

镰刀菌 XX-A-02-II 发酵液诱发蚕豆根尖遗传损伤研究

庞振凌, 王 云

(南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473061)

摘 要:采用蚕豆根尖微核技术研究 0、5、25、50、100、200 倍不同稀释倍数镰刀菌发酵液的遗传毒性。结果表明:同阴性对照相比,所有试验处理对蚕豆根尖细胞微核发生率的影响显著增加,而且表现出一定的剂量效应。镰刀菌滤液原液对蚕豆根尖细胞微核发生率影响显著高于阳性对照的效应,从而说明镰刀菌滤液具有较强的遗传毒性。

关键词:镰刀菌发酵液;微核试验;遗传毒力

中图分类号:S 643.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)01-0098-04

微核是细胞在有丝分裂时因各种有害因素损伤,使细胞核成分残留在核外的微小染色质块。微核多见于间期细胞,大小差别很大,其大小一般为主核 $1/4 \sim 1/3$,由于它与染色体畸变有明显的相关性,可作为反映外源性因素对细胞染色体损伤强度的指标。试验证明,环境诱变因子的强弱与诱发的微核率成正比,因此可用微核率大小来表示诱变因子的强弱^[1]。细胞微核试验技术具有简便、快速、灵敏高等优点,蚕豆根尖细胞微核技术更被国际诱变剂、致癌剂防护委员会(ICPEMC)推荐为检查致癌剂、诱变剂常用的遗传毒理方法之一,而国内

学者运用该技术已开展了水质污染、环境污染物、香烟烟雾水溶物和农业土壤污染等方面的研究^[2]。

镰刀菌是一类世界性分布的真菌,镰刀菌毒素是由镰刀菌属中多种真菌所产生的次级代谢产物。根据联合国粮农组织和世界卫生组织联合召开的第三次食品添加剂和污染物会议资料,已经将镰刀菌毒素问题同黄曲霉毒素一样,是自然发生的最危险的食物污染物^[3]。近年来,镰刀菌毒素对人类健康的影响越来越引起人们的注意,尤其是在许多人类肿瘤高发地区的粮食中曾多次检出过有关的镰刀菌,使人们越来越关注镰刀菌及其毒素的致癌危险性。镰刀菌毒素是镰刀菌产生的一类对其寄主植物具有一定生理活性和非专化性作用位点的代谢产物,属于非寄主选择性毒素,可以破坏植物细胞膜及超微结构,并诱导体外培养的动物细胞发生凋亡^[4]。毒素的作用方式主要是对超微结构的影响,毒素

第一作者简介:庞振凌(1956-),女,河南内乡人,本科,教授,现主要从事遗传学的教学与科研工作。E-mail:PZL56@163.com.

基金项目:南阳市科技攻关计划资助项目(2007S1419);南阳师范学院资助项目(nyct200525)。

收稿日期:2012-07-23

Comparison of Fruit Nutritional Traits and Isoenzymes in Different Ploidy Striffin Melon

LI Wei, YU Ze-yuan, LI Xing-guo, SHAO Qin

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Taking different ploidy striffin melon materials, including diploid, triploid crossed with $4 \times \times 2 \times$ and autotetraploid induced by colchicine were selected for text their nutritional traits and the variabilities of EST, POD and SOD isoenzymes in leaves. The results showed that the content of soluble sugar, content of soluble solids, content of soluble protein, content of VC and content of amino acid were divergent in different ploidy striffin melon as follow: soluble sugar, VC and amino acid contents made the same trend, $4 \times > 3 \times > 2 \times$; soluble solids and soluble protein contents made the same trend, $3 \times > 4 \times > 2 \times$; the EST isoenzyme bands of diploid and triploid were all two more than those of autotetraploid in leaves. The number of POD and SOD isoenzyme bands of different ploidy melon materials were same, but the expressed quantity of polyploid was higher. The results indicated the isoenzyme band pattern of different ploidy melon materials were same, but the activities in polyploid were stronger than that in the diploid.

