第 23 卷第 2 期
2003 年 2 月

生 态 学 报
ACTA ECOLOGICA SINICA

Vol. 23, No. 2
Feb., 2003

SO_2 对蚕豆根尖细胞微核的诱导作用

仪慧兰，孟紫强*

（山西大学环境医学与毒理学研究所，生命科学与技术学院，太原 030006）

摘要：应用蚕豆根尖微核试验，对 SO_2 的遗传毒性效应进行了研究。结果表明：一定浓度范围内（0.108～14.00 mg/m³），蚕豆根尖微核细胞数与 SO_2 浓度间呈正相关，太原市大气污染严重的冬季采暖期根尖细胞微核率明显高于非采暖期；SO_2 浓度 0.604 mg/m³ 处理 24 h 和 48 h 或 2.80～28.00 mg/m³ 熏气处理 4 h 可使蚕豆根尖中具有微核的细胞数明显增加，结果表明，低浓度 SO_2 较长时间接触或高浓度短期接触均可引起蚕豆根尖细胞遗传物质的损伤，应用蚕豆根尖细胞微核实验可对大气 SO_2 污染进行生物监测。SO_2（2.80～28.00 mg/m³）熏气实验中，接触时间延长能导致根尖细胞微核率下降，2.80 mg/m³ 熏气组下降较快，14.00 mg/m³ 熏气组下降较慢，研究结果提示，在运用蚕豆根尖微核实验监测环境 SO_2 污染时要考虑蚕豆的染毒方式，避免假阴性结果的出现。

关键词：SO_2；蚕豆；微核

Effect of sulfur dioxide on the micronuclei formation in *Vicia faba* root tips

YI Hui-Lan, MENG Zi-Qiang (*Institute of Environmental Medicine and Toxicology, School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan* 030006, *China*). ***Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(2): 292～296.**

Abstract: Sulfur dioxide (SO_2) is a ubiquitous air pollutant, present in low concentrations in the urban air, and in higher concentrations in the working environments. Consequently, it has become important to study the toxic effects of SO_2 in the environment to humans. *Vicia faba* have been used for evaluating chromosomal aberrations since the early 1920s. In the present study, the *Vicia* root-micronucleus assays was selected to assess for DNA aberrations induced by sulfur dioxide.

The *V. faba* test was essential carried out according to Kanaya *et al*. Dry seeds of *V. faba* were soaked for 36 h in tap water and the seedlings were allowed to germinate between two layers of moist cotton. When the newly emerged roots were of 1.00～2.00 cm in length, they were used in the test.

The *Vicia* seedlings, which incubated in tap water, divided into groups. One group of seedlings unexposed to SO_2 was used for negative control. One group incubated in SO_2 polluted air. Other groups of seedlings were exposed to SO_2 at 2.80, 14.00 and 28.00 mg/m³ respectively, 4 h per day for 10 days. The *Vicia* roots after a recovery period (20 h) were fixed overnight in freshly prepared 1 : 3 aceto-ethanol solution, and then transferred to 70% ethanol for storage. They were hydrolyzed in 1 mol/L HCl at 60 C

基金项目：山西省教委环境科学重点学科基金资助项目；山西省自然科学基金资助项目

收稿日期：2001-10-12；**修订日期**：2002-06-29

作者简介：仪慧兰（1963～），女，山西人，博士，副教授。主要从事环境毒理学方面的研究。shxhlanyi@hotmail.com

* 通信联系人 Author for correspondence

Foundation item: Supported by the Key Subject Foundation for the Environmental Science of the Provincial Education Committee of Shanxi and the Provincial Natural Science Foundation of Shanxi, China

Received date: 2001-10-12; **Accepted date**: 2002-06-29

Biography: YI Hui-lan, Doctor, Associate Professor. Research interesting lies in environmental toxicology. shxhlanyi@hotmail.com

for 8～10 min and stained with Schiff reagent for 40～60 min, 1 mm of the mitotic zone from well-stained root tips were immersed in a drop of distilled water on a clean slide and squashed under a cover glass. About 5000 cells were examined from 5 separate *Vicia* seedlings per experimental group. Micronucles (MCN) frequency was expressed in terms of the number of cells with MCN per 1000 root tip cells. The Dunnett's *t* test was used for analyzing the significant difference between different treatments.

