Российская академия наук
Уральское отделение
Коми научный центр

НАУЧНЫЕ ДОКЛАДЫ

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

РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ НА ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЙ КСЕНОБИОТИК – МЕТИЛФОСФОНОВУЮ КИСЛОТУ

СЫКТЫВКАР 2004

Российская академия наук
Уральское отделение
Коми научный центр

Научные доклады
Выпуск 464

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

РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ НА ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЙ КСЕНОБИОТИК – МЕТИЛФОСФОНОВУЮ КИСЛОТУ

Доклад на заседании президиума
Коми научного центра УрО
Российской академии наук

Сыктывкар 2004

УДК 504.73.054

С.Ю. Огородникова, Т.К. Головко, Т.Я. Ашихмина. **РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ НА ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЙ КСЕНОБИОТИК – МЕТИЛФОСФОНОВУЮ КИСЛОТУ**. – Сыктывкар, 2004. – 24 с. (Научные доклады / Коми научный центр УрО Российской академии наук; Вып. 464).

В работе представлены экспериментальные данные о системном действии метилфосфоновой кислоты (МФК) в низких концентрациях на физиологические процессы в растениях. Впервые показаны изменения роста и развития, дыхательной активности, водного режима, содержания пигментов, состояния антиоксидантной системы растений. Корни сильнее реагировали на действие МФК, чем побеги. Среди исследованных видов растений наибольшую чувствительность к МФК проявляли бобовые.

S.Yu. Ogorodnikova, T.K. Golovko, T.Ya. Ashihmina. **PLANTS RESPONSES TO PHOSPHORORGANIC XENOBIOTIC – METHYLPHOSPHONIC ACID**. – Syktyvkar, 2004. – 24 p. (Scientific reports / Komi Science Centre, Ural Division, Russian Academy of Sciences, Issue 464).

The data on influence on plants of methylphosphonic acid (MPA) – product of degradation phosphororganic substances (chemical weapons, herbicides, ect.) are presented. It was shown that MPA, applied in low concentrations (<0.1 mol/l), effects on plant growth and development, pigment complex, rates of respiration and transpiration. In comparison with shoots roots were more sensitive to MPA. The metabolic changes observed in plants and mechanisms of MPA influence are discussed.

Редакционная коллегия

М.П. Рощевский (отв. редактор), В.А. Голдин (зам. отв. редактора), Н.В. Ладанова (отв. секретарь), В.А. Головко, Н.А. Громов, А.В. Кучин, В.Н. Лаженцев, Н.А. Манов, Ю.С. Оводов, Э.А. Савельева, А.Ф. Сметанин, А.И. Таскаев, Н.П. Юшкин

Рецензенты

д.б.н., проф. А.М. Маркаров, к.б.н. Т.И. Евсеева

© С.Ю. Огородникова, Т.К. Головко, Т.Я. Ашихмина, 2004

© Коми научный центр УрО РАН, 2004

1. ВВЕДЕНИЕ

В России и за рубежом наработано большое количество химического оружия, и перед мировым сообществом стоит проблема его уничтожения. На территории России – в Саратовской, Курганской, Кировской, Брянской, Пензенской областях и Республике Удмуртия – хранится около 40 тыс. т отравляющих веществ [2]. В соответствии с принятой в Париже в 1993 г. и ратифицированной Россией в ноябре 1997 г. «Конвенцией о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и его уничтожении» в нескольких регионах РФ запланировано строительство объектов по уничтожению химического оружия [5, 14]. Одним из таких является Кировская область, где сосредоточено 17.4% от общего запаса химического оружия России [3]. Большая его часть – это фосфорсодержащие отравляющие вещества (зарин, зоман и Vx газы), оказывающие нервно-паралитическое действие на млекопитающих вследствие ингибирования фермента холинэстеразы.

Попадая в окружающую среду, фосфорсодержащие отравляющие вещества подвергаются трансформации. При разложении зарина и зомана образуются изопропиловый и пинаколиловый эфиры метилфосфоновой кислоты. Их дальнейший гидролиз приводит к образованию метилфосфоновой кислоты (МФК) [1, 20]. МФК устойчива в природных условиях и сохраняется в почве десятилетиями [8]. Она мало токсична для млекопитающих и водных микроорганизмов [15]. Действие МФК на растительность практически не изучено. Однако растения, как основной компонент экосистем, будут в первую очередь подвержены влиянию продуктов трансформации фосфорсодержащих отравляющих веществ в случае аварийных ситуаций и/или при работе объектов по уничтожению химического оружия.

Известно, что производные метилфосфоновой кислоты, например близкий по структуре глифосат (N-фосфонометилглицин), проявляет гербицидную активность. Первичный молекулярный механизм его действия заключается в ингибировании ключевого фермента биосинтеза ароматических

аминокислот – 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазы [19]. Глифосат угнетает биосинтез предшественника хлорофилла – 5-аминолевулиновой кислоты и ускоряет окислительную деградацию индолилуксусной кислоты (ИУК). Для уничтожения сорной растительности используют глифосат в концентрациях 0.01-0.02 моль/л. Однако известно, что и более низкие концентрации, на порядок меньше рекомендуемой, оказывают влияние на гормональный статус растений [7]. Поэтому можно ожидать, что продукты трансформации фосфорсодержащих отравляющих веществ, попадая в окружающую среду в низких концентрациях, также будут оказывать действие на растения.

Цель работы – изучение эффектов метилфосфоновой кислоты – продукта деструкции фосфорсодержащих отравляющих веществ на жизнедеятельность растений. Для этого следовало выявить влияние метилфосфоновой кислоты на рост и накопление биомассы, а также охарактеризовать изменения метаболизма растений под воздействием метилфосфоната на основе изучения дыхательного газообмена, скорости тепловыделения, состояния пигментного комплекса, активности пероксидазы и перекисного окисления липидов.

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в лабораторных и полевых условиях. В качестве тест-объектов использовали культурные и дикорастущие виды растений: ячмень (*Hordeum distichum* L.) сорта Новичок, пелюшку (*Pisum arvense* L.) сорта Надежда, клевер ползучий (*Amoria repens* L.), подорожник большой (*Plantago major* L.), одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Wigg.), чину луговую (*Lathyrus pratensis* L.), горошек мышиный (*Vicia cracca* L.), бодяк полевой (*Cirsium arvense* (L.) Scop.), лютик едкий (*Ranunculus acris* L.).

