

## Сравнительные эффекты гербицидов Топик и Гранстар на развитие окислительного стресса в листьях злаков

© 2012. А. С. Лукаткин, д.б.н., зав. кафедрой,  
А. Н. Гарькова, аспирант, О. В. Нуштаева, аспирант, Ю. Н. Макушкина, магистрант,  
ФГБОУВПО «Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва»,  
e-mail: aslukatkin@yandex.ru

Гербициды Гранстар (класс сульфонилмочевины) и Топик (класс арилоксифеноксипропилаты) при кратковременном действии и в длительном последствии индуцировали возникновение окислительного стресса в листьях культурных злаков – кукурузы (*Zea mays* L.), озимой ржи (*Secale cereale* L.) и озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Наибольшая интенсивность окислительного стресса, оцениваемого по скорости генерации супероксидного анион-радикала ( $O_2^-$ ), выявлена при обработке растений высокими дозами ксенобиотиков (300 мкг/л и 10 мкл/л для Гранстара и Топика соответственно). Сравнение препаратов показало более сильное воздействие Топика на возникновение окислительного стресса (при остром действии) и Гранстара – при длительном последствии. Самым уязвимым объектом к изученным препаратам оказалась кукуруза, а устойчивым – озимая рожь.

Herbicides Granstar (Sulfonylurea class) and Topic (Aryloxyphenoxypropylate class) in short-term action and long-term aftereffects induce oxidative stress in leaves of cultural cereals – maize (*Zea mays* L.), rye (*Secale cereale* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). The highest intensity of oxidative stress as measured by the rate of generation of superoxide anion ( $O_2^-$ ) is found in plants treated with high doses of xenobiotics (300  $\mu\text{g} / \text{L}$  and 10  $\mu\text{L} / \text{L}$  for Granstar and Topic, respectively). Comparison of the herbicides showed a stronger effect on the oxidative stress in plants treated with Topic (acute effect) and Granstar (long-term aftereffects). The most vulnerable target for the herbicide study was maize, the most sustainable – winter rye.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, *Secale cereale*, *Zea mays*, ксенобиотики, окислительный стресс, гербициды, Гранстар, Топик, генерация супероксидного анион-радикала

Key words: *Triticum aestivum*, *Secale cereale*, *Zea mays*, xenobiotics, oxidative stress, Herbicides, Granstar, Topic, generation of superoxide anion

### Введение

На культивируемые растения воздействует большое количество различных ксенобиотиков. Их применение (особенно гербицидов) необходимо для предотвращения возможных потерь урожая зерна и сохранения его качества. Однако это неизбежно приводит к попаданию больших количеств химических препаратов в окружающую среду, что может негативно влиять как на целевые, так и нецелевые (культурные) растения [1]. В результате действия ксенобиотиков в растениях возникает серьёзный дисбаланс между образованием активированных форм кислорода (АФК), возможностью их ликвидации и скоростью репарационных процессов в клетках [2]. Возникает ситуация, когда антиоксидантные системы не в силах сбалансировать возросший уровень АФК, а системы репарации не успевают устранить повреждения клеточных структур. В результате развивается окислительный стресс, который может быть вызван как сверхпродукцией АФК, так и падением эффективности ан-

тиоксидантной защиты [3]. Большое количество гербицидов применяют на злаковых культурах, но сведений о возникновении окислительного стресса при их воздействии сравнительно немного (кроме известного индуктора АФК параквата). Показано, что обработка проростков кукурузы и бобов флуометуронном, атразином и римсульфураном приводила к повышенному содержанию перекисей в клетках [4]. Имеются данные о влиянии глифосата на параметры окислительного стресса и активность антиоксидантных ферментов у гороха и пшеницы [5, 6], о реакциях растений на стресс, вызванный гербицидами оксифлуорфеном [7], норфлуразоном [8], атразином [9]. Однако механизмы действия гербицидов, принадлежащих к различным группам, существенно разнятся, и неизвестно, все ли гербициды оказывают такие оксидативные эффекты на растения. Исходя из того, что оба препарата являются мало изученными в области физиологических ответных реакций растений на стресс, но достаточно распространёнными в сельском хозяйстве, мы провели сравни-

тельное изучение характеристик влияния гербицидов, относящихся к различным классам (сульфонилмочевин и арилоксифеноксипропилатов), на развитие окислительного стресса в листьях культурных злаков.

### Объекты и методы

Объектами исследования служили молодые растения кукурузы (*Zea mays* L.) гибрида Коллективный 172 МВ, озимой ржи (*Secale cereale* L.) сорта Эстафета Татарстана и озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Мионовская 808. Материал для работы – гербициды Гранстар и Топик.

