

УДК 577.344+581.162

ПОКАЗАТЕЛЬ СТЕРИЛЬНОСТИ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА *ZEA MAYS* КАК КРИТЕРИЙ ПАЛИНОТОКСИЧНОГО ВЛИЯНИЯ КСЕНОБИОТИКОВ

Эмирова Д. Э., Баличиева Д. В., Ибрагимова Э. Э.

*РВУЗ «Крымский инженерно-педагогический университет», Симферополь,
emirovadilyara@mail.ru, evelina_biol@mail.ru*

Исследовалось влияние различных концентраций пестицида ДНОК на генеративную систему *Zea mays* L. Установлено, что низкие концентрации (2 и 4 г/л) палинотоксического эффекта не оказывали. Высокие концентрации (8 и 16 г/л) оказывали среднетоксичное действие на генеративные органы *Z. mays*, проявляющееся в достоверном увеличении продукции стерильных пыльцевых зерен.

Ключевые слова: пыльца, генеративные органы, пестицид ДНОК, *Zea mays*, палинотоксичность, стерильность, фертильность.

ВВЕДЕНИЕ

Интенсификация сельскохозяйственного производства предусматривает широкое применение минеральных удобрений и химических средств защиты растений с внедрением научно обоснованных систем агротехнических, мелиоративных и организационно-хозяйственных мероприятий. Использование необоснованно высоких норм препаратов может отрицательно сказаться на урожае [1, 2, 3], привести к локальному загрязнению окружающей среды продуктами распада остаточных количеств пестицидов и нежелательным экологическим последствиям [4]. Для предотвращения последних необходимо проводить скрининг широко использующихся в агропромышленном комплексе препаратов с целью установления степени их токсичности для сельскохозяйственных культур [5]. В настоящее время многие исследователи для достижения данной цели используют широкий арсенал методов, к числу которых можно отнести методы биоиндикации и биотестирования [6], использование которых является оправданным в силу высокой чувствительности живых организмов и систем их органов к токсическому действию веществ техногенной природы. Одной из самых чувствительных систем организмов к действию токсических веществ является генеративная. В этой связи органы генерации довольно часто используются в эколого-токсикологических исследованиях в качестве тест-систем для выявления отрицательного влияния тестируемых веществ. В данном контексте очень удобным и широко используемым является микрогаметофитный анализ [7, 8, 9, 10].

Литературные данные свидетельствуют, что под влиянием неблагоприятных внешних условий, искусственного воздействия различными реагентами нормальное развитие пыльцы может нарушаться, что приводит к ее стерильности [11]. Наиболее чувствительными стадиями онтогенеза растительного организма к пестицидному воздействию являются бутонизация и цветение [12]. В связи с этим в наших

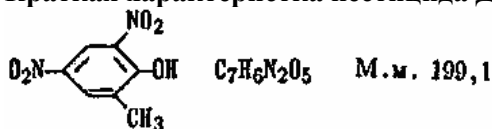
исследованиях мы использовали генеративные органы сельскохозяйственных растений для индикации палинотоксического действия ксенобиотиков.

Цель работы – определение стерильности мужского гаметофита *Zea mays* L. как критерия палинотоксического влияния ксенобиотиков.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В своих исследованиях мы использовали ДНОК (с рекомендуемой нормой расхода 40 г на 10 л воды), имеющий широкое применение в агропромышленном комплексе Крыма [13].

Краткая характеристика пестицида ДНОК (синокс, трифосид) [14, 15].



4,6-Динитро-о-крезол (Bayer).

Желтое кристаллическое вещество, т. пл. 85,5° С. Технический продукт, содержащий 95–98% основного вещества, имеет температуру плавления 83–85° С. Растворимость в воде 0,013%, хорошо растворим в большинстве органических растворителей. Со щелочами и аммиаком дает хорошо растворимые в воде феноляты.

ДНОК и его феноляты огне- и взрывоопасны. В связи с этим ДНОК выпускается в виде 40%-го растворимого в воде фенолята, содержащего в качестве наполнителя сульфаты натрия или аммония.

