

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ГЕРБИЦИДОВ (НА ПРИМЕРЕ ГЛИФОСАТА) НА КУЛЬТУРНЫЕ И СОРНЫЕ РАСТЕНИЯ

В статье описана методика, позволяющая оценивать фитотоксическое действие гербицидов на фотосинтетический аппарат высших растений с помощью регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла, а также приведены результаты проведенных исследований. Представленная работа является частью исследований, направленных на разработку и совершенствование флуоресцентных методов и создание аппаратуры для биомониторинга загрязнения объектов окружающей среды гербицидами.

Проблема оценки и прогнозирования влияния различных фитотоксических веществ на растительные организмы является довольно актуальной, так как при использовании гербицидов происходят большие изменения в видовом составе растений, а также образуются биотипы сорняков, обладающих повышенной устойчивостью к препаратам [4]. Особую ценность имеют сведения о негативных изменениях в биологических объектах на самой их ранней стадии, когда они не приняли еще необратимый характер. Этим требованиям отвечают современные биофизические методы экспресс-диагностики состояния клеток [7, 8]. Удобным и перспективным среди данных методов является метод регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла, несущий информацию о функционировании первичных реакций фотосинтеза. Как показывают уже имеющиеся работы [1, 2, 7 и др.], метод, основанный на измерении замедленной флуоресценции, позволяет без нарушения нативности объекта быстро оценить величину действия на растения различных стресс-факторов, обладает высокой чувствительностью, может быть применен к широкому кругу объектов.

В связи с этим целью проводимых исследований явилось определение и прогнозирование действия гербицидов (на примере глифосата) на культурные и сорные растения степной зоны. Достижение указанной цели предполагало решение следующих задач:

- провести анализ современных методов и средств, используемых для контроля воздействия гербицидов на растительные организмы;
- разработать экспериментальную установку для регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла и оптимизировать режимы измерения послесвечения;
- исследовать замедленную флуоресценцию листьев культурных и сорных растений, наиболее характерных для степной зоны;
- изучить динамику изменений флуоресцентных показателей и влияние на них обработки рас-

тений фитотоксическими веществами различных концентраций;

- исследовать замедленную флуоресценцию культурных и сорных растений в модельных экспериментах и естественных условиях;
- разработать методику оценки влияния гербицидов на растения на основе регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла.

Биофизические основы применения регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла для оценки состояния фотосинтетического аппарата растений

Замедленная флуоресценция, обнаруженная в 1951 году Арнольдом и Стрелером, состоит в том, что после светового возбуждения в фотосинтезирующих клетках наблюдается слабое, длительно затухающее свечение, испускаемое хлорофиллом [2, 6]. Это свечение возникает уже после прекращения флуоресценции за счет энергии, выделяемой в ходе темновых реакций первичных фотопродуктов фотосинтеза в реакционных центрах фотосистемы II (рис. 1).

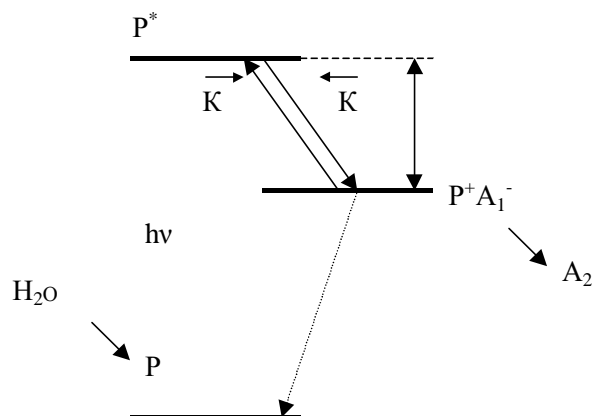
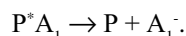


Рисунок 1. Схема возникновения замедленной флуоресценции хлорофилла высших растений при возвращении от A_1^- на P .
 К – прямой перенос электрона $P^*A_1^- > P^+A_1^-$.
 К – обратный перенос электрона $P^+A_1^- > P^*A_1^- > P + h\nu$, сопровождающийся замедленной флуоресценцией.