The results showed that sulfur dioxide induced genetic damage in *Vicia* root tip cells. The MCN frequencies had positive response to SO_2 concentration, and increased with the concentrations in the range of 0.108～14.00 mg/m^3, the higher the concentration was, the more the cells with MCN in root tips. The MCN frequencies increased significantly when *V. faba* seedlings exposed to sulfur dioxide for 24～48 h at 0.604 mg/m^3 or for 4 h in the range of 2.80～28.00 mg/m^3. It was suggested that both the low concentration for longer exposure and the high concentration for shorter duration could induce cytogenetic damage and *V. faba* root micronucleus test could be used to monitor SO_2 pollutant in the environment.

The experimental results also showed that MCN frequencies went down gradually along with the exposure time prolonged. At 2.80 mg/m^3 it takes 4 days to decrease the MCN frequencies near to the control's level, and at 14.00 mg/m^3 it takes at least 9 days. The results indicated that the toxicity of sulfur dioxide to *Vicia* root cells became slight after a longer exposure, so we should be careful to avoid the incorrect monitoring results.

Key words: sulfur dioxide; *Vicia faba*; micronucleus

文章编号:1000-0933(2003)02-0292-05　**中图分类号**:Q142,Q891,X171.5　**文献标识码**:A

我国是世界上少数以煤炭为主要能源的国家之一。大量煤炭的燃烧导致我国 SO_2 排放量逐年增加,统计资料显示,至 1997 年,我国排放的 SO_2 量达 2346 万 t,居世界第一位,大气污染造成的酸雨面积也大幅增加,年均降水 pH 值低于 5.6 的区域面积占全国面积的 40%左右。流行病学调查发现,SO_2 污染可引起呼吸道疾病,并与肺癌的发生有密切关系[1]。研究表明,SO_2 及其衍生物能够引起哺乳动物和人体细胞遗传损伤,产生微核、SCE、染色体畸变等[2,3],能促进中国仓鼠卵巢细胞(CHO-AS52)突变[4]。由 SO_2 污染形成的酸雨,对生态系统及建筑物有破坏作用。酸雨导致土壤和水系酸化,降低农牧业生产力,影响人类的生活及健康。SO_2 和酸雨对植物的生长发育、物质代谢及酶的活性有明显的影响,而且具有遗传损伤作用[5-7]。

太原市是以煤炭、冶金、机械、化工为主体的能源重化工基地,空气污染综合指数连续几年列全国 31 个省会城市之首,其中 SO_2 是主要的污染物之一,1999 年 SO_2 排放量为 21.1 万 t,对大气环境造成严重污染。建立和运用快速有效的监测系统对环境质量进行监测和评价,是环境治理的一个必要环节。生物监测能够反映环境污染对机体的毒性效应,具有其它检测手段无可比拟的优点。

蚕豆根尖微核试验是世界范围内推广运用的环境致突变性检测技术[8,9],1986 年被我国环保局列为水环境生物测试的规范方法,用于检测水体的致突变性,而对空气 SO_2 污染的监测尚未见报道。本实验对太原地区 SO_2 污染诱发的蚕豆根尖细胞微核进行检测,并用 SO_2 熏气试验,研究其对蚕豆的遗传毒理效应,探索应用蚕豆根尖细胞微核实验检测环境 SO_2 污染的可能性。

1　材料与方法

1.1　材料　蚕豆(*Vicia faba*),采用华中师范大学提供的松滋青皮豆,是经过专门筛选、隔离栽培、无污染的品种。

1.2　实验方法

1.2.1　蚕豆萌发　参照 Kanaya 等[9]的方法。蚕豆于 24 C用自来水浸泡 36h,湿纱布包裹催芽 36h。选已发芽的蚕豆放入垫有湿脱脂棉的培养皿中培养 36h。其间每 12h 用水冲洗 1 次,换水培养。选择根长整齐一致,根长约 1.5～2.0 cm 的蚕豆随机分组。

