

## Реакции растений на действие метилфосфоновой кислоты

С.Ю. Огородникова, Т.К. Головки, Т.Я. Ашихмина

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН

Исследовано влияние фосфорорганического ксенобиотика – метилфосфоновой кислоты (МФК) на жизнедеятельность культурных (ячмень, пелюшка) и дикорастущих растений (клевер ползучий, подорожник большой, одуванчик лекарственный, чина луговая, бодяк полевой, лютик едкий, ежа сборная). Установлено, что МФК вызывает в растениях окислительный стресс и влияет на важнейшие процессы жизнедеятельности – рост, накопление биомассы, дыхание, тепловыделение и содержание пигментов. Предложена схема действия МФК, сделано заключение об опасности появления в окружающей среде устойчивых продуктов деструкции фосфорсодержащих отравляющих веществ.

The influence of phosphororganic xenobiotic - methylphosphonic acid (MPA) on cultural (barley, fodder pea) and wild plants (*Amoria repens*, *Plantago major*, *Taraxacum officinale*, *Lathyrus pratensis*, *Pisum arvense*, *Ranunculus acris*, *Dactylis glomerata*) was investigated. It was shown that MPA causes oxidative stress in plants, effects on plant growth, accumulation of biomass, rates of respiration, heat production and pigment complex. The scheme of MPA action was offered.

Химическое загрязнение биосферы является одной из серьезных экологических проблем. Растения в связи с неподвижным образом жизни и как основной компонент экосистем в первую очередь подвергаются воздействию загрязняющих веществ. Поллютанты оказывают токсическое действие на растительный организм: индуцируют развитие окислительного стресса [1], подавляют активность ферментов [2], повреждают фотосинтетический аппарат [3], нарушают развитие вегетативных и генеративных органов [4], что приводит к нарушению роста и развития, а иногда и гибели растений. Поэтому под влиянием загрязняющих веществ снижается продуктивность и изменяется структура растительного покрова.

Среди химических загрязнителей наибольшую опасность для живых организмов и природных комплексов представляют вещества, чуждые биосфере, – ксенобиотики. К ксенобиотикам относятся и фосфорорганические соединения – фосфонаты, которые широко применяются в качестве пестицидов (гербициды, нематоциды, фунгициды, регуляторы роста и др.). Наиболее токсичные соединения данного класса составляют основу фосфорсодержащих отравляющих веществ (зарин, зоман, Vx-газы). В соответствии с Конвенцией о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и его уничтожения в ряде регионов РФ начато строительство объектов по уничтожению химического оружия [5]. Одним из таких регионов является Кировская область, где сосредоточено 17,4%

от общего запаса химического оружия России, большая часть из которого – фосфорсодержащие отравляющие вещества.

При функционировании объекта по уничтожению химического оружия возможно появление в окружающей среде большого числа продуктов деструкции отравляющих веществ [6]. Конечным продуктом гидролиза в природном комплексе фосфорсодержащих отравляющих веществ является устойчивая к разложению в природе метилфосфоновая кислота. Известно, что она сохраняется в почве десятилетиями и характеризуется низкой токсичностью для млекопитающих [7, 8]. Сведения об эффектах МФК на растения практически отсутствуют. Ранее нами было показано, что МФК вызывает ингибирование прорастания семян, торможение роста и развития проростков ячменя и пелюшки [9, 10]. Выявленные нами эффекты подтверждены в опытах на проростках подсолнечника [11].

Целью данной работы было изучение реакции культурных и дикорастущих видов растений на действие метилфосфоновой кислоты разной концентрации. Функциональное состояние растений оценивали по показателям линейного роста, накопления биомассы, дыхания, тепловыделения, состояния пигментного комплекса и активности перекисного окисления липидов.

### Материал и методы

Исследования проводили на культурных одно- и двудольных растениях: ячмень

(*Hordeum vulgare* L.) сорта Новичок и пелюшка (*Pisum arvense* L.) сорта Надежда, и дикорастущих растениях, широко распространённые в естественных фитоценозах: клевер ползучий (*Trifolium repens* L.), подорожник большой (*Plantago major* L.), одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Wigg.), чина луговая (*Lathyrus pratensis* L.), мышиный горошек (*Vicia cracca* L.), бодяк полевой (*Cirsium arvense* (L.) Scop.), лютик едкий (*Ranunculus sceleratus* L.), ежа сборная (*Dactylis glomerata* L.), мятлик луговой (*Poa pratensis* L.), пырей ползучий (*Agropyron repens* (L.) Beauv.).