ЛД₅₀ для мышей и крыс 40–85 мг/кг. ЛД₅₀ натриевого фенолята для овец 200 мг/кг. Препарат сильнотоксичен для пчел. СК₅₀ для карпов и других рыб 6–13 мг/л.

Используется в качестве инсектицида, гербицида и фунгицида.

В почве препарат разрушается в течение 30–60 дней в зависимости от температуры и характера почвы.

В качестве объекта исследования использовали проростки семян *Zea mays* L. сорта Среднеспелый (гибрид кадр 267 МВ), которые выращивали в открытом грунте в условиях обработки различными дозами ДНОК. Контрольные растения выращивали без обработки. Грунт экспериментальных делянок – чернозем, рН нейтральное. Рабочие концентрации готовили непосредственно перед применением. Обработку растений проводили однократно в фазу закладки и формирования мужских соцветий при помощи пульверизатора. Повторность эксперимента четырехкратная. У указанной культуры изучали стерильность мужского гаметофита. Материалом для исследований служили мужские генеративные органы *Z. mays*, обработанные 2, 4 (рекомендуемая доза), 8 и 16 г/л концентрациями пестицида ДНОК.

Собранные соцветия фиксировали в уксуснокислом спирте (3:1), а затем, после промывки в 70%-ном спирте, переносили в 80%-ный этиловый спирт, где хранили до цитологического анализа при t = –2° С. Фертильность пыльцевых зерен определяли йодным методом на временных давленных препаратах [16]. В каждом экспериментальном варианте исследовали не менее 2000 штук пыльцевых зерен. Для сравнения полученные данные приводили к интенсивным показателям [17].

Изучение морфологической структуры пыльцевых зерен проводили при помощи системы анализа изображений, включающей микроскоп «LEICA DME» (объектив x4, x10, x40, x100 коэффициент увеличения тубусной линзы x0.10, x0.22, x0.65, x1,25), видеокамеру «CANON S80» и персональный компьютер.

Для скрининга палинотоксического влияния различных концентраций ДНОК использовали тест на стерильность мужского гаметофита. Были рассмотрены следующие параметры: количество фертильных и стерильных пыльцевых зерен, индекс стерильности (ИС), представляющий собой величину, показывающую во сколько раз частота индуцированного уровня стерильности, вызванная действием различных доз препарата, выше уровня спонтанной стерильности (контроль) [9].

Палинотоксический эффект различных концентраций ДНОК – ПЭ (%) по показателям фертильности пыльцы тест-растения рассчитывали по формуле [18]. Полученные данные были ранжированы по классификации ЕС₁₀₋₉₀ [18].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2000». Достоверность различий полученных данных определяли с помощью t-критерия Стьюдента [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальные данные показали, что между растениями, обработанными различными дозами исследуемого препарата, имеются определенные различия по показателям фертильности мужского гаметофита. Данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют, что мужская генеративная сфера *Z. mays* характеризуется высоким показателем фертильности пыльцы.

Таблица 1

Влияние различных концентраций ДНОК на показатели фертильности (Ф), стерильности (С), палинотоксичности (ПЭ) и индекса стерильности (ИС) мужской генеративной системы *Zea mays* по сравнению с контролем

№	Вариант	Ф, %	С, %	ИС	ПЭ, %	ЕС ₁₀₋₉₀
1	К	97,55±0,26	2,45±0,26	–	–	–
2	2 г/л	95,20±1,07	4,80±1,07	1,96	2,41	ЕС ₁₀
3	4 г/л	94,05±1,03*	5,95±1,03*	2,43	3,59	ЕС ₁₀
4	8 г/л	86,20±1,47**	13,80±1,47**	5,63	11,63	ЕС ₁₀₋₅₀
5	16 г/л	84,65±0,95***	15,35±0,95***	6,26	13,22	ЕС ₁₀₋₅₀

Примечание к таблице: Отличия от контроля достоверны при * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ ($t_{st} = 2,78 - 4,60 - 8,61$).