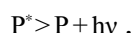
Рассмотрим упрощенную схему этого процесса. В реакционных центрах при поглощении кванта света ($h\nu$) возбуждается молекула хлорофилла реакционного центра P ($P \rightarrow P^*$). Затем происходит переход электрона от P^* на первичный акцептор электрона A_1 (восстановление первичного акцептора электрона A_1):



Это одновременно сопровождается окислением фотоактивного хлорофилла реакционных центров (P) (см. рис.1):



Затем электрон уходит от акцептора A_1^- дальше в цепь переносчиков и в итоге попадает на окисленную молекулу НАДФ⁺. Окисленный реакционный центр фотосистемы II (P^+), в свою очередь, восстанавливается за счет электрона, полученного при разложении воды. Эти этапы ответственны за генерацию первичного прямого потока электронов. Однако существует небольшая вероятность обратного переноса электрона в реакционном центре от A_1^- к P^+ , при котором происходит его рекомбинация с P^+ с регенерацией возбужденного состояния P^* . В результате этого клетки испускают замедленное свечение с некоторой задержкой во времени:



Очевидно, интенсивность замедленной флуоресценции пропорциональна количеству реакционных центров в состоянии $P^+A_1^-$ с разделенными зарядами. Это состояние зависит от скорости последующих стадий переноса электрона. При действии повреждающих факторов на фотосинтетический аппарат концентрация реакционных центров в состоянии $P^+A_1^-$ может изменяться. Это позволяет использовать замедленную флуоресценцию для оценки степени влияния на растительные организмы различных фитотоксических веществ, в том числе и гербицидов.

Материалы и методы исследования

Для регистрации замедленной флуоресценции растений использовали специально сконструированную высокочувствительную установку на основе электронных блоков системы «Вектор» (рис.2).

Данная установка позволяет индуцировать и регистрировать длительное послесвечение отдельных листовых пластинок. В качестве светоприемника используется фотоумножитель ФЭУ-82 с

сурьмяно-цезиевым катодом, чувствительным в красной области спектра. ФЭУ – вакуумный прибор, сочетающий в себе свойства фотоэлемента с внешним фотоэффектом и усилителя слабых токов. Фотоэлектронный умножитель эксплуатируется в режиме счета импульсов. При подготовке ФЭУ для измерения свечений он в течение нескольких часов выдерживается в темноте под напряжением. После усиления импульсы формируются и регистрируются при помощи счетного одноканального прибора ПСО 2-4, а затем фиксируются на ленте цифрового печатающего устройства (ЦПУ). Возбуждение свечения осуществляется светом от галогенной лампы мощностью 60 Вт в сочетании со стеклянным светофильтром КС-14 ($\lambda > 650$ нм). Длительность облучения листьев лампой – 5 сек. Уменьшить промежуток времени между облучением объекта и регистрацией замедленной флуоресценции позволяет светонепроницаемая камера со шторкой, на которой закрепляется исследуемый объект. Работа прибора автоматизирована. Передвижение шторки осуществляется с помощью электромагнита.

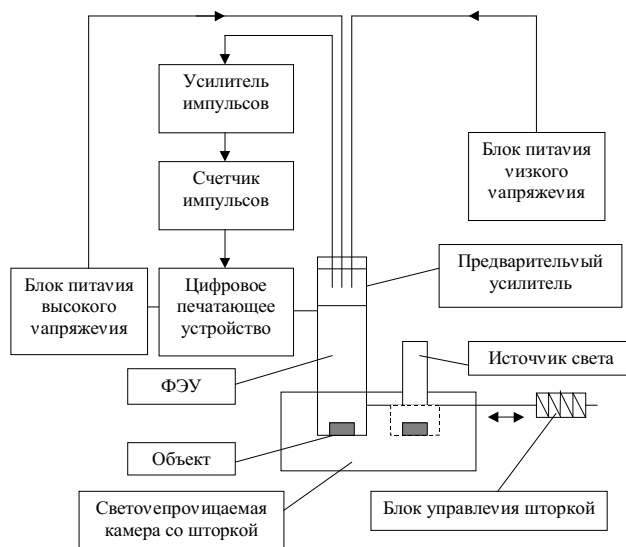


Рисунок 2. Блок-схема установки для регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла

В качестве тест-объектов использовали растения кукурузы и щирицы. Опытные растения обрабатывались растворами гербицида разных концентраций (2% и 4%) с помощью пульверизатора. Контрольные растения аналогичным образом опрыскивали чистой водой. Затем отделенный от растения лист помещали в камеру экспериментальной установки, облучали его лампой и в течение 10 сек. регистрировали количество импульсов (площадь

каждого листа была одинаковой). Замедленную флуоресценцию последовательно измеряли у обработанного гербицидом и контрольного растений. При этом учитывалась продолжительность воздействия гербицида на растения (1, 2, 3, 4 сут.).

