

Mirosław Krzuś

Wpływ różnych stężeń insektycydu Decis 2,5 EC na przebieg mitozy w stożkach wzrostu korzeni *Allium sativum* L.

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było szczegółowe opracowanie wpływu Decis 2,5 EC na aktywność mitotyczną i przebieg podziałów mitotycznych. Sprawdzenie, czy testowany preparat w badanych koncentracjach indukuje mutacje oraz w jakim zakresie indeks mitotyczny ulega zmianie.

Przeprowadzone analizy pozwalają wnioskować, że Decis 2,5 EC użyty w dawce 0,2 ml/l H₂O i w dawce 0,4 ml/l H₂O (stężenie zalecane przez producenta) nie powoduje zakłóceń w przebiegu mitozy, a tym samym nie wpływa ujemnie na wzrost i rozwój roślin.

Natomiast w większych stężeniach tzn. przy koncentracji 0,6 ml/l H₂O powoduje on: zwiększenie aktywności mitotycznej, liczne anomalie w przebiegu stadiów mitozy oraz zmiany strukturalne i liczbowe chromosomów.

Przy jeszcze wyższej koncentracji badanego preparatu 0,8 ml/l H₂O zaobserwowano zmniejszenie aktywności mitotycznej, a liczba zakłóceń uległa zwiększeniu. Nadto w nielicznych przypadkach obserwowano degenerację komórek.

Można zatem przypuszczać, że zmiany zachodzące w procesie mitozy przy stężeniach 0,6 ml/l H₂O i 0,8 ml/l H₂O ujawniają swój ujemny wpływ na proces rozwoju roślin traktowanych roztworem Decis 2,5 EC.

Wstęp

Ojczyzną czosnku jest Bliski Wschód. Obejmuje on kraje zakaukaskie, wschodnią i środkową część Małej Azji, a także Iran oraz górski Turkmenistan. Czosnek uprawiany był w wielu krajach. Na ziemiach polskich zaczęto go uprawiać w okresie wczesnopiastowskim od wieku IX (Nowiński 1970).

Badania nad kariotypem *Allium sativum* L. były prowadzone wcześniej, jednak dopiero Battaglia w 1963 r. dokładnie opisał ten kariotyp. Dowiódł, że pięć par chromosomów ($2M_1$, $2M_2$, $2M_3$, $2M_4$, $2M_5$) to chromosomy metacentryczne, a jeden chromosom pary $2M_2$ jest ściśle metacentryczny o indeksie ramion równym 1. Pary $2M_6$, $2M_7$, $2M_8$ stanowią chromosomy submetacentryczne. Chromosomy pary $2M_6^S$, $2M_7^S$ posiadają przewężenia wtórne (SAT).

Współcześnie w związku z wprowadzeniem do praktyki różnorodnych pestycydów konieczne stało się badanie zakresu ich ubocznego wpływu na rośliny uprawne.

Celem niniejszej pracy było szczegółowe opracowanie wpływu Decis 2,5 EC na aktywność mitotyczną i przebieg podziałów mitotycznych. Sprawdzenie, czy badany preparat w badanych koncentracjach indukuje mutacje oraz czy indeks mitotyczny ulega zmianie.

Decis 2,5 EC to preparat owadobójczy o działaniu kontaktowym i żołądkowym, w formie płynu do sporządzania emulsji wodnej. Czynnym składnikiem jest 2,5% delta-metryna. Preparat jest przeznaczony do zwalczania szkodników gryzących i ssących na roślinach warzywniczych w rodzaju *Allium*, drzewach i krzewach owocowych oraz roślin ozdobnych. Okres karencji tego preparatu wynosi 7 dni. Decis 2,5 EC jest insektycydem z grupy pyretrynoidów, pochodnych pyretryny syntetycznej. Pyretryna pochodzenia naturalnego znajduje się w kwiatach roślin: *Pyrethrum cinerariifolium* Trev. = *Tanacetum cinerariifolium* (Trev.) Sch.-Bip. i *Pyrethrum roseum*. Używana była w XIX wieku do zwalczania szkodników (Witkowski 1978).