Фертильность пыльцевых зерен, продуцируемых генеративными органами растений контрольного варианта, в наших исследованиях достигала 97,5% (при спонтанном уровне стерильности 2,5%). Обработка опытных растений 2 г/л дозой ДНОК существенного влияния на генеративные органы тест-культуры не оказывала, о чем свидетельствует высокий уровень фертильности мужского

гаметофита (95,2%) и отсутствие достоверных различий с контрольным вариантом исследования.

При увеличении дозы тестируемого препарата в два раза (4 г/л, рекомендуемая доза) было отмечено достоверное снижение продукции фертильной пыльцы тест-растениями в 1,04 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольным вариантом исследования. Дальнейшее увеличение дозы препарата вызывало достоверное снижение продукции фертильных пыльцевых зерен и увеличение абортивных. В частности, при концентрации ДНОК 8 г/л было отмечено снижение фертильности мужского гаметофита *Z. mays* в 1,13 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контрольным вариантом, при 16 г/л – в 1,15 раза ($p < 0,001$) соответственно. Таким образом, мужской гаметофит *Z. mays* характеризуется высоким показателем фертильности, который достоверно снижался в диапазоне действия 4–16 г/л доз препарата ДНОК (рис. 1).

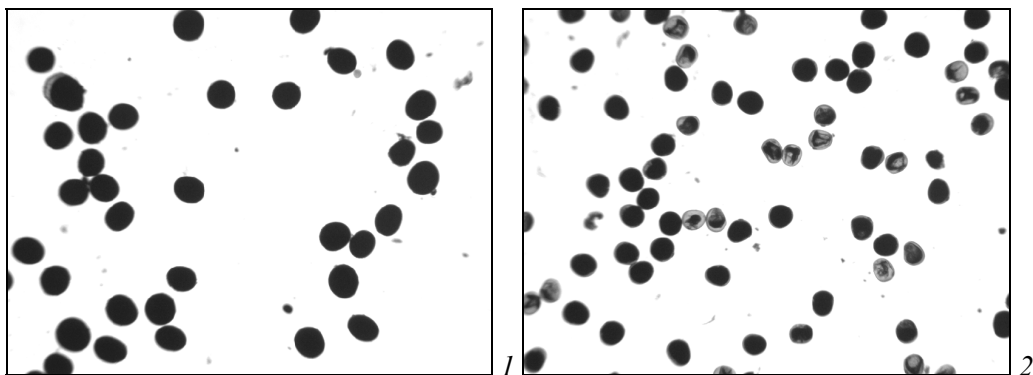


Рис. 1. Влияние ДНОК на фертильность мужского гаметофита *Zea mays*
1 – контроль; 2 – обработка 16 г/л (увел. 10х0,22; фертильные пыльцевые зерна окрашенные, стерильные – неокрашенные).

Параллельно была рассчитана величина индекса стерильности (ИС) по всем вариантам исследования. При концентрации препарата 2 г/л и 4 г/л указанный показатель колебался в пределах 1,96–2,43. При высоких дозах тестируемого препарата (8 и 16 г/л) величина ИС возрастала до 5,63 и 6,26 соответственно. Следовательно, повышенные концентрации препарата ДНОК вызывали увеличение показателя индекса стерильности, что может свидетельствовать о его токсичности для мужской генеративной сферы *Z. mays*.

Данное предположение согласуется с расчетом показателя палинотоксического эффекта (ПЭ) различных доз ДНОК на тест-растения. Низкие концентрации (2 г/л), в том числе и рекомендуемая к применению доза (4 г/л), палинотоксического эффекта на мужскую генеративную систему *Z. mays* не оказывали. Концентрации 8 и 16 г/л оказывали достаточно выраженное палинотоксичное влияние на мужской гаметофит *Z. mays*. Ранжирование полученных показателей ПЭ по классификации ЕС₁₀₋₉₀, позволило прийти к заключению, что ДНОК в изученном диапазоне

концентраций оказывает среднетоксичное действие на мужские генеративные органы *Z. mays*.