В опытах применяли метилфосфоновую кислоту фирмы Lancaster (Англия), содержащую 98% действующего вещества, из которой были приготовлены растворы разной концентрации (0,0005 – 0,1 моль/л) для опрыскивания растений. Опыты проводили в лабораторных и полевых условиях.

Влияние МФК на растения ячменя изучали в вегетационном и полевом опытах. Растения выращивали в климатической камере ВКШ-0.6 (Россия) на питательном растворе, который подавали с учётом скорости роста растений. В полевых опытах ячмень выращивали на участке со среднеокультуренной подзолистой почвой в соответствии в агротехническими рекомендациями. В обоих случаях проводили однократное опрыскивание растений (до полного смачивания) растворами МФК разной концентрации в фазу 3-4 листьев. Растения пелюшки выращивали в полевых условиях. На 20-й день после всходов (фаза вегетативного роста) растения опрыскивали растворами МФК. Для изучения влияния МФК на ростовые процессы и накопление биомассы отбирали по 30 растений каждого варианта. Определяли линейные размеры, массу сырых и сухих органов.

При исследовании состояния растений природной флоры на злаково-разнотравном лугу закладывали площадки по 1 м<sup>2</sup> с однородным травостоем. Опрыскивание растений проводили в конце июня однократно. Действие МФК изучали на сходных по развитию растениях, с опытных площадок отбирали 10-15 растений каждого вида.

Дыхание измеряли по поглощению O<sub>2</sub> манометрическим методом при 20°C [12]. Скорость выделения метаболического тепла тканями растений измеряли на микрокалориметре «Биотест-2» (ИБП, Пущино, Россия). Содержание хлорофиллов и каротиноидов в зрелых листьях определяли спектрофотометрически на СФ-46 («Ломо», Россия) [13]. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) анализировали по цветной реакции тиобарбитуровой кислоты (ТБК) с малоновым диальдегидом, образующимся в процессе ПОЛ [14].

Все опыты проводили в 3-4-кратной биологической повторности, аналитические определения проводили в 3-6-кратной повторности в зависимости от показателя. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов [15]. На рисунках 1-3, 5 и в таблицах 1-3 приведены средние арифметические величины со стандартным отклонением.

### Результаты и их обсуждение

Опрыскивание надземной части растений МФК приводило к ингибированию ростовых процессов. В опытах с 0,01 моль/л МФК выявили снижение роста и накопления биомассы растений (табл. 1). Так, через 2 недели после обработки у молодых растений ячменя длина корней и высота побегов была на 40% меньше, чем в контроле.

Таблица 1

Влияние метилфосфоновой кислоты на рост и накопление биомассы ячменя

Вариант	Длина, см		Сухая биомасса, мг	
	Побег	Корень	Побег	Корень
Контроль	53.7±3.2	29.5±4.2	160.3±26.4	47.1±2.9
0.0005	51.8±2.9	32.5±4.2	177.0±18.6	47.0±1.3
0.01	41.5±3.0*	17.4±2.5*	104.9±21.7*	29.0±2.9*

Примечание \* P<0.05

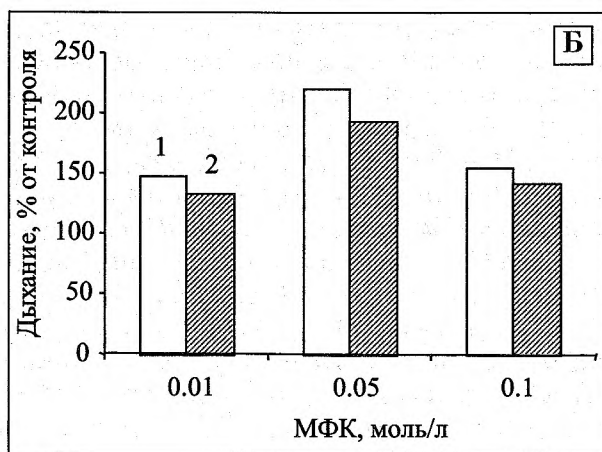
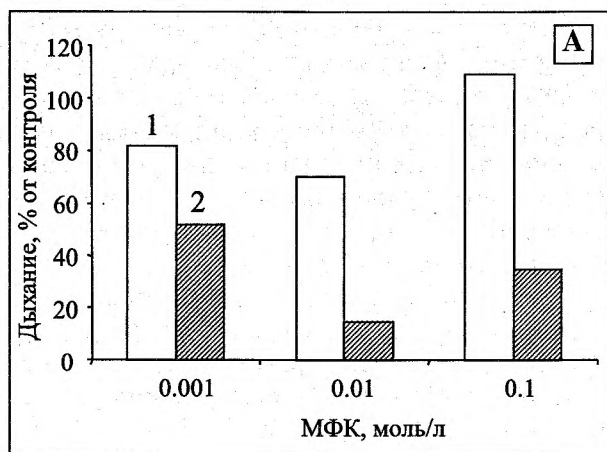


