



环境诱变剂植物检测系统

林光恒

马德修

(中国科学院海洋研究所) (美国西伊利诺大学环境管理研究所)

环境诱变剂 (mutagens) 植物检测系统可以分为两大类,一类是陆地植物检测系统,另一类是海洋植物检测系统,前者用高等植物,而后者则用低等植物。就研究的深度和广度而言,后者远远不及前者。本文要讨论的是陆地植物检测系统,有关海洋植物检测系统请参阅本文的姊妹篇“海洋环境中诱变剂遗传活性的生物检测”一文^[1]。

根据美国环保局资料,已知的、公认的和最重要的 25 种环境诱变剂测定方法中,有 3 种是陆地植物方面的,即植物根尖细胞有丝分裂染色体畸变测定法,植物基因突变测定法和紫露草 (*Tradescantia*) 四分体微核测定法。

一、植物根尖细胞有丝分裂 染色体畸变测定法

在这个测定法中较常用的根尖有洋葱 (*Allium cepa*)、玉米 (*Zea mays*)、紫露草 (*Tradescantia paludosa*)、大麦 (*Hordeum vulgare*)、蚕豆 (*Vicia faba*) 等。这个系统主要应用于测定液体中的诱变剂,如存在于水体中的诱变剂(河水、湖水、饮用水、污水、咸淡水等)。方法主要之点就是把上述这些植物的根部在具诱变剂的水体中生长一段时间以后,给予一段恢复期,让根尖在干净无污染的水中生长恢复,然后将幼嫩根尖截下带有尖部的一段进行固定,并用醋酸洋红压片技术 (Acetocarmine Squash Technique) 或弗尔根染色技术 (Feulgen Stain Technique) 压片制作用于观察染色单体 (Chromatid) 或染色体畸变的片子。

最方便和最常用的材料是洋葱、蚕豆和紫露草。洋葱和蚕豆可以直接从市面上买到,紫露草生活力强,在温室暖房中可以一年四季开花。下面我们分别以蚕豆和紫露草为例来说明这个方法的原理、应用范围以及注意事项。

(一) 用蚕豆根尖细胞有丝分裂染色体畸变来

检测环境中的诱变剂

蚕豆 (*Vicia*) 自本世纪五十年代初期以来一直被用来研究由各种射线所诱发的染色体断裂和畸变。六十年代初期起它也被用来研究被各种化学药物诱发的染色体损伤。常用的种类是 *Vicia faba* 及其变种 *V. faba var. minor*, 后者的种子比前者小,但染色体大小和数目都一样,都有 6 对相当大的染色体。

这一测定法所依据的原理是水溶性的物质(包括诱变剂在内的各种化学物质)很容易被快速生长的蚕豆根尖的分生组织所吸收。各种诱变剂和断裂剂 (Clastogens) 通过对根尖分生组织细胞中的有丝分裂周期 (G_1 期、S 期和 G_2 期) 的染色体的作用,切断 DNA 分子或干扰 DNA 分子的合成和修复,导致染色体损伤和断裂。这种始于间期的断裂在同一有丝分裂周期的中期或后期能以染色单体或染色体畸变形式有效地表现出来。根据固定材料时间的早晚,可以分别把染色单体类型畸变和染色体类型畸变作为终端进行观察统计。

这里要指出的是,材料处理以后恢复期的长短直接影响到终端所观察的对象。如果固定时间较早,即仅给予较短的恢复时间,如 8 小时,这时在同一有丝分裂中期所观察到的畸变是属染色单体型畸变,此期观察到的染色单体损伤当揭示出晚间期 (the later period of interphase) 即 G_2 期 (此时染色体早已复制) 受诱变剂或水体中的化学物质作用的染色单体损伤程度。反之,如果固定时间较晚,即处理后给予较长的恢复时间,一般约 40 小时,即中期时统计的畸变染色体是在上一次细胞分裂间期中的 G_1 期被化学药物损伤的染色体产物,属染色体型畸变。就技术上言,染色单体畸变比染色体畸变更容易在中期图象上统计,因此从数量统计的角度上看是更可靠的。