Таким образом, низкие концентрации ДНОК (2 и 4 г/л) не оказывали палинотоксического влияния на мужской гаметофит *Z. mays*, высокие дозы препарата оказывали среднетоксичное действие, проявляющееся в повышенной продукции стерильной пыльцы.

ВЫВОДЫ

1. Препарат ДНОК в диапазоне изученных концентраций (2–16 г/л) вызывал снижение продукции фертильных пыльцевых зерен органами мужской репродукции *Z. mays*.

2. Концентрации ДНОК (2 и 4 г/л) палинотоксического эффекта на мужскую генеративную систему *Z. mays* не оказывали, в связи с чем могут быть рекомендованы к применению.

3. Высокие концентрации ДНОК (8 и 16 г/л) оказывали среднетоксичное действие на генеративную сферу тест-растения.

4. Мужская генеративная сфера *Z. mays* характеризуется высоким показателем фертильности, в силу чего может использоваться для скрининга гаметоцидного действия поллютантов различной природы.

Список литературы

1. Kerecki B. Effects of herbicides on some maize inbred lines / B. Kerecki, L. Stefanonovic, L. Zaric // Abstr. 11th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, Varna, 7–11, Sept., 1998. – Bulg. J. Plant Physiol. – 1998. – Spec. issue. – P. 313.
2. McFarland M. J. Anoxic treatment of trifluralincontaminates soil / M. J. McFarland, M. Beck, S. Harper, K. Deshmuck // J. Hazardous Mater. – 1996. – Vol. 50. – № 2–3. – P. 129–141.
3. Yuan S.-z. Метод биологической пробы оценки чувствительности некоторых сельскохозяйственных культур к хлорсульфурону и его применение при определении остаточных количеств / Yuan S.-z., Liu S.-z., Li G.-c., Zhang J.-j., Dai Z.-j., Kong Y. // Jiangsu nongye yanjiu = Jiangsu Agr. Res. – 2000. – Vol. 21, № 2. – P. 62–66.
4. Охрана окружающей среды при использовании пестицидов / [Л. И. Бублик, В. П. Васильев, Н. А. Гороховский и др.; под ред. В. П. Васильева]. – К.: Урожай, 1983. – 128 с.
5. Ібрагімова Е. Е. Методичні підходи до екоотоксичної оцінки пестицидів / Е. Е. Ібрагімова, Д. В. Балічієва // Вісник аграрної науки. – 2007. – № 1. – С. 69–71.
6. Ашихмина Т. Я. Биоиндикация и биотестирование природных сред как основа экологического контроля на территории зоны защитных мероприятий объекта по уничтожению химического оружия / Т. Я. Ашихмина, Л. И. Домрачева, Л. В. Кондакова, С. Ю. Огородникова, Т. И. Кочурова, Т. Я. Кантор // Российский химический журнал. – 2007. – Т. LI, № 2. – С. 59–63.
7. Лях В. А. Степень прорастания in vitro пыльцы древесных растений как показатель их устойчивости к загрязнению фторидами / В. А. Лях, Е. Н. Войтович, Е. В. Дубовая, Т. Н. Пересыпкина // Ученые записки Крымского инженерно-педагогического университета. – Выпуск 15. – Биологические науки. – 2008. – С. 77–80.
8. Эмирова Д. Э. Палинотоксичное действие различных концентраций БИ-58 на генеративные органы *Allium cepa* L. / Д. Э. Эмирова, Э. Э. Ибрагимова // Ученые записки Таврического национального университета имени В. И. Вернадского. Сер. «Биология, химия». – 2010. – Т. 23 (62), № 2. – С. 186–192.
9. Ібрагімова Е. Е. Екологічна оцінка дії техногенних хімічних забруднень на цитогенетичні показники вищих рослин в умовах Криму: автореферат дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол.