Materiał i metodyka badań

Allium sativum L. został zakupiony w sklepie warzywniczym. Na tym materiale przeprowadzono próbę kontrolną i doświadczalną. Do badań użyto 15 ząbków czosnku.

W próbie kontrolnej 3 ząbki czosnku umieszczano w szalkach Petriego, na ligninie zwilżonej wodą i pozostawiano na 4–5 dni. Pozostałe 12 ząbków czosnku przeznaczono do części doświadczalnej. Kiełkujące korzenie o długości około 0,5–1,0 cm pobierano o godzinie 12³⁰ – 14⁰⁰ i dawano do α -bromonaftalenu na 24 godziny w celu skrócenia długości chromosomów. Następnie przenoszono materiał do utrwalcza Carnoy'a na 24 godziny. Utrwalony materiał poddawano hydrolizie w roztworze 1n HCl przez 10 minut, w temp. 60°C. Zhydrolizowane korzenie przenoszono następnie do odczynnika Schiffa na 60 minut i dawano do lodówki. Z tego materiału sporządzono trwałe preparaty w następujący sposób. Z wybarwionych korzeni odcinano stożki wzrostu, dawano je na szkiełko podstawowe do roztworu 40% kwasu octowego, nakrywano szkiełkiem nakrywkowym i sporządzano preparaty rozgniotowe. Preparaty suszono i przeprowadzano przez alkohol etylowy 96%, alkohol butylowy i ksylen. Zamykano preparaty w balsamie kanadyjskim.

Część doświadczalna obejmowała te same czynności, z tym że 12 ząbków czosnku rozdzielono w równych ilościach na 4 szalki. Po skiełkowaniu ząbki czosnku przenoszono na ligninę zwilżoną roztworem Decis 2,5 EC na 24 godziny. Sporządzono odpowiednie stężenia roztworu Decis 2,5 i tak przygotowano cztery szalki Petriego z następującymi stężeniami: 0,2ml/l H₂O; 0,4ml/l H₂O (stężenie zalecane przez producenta); 0,6ml/l H₂O; 0,8ml/l H₂O.

Następne czynności przeprowadzono tak jak w kontroli. Obserwacje prowadzono przy pomocy mikroskopu MB 30 przy powiększeniu 300 x, 600 x, 1500 x.

Z wykonanych preparatów sporządzono mikrofotografie, które posłużyły do analizy oraz ilustracji wyników badań.

Wyniki badań

Przebieg mitozy

Obraz mitozy w materiale kontrolnym

Na podstawie obserwacji mikroskopowych obliczono indeks mitotyczny kontroli. W tym celu przebadano 2640 komórek. Stwierdzono: w stadium profazy – 489 komórek, w stadium metafazy – 59 komórek, w stadium anafazy – 46 komórek, w stadium telofazy – 40 komórek. Indeks mitotyczny kontroli wynosi 24,0 %.

Przebieg mitozy i aktywności mitotycznej w materiale traktowanym roztworem Decis 2,5 EC

Obliczono aktywność mitotyczną materiału kontrolnego traktowanego różnymi dawkami roztworu Decis 2,5 EC i stwierdzono istotne różnice w wartościach indeksu mitotycznego materiału traktowanego w stosunku do kontroli. Traktując materiał roztworem Decis 2,5 EC o stężeniu 0,2ml/l H₂O obserwowano wartość indeksu mitotycznego równą 23,4%, aktywność mitotyczna uległa tylko nieznacznej zmianie. Przy stężeniu 0,4ml/l H₂O wartość indeksu mitotycznego była równa 24,0%, aktywność mitotyczna w stosunku do kontroli również nie uległa istotnej zmianie. Traktując jednak materiał dawką 0,6ml/l H₂O zaobserwowano zwiększenie aktywności mitotycznej, a wartość indeksu mitotycznego wynosiła 29,6%. Przy stężeniu równym 0,8ml/l H₂O obserwowano spadek aktywności mitotycznej, a indeks mitotyczny osiągnął wartość 16,9%. Wyniki przedstawia tabeli 1.

