

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ГЕРБИЦИДОВ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

В статье рассматривается экологическая проблема загрязнения окружающей среды фитотоксическими веществами, применяемыми в сельском хозяйстве. Авторами разработана уникальная высокочувствительная экспериментальная установка и методика оценки фитотоксического действия гербицидов на растительные организмы на основе регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла. В результате анализа проведенных исследований определены параметры интенсивности замедленной флуоресценции хлорофилла, на основе которых предложена классификация растений по ответной реакции фотосинтетического аппарата на действие гербицида.

Развитие химических методов борьбы с сорняками вызывает необходимость постоянного совершенствования методов обнаружения и оценки биологической опасности загрязнителей окружающей среды, а также установления степени токсичности их для растения, так как при использовании гербицидов происходят большие изменения в видовом составе растений, а также образуются биотипы сорняков, обладающих повышенной устойчивостью к препаратам [6]. Результаты такого контроля необходимы для объективной оценки экологических последствий применения пестицидов в растениеводстве.

Высокая чувствительность и возможность быстрого получения информации непосредственно от интактного объекта делают целесообразным метод регистрации замедленной флуоресценции для ранней диагностики изменения физиологического состояния растений в результате техногенного загрязнения компонентов агроэкосистем фитотоксическими веществами, в том числе и гербицидами. В связи с этим **целью** проводимых исследований явилось определение и прогнозирование действия гербицидов (на примере раундапа) на культурные и сорные растения. 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, произрастающих на территории Оренбургской области, в модельных экспериментах и естественных условиях;

– изучить динамику изменений флуоресцентных показателей и влияние на них обработки растений фитотоксическими веществами различных концентраций;

– разработать методику оценки влияния гербицидов на растения на основе регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла.

Замедленная флуоресценция (длительное послесвечение, фотореэссия) основана на том, что образованные в первичных реакциях фотосинтеза фотопродукты могут вступать в обратные реакции [1]. В результате энергия, запасенная в этих продуктах, идет на вторичное возбуждение хлорофилла, приводя к испусканию свечения, которое по спектру совпадает с флуоресценцией, но отличается от нее гораздо большей длительностью. Замедленная флуоресценция генерируется в основном в реакционных центрах фотосистемы II. Фотореэссия имеет 3 компоненты: короткоживущую, длящуюся  $10^{-3}$  секунд, долгоживущую (минуты) и промежуточную. Спектры возбуждения замедленной флуоресценции совпадают со спектром действия фотосинтеза. Спектр излучения имеет два максимума при 685 и 735-740 нм, причем первый приблизительно в 5 раз больше, чем второй.

Следует отметить, что измерения индуцированной светом замедленной флуоресценции позволяют работать не только с молодыми растениями в возрасте проростков, но и полностью сформировавшимися взрослыми растениями. Так как послесвечение тесно связано со структурно-функциональными изменениями липопротеиновых мембран хлоропластов во время превращения в них энергии квантов света в энергию химических связей, можно регистрировать реактивные перестройки в хлоропластах растения при действии на него различных факторов окружающей среды, в том числе гербицидов [15].

Сравнение характера замедленной флуоресценции не обработанных и обработанных фитотоксическими веществами растений позволяет с известной степенью точности судить о месте приложения и скорости проявления токсического действия гербицида, а также о характере ответных реакций растений на гербицид. Поскольку выделяющаяся

в форме фотореземиссии энергия очень мала (порядка нескольких сот фотонов), ее измерение возможно только при наличии очень чувствительных детекторов света – фотоэлектронных умножителей [14]. Разработка соответствующей методики являлась одной из задач настоящей работы.