Рис. 1. Изменение дыхательной активности ячменя (А) и подорожника большого (Б) под влиянием метилфосфоновой кислоты. 1 – листья, 2 – корни

ле. Наряду с торможением линейного роста снижались темпы накопления биомассы. Биомасса опытных растений не превышала 65% от контрольных. Угнетение роста и накопления биомассы корней свидетельствует о том, что МФК хорошо поглощается листовой поверхностью, обладает системным действием и транспортируется по сосудистой системе в корни. Сходные эффекты ранее мы отмечали на растениях ячменя и пелюшки при другом способе обработки – добавлении МФК в среду выращивания [9,16]. Следовательно, МФК вызывает ингибирование ростовых процессов, независимо от способов обработки.

Замедление роста является ответной реакцией растений на действие стресс-факторов и, по-видимому, направлено на расширение энергетических возможностей для адаптации растительного организма к дей-

ствию стрессора. Для оценки влияния МФК на энергопластический обмен растений изучали активность дыхания и скорость тепловыделения. Дыхание как процесс, связанный с различными сторонами жизнедеятельности растений, является хорошим показателем метаболической активности и её изменений под влиянием факторов среды [17].

Результаты опытов свидетельствуют о том, что МФК вызывала изменение дыхательной активности растений. В полевом опыте обработка ячменя растворами МФК приводила к угнетению дыхания (рис. 1А). При этом корни реагировали на МФК сильнее, чем листья. У подорожника большого, напротив, отмечали возрастание дыхания под действием МФК в концентрациях 0,01, 0,05 и 0,1 моль/л (рис. 1Б). Однако прямой зависимости между действующей концентрацией МФК и усилением дыхания не выявлено. Потребление кислорода повышалось максимально при действии 0,05 моль/л МФК. Увеличение концентрации МФК до 0,1 моль/л приводило к снижению поглощения  $O_2$ , что может быть результатом подавления активности ферментов дыхательного пути и/или угнетения обменных процессов в повреждённых тканях.

Обработка МФК (0,1 моль/л) вызывала активацию дыхательного газообмена в листьях одуванчика лекарственного, лютика едкого и бодяка полевого (рис. 2). Так, на 6-й день после применения МФК дыхание одуванчика лекарственного повышалось на 40%, а лютика едкого и бодяка полевого на 25-27%.

Таким образом, обработка МФК оказывала влияние на дыхательную активность

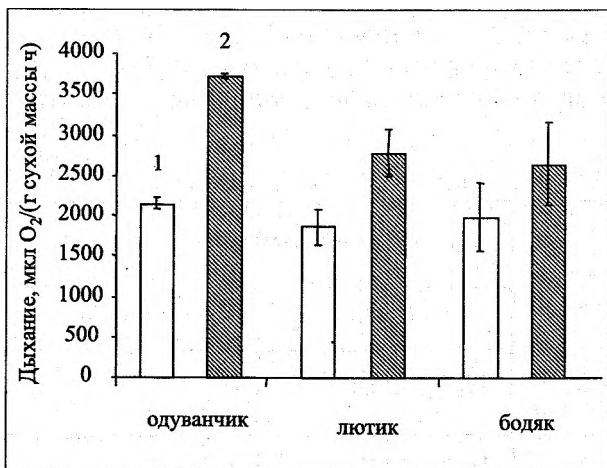


Рис. 2. Влияние метилфосфоновой кислоты на дыхание листьев. 1 – контроль, 2 – МФК (0,1 моль/л)

растений. Во всех случаях, за исключением ячменя, происходило возрастание дыхания, что связано с увеличением энергетических затрат на поддержание функциональной активности клеток и репарацию поврежденных клеточных структур [18,17]. Снижение скорости дыхания, скорее всего, свидетельствует об угнетении функциональной активности растений под действием стрессора – МФК.