Key words: striffin melon; autopolyploidy; isoenzymes; fruit nutritional traits

能破坏细胞核和核糖体的结构,抑制 DNA 指导下的 RNA 的合成,进而使细胞发生质壁分离、原生质体颗粒化、线粒体肿大、双膜崩解等^[5]。有关文献报道,检测镰刀菌发酵液毒性有采用 Ames 试验、小鼠淋巴器官细胞诱变试验和果蝇性连锁隐性致死突变试验等方法^[6-9],但目前尚无采用蚕豆根尖微核技术检查镰刀菌毒素遗传毒性的研究。因此现采用蚕豆根尖细胞微核技术研究不同稀释倍数镰刀菌发酵液毒素的遗传毒性效应,并对结果进行了统计处理和分析,为该镰刀菌品种毒素遗传毒性进行更全面地评价。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试蚕豆购于南阳市新西种子公司。XX-A-02-II 镰刀菌品种发酵液由南阳师范学院生命科学与技术学院植物保护试验室提供。1 mol/L 盐酸、无水乙醇、冰醋酸、1 mol/L NaN_3 、固定液、改良石炭酸品红染液和醋酸地衣红染液等试剂。

取出冰箱中的镰刀菌毒素发酵液原液,分别用蒸馏水稀释配制成 6 个不同浓度梯度的镰刀菌毒素发酵液,稀释倍数分别为 0 倍(原液)、5 倍、25 倍、50 倍、100 倍、200 倍。阴性对照采用 PDB 培养基,阳性对照采用 1 mol/L NaN_3 。

1.2 试验方法

浸种:选取大小均匀的蚕豆种子放入盛有自来水托盘中,置 25℃ 温箱中,浸种 23~26 h,此间换水 2 次。**催芽:**待种子吸胀后,用纱布包裹置托盘内,保持湿度,25℃ 的培养箱中不照光培养生根,当根长到 1~2 cm 时,把托盘中纱布换成滤纸继续培养,其间要注意保持湿度,至根长至 2~5 cm 备用。**染毒:**每一处理组选取上述较好的种子 4~5 粒,放入贴好标签的不同梯度发酵液培养皿中且要让根尖浸入到毒液中。继续培养 24 h。**阴性对照:**在培养皿中继续用 PDB 培养基浸泡。**阳性对照:**在培养皿中用 1 mol/L NaN_3 浸泡。**恢复培养:**将处理后各种子用蒸馏水浸洗 3 次,每次 3~5 min,洗净后的种子再放入新铺滤纸培养皿中置 25℃ 温箱中,使根尖细胞恢复 22~24 h。**固定:**将恢复后的种子,从根尖顶端切下 1 cm 长的幼根放入小的试剂瓶中,加固定液固定 24 h。**解离染色:**已固定的幼根,用蒸馏水浸洗 2 次,每次 5 min。吸净蒸馏水后,再加入 1 mol/L HCl 将幼根浸泡住,连瓶放入 60℃ 水浴锅中水解,约 10 min 至幼根被软化即可。**压片镜检:**随机取出处理好的根尖进行压片,使细胞在尽量分散开,在上边滴加 1 滴石炭酸品红染液,待 1 min 后盖上载玻片,擦去多余染液进行镜检^[10]。每个浓度梯度及对照组至少随机镜检 3 个根尖,每个根尖至少计数 1 000 个,记录发生的微核数,测定其

微核千分率(MCN‰),并进行统计学处理^[11]。

2 结果与分析

2.1 镰刀菌发酵液对蚕豆根尖微核率的影响

在显微镜下观察不同浓度梯度的镰刀菌毒液所制装片,均可观察到微核现象,其是与主核分离的小核,大小为主核的 1/3 以下,微核着色与主核基本一致,形态有圆形或不规则形等,见图 1 箭头所示。同时也可以观察到镰刀菌发酵液对蚕豆根尖细胞分裂期染色体损伤,形成了细胞染色体断片见图 2 箭头所示。