Семена злаков высаживали в сосуды с почвой (среднесуглинистый выщелоченный чернозём) и выращивали растения в лабораторных условиях до фазы 2–3 листьев (возраст 7 сут) при 22–25 °С, освещении люминесцентными лампами с плотностью потока фотонов около 200 мкмоль/м<sup>2</sup>·с, влажности воздуха около 80%, продолжительности светового дня 12 ч. Полив производили через день. В первой серии опытов высечки листьев 7-дневных растений выдерживали в растворах гербицида Гранстар (3, 30 и 300 мкг/л) или Топик (0,1, 1 и 10 мкл/л) от 1 до 3 ч, после чего определяли скорость генерации супероксидного анион-радикала по методике [10]. Сущность метода заключается в том, что для оценки уровня генерации супероксида (довольно стабильной АФК) используют его реакцию с адреналином, приводящую к образованию адrenoхрома. В качестве контроля использовали высечки, выдержанные в дистиллированной воде.

Во второй серии опытов 7-дневные растения опрыскивали растворами гербицида Гранстар (3, 30 и 300 мкг/л) и Топик (0,1, 1 и 10 мкл/л) из расчета 2 мл/растение (контрольные растения обрабатывали водой). Спустя 1, 2 и 3 суток в растениях определяли генерацию O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Все определения проводили в 3 независимых опытах, состоявших из 2–3 биологических повторностей, каждый вариант включал 3 аналитические повторности. Результаты обрабатывали статистически по общепринятым биометрическим формулам с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft Excel». На рисунках представлены средние значения из всех опытов с их стандартными ошибками, рассчитанными по стандартным биометрическим критериям. Достоверность различий между вариантами опыта оценива-

ли по t-критерию Стьюдента при уровне значимости 0,05.

### Результаты и их обсуждение

Окислительный стресс является одним из начальных проявлений повреждения клеток растений. Важным показателем, характеризующим силу окислительного стресса, является резкое возрастание образования АФК в клетке. При этом серьёзной задачей, стоящей перед нами, было определение пороговых концентраций гербицидов Гранстар и Топик, оказывающих повреждающее действие на растения. С этой целью изучали скорость генерации O<sub>2</sub><sup>-</sup> в динамике действия и последствий гербицидов разных классов на проростки злаков. Поскольку эта АФК является короткоживущей (период существования радикала не более 10<sup>-4</sup> с [11]), то мы не можем точно измерить концентрацию O<sub>2</sub><sup>-</sup> в данный период времени, и должны указывать либо стационарную концентрацию, либо скорость генерации радикала.

На первом этапе работы рассматривали скорость генерации O<sub>2</sub><sup>-</sup> при кратковременном (от 1 до 3 ч) действии гербицидов Гранстар и Топик. Обнаружено, что при увеличении времени инкубации высечек листьев злаков в растворах гербицида Топик уровень данной АФК (выраженный в процентах к водному контролю) всегда возрастал по сравнению с контролем (табл. 1). При этом показано, что воздействие препарата на высечки листьев зависело от концентрации. Уже после 1-го часа инкубирования скорость генерации O<sub>2</sub><sup>-</sup> значительно возрастала, особенно при максимальной дозе в высечках пшеницы. Спустя 3 ч от начала инкубирования высечек в гербициде наблюдали прогрессирующее повышение в большинстве вариантов опыта. Таким образом, гербицид Топик оказал максимальный эффект образования АФК у всех исследованных объектов при концентрации 10 мкл/л после 3 ч инкубации (табл. 1).

В динамике обработки высечек листьев злаков гербицидом Гранстар также прослеживается линейная (или близкая к линейной) зависимость реакции системы генерации АФК злаков от концентрации гербицида и длительности инкубации высечек. Выявлено, что генерация O<sub>2</sub><sup>-</sup> усиливалась в высечках листьев, инкубируемых в возрастающих концентрациях гербицида Гранстар (табл. 2). При этом у ржи малые дозы препарата (3 мкг/л) не давали достоверных различий с контролем, тогда

Таблица 1

Влияние кратковременной инкубации листьев злаков с гербицидом Топик на скорость генерации  $O_2^-$ , к водному контролю