В работах Мочалкина и др. [10], Мочалкиной и др. [11] было показано, что у растений, обработанных различными классами гербицидов (производными дипиридиния, фенилмочевины, симметриазина и некоторыми другими) изменяется уровень замедленной флуоресценции. Наиболее четкие данные были получены в случае гербицидов, которые являются ингибиторами реакции Хилла (производные мочевины и триазина). Вещества оказывали более сильное действие, если в растение их вводили путем вакуум-инfiltrации или добавляли в водную культуру. В опытах с почвенной культурой эффективность отдельных веществ изменяется, вероятно, из-за различной способности адсорбироваться почвенными коллоидами, скорости миграции и доступности для растения. Как правило, гербициды подавляют свечение. Установлена корреляция между снижением свечения и уменьшением биомассы, площади ассимиляционного аппарата и продуктивности растения. Изменение послесвечения обнаруживается обычно раньше, чем визуальные признаки поражения. Авторы этих работ приходят к выводу, что наблюдение за замедленной флуоресценцией можно использовать как диагностический показатель состояния растения при действии гербицидов. В описанных исследованиях регистрировали самый медленный компонент послесвечения со временем жизни более 10 секунд.

Д.Н. Маторин и др. [8] проанализировали влияние ряда гербицидов и близких к ним по химической природе соединений, не обладающих гербицидной активностью, на миллисекундное послесвечение зеленой водоросли хлорелла. Было установлено, что активные производные фенилмочевины и триазина уменьшают послесвечение вдвое в концентрациях  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  моль/л. Авторами разработан метод определения остаточных количеств гербицидов в почве. Для обнаружения веществ, механизм фитотоксического действия которых связан с влиянием на рост и развитие растения, предлагается вносить почвенные вытяжки в растущую культуру хлореллы и через 1-2 дня инкубации измерять послесвечение.

Р.М. Гашимовым [2] изучено влияние ряда гербицидов и тяжелых металлов на параметры замедленной флуоресценции водорослей, хлоропластов

растений, субхлоропластных частиц фотосистемы I и хлоропластов с реконструированными участками электронно-транспортной цепи в фотосистеме I и фотосистеме II. На основании изменения интенсивности выделения кислорода и характера замедленной флуоресценции выделено несколько групп гербицидов, различающихся по механизму действия на фотосинтетический аппарат.

В указанных работах, однако, не проводилось исследование влияния гербицидов, не являющихся ингибиторами реакций фотосинтеза, первичный механизм действия которых связан с подавлением биосинтеза ароматических аминокислот.

Для регистрации замедленной флуоресценции использовали высокочувствительную установку, сконструированную на основе электронных блоков системы «Вектор» [4, 5]. Данная установка позволяет индуцировать и регистрировать послесвечение отдельных листовых пластинок. В качестве светоприемника используется фотоумножитель ФЭУ-82 с сурьмяно-цезиевым катодом, чувствительным в красной области спектра. Фотоэлектронный умножитель эксплуатируется в режиме счета импульсов, что улучшает порог чувствительности по сравнению с режимом измерения среднего анодного тока. При подготовке ФЭУ для измерения свечений он в течение нескольких часов выдерживается в темноте под напряжением. Для настройки и контроля работы установки используется электронный осциллограф. После усиления импульсы формируются и регистрируются при помощи счетного одноканального прибора ПСО 2-4, а затем фиксируются на ленте цифрового печатающего устройства. Возбуждение свечения осуществляется светом от галогенной лампы мощностью 60 Вт. Длительность облучения листьев лампой – 5 секунд. Уменьшить промежуток времени между облучением объекта и регистрацией замедленной флуоресценции позволяет светонепроницаемая камера со шторкой, на которой закрепляется исследуемый объект. Передвижение шторки осуществляется с помощью электромагнита.

Поскольку замедленная флуоресценция зеленых растений, по мнению большинства авторов, чувствительна к изменениям внешних факторов и в значительной степени зависит от состояния объекта, мы старались по мере возможности стандартизировать условия проведения измерений.

Для отработки методики эксперимента и установления режимов работы применяемой аппаратуры нами были проведены лабораторные исследования с листьями комнатных растений (гибискус, бальзамин, традесканция белоцветковая).

В качестве объектов полевых исследований использовались листья культурных (кукуруза сорта Кичкасская местная, подсолнечник сорта Ско-ропелый) и сорных (щирица запрокинутая, марь белая, латук дикий, вьюнок полевой, молочай Вальдштейна) растений, относящихся к различным семействам. Выбор видов для эксперимента определялся высокой встречаемостью в агроценозах и более или менее равномерным распределением по территории области [12, 13]. Кроме того, эти растения имеют хорошо развитую листовую пластинку, что делает их удобными для измерений сверхслабых свечений. Довольно большой набор видов – представителей различных семейств позволяет выявить среди них как наиболее чувствительные, так и наиболее устойчивые к фитотоксическим веществам.

