

硫酸铝对大蒜根尖细胞毒性效应的研究

秦永燕¹, 丹惠国¹, 刘瑞祥¹, 姚沁涛²

(1. 长治学院 生物科学与技术系, 山西 长治 046011; 2. 长治一中生物组, 山西 长治 046011)

摘要: 以不同浓度的硫酸铝为诱变剂, 采用微核法和染色体畸变法, 测定大蒜根尖细胞的微核率、有丝分裂指数和染色体畸变率。结果表明: 在试验浓度范围内, 随着处理浓度的升高, 微核率呈先增加后减少; 细胞有丝分裂指数呈先减少后增加, 但均低于对照组, 而且差异显著 ($P < 0.05$); 硫酸铝可诱导大蒜根尖细胞染色体产生多种类型的畸变, 如染色体粘连、染色体断片、染色体桥、染色体分离融合等现象, 且畸变率随处理浓度的增加而升高。

关键词: 硫酸铝; 大蒜; 微核率; 有丝分裂指数; 染色体畸变率

中图分类号: Q944.6 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)06-1269-04

Cytogenetic Toxicity Effect of Aluminum Sulphate on *Allium sativum* L. Root Tip Cells

QIN Yong-yan¹, DAN Hui-guo¹, LIU Rui-xiang¹, YAO Qin-tao²

(1. Department of biological Science and Technology, Changzhi College, Changzhi 046001, China; 2. Biology Group, No. 1 Middle School, Changzhi 046001, China)

Abstract: The cytogenetic toxicity effects of different concentrations of $Al_2(SO_4)_3$ on *Allium sativum* L. root tip cells were studied. Micronucleus assay and chromosome aberration assay were used to determine the micronucleus rate, the mitotic index and chromosome aberration rate of *A. sativum* root tip cells. The result showed that: in the tested concentration range, the micronucleus rate increased first and then decreased with increasing concentration. The cell mitotic index decreased first and then increased, but lower than the control group ($P < 0.05$). Various types of chromosome aberration were observed such as chromosome adhesion, chromosome fragments, chromosome bridges, chromosome separation fusion phenomenon and the distortion rate increased with increasing concentration.

Key words: *Allium sativum* L.; $Al_2(SO_4)_3$; micronucleus rate; mitosis index; chromosome aberration

铝是地壳中第三大丰富元素,也是地壳中含量最丰富的金属元素。当它溶解在酸性土壤中便对植物产生毒害作用。近年来全球环境恶化,使土壤逐渐酸化。因此,已出现的和潜在的 Al^{3+} 对植物的伤害和对作物产量的影响不容忽视。据报道^[1],酸性土壤约占全世界土地面积的 30% 和耕地面积的 50%。因此,开展对植物铝害机理的研究,对环境监测及农业指导均具有重要意义。

近年来,根尖微核法(Micronucleus, MN)和染色体畸变法(Chromosome aberration, CA)被认为是用作致突变性分析的一种很好的测试系统^[2]。Miller 等人^[3]研究表明,微核率与染色体畸变实验具有良好的相关性。因此,本文以大蒜根尖为材料,通过不同铝浓度处理,观察、统计其微核率、有丝分裂指数和

收稿日期: 2012-05-28 修回日期: 2012-07-23

基金项目: 山西省长治市科技计划项目(20123055)、山西省高校科技研究开发基金资助项目(20081043)和长治学院 2009 年校级科研课题(200913)

作者简介: 秦永燕(1980—),女,实验师,硕士,主要从事植物遗传研究, E-mail: qyy429@126.com。

染色体畸变率,以期在细胞水平上探讨硫酸铝对大蒜根尖细胞遗传毒性的影响,并为进一步研究铝对植物的毒害机理提供一定的理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

大蒜(*Allium sativum* L.) ,百合科植物,购于长治市场。

硫酸铝($Al_2(SO_4)_3$) ,分析纯,北京化工工厂生产。用蒸馏水分别配成 0.10、0.125、0.25、0.50、1.00 g/L 5 个不同浓度的溶液。

1.2 方法

选取大小均匀并无损伤的大蒜鳞茎,置于盛有蒸馏水的小烧杯中,在 $(23 \pm 1)^\circ C$ 恒温箱中培养。待根长至 1~2 cm 时,分别移至 5 种浓度(0.10、0.125、0.25、0.50、1.00 g/L) 的硫酸铝溶液中染毒 30 h (设蒸馏水处理作对照),然后恢复培养 30 h。各处理根尖水洗后用卡诺固定液(95%乙醇:冰醋酸=3:1, V/V) 固定 24 h,移入体积分数为 70% 酒精中保存备用。常规制片,shiff 试剂染色 24 h,压片,镜检,在 Motic 生物数码显微镜下,对每个处理组随机观察 10 个根尖,每个根尖观察 1 000 个分生区细胞,统计微核率、有丝分裂指数、染色体畸变率,并对异常细胞进行显微照相。数据处理均采用 SPSS11.5 系统进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 $Al_2(SO_4)_3$ 对大蒜根尖细胞有丝分裂指数的影响