诱变剂或各种化学药物对染色体的损伤程度是

以每 100 个细胞(中期分裂象)中的断裂数来表示的。值得注意的是在染色体型畸变中,双着丝点(dicentrics)、倒位(inversion)、移位(translocation)和环(ring)都应统计为二次击中(2-hit)即二次断裂的畸变。染色单体型畸变中的染色单体交换也应统计为二次击中。染色体或染色单体的端部缺失(terminal deletions)则统计为一次击中畸变(一次断裂)。观察染色体或染色单体畸变是一项技术性很强且需要丰富经验的工作。为了使观察统计结果可靠和标准化,应参考 N. S. Cohn (1969) 写的“Elements of Cytology”(细胞学纲要)一书^[12]和美国橡树岭国家实验室(Oak Ridge National Laboratory)推荐的染色体和染色单体畸变标准格式记录表,以便分门别类记载各种类型的畸变。Cohn (1969)在他的书中详细地列出了通过辐射研究鉴别出的各种染色体和染色单体畸变图。

观察统计染色体或染色单体畸变,多在油镜下进行。也有人用根尖细胞中微核(micronuclei)频率作为观察终端来衡量诱变剂诱变效应^[13],以每 100 个细胞中微核数表示。但是不管是用染色体或染色单体畸变频率或断裂频率,还是用微核频率作为诱变剂诱变效能的指标,对于实验所得到的资料,都要用统计学进行处理,即用 t 测验进行显著性测定,以决定对照组和处理组之间是否有明显的差异。一般都用 1% 显著度为确定阳性反应的标准,当显著度为 5% 或高于此值时,即为阴性反应。

人们曾用蚕豆根尖细胞染色体和染色单体畸变测定法研究了大量的化学药物的诱变效能,其中包括抗生素、烷基磺酸盐类、(alkyl sulfonates) 嘧啶(pyrimidine) 和嘌呤衍生物(purine derivative)等等。在阳性反应的化学药物中不少表现出与剂量的相关性,个别药物其阳性反应表现为与温度和 pH 值有关,因此我们用“+/D”、“+/T”和“+/pH”三种符号来分别表示这三种不同的关系。

为了比较不同实验和不同化学药物诱变效能的大小,试验中所用的剂量单位也应统一,通常多用百分数、mol 浓度或 ppm 作为剂量单位。在阳性结果的剂量前要分别标以实验所用的最低剂量“DL”、最高剂量“DH”或单一剂量“DS”^[14]。

蚕豆根尖细胞有丝分裂染色体畸变生物测定法,是一种比较有效的、简便的和效率较高的化学诱变剂初筛方法。除了材料容易得到外,还不受时间、空间和设备条件的限制,全年都可进行试验,而且耗资很少,结果可在 48 h 内得到,因此,已为世界许多实验室所采用。但是,这个测定系统本身也有它的

局限性,即不适用于水溶性或处于液态的各种化学药物或物质;而且就敏感性而言远不及植物花粉母细胞减数分裂系统。当然,不能因某种药物在这个测定系统中具诱变效能而直接推断该药物必然也具有致癌性。为了了解蚕豆根尖有丝分裂染色体畸变生物测定中阳性反应的潜在诱变剂是否同样也具有致癌和致畸作用,有必要用哺乳动物测定系统进一步再进行测定。

(二) 用紫露草根尖细胞有丝分裂染色体畸变来检测环境中的诱变剂

紫露草 *Tradescantia paludosa* Anderson and Woodson (俗名叫蜘蛛草)原产地在美国,是一种很有价值的实验用草本植物,长期以来一直被用作研究辐射和环境诱变剂对染色体的损伤作用。这种植物体细胞中有 6 对相当大的染色体($2n = 12$,与蚕豆体细胞中的染色体数目一样),而且都是中央着丝点的。目前常用的有三个品种,即 *T. paludosa* No. 02、*T. paludosa* No. 03 和 *T. paludosa* 4430。紫露草在腐殖质丰富的土壤中,生长繁茂,植株可高达 40—60 cm,温室盆栽中,每盆可多达 20—30 株植株;叶片呈深绿色长窄条状,花呈蓝色或紫蓝色,一般都在夏季和早秋开花。在短日照季节里,如果对温室暖房中的紫露草提供 6—8 小时的人工光照(可用日光灯或白炽灯),则可诱发植株开花。