Для работы применяли метилфосфоновую кислоту фирмы Lancaster (Англия), содержащую 98% действующего вещества, из которой были приготовлены растворы разной концентрации.

В вегетационных опытах изучали действие МФК на прорастание семян и проростки ячменя и пелюшки. Опыты проводили в климатической камере ВКШ-0.6 (Россия). Условия в камере: фотопериод 16 ч, интенсивность фотосинтетически активной радиации 200 мкмоль/м^2·с (45 Вт/м^2), относительная влажность воздуха 60-70%, температура (день/ночь) 21/18 °С. Проростки ячменя и пелюшки выращивали на дистиллированной воде, содержащей разные концентрации метилфосфоновой кислоты: $5\cdot10^{-5}$, $5\cdot10^{-4}$, $5\cdot10^{-3}$, 0.01 моль/л. Первую серию опытов выполняли при добавлении МФК, что приводило к сильному закислению среды (pH 2.4-3.1). Вторую – проводили с МФК в присутствии цитратного буфера (pH 4.6-5).

В другом вегетационном опыте изучали влияние обработки МФК на растения ячменя в фазе 3-4 листьев. Семена проращивали на фильтровальной бумаге в течение четырех суток в термостате при температуре 25 °С. На пятый день проростки переносили в климатическую камеру на питательный раствор [25], который постоянно аэрировали и поддерживали pH в интервале 5.8-6.8. Растения опрыскивали растворами МФК ($5\cdot10^{-4}$, 0.01 моль/л), содержащими цитратный буфер (pH 4).

Полевые опыты проводили (2003 г.) на экспериментальном участке Института биологии Коми НЦ УрО РАН вблизи г. Сыктывкар. Вегетационный период был сравнительно теплым: средняя температура за июнь-август составляла 15.7 °С, сумма осадков – 258 мм. Растения ячменя и пелюшки выращивали на делянках площадью 1 м^2 в четырехкратной повторности. Семена высевали вручную рядовым способом. Растения обрабатывали МФК однократно путем опрыскивания до полного смачивания надземной части. Ячмень обрабатывали в фазе трех листьев, пелюшку – в фазе всходов.

Для изучения реакции видов природной флоры на действие МФК были выбраны участки злаково-разнотравного луга площадью 1 м^2. На них проведено опрыскивание травостоя МФК 0.1 моль/л. Участки с преобладанием клевера ползучего и подорожника большого обрабатывали МФК в

концентрациях 0.01, 0.05, 0.1 моль/л. Действие метилфосфоновой кислоты изучали на сходных по развитию растениях (фаза цветения), с опытных площадок отбирали 10-15 растений каждого вида.

Определение энергии прорастания проводили в течение трех суток после выдерживания семян на растворах МФК разной концентрации. Семена проращивали в термостате при t 25 °С.

Для изучения влияния МФК на ростовые процессы и накопление биомассы отбирали по 30 растений каждого варианта. Растения разделяли по органам, измеряли длину побегов и корней. Растительный материал взвешивали, фиксировали при t 105 °С и высушивали до постоянного веса при t 70 °С.

Дыхание измеряли манометрическим методом на аппарате Варбурга в трех-четырехкратной повторности при t 20 °С [16]. Для определения дыхания использовали корни и листья с 5-10 растений.

Активность перекисного окисления липидов оценивали по накоплению в тканях одного из конечных продуктов этого процесса – малонового диальдегида (МДА). Содержание МДА определяли спектрофотометрически на СФ-46 [10] в трехкратной повторности.

Активность пероксидазы определяли по Михлину [6].

Интенсивность транспирации изучали весовым методом по потере воды навеской растительного материала массой 100-300 мг [17]. Повторность измерений – шестикратная.

Скорость выделения тепла различных частей растений измеряли на микрокалориметре «Биотест-2» (ИБП, Пущино, Россия), расчет данных проводили согласно методике [21].

Состояние пигментного комплекса оценивали у физиологически развитых, закончивших рост листьев. Пробы листьев отбирали с 10-15 растений каждого варианта. Содержание пигментов определяли спектрофотометрически в трех-четырехкратной повторности [22].

Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов [9]. Использовали па-

кеты прикладных программ Microsoft Office для персонального компьютера. На рисунках и таблицах приведены средние арифметические величины со стандартной ошибкой.

3. ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН, РОСТ И РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ ОДНО- И ДВУДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ В ПРИСУТСТВИИ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Прорастание семян включает несколько этапов: набухание, проклевывание, гетеротрофный рост проростка и переход к автотрофному способу питания [12]. Набухание осуществляется благодаря повышению проницаемости семенных покровов и гидратации коллоидов внутри семени. В период набухания происходит активное поглощение воды и растворенных в ней веществ. При достижении критической влажности (40-60% от сырой массы) через разорванные семенные покровы появляется зародышевый корень (проклевывание). Начальный рост проростка осуществляется за счет запасов питательных элементов семени. На свету включаются процессы фотоморфогенеза, проростки зеленеют и приобретают способность к автотрофному питанию. Интенсивные клеточные деления и образование структур сопровождаются значительным потреблением энергии и органического субстрата, что обеспечивается за счет высокого уровня метаболизма. В фазе проростка молодой растительный организм весьма чувствителен к воздействию неблагоприятных факторов. Поэтому проростки считаются хорошими тест-объектами.

Мы исследовали прорастание семян ячменя и пелюшки в лабораторных условиях. Как показали опыты, МФК в концентрациях $5 \cdot 10^{-5}$-0.01 моль/л не оказывала существенного влияния на проклевывание семян ячменя. Семена пелюшки также характеризовались высокой энергией прорастания, количество проросших семян за трое суток составило 95-97%. Прорастание семян игнибировалось в присутствии более высокой концентрации МФК, 0.1 моль/л, что может быть следствием сильного закисления среды (pH 2).