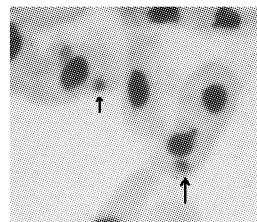


图 1 蚕豆根尖细胞微核
Fig. 1 Micronucleus of root tip cells in broad bean

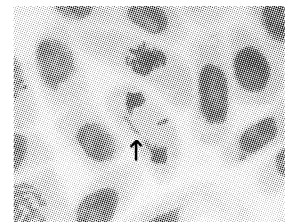


图 2 蚕豆根尖细胞染色体断片
Fig. 2 Chromosomal fragments of root tip cells in broad bean

6 个浓度梯度镰刀菌发酵液及阳性对照阴性对照试验组引起的蚕豆根尖细胞微核千分率如表 1 所示。其中阴性对照的蚕豆根尖微核发生率等于 0,说明在 PDB 培养基中的成分不会导致蚕豆根尖细胞产生微核。阳性对照微核率较大,具有较强的遗传毒害作用。从表 1 和图 3 可知,试验各组梯度与阴性对照组微核率之间的差异极显著,说明各组浓度梯度的镰刀菌发酵液均能导致蚕豆根尖细胞微核率增加,并且随着镰刀菌发酵液稀释倍数的增加蚕豆根尖细胞微核发生率显著下降,表明镰刀菌发酵液的浓度与蚕豆根尖细胞微核率之间存在着明显的剂量效应关系,而发酵液原液对蚕豆根尖细胞微核发生率显著高于阳性对照组。微核的产生是对纺锤体、染色体本身产生损伤的表现,从该试验结果分

表 1 不同浓度梯度镰刀菌发酵液处理的蚕豆根尖细胞微核率

Table 1 The micronucleus rate of root tip cells in broad bean induced by different dilutions *Fusarium* filtrate

分组	浓度	微核率/‰			平均微核率/‰	标准差
		1	2	3		
阳性对照	1 mol/L NaN_3	75	74	73	74.0	1.00
	0 倍原液	111	105	98	104.7	6.51**
	5 倍稀释	59	39	60	52.7	11.85**
镰刀菌发酵液	25 倍稀释	66	49	73	62.6	12.34**
	50 倍稀释	31	46	51	42.7	10.41**
	100 倍稀释	17	11	14	14.0	3.00**
	200 倍稀释	18	11	14	14.3	3.51**
阴性对照	PDB 培养基	0	0	0	0	0

注:与阴性对照组比较;**表示 $P < 0.01$ 。下同。

Note: Compared with negative control; ** respects $P < 0.01$. The same below.

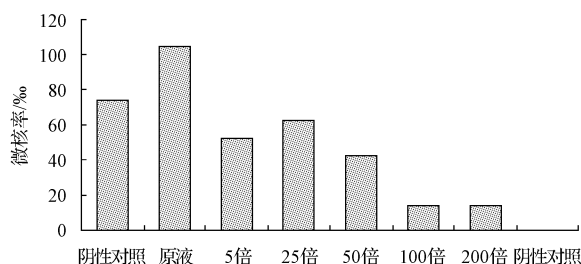


图3 不同稀释倍数镰刀菌发酵液对蚕豆根尖的微核率

Fig. 3 The micronucleus rate of root tip cells in broad bean induced by different dilutions *Fusarium* filtrate

析可知,镰刀菌发酵液中的有害成分,可能直接作用于分裂期细胞核,破坏核骨架,从而诱发核突出物及核裂团形成较高的微核数。

2.2 镰刀菌发酵液对蚕豆根尖微核率的单因素方差分析

对不同梯度的镰刀菌发酵液进行方差分析表2所示,差异极显著。然后对所得数据进行多重比较。由表3可知,发现大部分浓度梯度的镰刀菌发酵液处理蚕豆根尖存在的极其显著的差异,尤其是原液与其它所有梯度之间都存在的极显著的差异,表明蚕豆根尖细胞对镰刀菌发酵液中毒素含量变化十分敏感,并且镰刀菌毒素的确对蚕豆根尖微核的形成有显著性影响。由此认为镰刀菌发酵液中的镰刀菌毒素具有较高的遗传毒性。

表2 微核率的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方差	F 值
镰刀菌发酵液	18 222.5	5	3 644.5	
误差	929.3	12	77.4	
总变异	17 293.2	17	47.1 **	

表3 数据间的多重比较

分组	平均微核率/%	0.05 显著水平	0.01 显著水平
原液	104.7	a	A
25 倍稀释	62.6	b	B
5 倍稀释	52.7	bc	BC
50 倍稀释	42.7	c	C
200 倍稀释	14.3	d	D
100 倍稀释	14.0	d	D

