

## 硝基苯诱发大豆根尖细胞遗传畸变研究

李蕊<sup>1</sup>, 冯海涛<sup>1</sup>, 郭东林<sup>1</sup>, 陈国友<sup>2</sup>, 郭长虹<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>哈尔滨师范大学生命与环境科学学院生物学系, 黑龙江 哈尔滨 150025; <sup>2</sup>黑龙江省农业科学院谷物品质研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**硝基苯是生产苯胺、联苯胺、二硝基苯的过程中的中间体,也是许多商业产品的主要成分。为了研究硝基苯对作物的遗传毒性,以大豆为试验材料,用硝基苯溶液处理大豆根部,进行了微核试验和染色体畸变试验。结果表明:硝基苯可以诱发多种类型的染色体畸变,主要有间期的微核、双核;中期的染色体断片;后期的染色体桥、染色体落后等。对硝基苯的诱变机理进行了分析,认为硝基苯可能是直接与 DNA 作用引起其断裂,也可能是通过激发细胞内的自由基反应而导致染色体畸变。

**关键词:**硝基苯;大豆;遗传畸变

**中图分类号:**S565.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2008)03-0539-04

## Genetic Aberration on Root Tip Cells of Soybean (*Glycine max*) Induced by Nitrobenzene

LI Rui<sup>1</sup>, Feng Hai-tao<sup>1</sup>, GUO Dong-lin<sup>1</sup>, CHEN Guo-you<sup>2</sup>, GUO Chang-hong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Biology and Environment, Harbin Normal University, Harbin 150025; <sup>2</sup>Center of Cereal Quality Research, Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Nitrobenzene is an intermediate in the synthesis of aniline, benzidine and dinitrobenzene, and it is also a component in a number of commercial products. Nitrobenzene has been shown to induce cancers in many tissues of animals. In order to study the mutant effect of soybean root tip cells induced by Nitrobenzene, the abnormality was observed through plant cell micronucleus assay and chromosomal aberration test assay. The result showed that Nitrobenzene induced various types of chromosome aberration on soybean root tips, such as micronuclear and binuclear in interphase; chromosome fragments in metaphase; chromosome bridges and laggard chromosomes in anaphase. The mechanism of chromosomal aberration is probable that Nitrobenzene arise DNA breakage directly or excite free radical reaction in cells indirectly.

**Key words:** Nitrobenzene; Soybean (*Glycine max*); Genetic aberration

硝基苯是一种有毒物质,在工业中作为生产农药、炸药及橡胶硫化促进剂的原料和生产苯胺、联苯胺、二硝基苯等多种医药和染料的中间体得到广泛的应用。工业的迅速发展造成苯、硝基苯类环境污染日益加重。有证据表明硝基苯可损伤体外培养的肝细胞,具有一定的细胞毒性。对于硝基苯水体污染的危害研究,过去集中在硝基苯对水生动物的影响,如,硝基苯能抑制鲤鱼鳃 ATPase 活性<sup>[1]</sup>,对小鼠骨髓细胞有突变作用<sup>[2]</sup>。水体或土壤中存留的硝基苯可能对植物造成各种损伤,有研究报道硝基苯胁迫对小麦种子萌发和幼苗生理特性产生了影

响。大豆是重要的经济作物,其遗传学及生理研究都很深入,但关于硝基苯对大豆的细胞遗传学效应研究尚未见报道。采用不同浓度的硝基苯溶液处理大豆根部,进行了微核试验和染色体畸变试验,观察到多种由硝基苯诱发的大豆根尖细胞遗传畸变类型。

### 1 材料和方法

#### 1.1 植物材料

黑农 38 大豆,购自黑龙江省农业科学院。

#### 1.2 试剂

收稿日期:2007-12-20

基金项目:国家科技攻关资助项目(2006BA618A);黑龙江省科技攻关资助项目;哈尔滨师范大学骨干教师资助计划项目(KG2006-05);哈尔滨师范大学大学生科技创新基金资助项目(2007046)。