Чтобы разделить эффект закисления и МФК, в следующем опыте проростки выращивали в присутствии МФК с добавлением буфера. Выявлено, что добавка МФК вызывала нарушение линейного роста (табл. 1, 2). Высота опытных растений ячменя и пелюшки была в 1.1-1.5 раза меньше контроля (рис. 1, 2). Под действием МФК $5 \cdot 10^{-3}$ и 0.01 моль/л отмечали достоверное ингибирование роста и развития корневой системы. Длина корней ячменя составляла 30-65% от контроля, пелюшки – 10-20%. Угнетение ростовых процессов происходило независимо от pH среды, что свидетельствует о токсическом действии МФК. Присутствие МФК в среде выращивания приводило к снижению накопления биомассы. Масса опытных растений ячменя была меньше контрольных на 16-40%. Сильнее (в 1.3-1.6 раза) снижалась биомасса проростков пелюшки, что указывает на большую чувствительность к МФК бобовых растений по сравнению со злаками. В результате сильного ингибирования корневой системы под действием $5 \cdot 10^{-3}$ и 0.01 моль/л МФК происходило перераспределение биомассы и сосредоточение ее в надземных органах. В присутствии МФК соотношение корни/побеги у опытных растений пелюшки снижалось до 0.3 по сравнению с 0.7 в контроле.

Наличие метилфосфоновой кислоты в среде выращивания приводило к изменениям в пигментном комплексе лис-

Таблица 1

Влияние метилфосфоновой кислоты на рост и накопление биомассы проростков ячменя

Вариант	Длина, см		Сухая биомасса, мг/растение	
	побег	корень	побег	корень
Контроль	8.89±0.75	6.59±0.77	8.07±0.99	11.33±1.14
$5 \cdot 10^{-5}$	6.67±0.62*	6.33±0.85	6.53±1.33	9.53±0.42
$5 \cdot 10^{-4}$	6.85±0.67*	6.18±0.69	6.67±0.31	9.53±2.0
$5 \cdot 10^{-3}$	7.75±0.62	3.41±0.55*	7.67±0.12	5.6±0.35*
0.01	6.7±0.71*	2.58±0.56*	6.33±0.31	5.67±0.12*

* Здесь и далее разница между опытом и контролем достоверна при $P \leq 0.05$.

Таблица 2

Влияние метилфосфоновой кислоты с буфером на рост и накопление биомассы проростков ячменя

Вариант	Длина, см		Сухая биомасса, мг/растение	
	побег	корень	побег	корень
Контроль	11.76±0.88	7.33±0.88	12.0±1.56	13.70±1.10
$5 \cdot 10^{-5}$	8.14±0.66*	7.04±0.68	9.93±0.23	10.93±0.81*
$5 \cdot 10^{-4}$	9.14±0.99*	6.77±0.73	10.21±0.53	10.50±0.55*
$5 \cdot 10^{-3}$	8.26±0.92*	4.81±0.77*	10.10±0.76	9.19±0.80*
0.01	7.11±0.84*	2.20±0.43*	9.13±0.42	4.40±0.59*

тьев пелюшки (рис. 3). Влияние кислоты проявилось в снижении содержания зеленых пигментов и каротиноидов. Так, при действии низкой концентрации МФК $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л уменьшение количества хлорофиллов *а* и *б* составило 10 и 22% соответственно, а в присутствии МФК 0.01 моль/л –

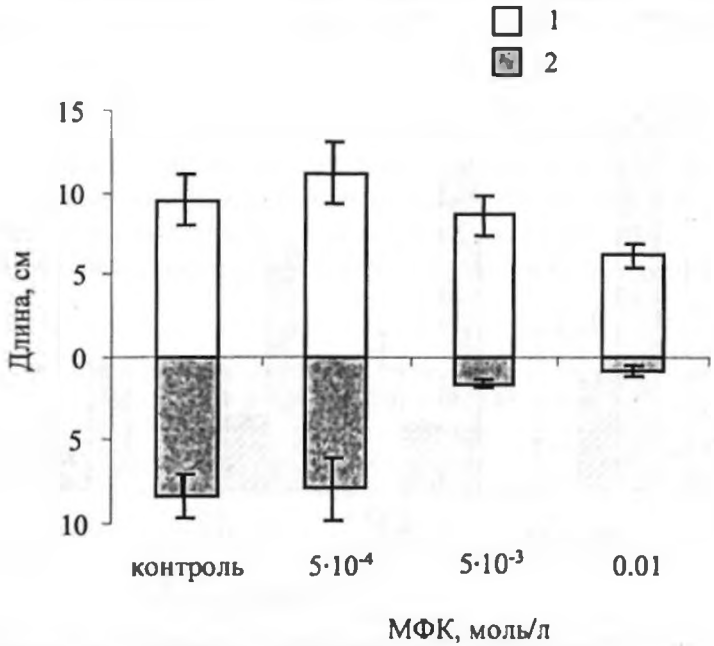

Рис. 1. Действие метилфосфоновой кислоты (pH 2.4-3.1) на рост проростков пелюшки. 1 – побег, 2 – корень.

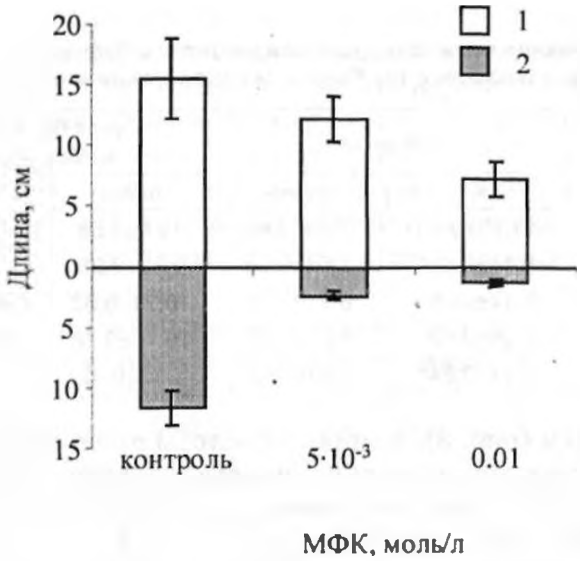

Рис. 2. Действие метилфосфоновой кислоты с буфером (pH 4.6-5) на рост проростков пелюшки. 1 – побег, 2 – корень.