В опытах использовали водные растворы фосфорорганического гербицида раундап (действующее вещество – глифосат). Данный препарат контактного действия применяется для сплошного и избирательного (при направленной обработке, без попадания на культуру) уничтожения одно- и многолетних двудольных и злаковых сорных растений, включая пырей ползучий, вьюнок полевой. Обладает частично системным действием и может перемещаться из надземных органов растения в подземные. Предполагается, что раундап подавляет синтез фенилаланина, ингибируя хлоризматмутазу или префенатдегидратазу [3, 5, 9].

Выбор видов для эксперимента определялся высокой встречаемостью и более или менее равномерным распределением. Период от момента сбора листьев до измерения не превышал 15 мин., что позволяет полностью исключить увядание. Исследования проводились в летний период 2001 г. Температура воздуха в дни сбора образцов была выше +20° С, солнечно.

Результаты опытов и их обсуждение

На основе полученных с помощью установки данных были построены кривые спада замедленной флуоресценции для кукурузы и щиряцы. Эти кривые описаны следующим (экспоненциальным) уравнением регрессии (1):

$$N = N_0 \cdot e^{-\lambda t}, \tag{1}$$

где N – число импульсов;
 N₀ – число импульсов в начальный момент времени;
 t – время, сек.;
 λ – постоянная, равная ln2/T (T – время, через которое число импульсов N в 2 раза меньше, чем N₀).

В таблице 1 приведена сравнительная характеристика параметров замедленной флуоресценции для указанного уравнения в зависимости от нескольких факторов (вида растения, времени экспозиции гербицидом и его концентрации).

Данные параметры (λ и N₀) можно использовать для ранжирования растений по чувствительности к различным гербицидам, а также для клас-

сификации гербицидов по характеру воздействия на растения.

Таблица 1. Сравнительная характеристика параметров замедленной флуоресценции

Время экспозиции, сут	Концентрация гербицида, %	Щиряца		Кукуруза	
		л	N ₀	л	N ₀
1	0	0,276	46	0,383	75
	2	0,276	41	0,345	39
	4	0,345	55	0,406	61
2	0	0,383	45	0,431	69
	2	0,345	48	0,431	39
	4	0,406	42	0,445	86
3	0	0,345	40	0,314	55
	2	0,276	23	0,265	33
	4	0,345	33	0,363	46
4	0	0,265	42	0,307	63
	2	0,173	20	0,296	25
	4	0,345	30	0,276	37

Проведенный анализ показал, что характер спада кривых послесвечения обработанных гербицидом растений в общем такой же, как в контроле, хотя интенсивность замедленной флуоресценции существенно различная. Заметные сдвиги в функциональной активности фотосинтетического аппарата клеток начинают проявляться через 24 часа после обработки фосфорорганическим гербицидом (это фиксировалось по ингибированию замедленной флуоресценции) (рис. 3). При этом гербицид с большей концентрацией вначале стимулирует послесвечение, а затем его подавляет.