В опытах использовали водные растворы гербицида раундап (действующее вещество глифосат – N-фосфонометил-глицин;  $C_3H_8NO_5P$ ). Раундап, широко используемый в сельском хозяйстве в настоящее время, является наиболее характерным представителем класса фосфорорганических гербицидов. 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 в норме 2-8 л/га. Раундап обладает частично системным действием и может перемещаться из надземных органов растения в подземные.

Первичный механизм действия раундапа связан с подавлением биосинтеза ароматических аминокислот [17]. Известно также, что раундап индуцирует хлороз [16]. Подобно индуцирующим хлороз гербицидам, он подавляет образование рибосом и РНК в хлоропластах, формирование гран и биосинтез пигментов. Кроме того, раундап может снижать содержание каротиноидов и хлорофилла в обработанных тканях. Продолжительное действие гербицида вызывает нарушения различных процессов клеточного биосинтеза, например синтеза белка, фотосинтеза и дыхания. Одновременно ослабевают транспорт ассимилятов.

Наземные органы вегетирующих растений обрабатывались водными растворами гербицида раундап разных концентраций (2% и 4%) с помощью пульверизатора. Контрольные растения аналогичным образом опрыскивали чистой водой. Отделенный от растения лист помещали в камеру экспериментальной установки, облучали его лампой и в течение 10 секунд регистрировали количество им-

пульсов, излучаемых листовой пластинкой. Замедленную флуоресценцию измеряли последовательно у обработанного и контрольного растений. При этом учитывалась также продолжительность действия гербицида на растение (1-4 суток). Период от момента сбора листьев до измерения не превышал 15 мин, что позволяет полностью исключить увядание. Исследования проводились в летний период 2000-2002 гг. Температура воздуха в дни сбора образцов была выше  $+20^{\circ}C$ , солнечно. Все измерения выполняли в 10-кратной повторности. Необходимый объем выборки определен с помощью стандартных методик [7]. Для анализа и статистической обработки результатов экспериментальных исследований использовался пакет программ Statistic 99.

Для качественной оценки влияния гербицида на долгоживущую компоненту послесвечения растений был разработан и применен фотографический метод. В эксперименте использовался фотоаппарат с короткофокусным объективом («Зенит»). Лист, отделенный от растения, помещали под объективом в светонепроницаемую камеру и открывали затвор фотоаппарата. Время экспозиции составляло 1-3 суток, после чего на высокочувствительной фотопленке фиксировались кванты света, излучаемые листом.

На основе полученных с помощью экспериментальной установки данных были построены кривые спада замедленной флуоресценции исследуемых растений. В качестве показателя замедленной флуоресценции взяты значения амплитуды медленной (секундной) компоненты затухания послесвечения. Проведенный анализ показал, что характер спада кривых послесвечения обработанных гербицидом растений в общем такой же, как в контроле, хотя интенсивность замедленной флуоресценции существенно различная [3].

Отмечено, что заметные сдвиги в функциональной активности фотосинтетического аппарата клеток исследуемых растений начинают проявляться через 24 часа после обработки раундапом (это фиксировалось по ингибированию замедленной флуоресценции).

Кривые спада замедленной флуоресценции описаны экспоненциальным уравнением регрессии (1):

$$N = N_0 \cdot e^{-\lambda t}, \quad (1)$$

где  $N$  – число импульсов;

$N_0$  – число импульсов в начальный момент времени;

$t$  – время, сек;

$\lambda$  – постоянная, характеризующая скорость спада интенсивности замедленной флуоресценции,

равная  $\ln 2/T$  ( $T$  – время, через которое число импульсов  $N$  в 2 раза меньше, чем  $N_0$ ).