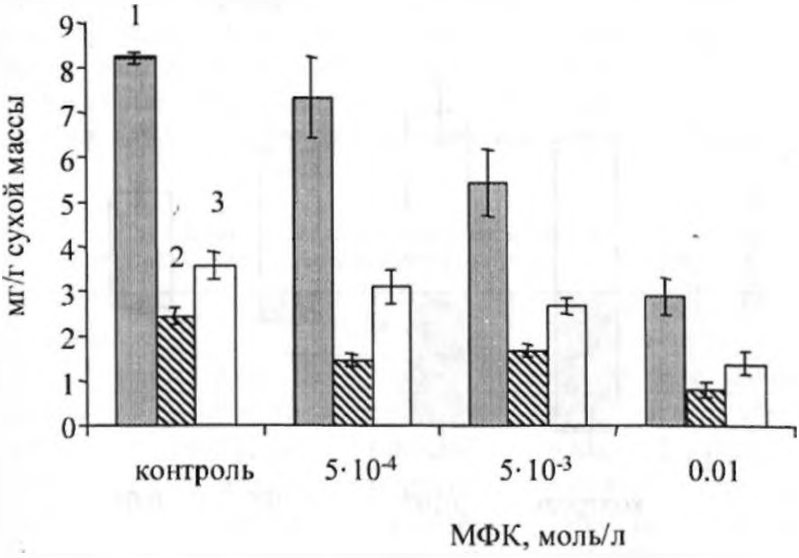

Рис. 3. Влияние метилфосфоновой кислоты с буфером на содержание пигментов в листьях пелюшки. 1 – хлорофилл *а*, 2 – хлорофилл *б*, 3 – каротиноиды.

65% по сравнению с контролем. Соотношение хлорофиллов отличалось стабильностью, и было близко к величине, характерной для контрольных растений. Под действием МФК снижался и уровень накопления каротиноидов. Изменения в содержании пигментов опытных растений, по-видимому, связаны с ингибированием процессов их биосинтеза под действием МФК.

Метилфосфоновая кислота вызывала нарушение энергопластического обмена растений, что проявлялось в изменении дыхательной активности и скорости тепловыделения. Скорость дыхания является хорошим показателем метаболической активности и ее изменений под действием стрессоров [4]. Установлено, что МФК в концентрациях $5 \cdot 10^{-4}$-0.01 моль/л без добавления буфера приводила к значительному усилению дыхания корней 6-дневных растений ячменя (табл. 3). Происходило увеличение скорости тепловыделения тканей опытных растений. Усиление дыхательной активности под действием МФК $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, вероятно, связано с возрастанием затрат энергии на процессы репарации. МФК в концентрациях $5 \cdot 10^{-3}$ и 0.01 моль/л, наоборот, вызывала повреждение клеток и преобладание катаболических процессов, связанных с рассеиванием энергии, что согласуется с данными по тепловыделению и дыханию.

Таким образом, проведенные опыты показали, что МФК в низких концентрациях оказывает влияние на рост, накопление биомассы, дыхание и тепловыделение проростков

Таблица 3

Дыхание и тепловыделение 6-дневных проростков ячменя под действием метилфосфоновой кислоты

Вариант	Дыхание, мкл O_2/г сух. мас.·ч		Тепловыделение, мкВт/г сух. мас.	
	лист	корень	лист	корень
Контроль	3077±97	1745±363	6.93±0.96	3.82±0.63
$5 \cdot 10^{-5}$	3415±245	1682±351	10.06±0.71*	7.81±0.40*
$5 \cdot 10^{-4}$	3610±386	2371±33	11.33±0.61*	6.22±0.42*
$5 \cdot 10^{-3}$	3309±141	2794±95*	5.47±1.51	11.91±2.65*
0.01	3096±537	2353±286	12.56±1.13*	8.02±0.42*

ячменя и пелюшки. По сравнению с МФК эффект МФК с буфером, обеспечивающим поддержание pH среды в пределах 4.6-5, был выражен несколько слабее. Корневая система растений более восприимчива к действию МФК, чем побеги.

4. ВЛИЯНИЕ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА РОСТ И НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ РАСТЕНИЙ В КОНТРОЛИРУЕМЫХ И ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

Рост растений является интегральным процессом и одним из основных потребителей вещества и энергии. Действие стрессоров на растения вызывает перестройку метаболизма, характеризующуюся ингибированием энергоемких анаболических процессов, что, как правило, приводит к торможению роста [23].

Выявлено, что метилфосфоновая кислота влияет на рост и развитие растений, и степень ее воздействия зависит от концентрации. Нарушения прослеживаются по различным параметрам: уменьшаются сырая масса, накопление сухого вещества, снижается высота опытных растений, тормозится рост корня.

Опыты с ячменем в контролируемых условиях показали, что 0.01 моль/л МФК оказывает заметное действие на линейный рост органов, особенно корней (табл. 4). Установлено, что после обработки МФК происходило сначала замедление роста корней, а затем его прекращение.

Исследования в контролируемых условиях выявили, что под действием 0.01 моль/л МФК снижалась скорость накопления биомассы. На пятый день после обработки скорость роста опытных растений составляла 0.109 г/г сут, у контрольных – эта величина была выше (0.14 г/г сут). В итоге через две недели масса ячменя, обработанного кислотой, была в 3.4 раза меньше контроля и составляла 136 мг/растение. Полевые опыты подтвердили чувствительность ячменя к действию метилфосфоновой кислоты (рис. 4). Скорость накопления биомассы снижалась под действием 0.01 и 0.1 моль/л МФК.