3 讨论

3.1 试验方法分析

该试验独创性采用了蚕豆根尖微核技术检测镰刀菌发酵液的遗传毒性,而与其它已经报道过的检测方法,如 Ames 试验、小鼠骨髓细胞染色体微核试验和哺乳动物细胞畸变等,虽然在表现形式和检测终点上存在差异,但其基本原则相近。在遗传毒性效应上,蚕豆细胞遗传系统具有同样的功效,都可用于鉴别未知物质的致突变性^[12]。而另一方面,哺乳动物骨髓细胞测试系统存

在着需要一定培养条件与时间,细胞同步化困难,微核率低的缺陷。Ames 试验则必须进行菌种鉴定、配制诱发性指示剂等复杂操作程序,使得这2个方法在实际运用中受到很大限制^[13],而蚕豆微核系统以蚕豆根尖细胞染色体大,DNA 含量高,对诱变因子有较好的敏感反映性,以及简便的操作等特点在实践中得以广泛的应用^[14]。并且据报道蚕豆根尖微核技术与动物试验方法之间对环境致突变物引起的染色体畸变等定性反应的一致性可达99%以上。可见此技术无疑是环境遗传毒物的快速筛选方法之一^[15],同样也十分适用该次检测镰刀菌发酵液的遗传毒性。

3.2 镰刀菌发酵液毒性分析

镰刀菌毒素是镰刀菌属中多种真菌所产生的次级代谢产物。镰刀菌毒素中主要有玉米赤霉烯酮、单端孢霉毒素、串珠镰刀菌素和伏马菌素等,它们均对DNA合成具有一定抑制作用^[16]。根据有关微核形成机理的理论研究,认为微核形成有两条途径:一是诱变剂打断DNA分子形成DNA断片,该断片因没有纺锤丝相连无法随染色体分离过程被拉向两极,因而随机滞留在某一个子细胞的细胞质中形成独立于细胞核之外的微小的具有核形状的微核;二是由纺锤丝毒剂打断纺锤丝造成的整条染色体落后于核分裂周期形成微核。这两条途径发生的概率各为1/2。微核的数量反映了染色体损伤的程度,故微核已成为检测环境诱变剂毒害效应的一个重要指标。

近年来镰刀菌毒素致癌、致畸、致突变的潜在危害越来越受到关注。据研究,致突变性与致癌性高度相关,致突变物中可能存在致癌的危险性。夏求洁从林县食管癌病户及田地里收割的粮食中鉴定出一组镰刀菌毒素,发现这些毒素在极低剂量时,即可引起细胞染色体畸变。且林县玉米等粮食中镰刀菌毒素与国内外食管癌低发区主食比较,其含量明显高,种类明显多,这与食管癌的发生率呈正相关^[17]。该试验结果表明,镰刀菌发酵液原液对蚕豆根尖细胞微核发生率的影响显著高于阳性对照,而阳性对照1.0 mol/L NaN₃已具有很强的染色体断裂作用和破坏纺锤体结构的功能^[18]。从而说明镰刀菌发酵液具有较强的遗传毒性,是一种强烈的致突变剂,具有潜在的致癌能力,这也查阅到相关文献研究结果相一致。因此在日常生活中要注意防范镰刀菌污染人们的生活环境,同时进一步发展镰刀菌毒素检测技术和优化镰刀菌毒素脱毒的方法,使人们远离镰刀菌毒素的威胁。

3.3 问题与展望

该试验属于镰刀菌毒素初步的遗传毒性的检测,对发酵液中毒素含量没有做精确的测定,只是测出粗毒液具有较大的遗传毒性,并且试验材料只有1个品种镰刀

菌发酵液,试验的方法也过于单一,因此很难对镰刀菌毒液的遗传毒性做出全面的评定。但通过该次试验,发现蚕豆根尖微核技术作为遗传毒物的预警系统来初筛潜在致癌危险的物质具有经济、快速、准确的特点,但蚕豆根尖细胞微核技术也存在一定的局限性。首先,微核的判定、计数在不同的试验室与观察者之间有一定的差异,数据难以进行比较,这就要求有标准的计数程序。其次,它无法根据结果直接指示受试样品中致突变物的类型和诱变机制^[19]。如能配合其它检测系统,选用丰富的镰刀菌品种作为试验材料,这将有助于建立一个有效镰刀菌毒素评定系统。开展这方面的研究对防治镰刀菌毒素致癌、致畸、致突变,发展镰刀菌毒素检测技术和优化镰刀菌毒素脱毒的方法等方面都具有重要的意义。

