

МЕМБРАННЫЕ ЭФФЕКТЫ ГЕРБИЦИДОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

А.И. Соколик, Е.А. Спивак, В.М. Юрин

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

С 1933 года, когда были впервые обнаружены гербицидные свойства у динитросоединений, химический метод борьбы с сорняками получил широкое распространение в сельском хозяйстве. В период с 1950 по 1960 г. г. был синтезирован ряд эффективных против сорных растений и нейтральных для определенных сельскохозяйственных культур гербицидов, а с 1970 года наступил период разработки гербицидов нового поколения, которые при невысокой норме расхода (от единиц до нескольких десятков граммов на гектар) проявляют высокую активность. Гербициды нового поколения постепенно начали вытеснять почвенные гербициды, однако их побочное действие на защищаемые растения остается относительно малоизученным [1, 2].

Химический метод борьбы с сорняками основан на избирательной эффективности различных химических соединений в отношении сорных и культурных растений. Селективность гербицидов довольно относительна, и они могут оказывать влияние как на сорные, так и на культурные растения, в посевах которых они применяются. Если культурное растение чувствительно к данному гербициду, возможны снижение и потери урожая, количественно определяющиеся степенью чувствительности.

Современные гербициды в основном применяются путем опрыскивания растений и действуют, проникая в растения через листья и стебли. В случае проникновения гербицида в почву мишенью его действия могут оказаться транспортные системы клеток корня. Побочными эффектами в обоих случаях может быть нарушение работы мембранных ион-транспортирующих механизмов, что вызовет последующие изменения функционирования всего растительного организма. Таким образом, важно выяснить, оказывают ли гербициды модифицирующее действие на ион-транспортирующие системы растительных клеток как корней, так и листьев. Использование в работе в качестве объекта одиночных клеток водоросли позволяет в какой-то степени ответить на оба вопроса, так как клетки являются зелеными и в этом смысле моделируют листья, с другой стороны через их плазматическую мембрану поступают необходимые минеральные элементы, и здесь можно говорить об их схожести с поглотительными клетками корня [3].

Целью данной работы явилось первичное тестирование гербицидов нового поколения (на примере распространенных гербицидов семейства сульфонилмочевин –аккурата, милагро, кортеса и представителя *ac*–триазиновых гербицидов – зенкора) на

способность нарушать или модифицировать работу ион-транспортирующих механизмов растительной клетки. Для достижения цели была поставлена задача: провести серию экспериментов по определению влияния гербицидов на параметры катионных каналов плазматической мембраны клеток *Nitella flexilis* при краткосрочной (в течение одного часа) и длительной (до трех суток) экспозиции в растворе, содержащем гербициды в различных концентрациях.

Материал и методика

В качестве объекта исследования использовали интернодальные клетки пресноводной харовой водоросли *Nitella flexilis* L. Agardz. которые являются традиционным объектом для исследования систем трансмембранных переноса ионов через плазматические мембранные растительных клеток с помощью стандартной микроэлектродной техники [4]. Перед проведением эксперимента клетки содержали в темноте в течение 2 сут для подавления активности светостимулируемой электрогенной H^+ -ATФазной помпы на плазматической мембране.

Использовали стандартную микроэлектродную технику и метод фиксации потенциала [5]. В ходе эксперимента регистрировали временной ход тока через плазмалемму при подаче импульсов потенциала фиксации от -260 мВ до 80 мВ с шагом 20 мВ с исходных уровней -160 и -20 мВ, что отвечает областям активации внутрь- и наружу-выпрямляющих калиевых каналов (ВВКК и НВКК соответственно). По токовым кривым строили мгновенные вольт-амперные характеристики (МВАХ), по которым рассчитывали значения проводимости мембраны для входящего и выходящего направлений [6].

При проведении кратковременных экспериментов клетку помещали в раствор искусственной прудовой воды (ИПВ) обычного состава и производили контрольную регистрацию токовых кривых [6]. Затем раствор ИПВ заменяли на экспериментальный (ИПВ + исследуемое вещество). Концентрации гербицидов отвечали используемым в сельскохозяйственной практике – $10\div40$ мг/л. Иногда концентрацию повышали на порядок – до 200 мг/л. В экспериментальном растворе клетку выдерживали в течение одного часа и каждые 15 мин производили регистрацию токовых кривых. После этого клетку вновь помещали в раствор ИПВ и производили отмыкание в течение получаса, регистрируя токовые кривые с интервалом 15 мин (два измерения). Общее время эксперимента составило 90 мин.