Таблица 4

Влияние метилфосфоновой кислоты на рост и накопление биомассы ячменя в контролируемых условиях

Дни после обработки	Контроль		МФК, моль/л			
			$5 \cdot 10^{-4}$		0.01	
	побег	корень	побег	корень	побег	корень
			Длина, см			
5	45.4±2.8	27.9±2.6	47.0±3.2	31.6±4.2	40.7±1.8	23.6±3.5
9	51.6±3.0	29.5±3.8	48.2±3.7	32±5.0	42.0±3.6	22.4±2.7
13	53.7±3.2	29.5±4.2	51.8±2.9	32.5±4.2	41.5±3*	17.4±2.5*
			Сухая биомасса, мг/растение			
5	160.3±26.4	47.1±2.9	177.0±18.6	47.0±1.3	104.9±21.7	29.0±2.9*
9	283.7±45.6	51.8±11.7	287.7±40.2	54.7±10.1	104.0±17.0*	21.9±3.1*
13	384.3±64.2	65.7±12.8	367.7±79.9	61.2±13.7	115.8±39.1*	19.5±1.9*

Обработка метилфосфоновой кислотой вызывала прекращение накопления биомассы как надземными органами, так и корневой системой. Это указывает на то, что МФК обладает системным действием, хорошо поглощается листовой поверхностью, слабо метаболизируется и транспортируется в корни.

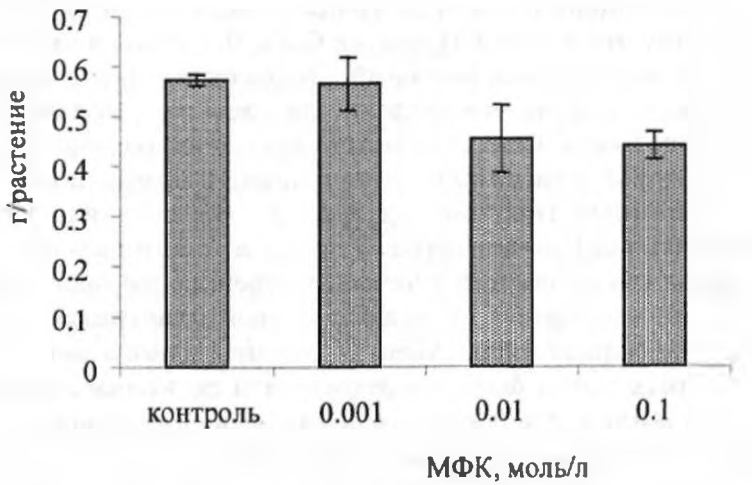

Рис. 4. Биомасса ячменя в полевых условиях под влиянием обработки метилфосфоновой кислотой.

5. ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РАСТЕНИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Известно, что в ответ на различные стрессоры в растениях индуцируются физиологические процессы, способствующие их адаптации к неблагоприятным условиям. К числу наиболее значимых неспецифических изменений можно отнести повышение содержания свободных радикалов, усиление катаболизма липидов и биополимеров, накопление пролина и полиаминов, торможение фотосинтеза, усиление дыхания, изменения в углеродном метаболизме (ингибирование биосинтеза высокополимерных соединений и усиление включения углерода в низкомолекулярные вещества) [4, 13, 18].

Проведенные исследования показали, что метилфосфоновая кислота вызывает нарушения жизнедеятельности растений, которые проявляются на разных уровнях: изменение активности ферментов, нарушение процессов, обеспечивающих энергией растительный организм и, в конечном итоге, ингибирование роста и развития растений.

Выявлено, что реакция растений на действие МФК зависит от анатомо-морфологических особенностей, способности к поглощению и концентрации кислоты. Метилфосфоновая кислота в концентрациях 0.05, 0.1 моль/л вызывала повреждение листьев растений. Через сутки после обработки у злаков отмечали появление на листьях небольших пятен белого цвета. Сильнее были повреждены растения с тонкой листовой пластинкой – пелюшка, клевер, чина луговая, мышиный горошек, одуванчик. На листьях клевера появились некрозные пятна. У чины и мышиного горошка происходило снижение тургора, повреждения были сосредоточены в основном по краю листовой пластинки, происходила деформация листьев. У лютика едкого некрозы в виде бурых пятен были сосредоточены по краям листа и в области жилок, где после опрыскивания скапливалась кислота. Наблюдали появление небольших белых и бурых пятен по всей листовой поверхности одуванчика. Листья в местах поражения засыхали. Образование некрозов после

обработки мы связываем с действием сильно кислого раствора МФК (pH 2).

Повреждения растений сопровождались нарушениями в пигментном комплексе листьев (табл. 5). Реакция пигментного фонда зависела от вида растений и концентрации кислоты. Выявлено, что бобовые (клевер ползучий, пелюшка) более чувствительны к действию МФК по сравнению со злаками. Значительные изменения в пигментном фонде вызывала МФК в концентрации 0.1 моль/л. У опытных растений уменьшались содержание пигментов и их соотношение, главным образом за счет снижения уровня хлорофилла *а* и каротиноидов в 1.2-1.4 и 1.2-1.3 раза соответ-

Таблица 5

Влияние метилфосфоновой кислоты на содержание пигментов в листьях

Вариант	Содержание пигментов, мг/г сухой массы			Хлорофилл *а/б*	Хлорофиллы / Каротиноиды
	Хлорофилл *а*	Хлорофилл *б*	Каротиноиды		
			Подорожник большой		
Контроль	3.72±0.48	1.24±0.21	1.81±0.22	3.0	2.74
0.01	4.03±0.49	1.31±0.12	1.82±0.29	3.08	2.95
0.05	3.90±0.68	1.61±0.10	1.81±0.25	2.42	3.04
0.1	2.51±0.13*	1.14±0.21	1.19±0.05*	2.20	3.07
			Клевер ползучий		
Контроль	6.51±0.57	2.03±0.16	2.62±0.15	3.21	3.26
0.01	5.43±0.52	1.77±0.35	2.62±0.13	3.07	2.75
0.05	4.90±0.29*	1.67±0.17	2.54±0.19	2.93	2.59
0.1	3.57±0.01*	1.48±0.21*	2.12±0.24	2.41	2.38
			Пелюшка		
Контроль	3.38±0.33	0.75±0.03	2.07±0.01	4.51	2.0
0.001	4.0±0.09*	1.09±0.12*	2.38±0.19	3.67	2.14
0.01	3.27±0.26	0.79±0.04	1.83±0.02*	4.14	2.22
0.1	2.74±0.23*	0.59±0.07*	1.55±0.17*	4.64	2.15
			Ячмень		
Контроль	5.52±0.13	1.06±0.13	2.56±0.21	5.21	2.57
0.001	4.21±0.17*	1.0±0.07	2.22±0.34	4.21	2.35
0.01	4.74±0.21*	0.96±0.06	2.33±0.11	4.94	2.45
0.1	4.67±0.44	1.09±0.10	2.29±0.07	4.28	2.51

ственно. Хлорофилл *б*, входящий в светособирающий комплекс, более устойчив к действию МФК. Только у пелюшки и клевера, листья которых были сильно повреждены, происходило достоверное снижение содержания хлорофилла *б*. Изменения в пигментной системе опытных растений, по-видимому, связаны с деструкцией (окислением) молекул пигментов и ингибированием процессов их биосинтеза под действием МФК.