作者简介:李蕊(1983-),女,硕士研究生,主要从事植物遗传学研究。冯海涛为共同第一作者。

通讯作者:郭长虹,教授,博士。Tel: 13936622308; E-mail: kaku3008@yahoo.com.cn。

硝基苯;醋酸洋红;卡诺固定液;70%乙醇;1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸等。

### 1.3 仪器及设备

显微镜;显微成像系统;培养箱;电子天平;冰箱;水浴锅等。

### 1.4 方法

1.4.1 试剂的配制 硝基苯溶液:用蒸馏水将硝基苯充分溶解配制成一定浓度,避光贮藏。醋酸洋红染液:将 100 mL 45% 醋酸加热煮沸,缓慢加入 1 g 洋红,防止溅出。待全部溶解后再煮沸 30 min,配制的染色液过滤后贮存于棕色试剂瓶中备用。卡诺固定液:3:1 的醋酸和无水乙醇配制,现用现配。

1.4.2 材料的前期培养 选择饱满、大小均匀的大豆种子经次氯酸钠消毒 20 min,清水浸泡至种子完全膨胀,摆放在放有纱布的培养皿中水培,24℃培养若干天至主根长 2~3 cm 左右,悬挂培养。

1.4.3 材料的处理及恢复 硝基苯溶液处理 1 d,清水恢复 1 d。4℃低温 6 h,剪侧根卡诺固定液常温固定 24 h,洗净浸入 70%乙醇中,置于 4℃冰箱保存备用。对照组未经硝基苯溶液处理,其它条件相同。

1.4.4 细胞学观察 取根尖,洗净放入 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 解离 8~10 min,洗净吸干放入醋酸洋红染液避光染色至少 1 d,常规方法制片,检片并照相。

## 2 结果与分析

染色体作为遗传物质,在高等生物细胞内具有固定的数目和结构。染色体发生断裂产生非重建性愈合或由于物理、化学因素作用在染色体上形成原发性损伤,产生易变部位,在以后的世代中出现结构重排,都有可能产生染色体畸变<sup>[2]</sup>。研究中发现未经硝基苯处理的对照组大豆根尖细胞能够观察到的染色体畸变很少,而经硝基苯溶液处理的大豆虽然其形态(芽和根的外部形态)与对照无可见差异,但在其根尖分生组织细胞有丝分裂相的镜检过程中观察到了多种类型的染色体畸变,主要有微核、双核、中期的染色体断片、后期的染色体桥等。

### 2.1 微核

观察到大豆根尖细胞的微核存在于细胞核外,游离在细胞质中,形态近圆形,比主核小,一般与主核完全分离;染色质的密度、着色方式和折光性等与主核相似;微核周围形态清晰显示有核膜的存在。不仅观察到了间期微核,还观察到了分裂期微核,硝

基苯处理组相对于对照组微核率有显著的升高。

真核生物细胞内的染色体或染色质在复制过程中常会发生损伤、断裂而形成的一些碎片,这些碎片在一般情况下,大多数能自动与原来的染色体愈合恢复原状,这种情况下能够观察到的微核数目很少。在有丝分裂周期中受到理化因素的影响,会使微核率显著提高。一方面诱变剂可能通过促进染色体断裂或降低生物自身的修复功能而阻碍染色体断片的愈合,染色体断片由于缺少着丝点,不能随细胞分裂移到细胞两极而停留在细胞质中,经过一个细胞周期形成新的细胞核时,染色体断片在细胞质中凝缩形成微核<sup>[3]</sup>;另一方面可能由于诱变剂的作用引起异常分裂、染色体滞后或分组从而由单染色体或几条染色体凝缩形成微核。试验显示硝基苯处理引起了微核率的显著升高。硝基苯作为遗传毒性物质可能兼具染色体断裂剂和非整倍体剂两方面的作用。