	Kontrola	Stężenia Decisu 2,5 EC			
		0,2ml/l H ₂ O	0,4ml/l H ₂ O	0,6ml/l H ₂ O	0,8ml/l H ₂ O
Ogólna liczba komórek	2640	2623	2654	2854	2649
Liczba komórek w interfazie	2006	2010	2016	2010	2200
Liczba komórek dzielących się	634	613	638	844	449
Indeks mitotyczny (%)	24,0	23,4	24,0	29,6	16,9

Tabela 1. Aktywność mitotyczna w komórkach stożków wzrostu korzeni *Allium sativum* L. traktowanych roztworem Decis 2,5 EC

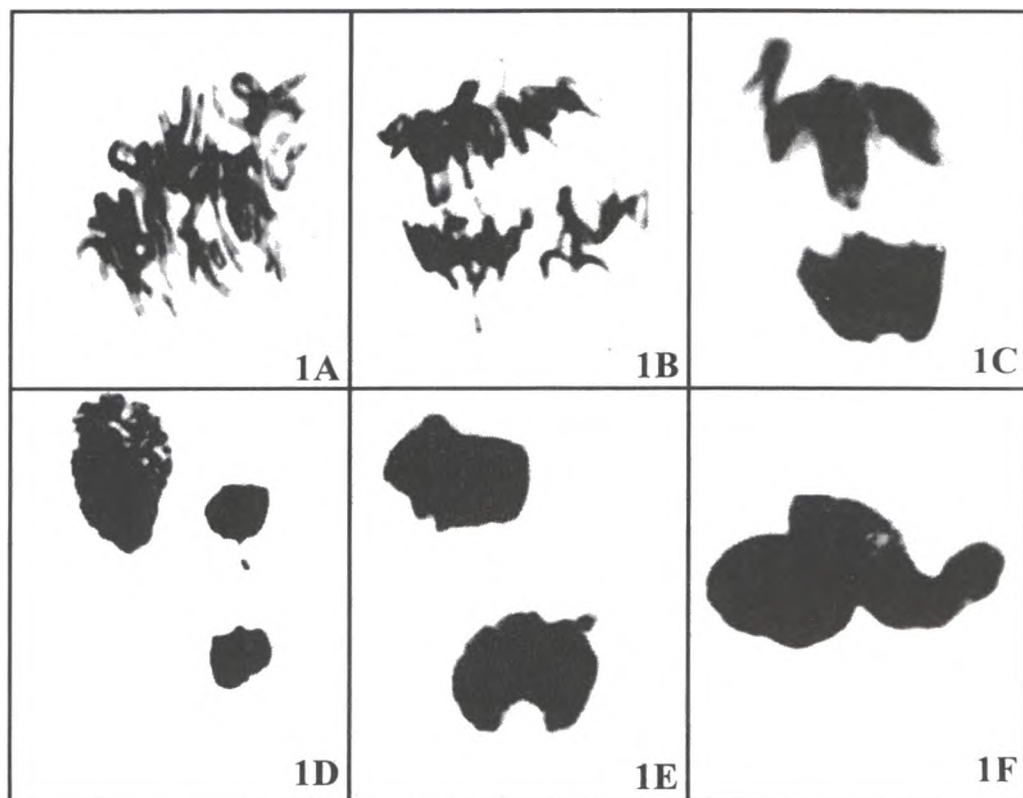


Fig. 1. Zakłócenia w obrazie mitozy w stożkach wzrostu korzeni *Allium sativum* L. pod wpływem roztworu Decis 2,5 EC: **1A.** Metafaza lepka; **1B.** Anafaza z widocznymi mostami chromosomowymi; **1C.** Nierównomierny rozdział chromosomów w anafazie; **1D.** Telofaza z eliminacją fragmentu chromosomu; **1E–F.** Nieregularne jądra komórkowe w interfazie