Под влиянием метилфосфоновой кислоты изменялась дыхательная активность растений. МФК в концентрациях 0.05 и 0.1 моль/л вызывала активацию дыхательного газообмена в листьях клевера, одуванчика, лютика, бодяка. Достоверно возрастало дыхание корней и листьев подорожника (рис. 5). У пелюшки корневая система более чувствительна к действию кислоты (табл. 6). Через неделю после обработки МФК дыхательная активность была выше в 1.3-1.7 раза. Усиление дыхания коррелировало с интенсивностью тепловыделения корней (r = 0.86). Дыхание и скорость тепловыделения являются интегральными показателями,

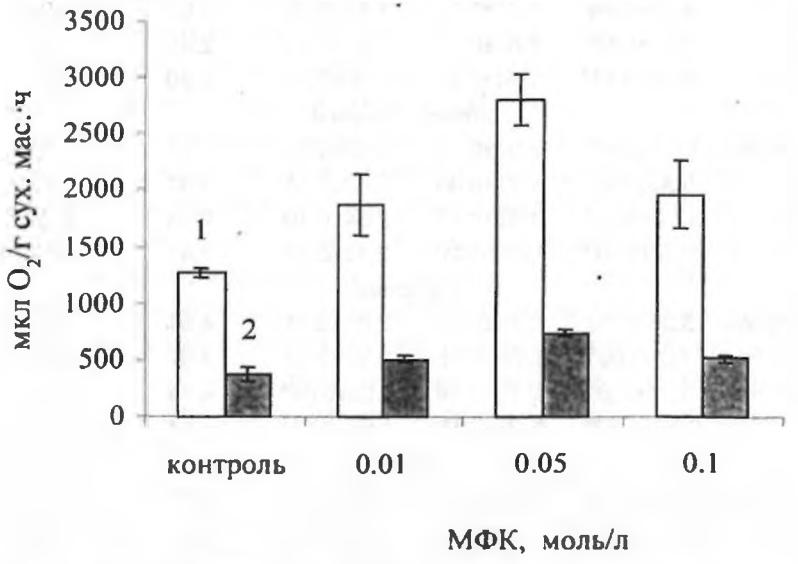

Рис. 5. Дыхательная активность подорожника после обработки метилфосфоновой кислотой. 1 – лист, 2 – корень.

Таблица 6

Дыхательная активность и тепловыделение пелюшки под влиянием обработки метилфосфоновой кислотой

Вариант	Контроль	МФК, моль/л		
		0.001	0.01	0.1
	Дыхание, мкл O_2/ г сух. мас.·ч			
Лист	2995±282	2246±22*	2443±201	3111±137
Корень	1771±231	2436±220*	2215±214	3053±326*
	Тепловыделение, мкВт/мг сух. мас.			
Лист	13.74±4.03	14.04±3.29	11.49±2.64	12.17±0.66
Корень	11.25±1.38	19.17±3.19*	16.27±2.68*	19.02±2.98*

характеризующими эффективность использования энергии, и связаны с работой всего организма. Поэтому возрастание дыхательной активности и тепловыделения корней свидетельствует об активизации обменных процессов, направленных на поддержание структурно-функциональной целостности и репарацию повреждений [4]. У ячменя, напротив, отмечали угнетение дыхания (рис. 6). В большей степени уменьшалось потребление кислорода корнями опытных растений. Листья менее восприимчивы к действию МФК.

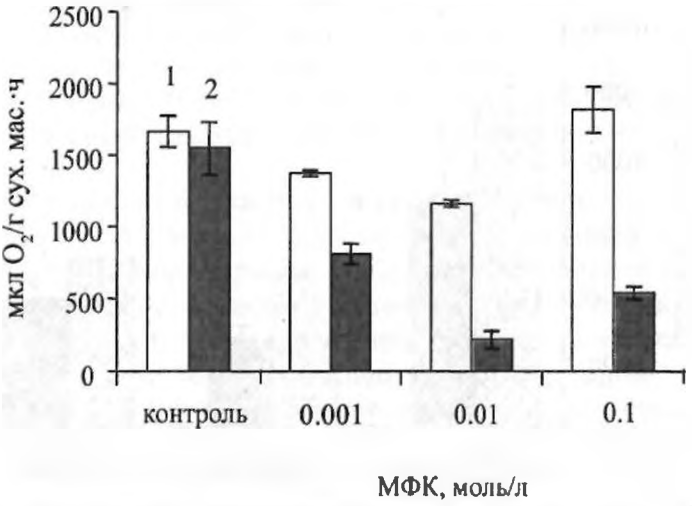

Рис. 6. Изменение дыхания ячменя под действием метилфосфоновой кислоты. 1 – лист, 2 – корень.

Помимо влияния на процессы, обеспечивающие энергией растительный организм, МФК вызывала нарушение других жизненно важных функций. После обработки отмечали изменение водного режима растений. Снижалась оводненность листьев опытных растений в среднем на 5%. Специфику водного обмена растений наиболее полно отражает транспирация, как более лабильный физиологический процесс. Установлено, что через сутки после обработки МФК интенсивность водоотдачи листьев подорожника, одуванчика и бодяка снижалась более чем на 25% (рис. 7). Скорость водоотдачи листьев клевера варьировала при действии МФК, однако достоверных изменений транспирации опытных растений не отмечено. Снижение интенсивности транспирации, по-видимому, связано с адаптацией растений к действию метилфосфоновой кислоты, которая была направлена на более экономное расходование воды.