Информативным показателем функционального состояния растения является выделение метаболического тепла [17]. Тепловыделение коррелирует с изменениями всех анаболических и катаболических процессов в живом организме и служит показателем эффективности использования энергии. Как видно из рисунка 3, под действием различных концентраций МФК скорость тепловыделения корней пелюшки повышалась в 1,5-2 раза. По-видимому, МФК вызывала повреждение клеток и ускоряла катаболические процессы, связанные с рассеиванием энергии. Таким образом, установленные нами изменения дыхательной активности и скорости тепловыде-

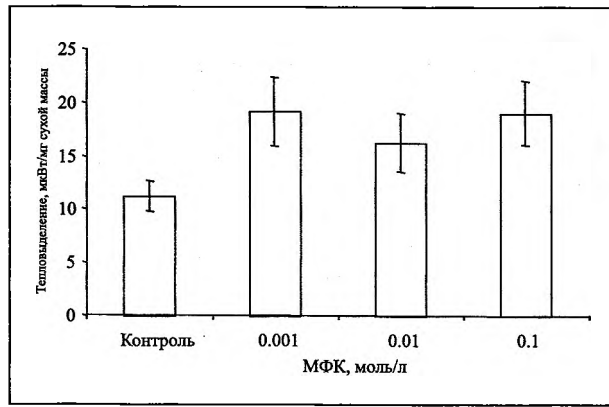


Рис. 3. Изменение тепловыделения корней пелюшки под влиянием метилфосфоновой кислоты

ления растений свидетельствуют о нарушении энергопластического обмена под действием МФК.

Растения являются автотрофными организмами, и способность противостоять стрессу во многом зависит от сохранности фотосинтетического аппарата. Обработка МФК вызывала нарушения в пигментном комплексе листьев, причём реакция пигментного комплекса зависела от вида растений и концентрации кислоты (табл. 2). Под влиянием МФК в концентрациях 0,001-0,1 моль/л происходило достоверное снижение содержания зелёных пигментов в листьях ячменя. Жёлтые пигменты отличались повышенной устойчивостью к действию МФК.

Обработка 0,1 моль/л МФК вызывала появление на листьях злаков (ячмень, ежа сборная, мятлик луговой, пырей ползучий) небольших хлорозных пятен. У подорожника большого листья не имели видимых повреждений, но содержание зелёных и жёлтых пигментов в них существенно снижалось, на 35-40%, под действием 0,1 моль/л МФК.

МФК в концентрации 0,05 и 0,1 моль/л вызывала видимые повреждения листьев пелюшки, клевера, чины и одуванчика. Наблюдалась потеря тургора, появление хлорозных и некротических пятен. Так, при действии МФК 0,1 моль/л содержание зелёных и жёлтых пигментов в листьях пелюшки снизилось на 20-25% по сравнению с контролем. Достоверное уменьшение содержания пигментов в листьях клевера выявили при действии МФК в концентрации 0,05 моль/л.

Можно полагать, что снижение содержания хлорофиллов в листьях при обработке растений МФК происходило в результа-

Таблица 2

Влияние метилфосфоновой кислоты на содержание пигментов в листьях

Вариант	Содержание пигментов, мг/г сухой массы	
	Сумма хлорофиллов (a+b)	Каротиноиды
Подорожник большой		
Контроль	5.86±0.36	1.81±0.22
0.01	5.09±0.28	1.82±0.29
0.05	5.32±0.65	1.81±0.25
0.1	3.65±0.32*	1.19±0.05*
Клевер ползучий		
Контроль	8.54±0.73	2.62±0.15
0.01	7.48±0.64	2.62±0.13
0.05	6.59±0.42*	2.54±0.19
0.1	5.06±0.21*	2.12±0.24
Пелюшка		
Контроль	4.12±0.02	2.07±0.01
0.001	5.08±0.22*	2.38±0.19
0.01	4.06±0.29	1.83±0.02*
0.1	3.46±0.07*	1.55±0.17*
Ячмень		
Контроль	6.59±0.09	2.56±0.21
0.001	5.21±0.24*	2.22±0.34
0.01	5.70±0.26*	2.33±0.11
0.1	5.77±0.41*	2.29±0.07

Примечание \* – P ≤ 0,05

**Таблица 3**

Содержание малонового диальдегида в листьях растений после обработки метилфосфоновой кислотой (0,1 моль/л)

Вид	МДА, мкмоль/г сырой массы	
	Контроль	Опыт
Подорожник большой	4.32±0.27	7.27±0.33*
Лютик едкий	2.46±0.06	3.81±0.33*
Одуванчик лекарственный	4.0±0.08	5.53±0.43*
Бодяк полевой	2.55±0.25	3.48±0.42
Пелюшка	1.73±0.05	2.30±0.06*
Ячмень	2.54±0.04	2.80±0.02*

Примечание \* -  $P \leq 0,05$

те деструкции (окисления) молекул пигментов и/или ингибирования ферментов синтеза хлорофиллов. Известно, что производное метилфосфоновой кислоты – N-(фосфонометил) глицин подавляет биосинтез предшественника хлорофилла – 5-аминолевулиновой кислоты [19].