Analiza cytologiczna materiału traktowanego roztworem Decis 2,5 EC wykazała szereg różnorodnych zaburzeń w przebiegu stadiów mitozy. I tak przy stężeniu 0,2ml/l H₂O nie zaobserwowano zaburzeń stadiów mitozy. Przy zastosowaniu dawki 0,4ml/l H₂O zaobserwowano nieliczne anomalie w stadiach mitozy (jest to dawka zalecana przez producenta). Natomiast przy zastosowaniu dawki 0,6ml/l H₂O zaobserwowano 149 komórek z zakłóceniami na 844 badanych komórek przy równoczesnym wzroście aktywności mitotycznej. Przy dawce 0,8ml/l H₂O aktywność mitotyczna uległa zmniejszeniu, ale liczba zaburzeń powiększyła się do 127 na 449 badanych komórek. Te zależności obrazuje tabela 2.

W materiale traktowanym roztworem Decis 2,5 EC stwierdzono zaburzenia jąder komórkowych w postaci wżerów. Kształt jąder był bardzo zróżnicowany. Napotymano jądra o kształcie: wrzecionowatym, mocno wydłużonym, zgiętym w kształcie litery L (fig. 1E, 1F). Najliczniej jednak obserwowano zaburzenia w stadium metafazy i anafazy. W stadium metafazy spotykano bardzo często metafazy lepkie (fig. 1A). Dawka 0,2ml/l H₂O i 0,4ml/l

Stadium Mitozy	0,2 ml/l H ₂ O			0,4 ml/l H ₂ O			0,6 ml/l H ₂ O			0,8 ml/l H ₂ O		
	Liczba badanych komórek	Liczba komórek z zakłóceniami	Procent zakłóceń	Liczba badanych komórek	Liczba komórek z zakłóceniami	Procent zakłóceń	Liczba badanych komórek	Liczba komórek z zakłóceniami	Procent zakłóceń	Liczba badanych komórek	Liczba komórek z zakłóceniami	Procent zakłóceń
Profaza	478	0	0	501	2	0,4	610	65	10,4	340	58	17,0
Metafaza	52	0	0	54	1	1,8	89	18	20,2	37	21	56,7
Anafaza	42	0	0	45	0	0	77	35	45,4	40	28	70,0
Telofaza	41	0	0	38	1	2,8	68	31	45,0	32	20	62,5

Tabela 2. Liczbowe i procentowe zestawienie zakłóceń w przebiegu mitozy w komórkach stożków wzrostu korzeni *Allium sativum* L. traktowanych roztworem Decis 2,5 EC

H₂O nie powodowała zakłóceń metafazy. Przy zastosowaniu dawki 0,6ml/l H₂O liczba metafaz lepkich osiągała wysoki procent, bo na 89 metafaz prawidłowych 18 metafaz było metafazami lepкими, co stanowiło 20,2%. Przy stężeniu 0,8ml/l H₂O na 37 metafaz prawidłowych 21 metafaz było metafazami lepкими, co stanowiło 56,7%. Liczne były także zaburzenia komórek w stadium anafazy i telofazy (tab. 2, 3, fig. 1B, 1C, 1D). Spotykano nierównomierne rozchodzenie się chromosomów, mosty chromosomowe, eliminacje chromosomów lub ich fragmentów.

Przy stężeniu 0,6ml/l H₂O, na 77 anafaz było: 15 o nierównomiernym rozchodzeniu się chromosomów, u 12 stwierdzono mosty chromosomowe i 8 było z eliminacją chromosomów. Natomiast przy dawce 0,8ml/l H₂O na 40 anafaz aż 28 było nieprawidłowych: 12 o nierównomiernym rozchodzeniu się chromosomów, w 10 stwierdzono mosty chromosomowe i w 6 anafazach eliminacje chromosomów (tab. 2, 3).