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

На основе параметра  $\lambda$  и кластерного анализа полученных данных разработана классификация видов и сортов растений по ответной реакции фотосинтетического аппарата на воздействие гербицида (рисунок 1).

Фотографические изображения послесвечения обработанных гербицидом и контрольных растений подтверждают экспериментальные данные, полученные при использовании разработанной нами установки для регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла. При этом визуально наблюдались значительные различия интенсивности свечения обработанного и контрольного растений.

Результаты экспериментов по исследованию влияния фосфорорганического гербицида на интенсивность замедленной флуоресценции с помощью фотографического метода позволяют рекомендовать данный метод в качестве дополнительного для оценки функционального состояния растений под действием различных факторов.

В результате проведенных исследований сделаны 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 основе регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла.

3. В результате проведенного исследования на большом фактическом материале определены особенности замедленной флуоресценции хлорофилла культурных и сорных растений разных сортов и видов под действием фосфорорганического гербицида.

4. Проявление фитотоксического действия раундапа было обнаружено по ингибированию замедленной флуоресценции через 24 часа после обработки исследуемых растений.

5. Предложенные параметры интенсивности послесвечения ( $\lambda$  и  $N_0$ ) характеризуют особенности действия гербицида на растения разных видов и сортов.

Таблица 1. Сравнительная характеристика параметров замедленной флуоресценции  $N_0$  и  $\lambda$

Растение	Контроль		2%		4%	
	$N_0$	$\lambda$	$N_0$	$\lambda$	$N_0$	$\lambda$
Щирица запрокинутая	48	0,039	64	0,280	65	0,210
Кукуруза сорта Кичкасская местная	79	0,075	49	0,150	93	0,210
Марь белая	40	0,002	38	0,150	30	0,200
Молочай Вальдштейна	54	0,013	52	0,030	67	0,260
Латук дикий	61	$9,035 \cdot 10^{-7}$	44	0,244	28	0,200
Подсолнечник сорта Скороспелый	29	0,022	26	0,245	22	0,350
Вьюнок полевой	88	0,004	59	0,257	93	0,635

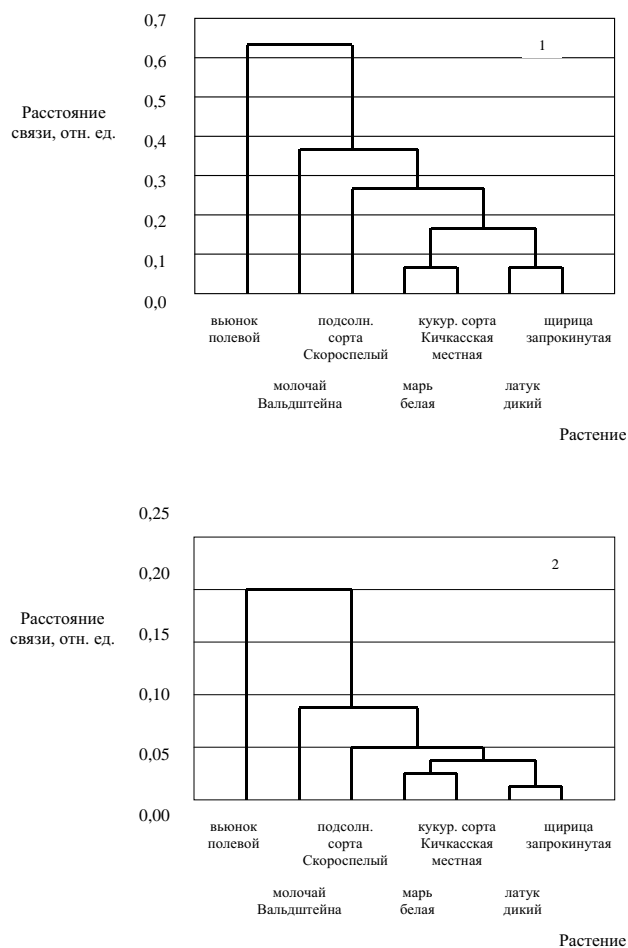


Рисунок 1. Классификация видов и сортов растений по ответной реакции фотосинтетического аппарата на действие раундапа на основе параметра замедленной флуоресценции  $\lambda$ : 1 – по методу сити-блок (Манхэттеновских) расстояний; 2 – по методу квадрата Евклидовых расстояний

6. На основе параметра замедленной флуоресценции  $\lambda$ , определяющего скорость спада интенсивности замедленной флуоресценции, разработаны принципы классификации видов и сортов растений по ответной реакции фотосинтетического аппарата на фитотоксические вещества.

