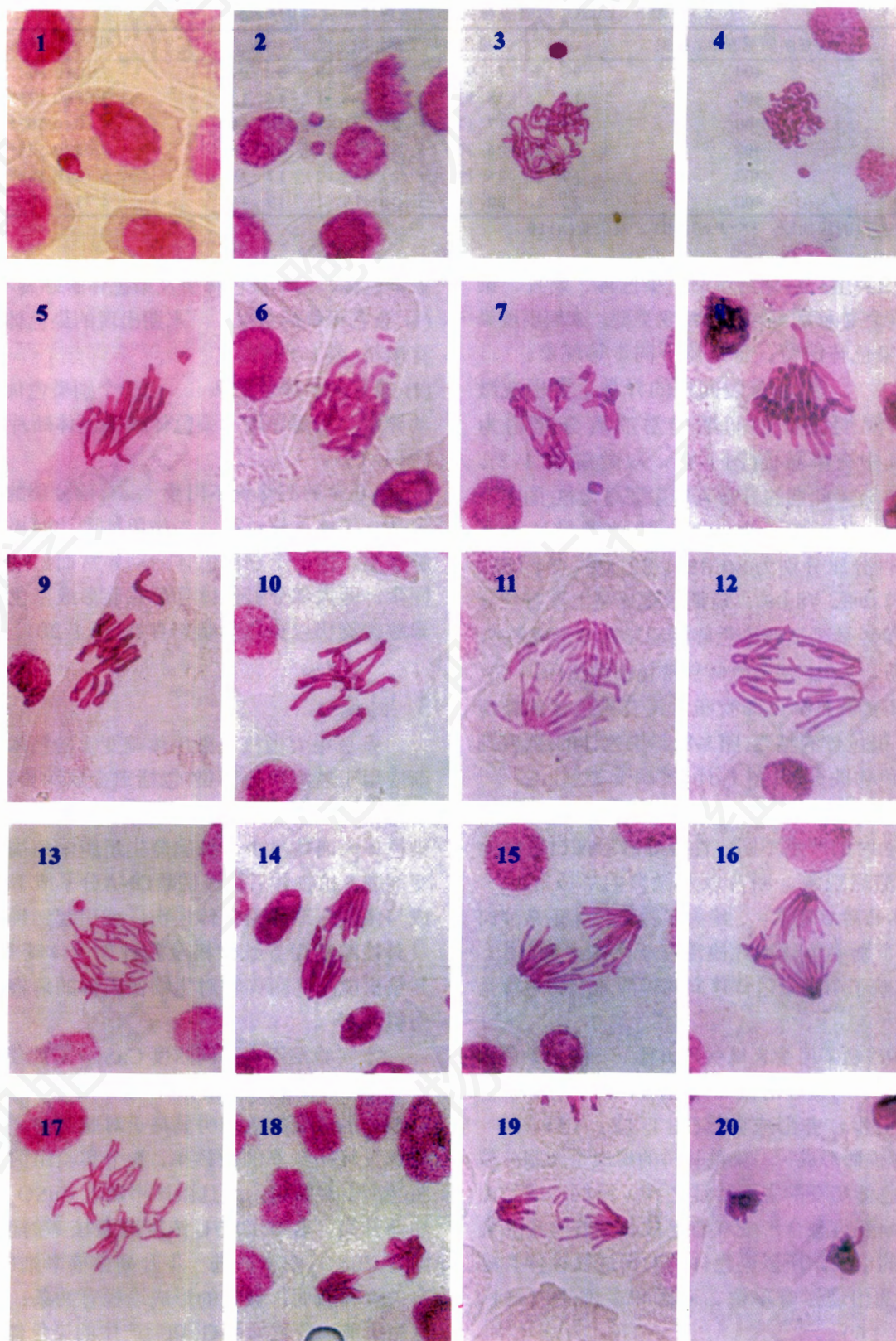


图1 硫酸铜对蚕豆根尖细胞有丝分裂的影响

1、2: 间期单微核及双微核; 3、4: 前期微核; 5: 中期微核; 6: 中期染色体断片; 7、8: 中期染色体黏连及断片; 9: 中期染色体滞留; 10: 中期染色体分散; 11: 后期染色体滞留; 12、13: 后期染色体移动不同步及微核; 14、15、16: 后期染色体桥及滞留; 17: 染色体数目加倍; 18: 末期染色体桥; 19: 末期染色体滞留; 20: 末期染色体解螺旋不同步。