Объект	Длительность инкубирования, ч	Концентрации гербицида, мкл/л		
		0,1	1	10
Пшеница	1	126,4±4,5	132,8±4,3	174,3±3,3
	3	130,9±1,8	156,1±1,4	180,6±1,2
Рожь	1	125,7±4,7	132,1±4,3	159,3±0,2
	3	159,7±1,3	163,3±1,3	172,7±1,3
Кукуруза	1	126,5±3,4	148,3±3,7	125,2±0,3
	3	139,4±1,8	171,4±0,7	185,7±5,0

Таблица 2

Влияние кратковременной инкубации листьев злаков с гербицидом Гранстар на скорость генерации  $O_2^-$ , % к водному контролю

Объект	Длительность инкубирования, ч	Концентрации гербицида, мкг/л		
		3	30	300
Пшеница	1	113,6±1,2	122,4±1,7	153,1±0,8
	3	120,5±2,3	125,0±1,5	159,4±1,4
Рожь	1	107,9±2,9	123,6±1,0	138,9±0,8
	3	106,6±3,0	125,5±1,6	146,7±2,1
Кукуруза	1	128,9±0,6	138,6±0,6	147,3±1,2
	3	140,3±1,2	151,1±1,2	166,2±0,9

как увеличение дозы препарата приводило к усилению генерации  $O_2^-$ . Наиболее выражено АФК-генерирующее действие Гранстара в высечках листьев кукурузы, где все концентрации препарата приводили к быстрому усилению генерации  $O_2^-$ .

Сравнение быстрых эффектов двух гербицидов, относящихся к разным химическим классам, показало более сильное воздействие препарата Топик на возникновение окислительного стресса. Самым уязвимым объектом к острому действию ксенобиотиков оказались молодые растения кукурузы, в высечках листьев которых уровень генерации  $O_2^-$  был максимальным.

Токсическое воздействие ксенобиотиков вызывает образование активных форм кислорода в любой клетке, испытывающей состояние

окислительного стресса. После снятия воздействия возможно длительное сохранение токсических эффектов, либо репарация повреждений. Эти процессы зависят от активности антиоксидантной защитной системы растений [3, 11]. При изучении последствий гербицидов молодые растения опрыскивали растворами препарата и измеряли скорость генерации  $O_2^-$  в листьях спустя 1, 2 и 3 сут после обработки.

Выявлено, что в контрольных растениях озимой пшеницы (обработанных водой) уровень этой АФК не изменялся в течение 3 дней (рис. 1 А). При обработке препаратом Топик в концентрациях от 0,1 до 10 мкл/л уровень  $O_2^-$  прогрессирующе увеличивался, и это повышение стабильно сохранялось во все три дня последствий обработки.

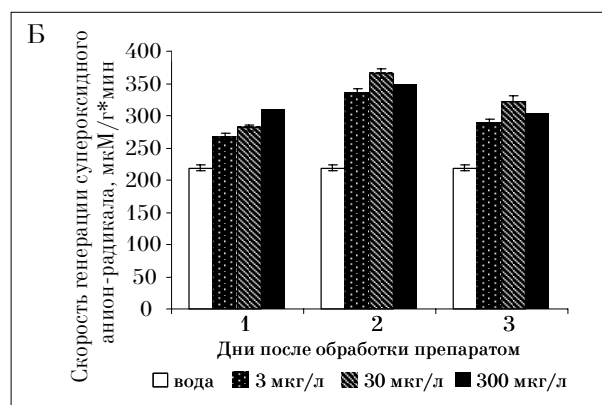
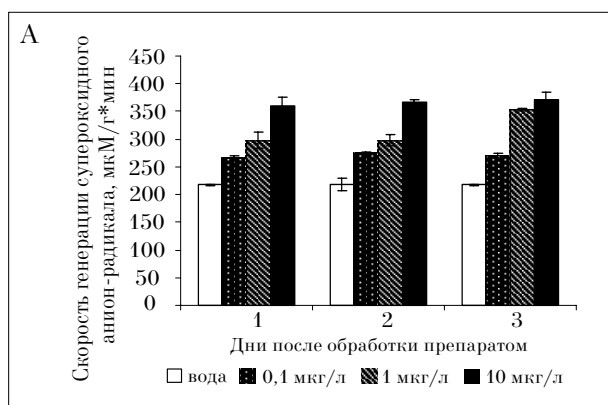


Рис. 1. Динамика генерации  $O_2^-$  в листьях пшеницы в течение 3 дней после обработки разными концентрациями гербицида: А – Топик, Б – Гранстар