7. Показано, что фотографический метод может быть применен в качестве дополнительного для оценки влияния неблагоприятных факторов на фотосинтетический аппарат растений.

8. Результаты проведенного исследования могут быть применены для получения экспресс-информации о механизмах действия новых препаратов фитотоксических веществ, внедряемых в практику сельского хозяйства, быстрого и надежного тестирования на сохранение действующего вещества при длительном хранении гербицидов, а также в системе ранней диагностики изменений состояния растительного покрова под воздействием техногенного загрязнения агроферы.

**Список использованной литературы:**

1. Веселовский В.А., Веселова Т.В. Люминесценция растений: Теоретические и практические аспекты. – М.: Наука, 1990. – 200 с.
2. Гашимов Р.М. Исследование влияния загрязняющих веществ на первичные процессы фотосинтеза методом замедленной флуоресценции: Дисс. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. – Ереван, 1984. – 166 с.
3. Ефремов И.В., Быкова Л.А. Биофизические аспекты проблемы загрязнения окружающей среды гербицидами // Состояние биосферы и здоровье людей: Материалы II Международной научно-практической конференции. – Пенза: ПГСХА, 2002. – С.22-24.
4. Ефремов И.В., Быкова Л.А. Изучение влияния фосфорорганических гербицидов (на примере глифосата) на культурные и сорные растения // Вестник ОГУ. – Оренбург: ИПК ОГУ, 2002. - №3. – С. 90-94.
5. Ефремов И.В., Межуева Л.В., Быкова Л.А. Устройство для регистрации замедленной флуоресценции. Решение о выдаче патента на изобретение от 11.06.02 г., по з-ке №2002115607.
6. Ладонин В.Ф., Лунев М.И. Остатки пестицидов в объектах агроценозов и их влияние на культурные растения. – М.: ВНИИТЭИСХ, 1985. – 61 с.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. - М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
8. Маторин Д.Н., Венедиктов П.С., Макевнина М.Т. Применение метода регистрации послесвечения зеленых водорослей для определения загрязненности фитотоксическими веществами почвы и воды // Биологические науки. – 1975. - №12. – С.122-125.
9. Мокроносов А.Т., Гавриленко В.Ф. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. – М.: Изд-во МГУ, 1992. – 320 с.
10. Мочалкин А.И., Алексеев С.И., Соколов М.С., Мочалкина К.И. Изменение характера фотоиндуцированного свечения растений под действием гербицидов // Химия в сельском хозяйстве. – 1969. – Т.7. - №12. – С.47-52.
11. Мочалкина К.И., Мочалкин А.И., Роман Л.Л., Соколов М.С. Фотоиндуцированное послесвечение у растений под действием гербицидов // Химия в сельском хозяйстве. – 1970. – Т.8. - №4. – С.101-104.
12. Попов А.В. Сорные растения Оренбургской области. – Оренбург: Изд-во ОГПУ, 1997. – 238 с.
13. Прогноз на 2001 год появления, распространения вредителей, болезней сельскохозяйственных культур и сорняков в Оренбургской области / Отв. ред. А.И. Полищук. – Оренбург, 2001. – 48 с.
14. Современные методы биофизических исследований / Под ред. А.Б.Рубина. – М.: Высш. шк., 1988. – 358 с.
15. Тарусов Б.Н., Веселовский В.А. Сверхслабые свечения растений и их прикладное значение. – М.: Изд-во МГУ, 1978. – 149 с.
16. Федтке К. Биохимия и физиология действия гербицидов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 223 с.
17. Физиолого-биохимический механизм действия пестицидов / С.И. Фудель-Осипова. – Киев: Наук. думка, 1981. – 99 с.