染色体畸变产生可能有几条途径: 一是由于药物直接作用于 DNA 分子, 造成 DNA 断裂损伤, 从而引起染色体畸变; 二是由于药物干扰了 DNA、蛋白质合成或 RNA 的转录, 结果使与染色体运动有关的物质不能形成, 由此形成染色体畸变; 三是药物还可通过干扰某些损伤的正常修复过程, 阻止染色体在正常情况下的重建, 而形成新的重接, 出现染色体桥、环、断片之类的重排。落后染色体、未及中板集合染色体, 均可能是由于硫酸铜破坏了纺锤丝的功能或形成, 也可能是干扰了染色体某些自身的运动规律而使染色体不能及时到达赤道板, 造成落后。染色体数目的多倍性, 也是由于纺锤丝被破坏使得子染色体移向两极受到障碍, 从而造成两组子染色体滞留在同一细胞内。实验表明不同浓度的 CuSO_4 均可导致多种类型的染色体畸变, 而且畸变率随着 CuSO_4 处理浓度的增加而升高, 在 0.25g/L 浓度时畸变率的值为最大, 随着 CuSO_4 浓度的进一步增加则呈现下降。综上所述, CuSO_4 对蚕豆根尖细胞微核率及染色体畸变率的影响总趋势是一致的, 即微核率及染色体畸变率均随着 CuSO_4 浓度的增加而升高, 随着 CuSO_4 浓度的进一步增加而出现下降。

本实验发现分裂细胞中有染色体片段、染色体桥的出现, 说明 CuSO_4 对蚕豆根尖细胞染色体的主要组成物质 DNA 的结构组成已造成一定影响。 CuSO_4 对蚕豆根尖细胞遗传毒性效应已得到充分证实, 但对蚕豆的其他生物学效应及其分子机制有待于进一步的研究和探讨。

参 考 文 献

- [1] 钱晓薇, 硫酸钾、硫酸铝对小鼠骨髓细胞致突变性的研究[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(5): 377 - 378.
- [2] 钟晓芝, 钱晓薇. 明矾对蚕豆根尖和大蒜毒性效应的细胞遗传学比较研究[J]. 江西科学, 2003, 21(2): 101 - 105.
- [3] 钱晓薇, 朱小春, 陈哲晓, 等. 三氧化二砷(As_2O_3)对蚕豆根尖细胞遗传学毒性效应的研究[J]. 遗传, 2002, 24(3): 305 - 309.
- [4] 钱晓薇. 三氧化二砷(As_2O_3)对雄性小鼠的遗传毒性的研究[J]. 细胞生物学杂志, 2003, 25(3): 179 - 181.
- [5] 钟晓芝, 钱晓薇. 三氧化二砷(As_2O_3)对蚕豆根尖微核率及果蝇发生量的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 2003, 15(2): 104 - 106.
- [6] 鲁双庆, 刘红玉. Cu^{2+} 对黄鳝肝脏保护酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性的影响[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 138 - 141.
- [7] 李 达, 陈道印, 肖季兰. 硫酸铜引起鱼类中毒的原因剖析[J]. 江西水产科技, 2000, 84(4): 39 - 40.
- [8] NAGALAKSHMI N, PRASAD M N V. Copper-induced oxidative stress in *Scenedesmus bijugatus*: Protective role of free radical scavengers[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1998, 61(5): 623 - 628.
- [9] OUZOUNIDOU G. Copper-induced changes on growth, methal content and photosynthetic function of *Alyssum montanum* Plants[J]. Environ Experi Botan, 199, 34(2): 165 - 172.
- [10] 杨再福. 铜(Cu^{2+})对中华大蟾蜍蝌蚪的毒性试验[J]. 环境保护科学, 2000, 26(总 101): 37 - 38.
- [11] 李 宏. 饱和对二氯苯液诱导小麦根尖细胞异常性的研究[J]. 渝州大学学报(自然科学版), 1997, 14(1): 36 - 42.
- [12] 戴 敏, 吴 琼, 周心一, 等. 应用蚕豆根尖及叶尖细胞微核技术检测 TNT 及车间空气的诱变性[J]. 癌变·畸变·突变, 1995, 7(1): 58 - 61.

The Effect of Copper Sulphate on Mitosis of *Vicia faba* Root Tip Cells

QIAN Xiao Wei

(School of Life and Enviromental Science, Wenzhou Normal College, Wenzhou 325003, China)

Abstract: In this paper we studied the cytogenetic toxicity effects of different concentrations of copper sulphate on *Vicia faba* root tip cells. With different concentrations of copper sulphate as mutagen, we used the micronucleus assay and chromosome aberration assay to determine mitotic index, micronucleus rate and chromosome aberration rate of *Vicia faba* root tip cells. The result showed that different concentrations of copper sulphate could apparently increase mitotic index, that is to say, the mitotic indexes of five test groups were significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). In the meantime, copper sulphate could also increase the micronucleus rate of *Vicia faba* root tip cells. Within certain range of concentration of copper sulphate, the rate of micronucleus was

found to increase systematically with the added concentration of copper sulphate, and then to decrease systematically with the concentration. Copper sulphate also caused various types of chromosome aberration. The rate of chromosome aberration was found to increase systematically with the increase of added concentration of copper sulphate for the lower concentration, and then to decrease systematically with the increase of added concentration of copper sulphate for the higher concentration, although still significantly higher than that of the control group ($P < 0.001$). The result was that copper sulphate had systematical effect of cytogenetic toxicity.

Key words: copper sulphate; *Vicia faba*; mitotic index; the micronucleus rate; the rate of chromosome aberration

This work was supported by "551 Talented Man Engineering" of Wenzhou and Wenzhou Technology Bureau(No. S2002A015)
E-mail: qxw@mail.wzptt.zj.cn