Rodzaj zakłócenia	Stężenie roztworu Decis 2,5 EC (ml/l H ₂ O)	Ogółem anafaz	Komórki z zakłóceniami	%
Nierównomierne rozchodzenie się chromosomów	0,2	42	0	0
	0,4	45	0	0
	0,6	77	15	19,4
	0,8	40	12	30,0
Mosty chromosomowe	0,2	42	0	0
	0,4	45	0	0
	0,6	77	12	15,5
	0,8	40	10	25,0
Eliminacje chromosomów lub ich części	0,2	42	0	0
	0,4	45	0	0
	0,6	77	8	10,3
	0,8	40	6	15,0

Tabela 3. Zaburzenia anafazy w komórkach stożków wzrostu korzeni *Allium sativum* L. traktowanych roztworem Decis 2,5 EC

Stężenie roztworu Decis 2,5 EC (ml/l H ₂ O)	Ogólna liczba komórek	Komórki zdegenerowane	%
0,2	2010	0	0
0,4	2016	4	0,2
0,6	2010	73	3,1
0,8	2200	108	4,9

Tabela 4. Liczbowe zestawienie komórek zdegenerowanych w komórkach stożków wzrostu korzeni *Allium sativum* L. pod wpływem roztworu Decis 2,5 EC

Dyskusja

Stosując dawkę zalecaną przez producenta, to znaczy rozcieńczenie 0,4ml/l H₂O nie zaobserwowano zakłóceń w przebiegu stadiów mitozy. W związku z tym preparat ten przy takiej koncentracji może być ogólnie stosowany. Także przy stężeniu niższym 0,2ml/l H₂O nie zaobserwowano zmiany w przebiegu stadiów mitozy. Natomiast przy wyższym stężeniu 0,6ml/l H₂O zaobserwowano wzrost aktywności mitotycznej o 5,6%, a przy stężeniu 0,8 ml/l H₂O obniżenie aktywności mitotycznej o 7,1% w stosunku do kontroli.

Preparat Decis 2,5 EC użyty w stężeniu 0,6ml/l H₂O, 0,8ml/l H₂O powoduje zmiany w wartości indeksu mitotycznego oraz liczne zaburzenia w przebiegu mitozy. Taki stan rzeczy potwierdzają inne badania (Chauhan i wsp. 1986). Stwierdzają oni, że deltametryna powoduje zmniejszenie wartości indeksu mitotycznego, przerywanie chromosomów w miejscu centromeru, eliminację chromosomów, mosty chromosomowe. Również inny insektycyd z grupy pyretrynoidów syntetycznych jakim jest Ambusz 25EC wywoływał zaburzenia w procesie mitozy w komórkach merystematycznych stożków wzrostu korzeni *Pisum sativum* L. (Klein 1990).

Spostrzeżenia moje są jeszcze jednym potwierdzeniem prac tych uczonych, którzy wykazali ujemny wpływ pyretrynoidów na przebieg mitozy.

Wynika z tego, że preparat taki, jakim jest Decis 2,5 EC, wprowadzony do użytku przy właściwie użytym stężeniu nie wpływa ujemnie na wzrost i rozwój. Może on być więc stosowany w rolnictwie.

Literatura

- Battaglia E. (1963), *Mutazione cromosomica & cariotipo fondamentale in Allium sativum L.* Caryologia 16, 1: 1–48
- Chauhan L.K.S., Dikshith T.S.S., Sundararaman V. (1986), *Effect of deltamethrin on plant cells I Cytological effects on the root meristems of Allium cepa*, Mutation Res. 171: 25–30
- Klein M. (1990), *Wpływ insektycydu Ambusz 25 EC (permetryna) na procesy mitozy i mikrosporogenezy u Pisum sativum L.*, Zesz. Nauk. AR, Kraków nr 142
- Nowiński M. (1970), *Dzieje upraw i roślin uprawnych*, Warszawa
- Witkowski W. (1978), *Pyretrynoidy – najnowsze osiągnięcia fitofarmacji*, Ochrona Roślin 7: 17–19