### 2.2 双核及多核

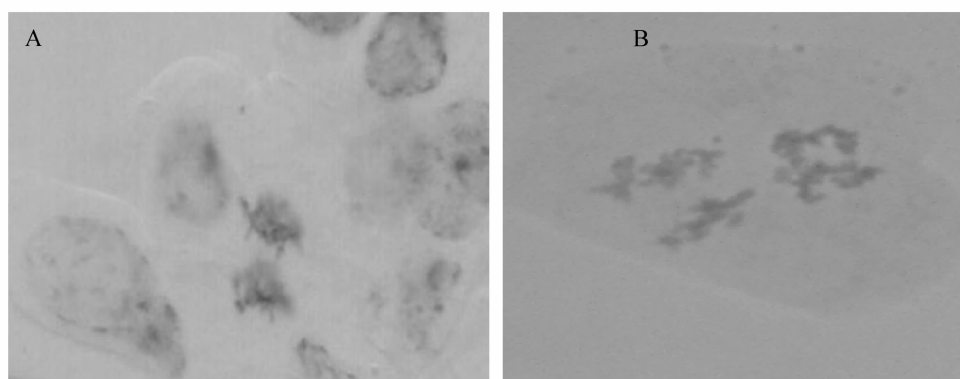
双核是指间期细胞中有两个核,两核大小接近相互游离。硝基苯处理大豆诱发形成了较高频率的双核细胞,这些位于同一细胞内的两个细胞核有的体积相同,有的体积不同,形状也有差异;有些双核距离较远,有的则靠的很近或彼此相连。另外还发现了一定频率的三核细胞即三个核存在于一个细胞中。双核细胞是植物细胞受到伤害产生的异常现象。在细胞周期中的染色体复制分离等过程正常进行,而细胞复制即胞质分裂过程被抑制即形成双核细胞。可能是细胞板的形成受到抑制,或参与的蛋白质合成受到抑制<sup>[4]</sup>。

### 2.3 中期染色体未集中到赤道板

观察中期细胞发现硝基苯处理组出现较多的未及中板集合染色体,也就是说某些染色体没能及时的达到中期赤道板上,与其它染色体在运动行为上出现时间差异,也就是不同步现象。一般情况下一个细胞内整个染色体组中的每一条染色体都能保持同步运动和分裂行为。当某些因素引起了染色体畸变或者影响到与染色体运动有关的物质或对纺锤丝中的微管产生了损伤时会出现不同步现象。

### 2.4 染色体断片与染色体桥

观察到细胞分裂的后期或末期在两个子细胞核之间有染色体丝相连即为染色体桥,有单桥、双桥等(图 1A)。在染色体多极分布的细胞中也可看到染色体桥的存在。



A: 后期染色体桥; B: 染色体多极分裂

A: Chromosome bridge in anaphase; B: Polypolarizing chromosome

图 1 硝基苯对大豆根尖细胞染色体分裂的影响

Fig. 1 The effect of nitrobenzene on mitosis of soybean root cells

一些理化因素影响可以导致染色体断裂,形成没有着丝点的染色体断片。不含着丝粒的断片通常在核分裂时被排除消失,也可能与其它染色体发生融合、易位和插入,这些畸变的类型在分裂中也可能以染色体桥的形式表现;具有着丝点的两条染色单体的断裂端也常常融合,在分裂的后期,着丝点被牵引移向两极,而相连的染色体丝会形成染色体桥,染色体桥可以持续到末期,随细胞分裂也可能形成新的断片<sup>[5]</sup>。

### 2.5 染色体滞后

染色体滞后现象大致可分为 3 种情况:一是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;二是大多数染色体移向两极,其余的随机组合滞留于两极间的不定位置,但可明显地看出染色体移动的极性;再有就是所有染色体或三、两随机组合或单独散布于两极间的不定位置。染色体移动高度不同步,反映了各染色体组或单个染色体移向两极的速度和进程不同<sup>[5]</sup>。

