

4种除草剂对黄鳝遗传毒性的研究

范立民, 陈家长, 吴 伟, 瞿建宏, 马晓燕, 胡庚东

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘 要:以黄鳝为试验材料,研究了噻草酮、2,4-D 丁酯、艾割和使它隆 4 种除草剂对鱼类的致突变性。通过对经腹腔注射染毒上述 4 种除草剂的受试黄鳝的活体肾细胞染色体数目和形态的观察,分析其突变率。结果(经统计 t 检验)显示,噻草酮、2,4-D 丁酯、艾割和使它隆 4 种除草剂分别在其试验最低受试剂量 50、0.05、50 和 8.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (体重)即可引起黄鳝的染色体畸变,表明这 4 种除草剂对黄鳝均具有遗传毒性,应在施用中严加管控,预防其对环境的风险性。

关键词:除草剂; 黄鳝; 染色体; 遗传毒性

中图分类号:X171.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)04-0701-04

Effects of Four Herbicides on the Genetic Toxicity of *Monopterus albus*

FAN Li-min, CHEN Jia-zhang, WU Wei, QU Jian-hong, MA Xiao-yan, HU Geng-dong
(Freshwater Fisheries Research Centre, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: The induced mutagenesis by 4 herbicides (i.e Metribuzin, 2, 4-D butylate, argold and starane) on *Monopterus albus* was observed and analyzed. After injected with herbicides through the abdomen cavity, the kidney cells were used for the chromosome aberration rate analysis by air-drying method. The results (by T-test) showed that the four kinds of herbicides could induce chromosomal aberrations even at the lowest injection dosage during the experiment, i.e. 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for metribuzin, 0.05 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 2, 4-D butylate, 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for argold and 8.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for starane respectively. The chromosome structure aberrations varied with different herbicides: ring chromosome caused by metribuzin, 2, 4-D butylate and argold; while, chromosome rupture by metribuzin and 2, 4-D butylate; single chromosome rupture by starane. The four kinds of herbicides had genetic toxicity to *Monopterus albus*. It was suggested that the four kinds of herbicides should be strictly controlled in order to prevent hazard to the aquatic animal and the environment.

Keywords: herbicide; *Monopterus albus*; chromosome; genetic toxicity

随着农业的发展,除草剂的用量不断加大,据估计在未来一段时间里除草剂将由目前的占农药总量的 48%提高到 65%~70%。保护人类的生存环境和可持续发展是 21 世纪的主题,在即将大范围使用除草剂的情况下,对于除草剂对环境的风险性,尤其是对于生物的遗传毒性研究的重要性日益突出。而对这方面的研究还比较少。目前,国内外对物质的遗传毒性研究采用的方法主要有:传统的致畸试验、微核试验、精子畸形试验、Ames 试验、单细胞凝胶电泳试验(SCGE)、姐妹染色体交换试验(SCE)和染色体畸变

试验^[1-8]等,应用 RAPD 技术来检测致突变作用^[9]是比较新的方法。

对于染色体畸变试验,多数研究人员只是分析染色体的畸变率,对引起的染色体畸变类型的进一步研究做的还比较少,而这一工作对于特定物质致畸机理的研究可能具有重要的桥梁作用,如 Avplan D D、Finger L R 等^[10]研究论述了染色体重排与特异序列的关系、染色体断点处特异序列的重组等。笔者分析了 4 种除草剂对黄鳝染色体数目畸变、不同类型结构畸变的影响,研究了 4 种除草剂对黄鳝的遗传毒性,对相关标准的制定提供试验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

收稿日期:2004-12-06

基金项目:国家自然科学基金资助(30170162)

作者简介:范立民(1978—),男,河北滦平人,从事渔业生态环境保护技术研究。

联系人:胡庚东 E-mail:hugd@ffrc.cn

1.1.1 试验用鱼

试验所用黄鳝取自本中心试验基地, 体重 32.5~55.3 g, 体长 34~42 cm。先将黄鳝在水温 20 ℃±2 ℃、溶氧 5~6 mg·L⁻¹ 条件下, 在水族箱中暂养一周, 然后挑选健康的黄鳝备用。

1.1.2 除草剂

供试药剂为 70% 噻草酮(张家港七洲, 2002)、使它隆(美国, 2002)、10% 艾割乳油(美国氧能公司, 2002)、2, 4-D 丁酯(大连松辽化工公司, 2001)。

1.2 方法

1.2.1 染毒

试验前期以白鲢为试验材料, 采用相关回归法确定 4 种除草剂对白鲢 96 h 的半数致死浓度。参考此浓度, 在 96 hLC₅₀ 的 1/5~1/3 内选定 3 个浓度组, 另设对照组(对照组黄鳝注射 8.5%生理盐水), 每组随机选取黄鳝 15 尾, 采用腹腔注射法染毒, 染毒时间为 24 h, 试验时每组随机选取 5 尾进行处理。