Во второй серии экспериментов отпрепарированную клетку выдерживали в течение одних, двух и трех суток в растворе ИПВ, содержащем исследуемое вещество. По прошествии этого времени клетку помещали в экспериментальную камеру и производили регистрацию токовых кривых в том же растворе. Затем раствор заменяли раствором ИПВ и производили отмыв в течение двух часов, регистрируя токовые кривые с интервалом 10 мин. Общее время эксперимента составляло 26, 50 и 74 часа. Во всех случаях pH растворов поддерживали на уровне 7,0 буферной системой ТРИС-HCl.

На рисунке 1 показаны примеры построения мгновенных вольт-амперных характеристик для мембраны в деполяризованном состоянии (область активации наружу выпрямляющих калиевых каналов) при проведении типичного эксперимента. На рисунке видно, что выходящая ветвь МВАХ отклоняется под действием гербицида больше, чем входящая, поэтому определяли хордовую проводимость мембранны для входящего и выходящего тока отдельно; значения токов брали при достаточном удалении от потенциала нулевого тока (не менее 150 мВ для обеих ветвей МВАХ).

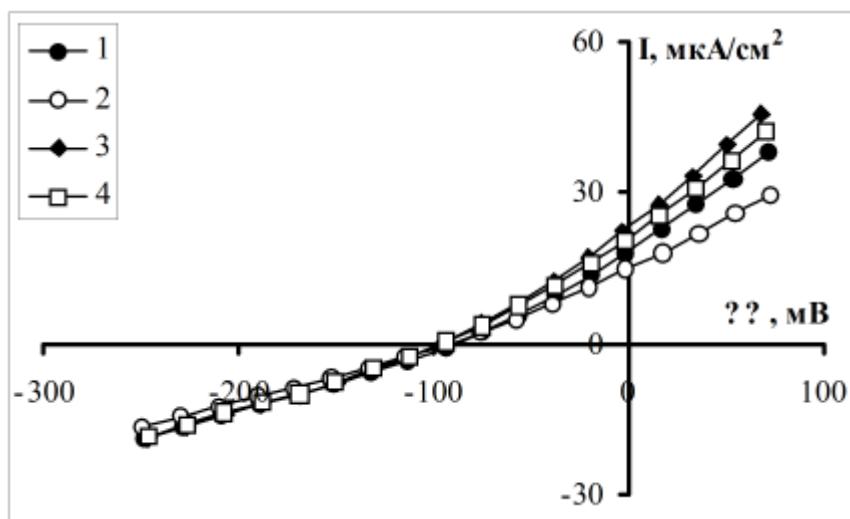


Рис. 1. Пример построения МВАХ для деполяризованного состояния мембранны (на-пряжение фиксации -20 мВ, область активации наружу выпрямляющих калиевых каналов).

1 – в растворе ИПВ (контроль); 2 – в растворе, содержащем 10 мг/л никосульфурана (милагро), через 15 минут после введения гербицида в среду; 3 – в том же растворе, через 60 минут после введения гербицида в среду; 4 – в растворе ИПВ (отмыв).

При обработке данных использовали стандартные методы вариационной статистики [7]. Для установления достоверности разницы между средними арифметическими значениями использовали критерий Стьюдента при уровне значимости $P<0,05$.

Результаты и их обсуждение

В кратковременных экспериментах был испытан гербицид кортес (хлорсульфурон) в трех концентрациях: 10, 20 и 200 мг/л ($2,1\times10^{-5}$, $4,2\times10^{-5}$ и $4,2\times10^{-4}$ моль/л соответственно).

На рисунке 2 А показано изменение проводимости плазматической мембраны для входящего и выходящего тока при значениях напряжения, отвечающих активации НВКК и ВВКК, под действием хлорсульфурана в концентрации $2,1\times10^{-5}$ моль/л. Зависимости на рисунке показывают, что при инкубации клеток в среде, содержащей гербицид, происходит небольшое снижение проводимости при напряжении -160 мВ – в области активации ВВКК. Тенденция к снижению сохраняется и после удаления гербицида из среды. В целом за время эксперимента (1,5 часа) проводимость снижается на 15%.