### 2.6 染色体多极分裂

正常情况下,染色体向两极的分配是均等的,分裂的结果使两极获得相同数量的染色体。经硝基苯作用的细胞出现了不均等的染色体分组,细胞不均等的分向多级,分向每极的染色体数目不等并伴有染色体移动不同步的现象(图 1B)。这类染色体多极分裂可能造成下一个细胞周期出现微核或小核。

## 3 讨论

硝基苯可以诱发大豆根尖细胞产生较高频率的微核,其作用同对二氯苯、8-羟基奎啉、叠氮化钠、马

来酰肼、甲基磺酸甲酯、氮丝氨酸、亚硫酸氢钠、以及某些射线相似。许多研究表明,微核率能够评价理化因素的诱变强度,可作为监测环境污染程度及测定细胞损伤程度的指标<sup>[6]</sup>。在试验中观察到的微核大小不等;在不同细胞中微核的数目也不同。低浓度硝基苯处理时,一个细胞含有一个微核者居多;随着硝基苯处理浓度的增高,细胞中微核数目也增多。这说明硝基苯处理可以诱发遗传畸变,并且随着硝基苯浓度的增高,其诱变效应也增强。

硝基苯也能诱发较高频率的双核,说明它可能抑制小泡融合而阻止细胞板的形成,最终阻碍胞质分裂的正常进行。硝基苯产生的双核细胞有等体积和不等体积两类,说明双核细胞可能由后期每条染色体的染色单体彼此分开的结果而形成,也可能是由于细胞进入中期之后,染色体没有及时到达纺锤体赤道面,使原来相距较远的两组或多组染色体不经后期而各自直接形成独立的核。

试验发现,硝基苯各处理均可导致多种类型的染色体畸变。如出现断片、未及中板集合染色体、环、桥及置后染色体等。虽然频率低于微核率,但变化规律相似。染色体畸变的产生可能有几条途径,一条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,另一条是由于药物干扰了 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<sup>[7]</sup>。此外,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、断片之类畸变类型。落后染色体及未及中板集合染色体可能是由于药物