Известно, что многие стрессоры индуцируют образование активных форм кислорода, которые вызывают повреждение клеточных структур [10, 11, 13, 18, 23, 24]. Судя по наблюдаемым эффектам на фотосинтетический аппарат и дыхание, можно предположить, что МФК усиливает окис-

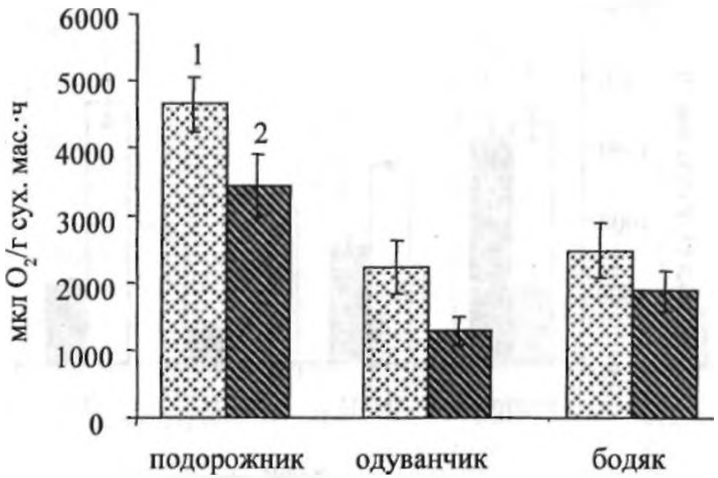

Рис. 7. Интенсивность транспирации листьев растений после обработки метилфосфоновой кислотой в концентрации 0.1 моль/л. 1 – контроль, 2 – опыт.

лительные процессы в тканях растений. Уровень окислительного стресса мы оценивали по активности антиоксидантного фермента пероксидазы и накоплению в тканях продукта окисления мембранных липидов малонового диальдегида (МДА).

Как видно из табл. 7, через два дня после обработки ячменя раствором МФК 0.1 моль/л отмечали повышение активности пероксидазы в корнях опытных растений, в дальнейшем происходило снижение величины этого показателя. В листьях активность пероксидазы возрастала на четвертый день после опрыскивания. У пелюшки активацию пероксидазы в листьях вызывали все испытуемые концентрации МФК. Можно полагать, что такие изменения активности пероксидазы носят адаптивный характер и направлены на снятие окислительного стресса.

Таблица 7

Изменение активности пероксидазы (мл J_2/г сырой массы) в растениях под действием разных концентраций метилфосфоновой кислоты

Вариант	Дни после обработки					
	второй		четвертый			
	Ячмень				Пелюшка	
	лист	корень	лист	корень	лист	корень
Контроль	3.15±0.49	15.77±0.5	4.87±0.5	13.76±0.86	7.74±1.05	33.08±1.0
0.001	не опр.	не опр.	9.46±1.49*	14.97±0.50	13.24±0.67*	37.38±0.86*
0.01	3.15±0.5	16.05±1.0	9.17±1*	11.18±0.86*	14.05±0.55*	33.88±1.34
0.1	3.72±0.49	20.93±1.3*	4.01±0.5	10.9±0.93*	17.08±0.40*	32.45±0.26

Определение уровня МДА в тканях растений показало, что обработка 0.1 моль/л МФК приводила к усилению перекисного окисления липидов (табл. 8). Достоверное возрастание уровня МДА в листьях отмечали у подорожника, одуванчика, лютика, бодяка и ячменя. Наряду с активацией перекисного окисления липидов в листьях, происходило накопление МДА в корнях растений. Так, на второй день после обработки 0.1 моль/л МФК содержание малонового диальдегида в корнях пелюшки было в 1.3 раза выше по сравнению с контролем и составляло 3.66 мкмоль/г сырой массы. У подорожника более низкие концентрации кисло-

Таблица 8

Содержание малонового диальдегида (мкмоль/г сырой м) в листьях растений после обработки метилфосфоновой кислотой, 0.1 моль/л

Вариант	Одуванчик	Лютик	Бодяк	Подорожник	Ячмень
Контроль	4±0.08	2.46±0.06	2.55±0.25	4.32±0.27	2.54±0.04
Опыт	5.53±0.43*	3.81±0.33*	3.48±0.42	7.27±0.33*	2.8±0.02*

ты вызывали достоверное возрастание уровня МДА. Накопление продуктов перекисного окисления липидов в тканях опытных растений под действием метилфосфоновой кислоты свидетельствует о возможном повреждении клеточных мембран.

Итак, нами выявлено, что метилфосфоновая кислота в сравнительно низких концентрациях оказывает существенное влияние на процессы жизнедеятельности растений. МФК вызывает повреждения листьев и приводит к нарушениям фотосинтетического аппарата. Помимо угнетения надземных органов МФК оказывает выраженные эффекты на корневую систему, что свидетельствует о ее системном действии. Под влиянием кислоты изменяется дыхательная активность растений, причем у большинства видов дыхание возрастает, у злаков, напротив, снижается, что, по-видимому, связано с особенностями метаболизма и инактивации МФК разными видами растений.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведено изучение влияния продукта трансформации фосфорсодержащих отравляющих веществ – метилфосфоновой кислоты на жизнедеятельность растений. При выполнении экспериментов в контролируемых условиях выявлены ответные реакции растений на действие метилфосфоновой кислоты, и в полевых опытах они были подтверждены. Полученные результаты свидетельствуют о том, что МФК в низких концентрациях (<0.1 моль/л) оказывает существенное влияние на рост и развитие растений.

Обработка растений метилфосфоновой кислотой в концентрации 0.05 и 0.1 моль/л вызывала видимые повреждения листьев, снижение оводненности тканей и интенсивности транспирации. Изменения в фотосинтетическом аппарате происходили под действием более низких концентраций и выражались в снижении содержания зеленых пигментов и каротиноидов. Под влиянием метилфосфоновой кислоты нарушалась дыхательная активность растений. Мы связываем усиление дыхания и скорости тепловыделения опытных растений с возрастанием энергетических затрат на процессы поддержания и репарацию повреждений. Обработка МФК индуцировала образование активных форм кислорода, о чем свидетельствуют данные по усилению активности пероксидазы и перекисного окисления липидов. Можно полагать, что действие низких концентраций МФК вызывает деградацию клеточных мембран.