1.2.2 染色体标本的制备

对试验鱼以 0.2 mL·100 g⁻¹ 体重 2 次注射酵母发酵液(10%葡萄糖+1 g 酵母粉, 20 ℃发酵 5 h, 离心取上清液), 间隔 24 h。第 2 次注射时间为取样前 4 h, 并同时以 4 μg·g⁻¹ 体重注射秋水仙碱。将黄鳝断尾放血 15 min, 取鱼体肾细胞, 空气干燥法制片。油镜下挑选图像清晰、染色体分散良好的分裂相进行观察, 对典型的正常黄鳝染色体中期分裂相、四倍体畸变、结构畸变中的染色体断裂和着丝点环进行摄影。

1.2.3 标本分析

染色体数目和形态畸变参照《人类染色体与辐射

诱变》一书提供的标准, 略加修改。每个个体观察 50 个中期分裂相, 结果以百分率(%)表示。数目畸变统计每个分裂相的染色体数目, 如表 1 进行分组, 各浓度中二倍体出现频率以及四倍体出现频率与对照组进行差异显著性检验(*t* 检验)。形态畸变统计染色体型畸变中的断裂、裂隙、着丝点环和着丝点融合, 染色体畸变中的断裂和裂隙, 以及结构畸变细胞率, 与对照组进行差异显著性检验(*t* 检验)。计算除草剂浓度与二倍体畸变、四倍体畸变及各种结构畸变的相关系数, 并进行相关系数显著性检验(*t* 检验)。

2 结果与讨论

2.1 染色体数目畸变

观察统计制备的染色体玻片, 可以看到 4 种除草剂对黄鳝染色体数目畸变率的影响。具体见表 1。

分析表 1 可以得出: 4 种除草剂对黄鳝染色体数目畸变均产生影响。经相关系数显著性检验(*t* 检验), 噻草酮和使它隆对黄鳝二倍体染色体数目畸变具有剂量效应相关性(相关系数分别为: 噻草酮 *r*=0.97, 使它隆 *r*=0.98); 其他 2 种除草剂则相关性不显著(相关系数均为 0.95)。4 种除草剂对四倍体的产生剂量效应相关性均不显著(使它隆 *r*=0.94, 噻草酮 *r*=0.88, 2, 4-D 丁酯 *r*=0.73, 艾割 *r*=0.85), 见图 1。4 种除草剂均未造成其他多倍体类型的产生。

2.2 染色体结构畸变

观察统计制备的染色体玻片, 可以看到 4 种除草剂对黄鳝染色体结构畸变率的影响。具体见表 2。

从表 2 可以得知, 4 种除草剂均对黄鳝染色体结

表 1 4 种除草剂对黄鳝染色体数目畸变率的影响

Table 1 Effects of herbicides on the aberration rates of chromosome number in *Monoperus albus*

浓度 /mg·kg ⁻¹	观察细胞数	二倍体染色体/%									四倍体染色体
		<20	20	21	22	23	24	25	26	>26	/%
对照组	250	7.2	3.4	3.2	3.0	2.8	80.4	0.0	0.0	0.0	0.0
50.0 (噻草酮)	250	8.8	3.2	3.0	4.8	4.2	74	0.0	0.0	0.0	2.0*
120.0 (噻草酮)	250	9.6	2.8	2.8	5.6	6.4	70.8*	0.0	0.0	0.0	2.0*
170.0 (噻草酮)	250	12.8	3.4	3.8	7.4	7.4	62.4**	0.0	0.0	1.8	2.8**
0.05 (2, 4-D 丁酯)	250	8.2	4.2	6.4	3.2	2.8	73.4	0.0	0.0	0.0	1.8*
0.1 (2, 4-D 丁酯)	250	10.6	5.6	7.8	4.6	3.0	66.4**	0.0	0.0	0.0	2.0*
0.2 (2, 4-D 丁酯)	250	12.8	6.4	8.6	5.2	2.6	62.4**	0.0	0.0	1.2	2.0*
50.0 (艾割)	250	8.6	5.4	1.8	4.6	0.8	75.2	0.0	0.0	0.0	3.6**
100.0 (艾割)	250	12.6	7.6	2.0	6.2	1.2	66.2**	0.0	0.0	0.0	4.2**
200.0 (艾割)	250	12.8	9.6	1.6	7.2	1.0	62.8**	0.0	0.0	0.0	5.0**
8.0 (使它隆)	250	6.2	2.8	6.4	3.8	5.8	69.4**	0.0	0.0	0.0	5.6**
15.0 (使它隆)	250	6.0	3.2	8.6	4.2	6.6	63.6**	0.0	0.0	0.0	7.8**
24.0 (使它隆)	250	5.8	3.6	10.2	5.6	7.8	56.6**	0.0	0.0	1.2	9.2**