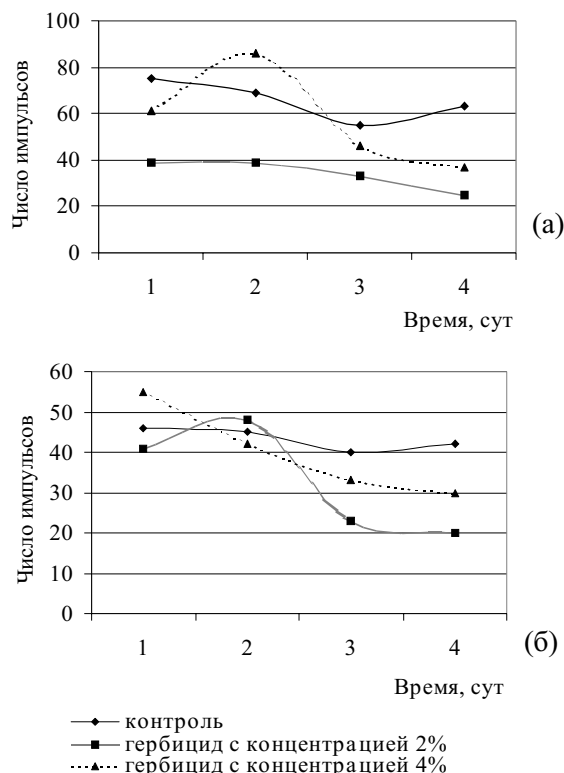


Рисунок 3. Зависимость интенсивности замедленной флуоресценции кукурузы (а) и щиряцы (б) от времени экспозиции растений гербицидом

Характерно, что максимальная концентрация гербицида вызывала некоторое увеличение интенсивности замедленной флуоресценции по сравнению с меньшей концентрацией, а в некоторых случаях и по сравнению с контролем (через 1 сут. после обработки щиряцы и через 2 сут. после обработки кукурузы) (рис. 4). Это может служить подтверждением тому, что раундап не является специфическим ингибитором фотосинтеза, а оказывает лишь косвенное влияние на этот процесс.

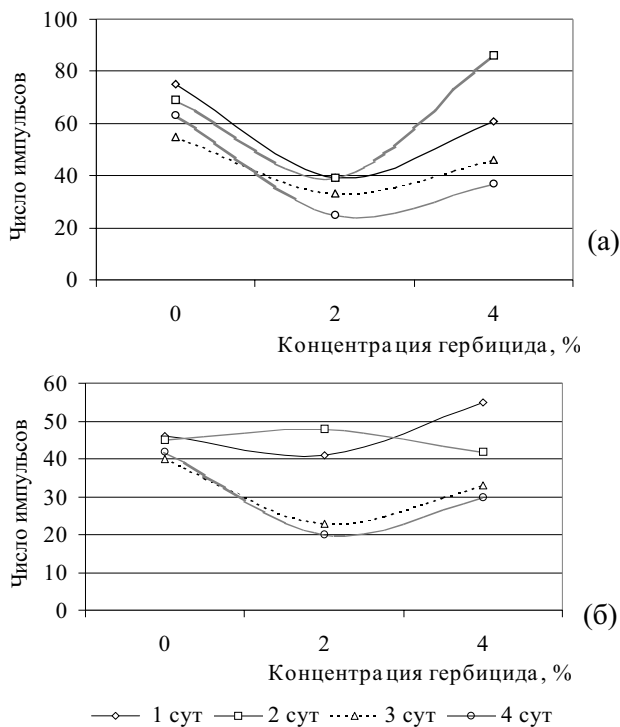


Рисунок 4. Изменение характера замедленной флуоресценции кукурузы (а) и щиряцы (б) в зависимости от концентрации гербицида

На графиках в трехмерной системе координат (рис. 5) выявлено, что кривые для щиряцы более пологие, чем для кукурузы, и относительно концентрации, и относительно времени экспозиции гербицидом. По дисперсии можно констатировать различ-

Выводы

Проведенные исследования позволяют сделать следующие **выводы**:

1. Сравнительный анализ современных методов и средств, используемых для контроля воздействия гербицидов на растительные организмы, позволил обосновать целесообразность применения в этих целях регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла.

2. Разработана экспериментальная установка и методика оценки фитотоксического действия гербицидов на растительные организмы на осно-

вый характер ответной реакции растений разных видов на воздействие используемых гербицидов. Так, для кукурузы характерна величина дисперсии s^2 , равная 29, для щиряцы она равна 9.