1980 年,我们发现我国山东紫露草,即毛萼紫露草(*Tradescantia reflexa*)对环境污染物的敏感性超过美国紫露草,从染色体数目的研究发现,毛萼紫露草体细胞中有 24 个染色体($2n = 24$),并带有 1—4 个 B 染色体,用这种植物的小孢子和花粉母细胞进行研究也证实了这点^[15,16]。这显然是一种四倍体种,就像 *T. ohioensis* 一样。目前的看法认为毛萼紫露草对诱变剂的高敏感性很可能与四倍体的染色体数以及数目众多的 B 染色体的存在有关(近来研究曾发现 B 染色体数,在有的植株中高达 6 个)。

紫露草现在已被广泛应用于细胞遗传学的研究,特别是用于对由于物理(如各种射线)和化学(如各种诱变剂)因素的作用所引起的染色体损伤的分析研究。共有三个测定系统可以应用,即根尖有丝分裂系统、花粉有丝分裂系统,以及花粉母细胞减数分裂系统。下面,我们只简单介绍有关紫露草根尖有丝分裂系统应用方面的有关知识。

在紫露草根尖细胞有丝分裂染色体畸变测定中,最常用的紫露草是 *T. paludosa* Sax clone No. 03。这个测定法所依据的原理与蚕豆根尖有丝分裂染色体畸变测定法是一样的。处理时只要将幼根浸在待

测试的化学药物(已知的或未知的)的水溶液中 6—24 小时(一般说来,要比蚕豆幼根略长些),然后用蒸馏水洗涤幼根数次,以除去残留在幼根表面的化学药物。随后的秋水仙素溶液处理和恢复时期的时间长短和操作程序与蚕豆根是一样的,惟秋水仙素溶液一般多用 0.2% 浓度。尽管紫露草幼根能耐受的 pH 值范围较宽(pH 5—8),然而只要有可能,对处理溶液用缓冲液进行适当的调节还是有必要的^[6]。

用紫露草根尖有丝分裂细胞作试验也要设置阴性和阳性对照,一般都用蒸馏水或去离子水作阴性对照,而用 EMS 作阳性对照。一些学者曾用此法对氯甲烷(methyl chloride)和环氧乙烷(ethylene oxide)和乙烯酮(ketene)等化学药物以及各种杀虫剂(如 Phosdrin、Bladex 等)的诱变性进行了测定。

紫露草根尖有丝分裂染色体畸变生物测定法也具有简便、易行、快速和可靠的优点,因而也是一种已被科学家接受的诱变剂初筛方法。当然,这个方法与那些具有同步化细胞的生物测定法(如紫露草花粉母细胞减数分裂染色体畸变或四分体微核生物测定法)相比较,效率就显得差些,因为到目前为止我们还没有办法促使根尖分生组织细胞分裂同步化。

二、环境诱变剂植物基因突变测定法

玉米花粉中蜡质突变,玉米和大麦里的黄绿色籽苗突变, *Arabidopsis thaliana* 子实体的颜色突变,大豆中的黄色斑点体细胞染色体交换或体细胞突变,以及紫露草雄蕊丝毛(staminal hair)从兰色变粉红色的突变等等,都是已知的,并已被应用来检测环境中诱变剂的基因突变。下面我们以紫露草雄蕊丝毛为例,对如何利用植物中的基因突变来检测环境中的诱变剂作一简单介绍。

最早把紫露草中的基因突变与辐射敏感性问题的联系起来的是 Sparrow 教授^[7,8]。他发现用 X-射线和 γ -射线急性或慢性照射紫露草能引起紫露草花瓣局部颜色的变化,并指出紫露草对射线是高度敏感的^[9]。根据 Sparrow 等人的研究发现决定紫露草花颜色的基因位点对辐射的敏感性大大超过测试过的其他各属植物,如 *Tupipa*, *Clematis*, *Trapaeolum* 和 *Gladiolus*。