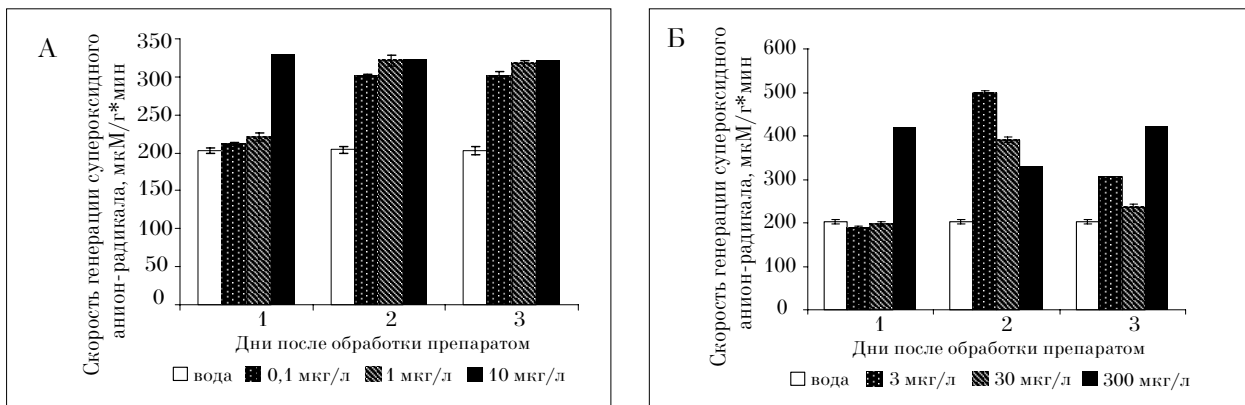


Рис. 2. Динамика генерации  $O_2^-$  в листьях ржи в течение 3 дней после обработки разными концентрациями гербицида: А – Топик, Б – Гранстар

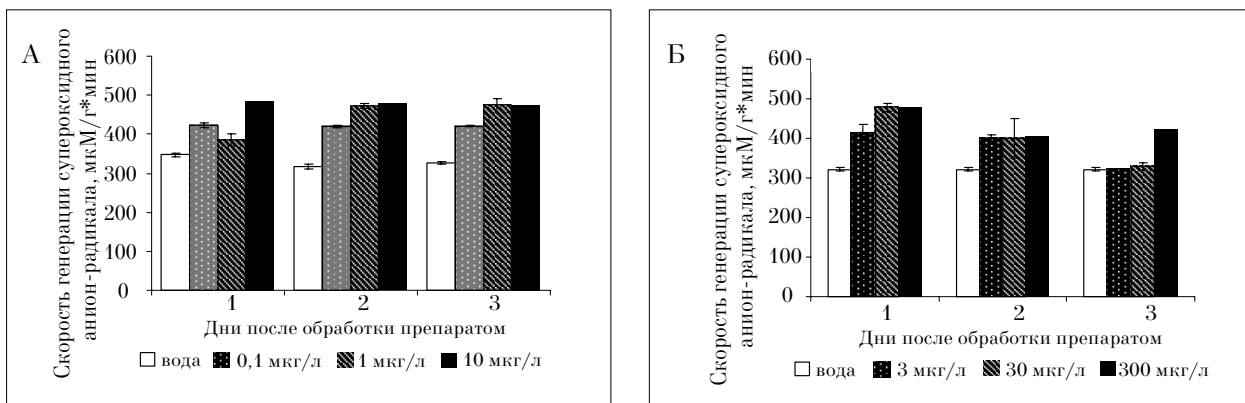


Рис. 3. Динамика генерации  $O_2^-$  в листьях кукурузы в течение 3 дней после обработки разными концентрациями гербицида: а – Топик, б – Гранстар

В опыте с обработкой высечек листьев пшеницы гербицидом Гранстар выявлена несколько иная динамика генерации  $O_2^-$  в последствии обработки (рис. 1 Б). Максимальная скорость генерации супероксидного анион-радикала наблюдалась спустя 2 суток после обработки, после чего начинала снижаться. Однако различия по генерации  $O_2^-$  между сроками после обработки зачастую были не достоверными. Кроме того, у пшеницы, обработанной Гранстаром, не выявлено достоверных различий между разными концентрациями препарата, особенно спустя 2 и 3 сут после обработки.

При исследовании динамики генерации  $O_2^-$  в листьях озимой ржи, обработанных различными концентрациями гербицидов, показано, что в контроле уровень АФК в течении трёх дней измерений практически не изменялся (рис. 2). После обработки малыми дозами гербицида Топик спустя 1 сут уровень  $O_2^-$  оставался практически на уровне контроля, но резко повысился на 2-й и 3-й дни измерения (рис. 2 А). При максимальной концентрации гербицида (10 мкл/л) уровень АФК резко увеличился уже на 1-й день после обработки и

оставался на таком же повышенном уровне в течение последующих дней измерения.