由表 1 可知,当硫酸铝浓度为 0~0.125 g/L 时,大蒜根尖细胞有丝分裂指数随硫酸铝浓度的升高呈下降趋势;当浓度为 0.25~1 g/L 时,大蒜根尖细胞的有丝分裂指数呈现回复上升趋势,但仍然低于对照组。5 个试验组分别与对照组相比差异显著,即 5 个试验组的有丝分裂指数明显低于对照组($P < 0.001$ 或 $P < 0.05$) ,表明在试验剂量范围内,硫酸铝对大蒜根尖细胞具有显著的毒害作用。

表 1 $Al_2(SO_4)_3$ 对大蒜根尖细胞分裂指数、微核率、染色体畸变率的影响

Tab. 1 The effect of aluminum sulphate on mitotic index, the rate of micronucleus and chromosome aberration of *A. sativum* root tip cells

浓度/($g \cdot L^{-1}$) $Al_2(SO_4)_3$	分裂指数/‰ ($\bar{X} \pm s$) MI Frequency	微核率/‰ ($\bar{X} \pm s$) /‰ MN Frequency	畸变率/‰ ($\bar{X} \pm s$) CA Frequency
0	75.92 ± 8.63	0.00 ± 0.00	0.39 ± 0.68
0.10	31.45 ± 4.39**	0.84 ± 0.07	4.57 ± 1.05**
0.125	27.07 ± 7.75**	0.92 ± 0.03	5.63 ± 0.86**
0.25	41.31 ± 9.33**	1.66 ± 0.19	7.68 ± 4.49**
0.50	42.57 ± 11.59**	0.95 ± 0.12	9.42 ± 1.99**
1.00	48.24 ± 5.26*	0.88 ± 0.05	14.95 ± 1.48**

均与对照组比较,“*”表示 $P < 0.05$,“**”表示 $P < 0.001$ 。

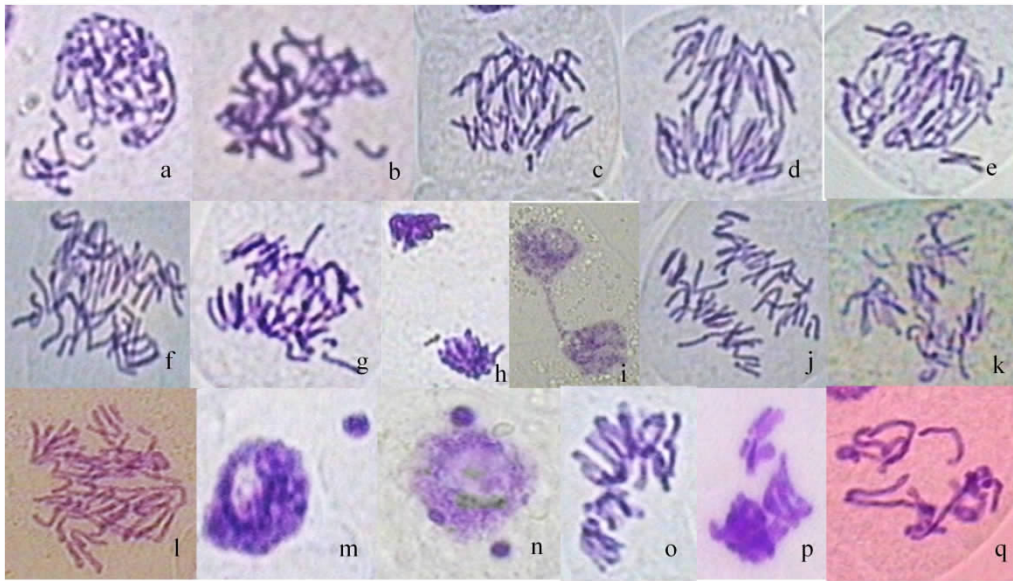
Each group comparison with the control group,“*”means expressing $P < 0.05$,“**” means expressing $P < 0.001$.