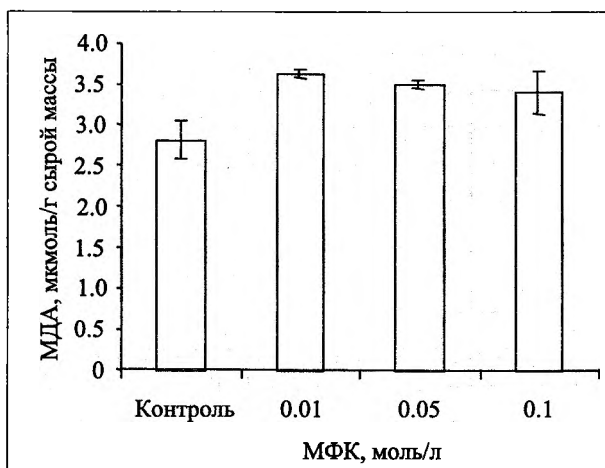
Многие стрессоры индуцируют образование активированных форм кислорода (АФК), которые вызывают повреждение клеточных структур [13,18]. Судя по наблюдаемым эффектам на фотосинтетический аппарат и дыхание, можно предположить, что МФК усиливает окислительные процессы в тканях растений. Уровень окислительного стресса мы оценивали по накоплению в тканях продукта перекисного окисления мембранных липидов малонового диальдегида (МДА). Как видно из таблицы 3, на второй день после обработки 0.1 моль/л МФК уровень МДА повышался у всех исследованных видов растений, что является следствием усиления перекисного окисления липидов (ПОЛ). Важно отметить, что наряду с активацией ПОЛ в листьях происходило накопление МДА в корнях растений (рис. 4). Увеличение содержания МДА в тканях опытных растений свидетельствует об усилении генерации активных форм кислорода, которые приводят к окислению биологических молекул и повреждению клеточных мембран.

Таким образом, результаты показывают, что МФК вызывает в растениях окислительный стресс и влияет на важнейшие

процессы жизнедеятельности – рост, накопление биомассы, фотосинтез, дыхание и тепловыделение. Другими словами, МФК в сравнительно низких концентрациях (0,001-0,1 моль/л) оказывает комплексное воздействие на растительный организм. На основе полученных данных можно представить следующую схему действия МФК (рис. 5).

Даже при однократном воздействии МФК вызывает увеличение содержания АФК в тканях растений (окислительный стресс), о чём свидетельствует возрастание активности перекисного окисления липидов. Избыточная генерация АФК приводит к снижению функциональной активности белков, повреждению клеточных структур и нарушению интенсивности метаболизма [20]. О нарушении метаболизма свидетельствуют изменение дыхательной активности и тепловыделения растений, обработанных МФК.

Снижение содержания хлорофиллов связано с ингибированием МФК ферментов их биосинтеза. Нарушение метаболизма приводит к угнетению роста и накопления биомассы опытных растений. Продолжительное действие МФК при выращивании на питательном растворе с добавлением МФК [9,15] и/или обработка растений МФК в концентрациях 0,1 моль/л и выше вызывают необратимые повреждения (образование на листьях некрозов, засыхание и отмирание листьев, верхушечных почек). В случае, когда сила действия стресс-фактора (МФК) превышает адаптивные возможности организма, они погибают.