注: **P*<0.05, ** *P*<0.01。

表 2 四种除草剂黄鳝染色体结构畸变率的影响

Table 2 Effects of herbicides on the aberration rates of chromosome structure in *Monopterus albus*

浓度 /mg · kg ⁻¹	观察细胞数	染色体型畸变率/%			染色单体型畸变率/%			结构畸变细胞率 /%
		断裂	裂隙	着丝点环	着丝点融合	断裂	裂隙	
对照组	250	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
50.0 (噻草酮)	250	2.0*	0.0	1.8*	0.0	0.0	0.0	3.8**
120.0 (噻草酮)	250	2.8**	0.0	3.2**	0.0	0.0	0.0	6.0**
170.0 (噻草酮)	250	5.4**	0.0	4.8**	0.0	0.6	0.0	10.8**
0.05 (2, 4- D 丁酯)	250	2.6**	0.0	3.0**	0.0	0.0	0.0	5.6**
0.1 (2, 4- D 丁酯)	250	4.2**	0.0	4.8**	0.0	0.0	0.0	8.8**
0.2 (2, 4- D 丁酯)	250	9.8**	0.0	6.2**	0.0	0.0	0.0	16**
50.0 (艾割)	250	0.0	0.0	1.8*	0.0	0.0	0.0	1.8*
100.0 (艾割)	250	0.0	0.0	2.4*	0.0	0.0	0.0	2.4*
200.0 (艾割)	250	0.0	0.0	5.0**	0.0	0.0	0.0	5.0**
8.0 (使它隆)	250	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4*	0.0	2.4*
15.0 (使它隆)	250	0.8	0.0	0.0	0.0	3.6**	0.0	4.4**
24.0 (使它隆)	250	1.2	0.0	0.0	0.8	4.8**	0.6	7.4**

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

构畸变产生影响,相关系数显著性检验(t 检验)表明,均与结构畸变细胞率具有剂量效应相关性(相关系数分别为:噻草酮 $r=0.98$,2,4-D 丁酯 $r=0.99$,艾割 $r=0.99$,使它隆 $r=0.99$)。使它隆只对染色单体型畸变中的染色单体断裂产生较显著的影响并具有剂量效应相关性($r=0.98$),对统计的其他染色体型畸变和染色单体型畸变影响不显著。其他 3 种除草剂对染色单体型畸变不产生影响。噻草酮和 2,4- D 丁酯引起的结构畸变类型是染色体型畸变中的染色体断裂和着丝点环的产生,除了 2,4-D 丁酯与着丝点环的产生剂量效应相关性不显著($r=0.94$)外,其他均具有剂量效应相关性(相关系数分别为:噻草酮对染色体断裂 $r=0.97$ 和对着丝点环的产生 $r=0.99$,2,4- D 丁酯对染色体断裂 $r=0.99$)。艾割只引起染色体型畸变中的着丝点环的产生,且具有剂量效应相关性($r=0.99$)。