破坏了纺锤丝的功能或形成,也可能是由于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纺锤体赤道板,造成落后。另外,一些化学诱变药物可以通过诱发自由基反应,使自由基浓度增加,从而增强了遗传物质(染色体 DNA)受损坏的程度,表现为诱变作用产生的染色体畸变和微核增多<sup>[8]</sup>。硝基苯对染色体的畸变作用以及微核形成的分子机理目前不十分明确。但从试验的结果来看其诱变作用是明显的,可能直接与 DNA 作用引起其断裂,也有可能通过诱发自由基反应,干扰 DNA、蛋白质合成或 RNA 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。硝基苯诱发大豆根尖细胞遗传畸变的具体机制尚有待进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] 徐镜波,景体淞. 硝基芳烃对鲤鱼鱼鳃 ATPase 的活性抑制和 QSARs[J]. 中国环境科学,1998,18(2):158-161. ( Xu J B, Jing T S. The inhibition of nitroaromatics to the enzymic activity of ATPase of carp gill and QSARs study[J]. China Environmental Science,1998,18(2):158-161. )
- [2] 赵兰,李金龙,邢厚娟. 硝基苯致小鼠骨髓细胞的突变作用[J]. 中国兽医科学,2007,37(6):539-542. ( Zhao L, Li J L, Xing H J. Mutagenicity of nitrobenzene on bone marrow cells of mice[J]. Veterinary Science in China,2007,37(6):539-542. )
- [3] 曹佳. 微核试验在中国的应用、发展与展望[J]. 遗传,2003,25(1):73-76. ( Cao J. The applications, developments and expectations of micronucleus test in China[J]. Hereditas,2003,25(1):73-76. )
- [4] 郝水. 有丝分裂与减数分裂[M]. 北京: 高等教育出版社,1982. ( Hao S. Mitosis and miosis[M]. Beijing: Higher Education Press,1982. )
- [5] 幸亨泰,梁万福. 生漆对洋葱根尖分生组织细胞有丝分裂影响的研究[J]. 遗传学报,1997,24(1):50-53. ( Xing H T, Liang W F. On the effect of Chinese lacquer upon the cell division of root tip of allium cepa[J]. Acta Genetica Sinica,1997,24(1):50-53. )
- [6] 李蕊,郭长虹,丁海燕,等. 大豆微核技术在环境监测中的应用[J]. 黑龙江农业科学,2007(3):81-82. ( Li R, Guo C H, Ding H Y, et al. Application of soybean micronucleus technology on environment detecting [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences,2007(3):81-82. )
- [7] 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. ( Li H. Study on the abnormalities of root tip cells in common wheat induced by saturated 1,4-dichlorophenyl solution[J]. Journal of Yuzhou University,1997,14(1):36-42. )
- [8] Edson V, Cordova R, Cleidson V, et al. Biomass growth, micronucleus induction, and antioxidant stress enzyme responses in VICIA FABA exposed to cadmium in solution[J]. Environmental Toxicology and Chemistry,2003,22(3):645-649.
- [9] 周淑清,黄祖杰,候天爵. 春播苜蓿地田间杂草生态经济阈值模型的研究[J]. 草业学报,1994,3(2):55-58. ( Zhou S Q, Huang Z J, Hou T J. A Study on eco-economic threshold and weeding eco-economic threshold of modeling in weed populations in alfalfa spring-sowing fields[J]. Acta Pratacultural Science,1994,3(2):55-58. )
- [10] 张洪进,张建明,张夕林,等. 红麻田杂草防除临界期及生态经济阈值的研究[J]. 杂草科学,1994(3):37-40. ( Zhang H J, Zhang J M, Zhang X L, et al. Research on the critical period and eco-economic threshold of weeds in Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) fields[J]. Weed Science,1994(3):37-40. )
- [11] 潘晓皖,汪晓红,王向阳,等. 麦田泽漆生态经济阈值的研究[J]. 农药科学与管理,2001,22(4):23-24,28. ( Pan X W, Wang X H, Wang X Y, et al. Research on the ecological economic threshold of *Euphorbia helioscopia* L. in wheat field[J]. Pesticide Science and Administration,2001,22(4):23-24,28. )
- [12] Robert C B, Lawrence R O. Shoot and root interference of common cocklebur (*Xanthium strumarium*) and soybean (*Glycine max*) [J]. Weed Science,1993,41(1):34-37.
- [13] 刘忠堂,何志鸿,魏冀西,等. 大豆窄行密植高产栽培技术引进试验与嫁接——Ⅲ 垄作窄行密植高产栽培技术的增产效果[J]. 黑龙江农业科学,1998(2):26-27. ( Liu Z T, He Z H, Wei J X, et al. Introduction, experiment and graft of narrow-row solid-seeded high-yield cultivation technique in soybean Ⅲ Yield-increasing effect of raised bed planting narrow-row solid-seeded high-yield cultivation technique[J]. Heilongjiang Agricultural Science,1998(2):26-27. )
- [14] Cooper R L. Response of soybean cultivars to narrow row sand, planting rates under weed-free conditions [J]. Agronomy Journal,1977,69(1):89-92.
- [15] 王诚. 大豆密植不同种植方式比较研究[J]. 黑龙江农业科学,1999(3):11-13. ( Wang C. Comparison of close-planting ways of soybean[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences,1999(3):11-13. )
- [16] 刘忠堂. 大豆窄行密植高产栽培技术的研究[J]. 大豆科学,2002,21(2):117-122. ( Liu Z T. Research on high-yield cultivation technique of narrow-row solid-seeded soybean[J]. Soybean Science,2002,21(2):117-122. )

(上接第538页)