1.2.2　SO_2 处理　采用甲醛吸收-副玫瑰苯胺分光光度法测定 SO_2 浓度。非采暖期对照组为冬季供暖前

培养的蚕豆,采暖期对照组为供暖后置于自然空气中生长的蚕豆。采用不同的 SO_2 浓度(2.80, 14.00, 28.00 mg/m^3)对蚕豆幼苗进行暴露实验(动式熏气)。SO_2 暴露试验持续 10 d,每日连续熏气 4 h 后从染毒缸取出,于实验室自然空气中(18～20 C)恢复培养 20 h,次日继续熏气。SO_2 暴露时间按累计值计算。于每次染毒结束恢复 20 h 后,从培养皿中取出部分蚕豆进行根尖固定,其余蚕豆继续熏气。其间每 12 h 用水冲洗 1 次,换水培养。

1.2.3 根尖固定和染色 切取蚕豆根尖,卡诺氏固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)固定 24 h。转入 70%的乙醇中 4 C保存。制片时,用 1 mol/L 的 HCl 于 60 C解离根尖 8～10 min,孚尔根(Feulgen)法染色。

1.2.4 根尖细胞制片和镜检 切取根尖分生区,常规压片。直接在显微镜下观察记录。每个处理观察 5～8 棵幼苗的根尖,每个根尖约 1000 个细胞。

1.3 数据分析

对镜检所得数据进行方差分析,采用 t 检验,检测不同处理组之间的差异显著性。

2 结果与讨论

2.1 SO_2 诱发蚕豆根尖细胞微核的浓度效应

镜检中凡是主核大小 1/3 以下,着色与主核相当或稍浅并与主核分离的小核,作为细胞中的微核。微核细胞中多数具有 1 个微核,少数具有 2 个微核,个别细胞有 3～5 个微核。研究结果表明(表 1),蚕豆根尖细胞对空气中的 SO_2 非常敏感,在一定浓度范围内,根尖微核细胞数呈剂量依赖性变化。在非采暖期大气 SO_2 含量低于国家环保局颁布的《环境空气质量标准》(GB3095-1996)二级标准(0.15 mg/m^3)时,蚕豆根尖细胞微核率较低;采暖期大气 SO_2 含量增大,实验时高出二级标准 4.03 倍,期间生长的蚕豆幼根细胞微核率显著高于非采暖期。SO_2 浓度 2.80 mg/m^3 和 14.00 mg/m^3 熏气 4 h 后蚕豆根尖细胞微核显著高于采暖期和非采暖期,而植物外形上无可见变化。28.00 mg/m^3 熏气组根尖微核率明显比低浓度熏气组低,但高于非采暖期和采暖期对照组。研究结果说明,SO_2 低浓度较长时间接触和高浓度短时间接触均能诱发蚕豆根尖细胞微核显著增加。

高浓度组根尖微核率降低的原因,与高浓度处理抑制根尖细胞分裂、延滞细胞周期,从而使根尖参与分裂的细胞数目减少有关[10]。

表 1 SO_2 诱导的蚕豆根尖细胞微核

Table 1 Frequencies of micronuclei in *V. faba* root tips exposed to sulfur dioxide for 4 h or to polluted air for 24 h

处 理 Treatment	浓 度 Concentration (mg/m^3)	时 间 Duration (h)	观察细胞数 Number of scored cells	微核率(‰) MCN frequency (Mean±S.E)	污染程度 Significance
非采暖期 Negative control	0.108	24	6100	3.08±0.05	
采暖期 Polluted air	0.604	24	5020	9.15±0.47**	
SO_2熏气组 SO_2 fumigation	2.800	4	8336	21.36±4.29**	++
	14.00	4	4514	36.33±5.56**	++
	28.00	4	5208	13.60±1.46**	+

与采暖期比较:+$p<0.05$, ++$p<0.01$;与非采暖期比较:*$p<0.05$, **$p<0.01$

由于太原市是以煤炭、冶金、化工为主体的能源重化工基地,目前为止多数工业生产和民用锅炉没能很好地解决燃煤过程中的 SO_2 排放问题,造成太原市大气 SO_2 含量严重超标,采暖季节 SO_2 浓度达 0.015～2.711 mg/m^3,日均值 0.503 mg/m^3,超标率为 87.53%,全年超标率 47.08%,局部的 SO_2 含量超过大气环境质量标准(GB3095-82)数十倍。蚕豆根尖微核实验的结果表明,一定浓度的 SO_2 能够诱发根尖微核细胞数增加,且呈现剂量效应关系,说明在一定的浓度范围内,用蚕豆根尖细胞微核实验技术,能够监测环境中的 SO_2 污染。