- наук / Е. Е. Ібрагімова; Київський національний університет ім. Тараса Шевченка. – К., 2008. – 20 с.
10. Ервадян С. Г. Использование морфологических показателей микрогаметофита для индикации загрязнения среды / С. Г. Ервадян, А. а. Небиш, Р. М. Арутюнян // Ученые записки Ереванского государственного университета. Естественные науки. Биология. – 2009. – № 1. – С. 39–44.
 11. Цаценко Л. В. Фитотестирование загрязнения агроландшафта / Л. В. Цаценко, О. Д. Филипчук // Вест. акад. с.-х. наук. – 1997. – № 3. – С. 39–41.
 12. Жумашев Ж. А. Морфо-физиологические особенности кормовых бобовых видов растений, произрастающих на загрязненной пестицидами почве / Ж. А. Жумашев // III-ий Международный конгресс студентов и молодых ученых «Мир Науки», посвященный 75-летию КазНУ им. Аль-Фараби (28-30 апреля 2009 г., г. Алматы): Материалы III-го Международного конгресса студентов и молодых ученых «Мир Науки». – Алматы: Казахский Национальный университет им. Аль-Фараби, 2009. – С. 103–104.
 13. Эмирова Д. Э. Анализ пестицидной нагрузки на сельскохозяйственные почвы Крыма / Д. Э. Эмирова, Э. Р. Алиев // *Materialy IV Międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji «Strategiczne pytania światowej nauki – 2008»*. – Тум 8. Rolnictwo. Weterynaria. Chemia I chemiczne technologie. Ekologia. Geografia i geologia: Przemysł. – Nauka i studia. – 2008. – S. 63–66.
 14. Мартыненко В. И. Пестициды: Справочник. / В. И. Мартыненко, В. К. Промоненко и др. – М.: Агропроиздат, 1992. – 307 с.
 15. Мельников Н. Н. Справочник по пестицидам / Н. Н. Мельников и др. – М.: Химия, 1985. – 259 с.
 16. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
 17. Мерков А. М. Санитарная статистика / А. М. Мерков, Л. Е. Поляков – М.: Медицина, 1974. – 384 с.
 18. Декл. пат. на кор. мод. України 32513 Спосіб визначення палінотоксичності техногенних хімічних забруднювачів навколишнього середовища; G01N 33/00 G01N 1/00 / Д. В. Балічієва, Е. Е. Ібрагімова, Д. Е. Емірова – № u200711625; Заявл. 22.10.2007; Опубл. 26.05.2008, Бюл. № 10. – 5 с.
 19. Плохинский Н. А. Биометрия / Н. А. Плохинский – М.: МГУ, 1970. – 367 с.

Емірова Д. Е., Балічієва Д. В. Ібрагімова Е. Е. Показник стерильності чоловічого гаметофиту *Zea mays* як критерій палінотоксичного впливу ксенобіотиків // Екосистеми, їх оптимізація та охорона. Сімферополь: ТНУ, 2010. Вип. 2. С. 200–205.

Досліджувався вплив різних концентрацій ДНОК на генеративну систему *Z. mays* Встановлено, що низькі концентрації (2 і 4 г/л) не мають палінотоксичного ефекту. Високі концентрації (8 і 16 г/л) мають середньотоксичну дію на генеративні органи *Z. mays*, що виявляються в достовірному збільшенні продукції стерильних пилоквих зерен.

Ключові слова: пилок, генеративні органи, пестицид ДНОК, *Zea mays*, палінотоксичність, стерильність, фертильність.

Emirova D. E., Balichiyeva D. V. Ibragimova E. E. Parameter of sterility of mail *Zea mays* gametophyte as palynotoxic influence xenobiotics criterion // Optimization and Protection of Ecosystems. Simferopol: TNU, 2010. Iss. 2. P. 200–205.

Influence of different concentrations of DNOC on the generative system of *Z. mays* was investigated. It is set that low concentrations (2 and 4 g/l) do not possess a palynotoxic effect. High concentrations (8 and 16 g/l) the medium toxic made influence on the generative organs of *Z. mays*, bringing to the reliable increase of products of sterile pollen.

Key words: pollen, generative organs, DNOC, *Zea mays*, palynotoxic, sterility, fertility.

Поступила в редакцію 04.11.2010 г.