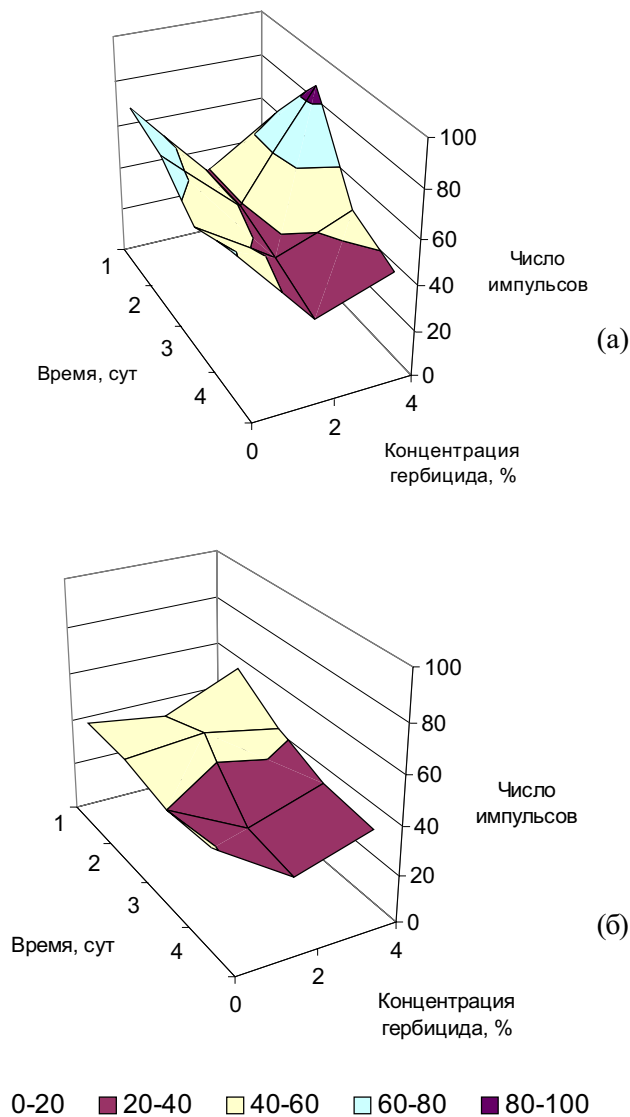


Рисунок 5. Зависимость интенсивности замедленной флуоресценции кукурузы (а) и щиряцы (б) от времени экспозиции растений гербицидом и от его концентрации (различными оттенками обозначено количество импульсов).

ве регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла.

3. В результате проведенного исследования определены особенности замедленной флуоресценции интактных листьев двух видов растений: кукурузы и щиряцы, заметно отличающихся по ряду биологических свойств.

4. Проявление фитотоксического действия гербицида было обнаружено через 24 часа после обработки исследуемых растений, что говорит о косвенном влиянии химических веществ данной группы на реакции фотосинтеза.

5. Предложенные параметры интенсивности послесвечения (λ и N_0) специфично характеризуют особенности действия гербицидов на растения разных систематических групп.

6. Показано, что величина дисперсии интенсивности длительного послесвечения является характеристикой ответной реакции растений на воздействие химических факторов.

7. Результаты проведенного исследования могут быть применены при разработке принципов использования замедленной флуоресценции для быстрой оценки функционального состояния фотосинтетического аппарата растений и определения его устойчивости к экстремальным воздействиям.

Список использованной литературы:

1. Биохемилюминесценция в сельском хозяйстве / Отв. ред. А.Д. Белов. – М.: МВА, 1986. – 114 с.
2. Веселовский В.А., Веселова Т.В. Люминесценция растений: Теоретические и практические аспекты. – М.: Наука, 1990. – 200 с.
3. Захаренко В.А. Гербициды. – М.: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
4. Лунев М.И., Кретьова Л.Г. Экологические аспекты применения гербицидов в растениеводстве. – М.: ВНИИТЭИагропром, 1992. – 48 с.
5. Мельников Н.Н. и др. Пестициды и регуляторы роста растений. – М.: Химия, 1995. – 575 с.
6. Рубин А.Б. Биофизика: В 2-х т. – Т.2. – М.: Высш. шк., 1987. – 302 с.
7. Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – №4. – С. 7-13.
8. Современные методы биофизических исследований / Под ред. А.Б. Рубина. – М.: Высш. шк., 1988. – 358 с.
9. Физиолого-биохимический механизм действия пестицидов / С.И. Фудель-Осипова. – Киев: Наук. думка, 1981. – 99 с.