目前用紫露草雄蕊丝毛生物测定法来监测环境中诱变剂的紫露草是 *Tradescantia clone 4430*。它是从开兰花的 *T. hirsutiflora* (2461 C) 和开粉红色花

的 *T. subacaulis* (2441) 杂交得到的。同时,这种植物具有减数分裂稳定,自发花粉突变率较低(10%),自花受粉不育,突变体中花颜色清楚,以及对化学诱变剂敏感等等优点^[10]。通过测交试验(即用有粉红色细胞突变的无性繁殖系 4430 与开粉红花的原亲本杂交)以及用带有粉红色细胞突变的无性繁殖系 4430 与二个异质 F₁ 姊妹株杂交都证实了紫露草花中粉红色素是由单一座位的一对基因所决定的,而且兰色(B)对粉红色(b)是显性^[10]。利用紫露草雄蕊丝毛颜色基因突变来监测大气中的诱变剂,最早是被美国布鲁克海温国家实验室(Brookhaven National Laboratory)所应用,随后也为其他实验室接受并加以应用。

现在已经清楚紫露草花中每一根雄蕊丝毛都是从一个表皮细胞通过连续的顶端和次顶端细胞分裂而形成的丝状体。在最适的生长条件下,成熟的未处理过的雄蕊有 40—75 根雄蕊丝毛,平均每根有 24 个细胞。如果在雄蕊丝毛发育的早期某一细胞产生突变,通过细胞分裂便产生一连串突变的细胞后代;如果这种突变是颜色的突变,从兰色突变为粉红色,那便出现由一串粉红色细胞所构成的雄蕊丝毛。显然,这一串相邻的粉红色细胞是由一个细胞单一颜色突变所产生的,因此只能判为一个单一突变现象加以处理,这根粉红色雄蕊丝毛可以视为一个突变体。

三、紫露草微核测定法(Trad-MCN Test)

紫露草微核测定法又叫紫露草四分体(tetrad)微核测定法。这个方法较之根尖细胞有丝分裂染色体畸变测定法和基因突变测定法,具有更简便、更有效和应用范围更广的优点。它根据的原理是紫露草花粉母细胞的减数分裂具有高度的同步性,而且分裂各期对环境中物理的或化学的,液体的或气体的各种诱变剂、断裂剂的敏感性很不相同,因此当花粉母细胞减数分裂 I 早前期的染色体如果受到内外环境因素(射线、诱变剂、断裂剂等等)的作用,受到损伤时,断裂的染色体或碎片,或受损伤的染色体便能在同步分裂的四分体时期形成微核,因此我们可以把微核作为监视的终点进行观察统计,以便判定诱变因素对这种真核生物的生殖细胞染色体的伤害程度及其诱变能力大小。这种方法比起观察根尖细胞有丝分裂染色体畸变来,无论在方法上,还是在技术上都简便容易的多。特别是如果把这个方法与“紫露草雄蕊丝毛突变测定法”结合起来,对同一诱变剂进行测定时,便可确立起染色体损伤与突变率之间

的关系。

紫露草微核测定法最初是在研究 1, 2-二溴乙烷 (1, 2-dibromoethane) 这种诱变剂对染色体的破坏作用以及剂量与反应间的关系时建立起来的^[11]。以后在用各种物理的因素, 如 X-射线、 γ -射线等, 和化学的因素, 如诱变剂甲基磺酸乙酯 (EMS)、叠氮化钠 (NaN_3)、叠氮酸 (hydrazoic acid)、环己胺 (cyclohexylamine) 及马来肼胍 (maleic hydrazide) 等等的实验中进一步确证了这一方法的有效性^[11, 12]。随后这一方法广泛地被世界上许多实验室 (包括我国某些实验室) 所采用, 现在这一方法已被我国环保部门采用为标准方法之一。