2.2 $Al_2(SO_4)_3$ 对大蒜根尖细胞微核率的影响

$Al_2(SO_4)_3$ 能够诱发一定频率的微核率。由表 1 可知,5 个试验组的微核率均明显高于对照组。在试验浓度范围内,微核率随 $Al_2(SO_4)_3$ 浓度的升高呈现出先增加后减少的趋势。当硫酸铝浓度为 0.25 g/L 时,出现的微核最多;当浓度为 0.25~1 g/L 时,微核呈下降趋势。与对照组相比,硫酸铝对大蒜根尖细胞微核率的影响不显著($P > 0.05$) ,表明大蒜对硫酸铝具有非剂量依赖性。

2.3 $Al_2(SO_4)_3$ 对大蒜根尖细胞染色体畸变率的影响

$Al_2(SO_4)_3$ 具有明显诱发大蒜根尖细胞染色体畸变的作用。由表 1 可知,染色体畸变率随 $Al_2(SO_4)_3$ 浓度的增加而逐渐上升,在 1.00 g/L 时染色体畸变率达到最高值。与对照组相比,在试验剂量范围内,硫酸铝对大蒜根尖细胞畸变率的影响存在显著差异。5 个试验组的染色体畸变率均明显高于对照组($P < 0.001$) 。



a b - 前期微核; c - 中期染色体粘连; d - 后期染色体桥; e f - 中期染色体滞后; g - 中期染色体断片; h - 末期染色体断片; i - 末期单桥; j k l 后期染色体多极化; m - 间期单核; n - 间期双核; o - 末期染色体多极化; p - 染色体分散融合; q - 纺锤丝被打乱。

a b - micronucleus in prophase; c - sticking chromosome in metaphase; d - single bridge in anaphase; e f - residence chromosome in metaphase; g - chromosome fragment in metaphase; h - chromosome fragment in telophase; i - single bridge in telophase; j k l - chromosome reach to multiple poles; m - micronucleus in interphase; n - double micronucleus in interphase; o - chromosome reach to multiple poles; p - chromosome spread and fusion; q - spindle fibers upset.

图1 硫酸铝对大蒜根尖细胞有丝分裂的影响

Fig. 1 The effects of aluminum sulphate on mitosis of *A. sativum* root tip cells

2.4 $Al_2(SO_4)_3$ 对大蒜根尖分生组织细胞有丝分裂的影响

从镜检结果来看,硫酸铝处理大蒜根尖细胞后,可导致多种类型的染色体畸变(图1)。如上次有丝分裂过程中染色体受损或染色体活动异常而造成的微核,染色体的损伤,纺锤丝的破坏或部分染色体的粘连而形成染色体滞后、单桥、双桥、多桥、多极化,合胞体等现象。

3 讨论

3.1 $Al_2(SO_4)_3$ 对大蒜根尖细胞有丝分裂指数的影响

本文研究结果表明,随着 $Al_2(SO_4)_3$ 处理浓度的增加,大蒜根尖有丝分裂指数呈现先下降后上升的趋势,但均低于对照组,说明铝抑制根尖细胞分裂。贺根和等研究表明铝会抑制根尖细胞的伸长。因此,铝处理后,根尖细胞的分裂和伸长均会受到抑制。冯英明^[4]报道,低浓度的活性氧(ROS)能提高植物细胞的抗氧化防御机制,清除活性氧,使细胞不受伤害。Foy^[5]研究证明铝降低植物有丝分裂指数的原因是铝抑制了细胞DNA的复制及蛋白质的合成,使细胞不能进入下一次的分裂期,从而降低有丝分裂指数。刘强等研究表明0~10 mm根段是铝积累的主要部位。因此,根据本文的研究结果推测:当铝离子浓度在0~0.25 g/L,随着处理浓度的增加,铝在大蒜根尖细胞内积累,诱发活性氧等有害物质的产生,抑制了细胞有丝分裂有关蛋白质的合成,从而阻碍细胞周期的运行,导致有丝分裂下降。同时,当铝离子浓度超过0.25 g/L时,由于有害物质的增加激活了细胞中抗氧化酶,在抗氧化酶的作用下,使细胞中有害物质得以及时清除,有丝分裂指数重新得以升高。Morimura^[6]在研究铝毒诱导植物细胞反应时认为,铝主要抑制根尖组织的细胞分裂,根系在铝处理后几小时内细胞分裂就停止,以后虽然又恢复分裂,但细胞分裂的速度要比未经铝处理的要低,这与本文的研究结果一致。

3.2 $Al_2(SO_4)_3$ 对大蒜根尖细胞微核率的影响

活性氧(ROS)过量产生以及抗氧化剂抵御机制的不足是导致微核增长的一项重要因素^[7]。本文的研究表明,不同浓度的硫酸铝对大蒜根尖细胞的微核率均有影响,当浓度为0.25 g/L时,微核率最高,

随着处理浓度的升高,微核率又呈现下降的趋势。因此,推测其可能的原因是低浓度的 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 诱发大蒜产生过多的活性氧(ROS),但是机体自身抗氧化剂抵御机制的不足使微核增多;当浓度高于 0.25 g/L 时,机体自身抗氧化剂抵御机制被激活,使微核率有所下降,但仍高于对照组,还有待进一步研究。