2.2 SO_2 诱发蚕豆根尖细胞微核的时间效应

表 2 为次日继续熏气 4 h 后根尖微核细胞统计结果,各不同浓度 SO_2 熏气组微核率比表 1 有不同程度的下降,2.80 mg/m^3 组根尖微核率下降幅度最大,14.00 mg/m^3 组下降幅度较小。但是,采暖期的根尖微核

率在延长接触时间后无明显变化。

表 2　SO_2 诱导的蚕豆根尖细胞微核

Table 2　Frequencies of micronuclei in *V. faba* root tips exposed to sulfur dioxide for 4×2 h or to polluted air for 48 h

处　理 Treatment	浓　度 Concentration (mg/m^3)	时　间 Duration (*h*)	观察细胞数 Number of *scored cells*	微核率 (‰) MCN frequency (*Mean*±S. E)	污染程度 Significance
非采暖期 Negative control	0.108	48	5000	3.12±0.13	
采暖期 *Polluted air*	*0.604*	*48*	*4800*	*7.90±0.94**	
SO_2 熏气组 SO_2 fumigation	2.800	4×2	4393	11.03±1.10**	+
	14.00	4×2	5193	34.30±3.67**	++
	28.00	4×2	5038	11.12±1.58**	+

与采暖期比较：+ $p<0.10$，++ $p<0.01$；与非采暖期比较：* $p<0.05$，** $p<0.01$

为了研究根尖微核率与 SO_2 接触时间的关系，用 2.80 mg/m^3 和 14.00 mg/m^3 的 SO_2 对蚕豆幼苗进行长期暴露，结果见表 3 和表 4。

表 3　2.80 mg/m^3 的 SO_2 熏气对蚕豆根尖细胞微核的影响

Table 3　The effects of SO_2 at 2.80 mg/m^3 on the MCN frequencies in *V. faba* root tips

熏气时间 Duration (h)	观察细胞数 Number of scored cells	正常细胞数 Number of normal cells	微核率 (‰) MCN frequency	污染程度 Significance
4×1	8336	7949	21.36**	++
4×2	4393	4280	12.23**	++
4×3	4528	4379	11.70*	+
4×4	4634	4520	9.70	
4×5	4535	4405	10.25	
4×6	5691	5546	7.91	

与采暖期比较：+ $p<0.05$，++ $p<0.01$；与 SO_2 熏气 4×6h 组比较：* $p<0.05$；** $p<0.01$

表 3 和表 4 中两个不同浓度处理组在熏气 4 h 后根尖细胞微核率最高，随着熏气时间的延长，熏气组根尖微核细胞率显著下降。同期的根尖有丝分裂指数也表现相同的特点。2.80 mg/m^3 熏气组 2d 后分裂指数最低为 12.16%，之后逐渐回升，6d 后为 17.27%。研究结果说明，蚕豆对环境中一定浓度的 SO_2 具有一个适应过程，对环境的适应导致根尖中微核细胞数目减少，分裂细胞数增多。

表 4　14.00 mg/m^3 的 SO_2 熏气对蚕豆根尖细胞微核的影响

Table 4　The effects of SO_2 at 14.00 mg/m^3 on the MCN frequencies in *V. faba* root tips

熏气时间 Duration (h)	观察细胞数 Number of scored cells	正常细胞数 Number of normal cells	微核率 (‰) MCN frequency	污染程度 Significance
4×1	4514	4336	36.33**	++
4×2	5193	5094	34.30**	++
4×3	4519	4399	28.54**	++
4×4	4324	4200	35.17**	++
4×5	5021	4881	19.06**	++
4×6	4105	4006	15.81*	++
4×7	4507	4376	10.85	
4×8	4422	4285	11.56	+
4×9	6832	6639	8.23	
4×10	8102	7864	7.85	

与采暖期比较：+ $p<0.05$，++ $p<0.01$；与 SO_2 熏气 4×10h 组比较：* $p<0.05$；** $p<0.01$

从表 3 和表 4 可以看出，两个不同浓度的处理在一定长的接触时间后根尖微核率降低到对照水平，但是 14.00 mg/m^3 处理组根尖微核细胞率降低到对照水平需要的时间比 2.80 mg/m^3 组长，结果说明，蚕豆