参考文献

- [1] 谢晓玲,徐德琳,邓自发,等.太湖蓝藻滤液的遗传毒性分析[J].生态科学,2008,27(4):208-211.
- [2] 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[J].植物学报,1995,37(1):14-24.
- [3] 彭杰,吴晓鹏,黄惠琴,等.镰刀菌毒素研究进展[J].中国农学通报,2009,25(2):25-27.
- [4] 赵秀娟,吴定华.黄瓜抗枯萎病离体鉴定技术研究[J].华南农业大学学报,2001,22(1):39-41.
- [5] 魏松红,刘文合,俞孕珍,等.稻瘟病菌毒素对水稻愈伤组织成活率及其超微结构的影响[J].沈阳农业大学学报,1999,30(3):238-240.
- [6] Groves F D, Zhang L, Chang Y S, et al. Fusarium mycotoxins in core and core products in a high risk area for gastric cancer in Shandong Province, China[J]. Journal of AOAC International, 1999, 82(3): 657-662.
- [7] Arbillaga L, Azqueta A, EzPeleta O, et al. Oxidative DNA damage induced by Ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line; evidence of the relationship with cytotoxicity[J]. Mutagenesis, 2007, 22: 35-42.
- [8] 乌口静,袁慧. zEA 对体外培养的大鼠翠丸支持细胞损伤作用的研究[D].长沙:湖南农业大学,2006.
- [9] Leire A, Amaia A, Joost H M, et al. *In vitro* gene expression data supporting a DNA non-reactive genotoxic mechanism for ochratoxin A[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2006, 220: 216-224.
- [10] 郦惠民,袁文静.遗传学试验[M].武汉:武汉大学出版社,1994: 126-127.
- [11] 刘来福,程书肖.生物统计学[M].北京:北京师范大学,1988:248-260.
- [12] 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.
- [13] 周宏治.农药甲基对硫磷污染环境的微核研究[J].四川大学学报(自然版),2000,37(增):62-66.
- [14] 祝庆蕃,常福聚,赵庆夏.蚕豆根尖细胞微核试验[J].癌变·畸变·突变,1989,11(2):7-8.
- [15] 王爽,诸葛坚,余应年.微核与微核试验在遗传毒理学种的应用[J].癌变·畸变·突变,2000,12(4):253-256.
- [16] 张莉,王友保.环境致突变物的蚕豆细胞微核检测[J].生物学通报,2002,37(9):49-50.
- [17] 章红,李季伦.镰刀菌毒素与某些疾病的关系[J].环境科学,1995,15(1):65-68.
- [18] 李淑梅.利用蚕豆根尖微核技术检测颍河水质污染的研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),2001,29(2):112-114.
- [19] 何晓宇综述,朱忠勇审校.微核试验研究进展[R].国外医学遗传学分册,1995,18(5):254-256.

Study on Genetic Damage of Root Tip Cells in Broad Bean Plant Induced by the Filtrate of *Fusarium* XX-A-02-II

PANG Zhen-ling, WANG Yun

(Department of Life Sciences and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061)

Abstract: The genetic toxicology of 0, 5, 25, 50, 100, 200 times *Fusarium* filtrate was investigated using micronucleus test of root tip cell of *Vicia faba*. The results showed that the effects of other treatments on micronucleus (MCN) of two plant root cells were significantly increased in contrast to negative control, and the effects exhibited dose-effect. Liquid filtrate of *Fusarium* which was not diluted root tip cells of *Vicia faba* micronucleus incidence was significantly higher than the positive impact of control. It illustrated that there was strong genotoxicity in the filtrate of *Fusarium*.

Key words: the filtrate of *Fusarium*; micronucleus; genotoxicity