На рисунке 2 Б показано изменение аналогичной проводимости для входящего и выходящего токов под действием гербицида кортес при увеличении его концентрации в среде на порядок – до $4,2\times10^{-4}$ моль/л. Видно, что проводимости для входящего тока за время эксперимента не изменились, а для выходящего тока в области деполяризации произошло статистически достоверное снижение проводимости на 25 % за время экспозиции в растворе, содержащем гербицид.

Таким образом, действие кортеса на проводимость плазматической мембраны клеток *N. flexilis* при кратковременном воздействии состоит в снижении проводимости мембранны в гиперполяризованном состоянии для входящего тока на 15% при концентрации кортеса в среде 10 мг/л ($2,1\times10^{-5}$ моль/л), при этом проводимость в состоянии деполяризации для входящего и выходящего токов не изменяется. При увеличении концентрации кортеса в среде в 20 раз модифицирующее действие проявляется исключительно для выходящего тока при деполяризации – происходит снижение проводимости на 25%. В обоих случаях быстрая обратимость не наблюдалась –

модифицирующее действие гербицида не исчезает при отсутствии его в инкубационной среде в по крайней мере течение получаса. .

Проводимость плазматической мембранны клеток *Nitella flexilis* при длительной экспозиции их в среде, содержащей кортес в концентрациях 2, 10 и 20 мг/л ($4,2 \times 10^{-6}$, $2,1 \times 10^{-5}$ и $4,2 \times 10^{-5}$ моль/л соответственно) при обоих значениях напряжения изменялась достоверно по отношению к контролю только для наибольшего значения концентрации (рис. 2 В).

Зависимости на рис. 2 В показывают, что при инкубации клеток *Nitella* в экспериментальном растворе, содержащем $4,2 \times 10^{-5}$ моль/л кортеса, достоверные изменения отмечены только для деполяризованного состояния мембранны.