Установлено, что корневая система растений более чувствительна к действию метилфосфоновой кислоты, независимо от способа обработки. Даже при однократном опрыскивании надземной части происходило ингибирование роста и нарушение функционирования корней, что свидетельствует о системном действии кислоты.

Сравнительное изучение реакций разных видов показало, что наиболее чувствительными к действию метилфосфоновой кислоты являются бобовые растения (пелюшка и клевер). Поэтому их можно использовать в качестве тест-объектов при проведении экологического мониторинга мест хранения и уничтожения фосфорсодержащих отравляющих веществ.

В целом, проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что метилфосфоновая кислота в низких концентрациях оказывает комплексное воздействие на растительный организм, вызывая изменение активности антиоксидантных ферментов, содержания и соотношения фотосинтетических пигментов, нарушение водного обмена, дыхательной активности и тепловыделения, что, в конечном итоге, приводит к угнетению ростовых процессов и снижению продуктивности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В.Н., Емельянов В.И. Отравляющие вещества. – М.: Военное издательство, 1990. – 320 с.

2. Ашихмина Т.Я. Комплексный экологический мониторинг объектов хранения и уничтожения химического оружия. – Киров: Вятка, 2002. – 544 с.

3. Белецкая И.П., Новиков С.С. Химическое оружие России: перспективы хранения и уничтожения // Химическое оружие. Экологические проблемы уничтожения. – М.: ВИНИТИ, 1997. – Вып. 1 – С. 65-75.

4. Головко Т.К. Дыхание растений (физиологические аспекты). – СПб.: Наука, 1999. – 204 с.

5. Грибов Е.Е., Зюков В.В., Кучинский Е.В., Петров С.В. и др. Проведение первоначальных международных инспекций на российских объектах по хранению химического оружия в рамках конвенции // Федеральные и региональные проблемы уничтожения химического оружия. – М.: ВИНИТИ, 2000. – Вып. 2. – С. 24-29.

6. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И., Мурри И.К. Методы биохимического исследования растений. – М.-Л.: Сельхозгиз, 1952. – 520 с.

7. Заякина О.В., Заякин В.В., Шевелуха В.С. Использование в модельных опытах глифосата как ингибитора биосинтеза ауксина в растениях // IV съезд Общества физиологов растений России: Тез. докл. – М., 1999. – Т. 2. – С. 649.

8. Кононова С.В., Несмеянова М.А. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами // Биохимия, 2002. – Т. 67. – № 2. – С. 220-233.

9. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1973. – 343 с.

10. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. – 208 с.

11. 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.

12. Обручева Н.В., Антипова О.В. Физиология инициации прорастания семян // Физиология растений, 1997. – Т. 44. – С. 287-302.

13. Пахомова В.М., Чернов И.А. Некоторые особенности индуктивной фазы неспецифического адаптационного синдрома растений // Известия РАН. Сер. биол., 1996. – № 6. – С. 705-716.

14. Петров С.В. Основные проблемы уничтожения химического оружия в Российской Федерации // Российский химический журнал, 1993. – Т. 37. – № 3. – С. 5-7.

15. Савельева Е.И., Зенкевич И.Г., Кузнецова Т.А. и др. Исследование продуктов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии // Российский химический журнал, 2002. – Т. 46. – № 6. – С. 82-91.

16. Семихатова О.А., Чулановская М.В. Манометрические методы изучения дыхания и фотосинтеза. – М.: Наука, 1965. – 168 с.

17. Сулейманов И.Г. Методика определения потери воды растением // Роль компонентов протоплазмы в водообмене растений. – Казань: Казанский университет, 1972. – С. 61-65.

18. Тарчевский И.А. Катаболизм и стресс у растений // 52-е Тимирязевское чтение. – М.: Наука, 1993. – 80 с.

19. Федке К. Биохимия и физиология действия гербицидов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 223 с.

20. Франке З. Химия отравляющих веществ. – М.: Химия, 1973. – Т. 1. – 440 с.

21. Хансен Л.Д., Тейлор Д.К., Смит Б.Н., Криддл Р.С. Связь между ростом растений и дыханием: экологические аспекты и отбор лучших сортов культурных растений // Физиология растений, 1996. – Т. 43. – № 6. – С. 805-812.

22. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С. 154-171.

23. Alexieva V., Ivanov S., Sergiev I., Karanov E. Interaction between stresses // Bulgarian Journal of Plant Physiology, 2003. Special Issue. – P. 1-17.

24. Asada K. Production and action of active oxygen in photosynthetic tissue. In: Foyer C.H., Mullineaux P.M., eds. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants. Boca Ration, FL: CRC Press, 1994. – P. 77-104.

25. Ingestad T. A definition of optimum nutrient requirements in birch seedlings // Physiologia Plantarum, 1971. – V. 24. – № 1. – P. 118-125.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Введение 3

2. Объекты и методы исследований 4

3. Прорастание семян, рост и развитие проростков одно- и двудольных растений в присутствии метилфосфоновой кислоты 7

4. Влияние метилфосфоновой кислоты на рост и накопление биомассы растений в контролируемых и полевых условиях 12

5. Изменение функциональных показателей растений под влиянием метилфосфоновой кислоты 14

6. Заключение 20

Литература 22

Светлана Юрьевна Огородникова

Реакции растений на фосфорорганический ксенобиотик – метилфосфоновую кислоту

Редактор Т.В. Цветкова
Оригинал-макет Е.А. Волкова

Лицензия № 0047 от 10.01.1999.

Компьютерный набор. Подписано в печать 01.11.2004.
Формат 60×90$^{1}/_{16}$. Бумага типографская № 1. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 1.25. Уч.-изд. л. 1.25. Тираж 120. Заказ № 51.

Издательство Коми научного центра УрО РАН.
167982, г. Сыктывкар, ул. Первомайская, 48.