接触环境中一定浓度的 SO_2 后，能够通过生理代谢产生一定的适应性，在较短的时间内适应环境中低浓度的 SO_2，并通过较长时间适应较高浓度的 SO_2，从而使得 SO_2 对根尖细胞中染色体的表观损伤减小。但 SO_2 浓度过高时将导致急性中毒，出现组织坏死、细胞死亡。168 mg/m^3 急性染毒 4 h 后，导致蚕豆叶片褐色坏死斑，根尖细胞几乎全部固缩，部分细胞核解体。

本文用蚕豆根尖细胞研究的结果与动物细胞实验结果[1]相似，说明 SO_2 诱发蚕豆根尖细胞遗传损伤能够反映同等条件下动物细胞的损伤情况，SO_2 诱发遗传物质损伤在动物细胞和植物细胞中具有一致性，有可能采用蚕豆根尖微核实验检测环境中的 SO_2 污染。

研究结果还表明，蚕豆根尖微核实验可用于一定浓度范围内 SO_2 污染的监测，但要选择蚕豆接触 SO_2 气体的时间和方式。由于植物体对环境发生适应性反应，造成表观遗传损伤减弱，根尖细胞微核率随着处理时间的延长而降低，容易导致漏检。

References

[1] Meng Z Q, Zhang L Z, Zhang K. Chromosomal aberrations in sulphur dioxide-exposed workers. *Chin. Environ. Sci.*, 1990, **10**(5): 360～363.

[2] Meng Z Q, Sang N, Zhang B. Induced effects of the in vivo derivatives of sulfur dioxide on chromosomal aberrations in CHL cells. *Chin. Environ. Sci.*, 2000, **20**(1): 8～12.

[3] Meng Z Q, Zhang L Z. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by sodium bisulfite. *Mutat. Res.*, 1992, **298**: 63～69.

[4] Meng Z Q, Zhang B. Polymerase chain reaction-based deletion screening of bisulfite (sulfur dioxide) enhanced gpt-mutants in CHO-AS52 cells. *Mutat. Res.*, 1999, **425**: 81～85.

[5] Yi H L, Meng Z Q. Cytogenetic damage of *A. sativum* root cells induced by derivatives of sulfur dioxide. *Acta Sci. Circumst.*, 2001, **21**(4): 486～490.

[6] Yi H L, Meng Z Q. Effect of sodium bisulfite on the cell division and growth of *Allium sativum* seedlings. *Bull. Bot. Res.*, 2001, **21**(3): 384～387.

[7] Qian Y C, Yu S W. Effects of sulfur dioxide on concentrations of free amino acids in crop plants. *Acta Sci. Circumst.*, 1992, **12**(3): 325～332.

[8] Kanaya N, Gill B S, Grover I S, *et al*. *Vicia faba* chromosomal aberration assays. *Mutat. Res.*, 1994, **310**: 231～247.

[9] Grant W F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—— a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat. Res.*, 1999, **426**: 107～112.

[10] Duan C Q, Wang H X. Cytogenetical toxical effects of heavy metal on *Vicia faba* and inquires into the *Vicia*-micronucleus. *Acta Bot. Sin.*, 1995, **37**(1): 14～24.

参考文献

[1] 孟紫强，张连珍，张珂. 硫酸厂工人外周血淋巴细胞染色体畸变的研究. 中国环境科学，1990，**10**(5)：360～363.

[2] 孟紫强，桑楠，张波. 二氧化硫体内衍生物诱发 CHL 细胞染色体畸变效应. 中国环境科学，2000，**20**(1)：8～12.

[5] 仪慧兰，孟紫强. SO_2 衍生物对大蒜根尖细胞遗传损伤作用的研究. 环境科学学报，2001，**21**(4)：486～490.

[6] 仪慧兰，孟紫强. SO_2 衍生物对大蒜幼苗生长和细胞分裂的影响. 植物研究，2001，**21**(3)：384～387.

[7] 钱永常，余叔文. 二氧化硫对作物游离氨基酸浓度的作用. 环境科学学报，1992，**12**(3)：325～332.

[10] 段昌群，王焕校. 重金属对蚕豆的细胞遗传学毒性作用和对蚕豆根尖微核技术的探讨. 植物学报，1995，**37**(1)：14～24.