Обработка растений озимой ржи гербицидом Гранстар показала возрастание (в два раза относительно контроля) скорости генерации  $O_2^-$  в первый день после опрыскивания лишь при концентрации 300 мкг/л (рис. 2 Б). На второй день после обработки наблюдали усиление генерации  $O_2^-$  при всех использованных концентрациях. К третьему дню происходило снижение продукции АФК (кроме дозы 300 мкг/л).

На молодых растениях кукурузы в контроле скорость генерации супероксидного анион-радикала слегка снижалась в динамике экспозиции (рис. 3). После обработки различными концентрациями гербицида Топик образование  $O_2^-$  значительно увеличивалось (рис. 3 А). При этом в динамике последствия препарата на уровень АФК отмечено малое изменение. Сравнение разных концентраций препарата показало, что чаще наблюдалась повышенная генерация  $O_2^-$  при более высоких дозах Топика.

Действие гербицида Гранстар на растения кукурузы было несколько иным (рис. 3 Б). Здесь

наблюдали наиболее значительное увеличение уровня АФК спустя 1 сут после обработки, после чего происходило прогрессирующее снижение генерации  $O_2^-$  (кроме самой высокой концентрации препарата). По-видимому, в данном варианте опыта мы видим репарацию повреждений, свидетельствующую о повышенной активности антиоксидантной системы растений кукурузы.

Сравнение последствий препаратов Топик и Гранстар показало, что у озимой пшеницы и кукурузы возрастание уровня АФК было примерно одинаковым в результате обработки обоими гербицидами, тогда как у озимой ржи сильнее выражены эффекты препарата Гранстар.

Таким образом, проведённые исследования показали, что обработка злаков гербицидами, относящимися к разным классам, привела к резкому усилению генерации  $O_2^-$  в клетках листьев как при остром (от 1 до 3 ч), так и при хроническом действии. Наиболее устойчивыми к кратковременному действию гербицидов оказались растения озимой ржи, более способными к репарации повреждений – проростки кукурузы и озимой ржи. Повышение дозы препаратов почти всегда стимулировало более выраженную генерацию АФК, хотя зависимость иногда была нелинейной.

*Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки РФ (АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы», проект 2.1.1/624).*

### Литература

1. Юрин В. М. Ксенобиотики и живые системы. Минск: Изд. Центр БГУ. 2008. 181 с.
2. Пескин А. В., Столяров С. Д. Окислительный стресс как критерий оценки окружающей среды // Известия РАН. Сер. биол. наук, 1994. № 4. С. 588–595.
3. Полесская О. Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: КДУ. 2007. 140 с.
4. Hassan N.M., Alla M.M.N. Oxidative Stress in Herbicide-Treated Broad Bean and Maize Plants // Acta Physiol. Plant. 2005. V. 27. P. 429–438.
5. Miteva L., Tsoneva J., Ivanov S., Alexieva V. Alterations of the Content of Hydrogen Peroxide and Malondialdehyde and the Activity of Some Antioxidant Enzymes in the Roots and Leaves of Pea and Wheat Plants Exposed to Glyphosate // Compt. R. Acad. Bulg. Sci. 2005. V. 58. P. 733–738.
6. Митева Л.П.–Е., Иванов С.В., Алексиева В.С. Изменение пула глутатиона и некоторых ферментов его метаболизма в листьях и корнях растений гороха, обработанных гербицидом глифосатом // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 139–145.
7. Nakamura A., Ohori Y., Watanabe K., Sato Y., Boger P., Wakabayashi K. Peroxidative Formation of Lipid Hydroperoxides in Etiolated Leaves // Pest. Biochem. Physiol. 2000. V. 66. P. 206–212.
8. Jung S. Expression Level of Specific Isozymes of Maize Catalase Mutants Influences Other Antioxidants on Norflurazon-Induced Oxidative Stress // Pest. Biochem. Physiol. 2003. V. 75. P. 9–17.
9. Иванов С.В., Алексиева В.С., Каранов Е.Н. Кумулятивный эффект низкой и высокой концентрации атразина на растения *Arabidopsis thaliana* // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 243–249.
10. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 1. Образование активированных форм кислорода при охлаждении растений // Физиология растений. 2002. Т. 49. С. 697–702.
11. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Физиология растений. 1989. Т. 6. С. 1–168.