**Рис. 4.** Влияние метилфосфоновой кислоты на активность перекисного окисления липидов в корнях подорожника большого

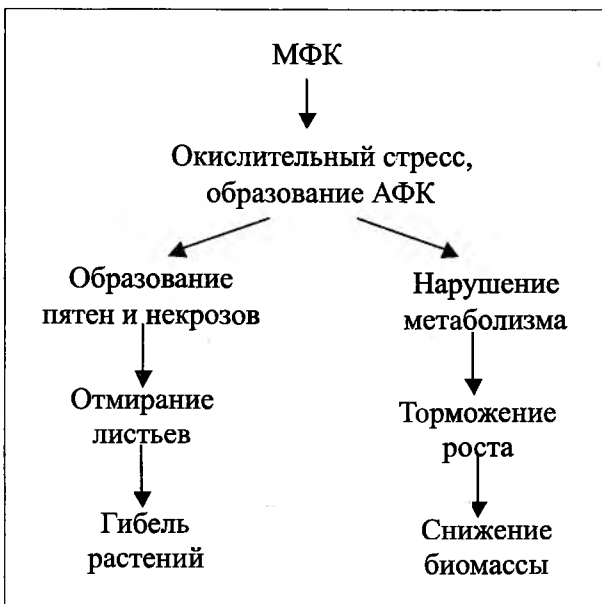


Рис. 5. Схема стрессорного действия метилфосфоновой кислоты на растения

Таким образом, выявленные нами эффекты метилфосфоновой кислоты на жизнедеятельность растений указывают на опасность появления в окружающей среде устойчивых продуктов деструкции фосфорсодержащих отравляющих веществ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №04-04-48255 и Интеграционно-го гранта УрО РАН по проекту № 49.

### Литература

1. Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиология растений. 2003. Т. 50. №3. С. 459-464.
2. Пахомова В.М. Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений // Цитология. 1995. Т.37. Вып. 1 /2. С. 66.
3. Малева М.Г., Некрасова Г.Ф., Безель В.С. Реакция гидрофитов на загрязнение среды тяжёлыми металлами // Экология. 2004. № 4. С. 266-272.
4. Меннинг У.Д., Федер У.А. Биомониторинг загрязнения атмосферы с помощью растений. Л.: Гидрометеоздат, 1985. 144 с.
5. Петров С.В. Основные проблемы уничтожения химического оружия в Российской Федерации // Российский химический журнал. 1993. Т. 37. №3. С. 5-7.
6. Ашихмина Т.Я. Комплексный экологический мониторинг объектов хранения и уничтожения химического оружия. Киров: Вятка, 2002. 544 с.

7. Кононова С.В., Несмеянова М.А. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами // Биохимия. 2002. Т. 67. № 2. С. 220-233.
8. Савельева Е.И., Зенкевич И.Г., Кузнецова Т.А., Радиллов А.С., Пшеничная Г.В. Исследование продуктов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии // Российский химический журнал. 2002. Т. 46. № 6. С. 82-91.
9. Огородникова С.Ю., Головки Т.К., Ашихмина Т.Я. Действие метилфосфоновой кислоты на рост и развитие проростков ячменя // Актуальные проблемы регионального экологического мониторинга: Матер. Всерос. науч. школы. Киров: Изд-во Старая Вятка, 2003. С. 215-218.
10. Огородникова С.Ю., Головки Т.К. Действие низких концентраций метилфосфоновой кислоты на проростки пелюшки // Агрехимический вестник. 2004. № 3. С. 26-27.
11. Скоробогатова В.И., Щербаков А.А., Сотников Н.В., Щербакова Л.Ф., Федоров Е.Е., Любунь Е.В., Крючкова Е.В. Воздействие фосфорорганических загрязнителей на растения // Молекулярные механизмы взаимодействия микроорганизмов и растений: фундаментальные и прикладные аспекты. Матер. Всерос. конференции. Саратов: Изд-во Научная книга, 2005. С. 44-45.
12. Семихатова О.А., Чулановская М.В. Манометрические методы изучения дыхания и фотосинтеза. М.: Наука, 1965. 168 с.
13. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зелёных листьев // Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 154-171.
14. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2002. 208 с.
15. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1973. 343 с.
16. Огородникова С.Ю., Головки Т.К. Влияние метилфосфоновой кислоты на растения пелюшки // Агрехимия. 2005. №4. С. 37-41.
17. Головки Т.К. Дыхание растений (физиологические аспекты). СПб.: Наука, 1999. 204 с.
18. Семихатова О.А. Энергетика дыхания растений в норме и при экологическом стрессе. Л.: Наука, 1990. 72 с.
19. Гольдфельд М.Г., Каралетян Н.В. Физико-химические основы действия гербицидов // Итоги науки и техники. Биологическая химия. Т. 30 М., 1989. 164 с.
20. Alexieva V., Ivanov S., Sergiev I., Karanov E. Interaction between stresses // Bulg. J. Plant Physiol. 2003. Special Issue. P. 1-17.
21. Finkel T. Redox-dependent signal transduction // FEBS Letters. 2000. V. 476. P. 52-54.