图 2 为正常黄鳝二倍体染色体图像,图 3 和图 4 分别为典型的染色体断裂和环状染色体图像。

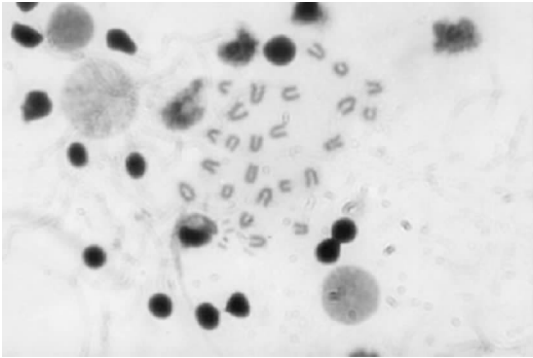


图 2 正常的黄鳝二倍体染色体图像

Figure 2 Photograph of normal diploid chromosome

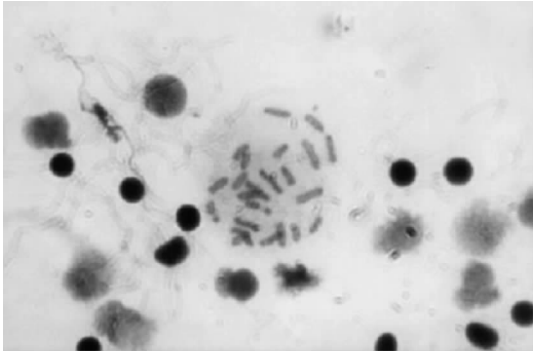


图 3 典型的染色体断裂图像

Figure 3 Photograph of chromosome rupture

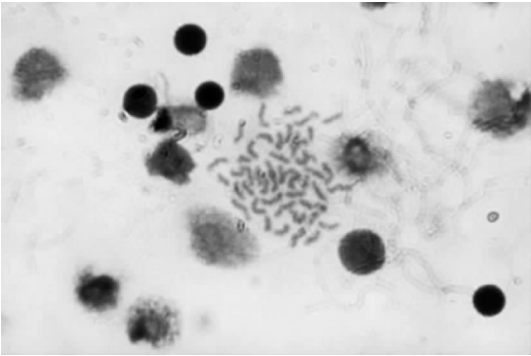


图 1 黄鳝四倍体染色体

Figure 1 Tetraploidy of *Monopterus albus*

2.3 讨论

2.3.1 染毒方法

一般来讲,依据染毒方式方法的不同,致突变试验可分为急性试验、亚急性试验和慢性诱变,本试验为急性试验。染毒方法可以有腹腔注射染毒,被检物参入饲料、定量进食染毒,溶入水中染毒等。考虑到黄

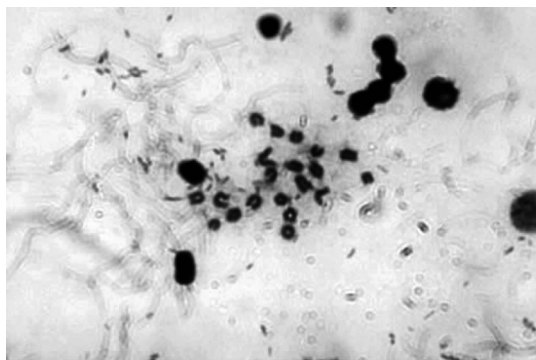


图4 典型的环状染色体图像

Figure 4 Photograph of typical ring chromosome

鳝的食性特点、几种除草剂的水溶性等情况,本试验采用腹腔注射染毒,虽然与自然情况下除草剂的致毒方式不同,其效应发生剂量也不能作为某些相关标准的直接参考值,但本试验所得到的几种除草剂的致突变性结果可以为相关标准的制定提供依据,并应该引起人们的广泛关注。

2.3.2 剂量选择

本试验对4种除草剂的剂量设定均在其相应96h LC_{50} 的1/5~1/3范围,是因为剂量过低不会引起遗传毒性效应,过高则会引起细胞死亡,适当的剂量选择对致突变试验来说非常重要。

3 结论

本试验所得结果显示,所用4种除草剂均具有遗传毒性,分别在其最低受试剂量(噻草酮 50.0、2,4-D 丁酯 0.05、艾割 50.0 和使它隆 8.0 $mg \cdot kg^{-1}$ 体重)即引起畸变的发生,但引起的结构畸变类型有所不同。噻

草酮和 2,4-D 丁酯引起染色体断裂和着丝点环的产生;艾割和使它隆分别只引起着丝点环的产生和染色单体的断裂。这可能显示出这4种除草剂的致突变机理有所不同。应对这4种除草剂严加管控,预防其对环境的风险性。

这4种除草剂以及其他具有遗传毒性的除草剂的致突变机理都有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王玉鹏.微核试验方法及其在环境监测中的发展趋势[J].环境与健康杂志,1999,16(6):378-379.
- [2] 张朝晖,陈 锋,吴端生,等.除草剂乐草隆对红鲫的遗传毒性研究[J].中国实验动物学报,2002,10(3):185-187.
- [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[J].南京医科大学学报,1995,15(4):243.
- [4] 耿德贵,屈 艾,王景明,等.除草剂精克草星对黄鳝的遗传毒性研究[J].癌变,畸变,突变,2000,12(1):28.
- [5] 汤新慧.除草剂诱发蟾蜍蝌蚪红细胞微核的研究[J].中国环境科学,1998,18(2):162.
- [6] 耿德贵,陈 刚,韩 燕,等.除草剂农达对黄鳝致突变性研究[J].徐州师范大学学报,2000,18(2):59-61.
- [7] 贾庆军,杨录军,刘晋伟,等.硝酸羟胺急性毒性和诱导染色体损伤的初步研究[J].癌变,畸变,突变,2004,16(6):359-361.
- [8] 陈家长,张瑞涛,胡庚东.鱼类“致癌,致畸,致突变”测试技术在渔业环境监测中的应用[J].中国水产科学,1996,6(1):93-96.
- [9] 陈家长,董在杰,胡庚东,等.RAPD技术检测除草剂对草鱼的致突变作用[J].农业环境科学学报,2004,23(5):1037-1038.
- [10] Finger L R,Harrey R C,Moore R C,et al.A common mechanism of chromosomal translocation in T-and-B-cell neoplasia[J].Science,1986,234(4779):982-985.