3.3 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 对大蒜根尖细胞染色体畸变率的影响

从表 1 可知随着硫酸铝浓度的增加,染色体畸变率升高。从镜检结果来看,染色体畸变的主要类型是染色体粘连。染色体粘连可能是发生在细胞有丝分裂前期的首次事件,它被描述成染色体凝集,标志着粘连出现和由染色单体桥形成缠绕的染色体纤维,这种染色体异常导致了染色体桥(后期染色体分离不自由、不等易位或染色体片段倒置的结果)的形成。由于 2 条染色体粘连在一起,随着有丝分裂的进行,导致染色体断裂,进一步造成染色体断片的形成。因此,染色体粘连、染色体桥和染色体断裂密切相关。当浓度为 1.00 g/L 时,染色体畸变率最高,说明高浓度的硫酸铝对大蒜根尖细胞产生强烈的诱变效应。由高毒性导致的染色体粘连反应,通常是一种不可逆转的转变,并有可能导致细胞死亡^[8]。因此,染色体粘连、染色体桥和染色体断裂等遗传毒性效应,可能导致细胞死亡,或者随后将损伤转移到下一代细胞中去。

铝对大蒜根尖分生区细胞的影响机制,可能是铝影响了微管组织的正常运行。MacDonald 等研究表明^[9], Al^{3+} 强烈促进微管蛋白装配到微管上,并抑制了随后发生的 Ca^{2+} 诱导的微管蛋白的解聚作用。微管装配过程中的 GTP 水解速度是调节体内微管动力学的关键,而这一速度会由于 Al^{3+} 的结合而降低。细胞中极低浓度的 Al^{3+} 就足以扰乱微管形成和解聚的动态平衡,并最终导致细胞功能丧失。此外,铝以影响有丝分裂纺锤体的方式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,导致染色质移动不同步,产生断片,滞后等现象。Frantzios 发现^[10],在处于分裂时期的小麦根尖细胞中,微管骨架是铝毒的一个靶点。纺锤体机制的功能障碍主要是由于金属离子对微管蛋白巯基的重新激活。微管蛋白是一种多半胱氨酸蛋白质, Al^{3+} 对巯基有很高的亲和力,因而在大蒜根尖分生组织中检测到的染色体多极分布现象可能是由于微管装置对 Al^{3+} 的高敏感性,扰乱纺锤体的正常行为造成的。

4 结 论

本试验中不同浓度的硫酸铝对大蒜根尖细胞的微核率、有丝分裂指数和染色体畸变率具有不同程度的影响,并且有丝分裂细胞中出现的染色体片断、中期粘连、后期染色体桥、末期染色体片段等现象,均说明 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 对大蒜根尖细胞具有明显的细胞遗传毒性效应。然而,铝对大蒜的其他生物学效应及其机制的研究还有待进一步的研究和探讨。

参考文献:

- [1] Kochian L V, Hoekenga O A, Piñeros M A. How do crop plants tolerate acid soils mechanism of aluminum tolerance and phosphorous efficiency [J]. Annual Review of Plant Biology 2004, 55: 459 - 493.
- [2] 钱晓薇. 重铬酸钾对蚕豆根尖细胞致畸效应的研究 [J]. 遗传 2004, 26(3): 337 - 342.
- [3] Miller B, Alerting S, Lecher F, et al. Comparative evaluation of the in vitro micronuclei test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience [J]. Mutation Research, 1997, 392(1-2): 45 - 49.
- [4] 冯英明, 喻敏, 王昌全, 等. 铝毒诱导植物细胞反应研究进展 [J]. 华中农业大学学报 2005, 24(3): 320 - 324.
- [5] Foy C D, Chancy R L, White M C. The physiology of metal toxicology in plants [J]. Annual Review of Plant Physiology, 1978, 29: 511 - 566.
- [6] Morimura S, Takahashi E, Matsumoto H. Association of aluminum with nuclei and inhibition of cell division in onion (*Allium cepa*) roots [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1978, 8(5): 395 - 401.
- [7] Serpil ünyayar, Ayla Celik, Özlem Cekiç, et al. Cadmium - induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba* [J]. Mutagenesis 2006, 21(1): 77 - 81.
- [8] Stephen J. Cytological causes of spontaneous fruit abortion in *Haemanthus katherinae* Baker [J]. Cytologia, 1979, 42: 137 - 145.
- [9] Macdonald T L, Martin R B. Aluminium ion in biological systems [J]. Trends Biochemical Sciences, 1988, 13(1): 15 - 19.
- [10] Frantzios G, Galatis B, Apostolakis P. Aluminium effects on microtubule organisation in dividing root - tip cells of *Triticum turgidum*. I. Mitotic cells [J]. New Phytologist 2000, 145(2): 211 - 224.