现在这一方法不仅被用于现场测试存在于空气中的环境污染物或射线, 而且还被用于测定食品添加剂和日用化妆品中是否含有诱变剂或毒性物质^[13]。从应用的角度看来, 这一测定方法已被证实为监测环境诱变剂最有效的一种方法。其理由有三: 一是方法本身灵敏度高, 因为应用真核生物紫露草生殖细胞减数分裂系统; 二是培养材料容易, 耗资少, 方法操作简便, 不需特殊仪器设备, 观察统计微核不受人力和时间限制, 试验周期短, 可在 48h 内得到结果; 三是方法适用范围广, 不仅可用于监测存在于空气中的诱变剂或放射性, 而且也可用于测试存在于液体中的诱变剂 (如河水、湖水、污水、井水、

自来水、咸淡水等等), 也还可以用以测试液态的或固态的 (水溶性的和非水溶性的, 对于非水溶性的要先溶于有机溶剂中)、食品、药物和日用化妆品。

这个测定方法常用的紫露草是 *T. paludosa* No. 02、*T. paludosa* No. 03 和 *Tradescantia* 4430 (杂种), 但是最常用的还是 *T. paludosa* No. 03, 这个品种于 1980 年引入我国, 现在中国科学院海洋研究所所有大量种植。

参 考 文 献

- [1] 林光恒, 海洋环境科学, 6(1), 49(1987).
- [2] Cohn, N. S., *Elements of Cytology*, pp. 243—271 2nd Ed., Harcourt, Brace and World, New York, 1969.
- [3] Kabarity, A. et al., *Acta Biol. Acad. Sci., Hung.*, 25, 9(1974).
- [4] Ma, T. H., *Mutation Research*, 99, 257(1982).
- [5] Ma, T. H. et al., *Mutation Research*, 104, 101 (1982).
- [6] Ma, T. H., *Mutation Research*, 99, 293(1982).
- [7] Sparrow, A. H., *Radiation Research*, 5, 596(1956).
- [8] Cuany, R. L. et al., *Abstamm Vererbungsl.*, 89, 7 (1958).
- [9] Sparrow, A. H. et al., *Bio-Science*, 18, 582(1968).
- [10] Thompson-Emmerling, M. et al., *J. Hered.*, 71, 261(1980).
- [11] Ma, T. H. et al., *Environ. Mut.*, 1, 123(1978).
- [12] Ma, T. H. et al., *Environ. Exper. Bor.*, 20, 169 (1980).
- [13] Ma, T. H. *Mutation Research*, 138, 157(1984).

关于检测环境致变物的 Ames 试验的几个问题

高 培 基

(山东大学微生物研究所)

1975 年 Ames 等建立了鼠伤寒沙门氏菌-微粒体系统, 用对诱发回复突变率的估计来检测环境致变物^[1], 由于表现为对动物致癌的 179 种化合物在 Ames 试验中有 87.9% 表现致突变作用, 而在确定为非致癌的 117 种化合物中有 86.3% 不具致突变作用, 都达到了近 90% 的正确度, 而且方法简便, Ames 试验已成为检测环境致变物的生物学短期试验中的首选方法。近年来我国已在环境保护、医药卫生和工农业生产等多方面应用了 Ames 试验, 做为环境质量安全评价, 产品检定和癌症病因分析等的依据^[3, 4]。随着人们对环境致癌因素的日益关切

和环境保护工作的开展, 食品卫生等法令的实施, Ames 试验的应用将更加广泛。但是, 研究者们陆续发现 Ames 试验方法中尚存在一些影响试验结果的不确定性因素^[3, 4, 6, 9, 10], Ames 等^[2]近年来也对其原试验方法做了修改, 本文仅就试验结果的判断和代谢活化系统的应用做一简略讨论。

一、关于确定被检物具致突变性的标准

Ames 试验是由对微生物诱发突变率和自发突变率的比较来推断被检物 (诱变剂) 是否具致突变作用。对微生物诱发突变率的估计, 涉及到对两个正