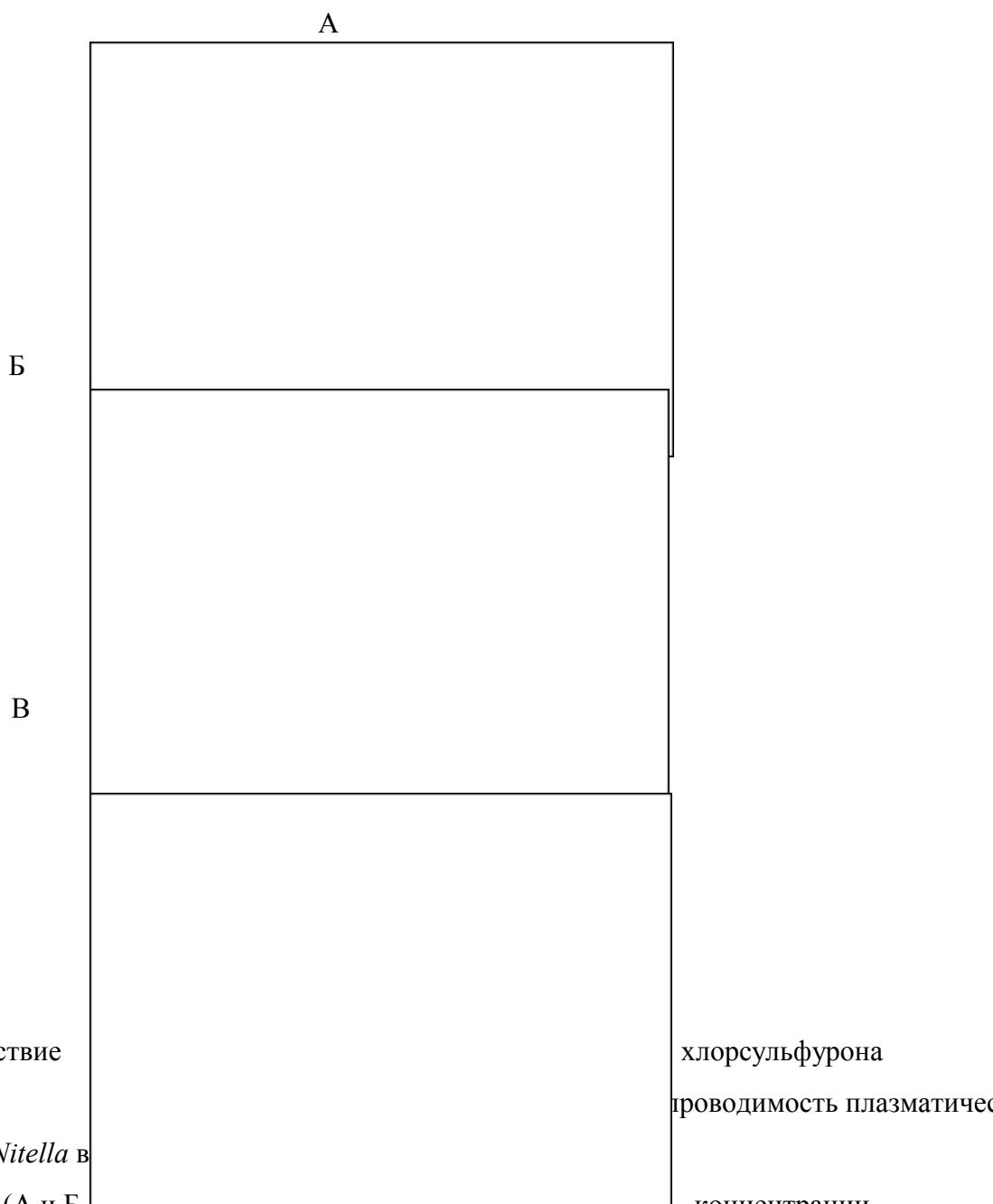


Рис. 2. Действие хлорсульфурана на проводимость плазматической мембраны клеток *Nitella* в кратковременных (А и Б, концентрации гербицида соответственно 10 и 200 мг/л) и длительных (В, концентрация гербицида 20 мг/л) экспериментах

1 – напряжение на мемbrane -160 мВ; 2 и 3 – проводимость для входящего и выходящего токов при напряжении -20 мВ. Стрелки показывают момент добавления и изъятия гербицида из раствора, звездочки – значения, достоверно ($P < 0,05$) отличающиеся от контрольных (момент времени 0).

В первые сутки происходит снижение проводимости для входящего тока на 20%, в течение вторых суток – двукратный рост проводимости, и в течение третьих суток – снижение на 45%. Качественно подобный эффект зарегистрирован для проводимости ветви выходящего тока МВАХ плазматической мембранны клеток *Nitella flexilis*: отсутствие эффекта в течение первых суток, значительное увеличение в течение вторых (в 3–3,5 раза) а в течение третьих – снижение до уровня, в 2 раза превышающего значение, зарегистрированное в ИПВ.

Для анализа полученных результатов важно отметить, что проводимость мембранны представляет собой сумму проводимости неселективных катионных каналов, не зависимых от напряжения, и потенциалзависимых калиевых каналов. Причем при деполяризации активируются НВКК, а при гиперполяризации – ВВКК. Таким образом, существенные количественные и качественные различия эффектов хлорсульфурана при обоих значениях напряжения означают, что гербицид практически не действует на неселективные катионные каналы и в последующем обсуждении их можно не учитывать.

Тот факт, что в кратковременных опытах проводимость ВВКК снижается при концентрации гербицида 10 мг/л, а при значительно более высокой – 20 мг/л – остается неизменной, наряду с отсутствием эффекта в длительных экспериментах может означать наличие адаптации мембранны к гербициду. Практически полное несоответствие кратковременных и длительных эффектов говорит об их различной природе: кратковременные – чисто мембранные, обусловлены непосредственным взаимодействием молекул вещества с мембранными структурами, длительные индуцируются молекулами вещества, проникшими внутрь клетки. В нашем случае это проявляется как противоположное направление изменения проводимости НВКК в кратковременных (снижение) и в длительных (значительный рост) экспериментах. Следует отметить избирательность эффектов: возрастание проводимости НВКК не сопровождается изменениями других каналов.

Результаты аналогичных экспериментов с никосульфуроном (милагро), проведенных по схеме, когда МВАХ получали каждые 15 минут в течении часа, не показали достоверных изменений проводимости мембранны в обоих диапазонах напряжения. Однако при уменьшении интервала между отсчетами до 5 мин, выявились эффекты, которые состояли в периодических изменениях величины проводимости мембранны, рассчитанной по МВАХ, полученным в области деполяризации до -20 мВ. Оказалось, что для разных клеток временной ход осцилляций приблизительно одинаков и не изменяется со временем воздействия гербицида, что особенно хорошо видно по усредненным данным

пяти экспериментов (рис. 3 А). Видно, что достоверно различные колебания проводимости

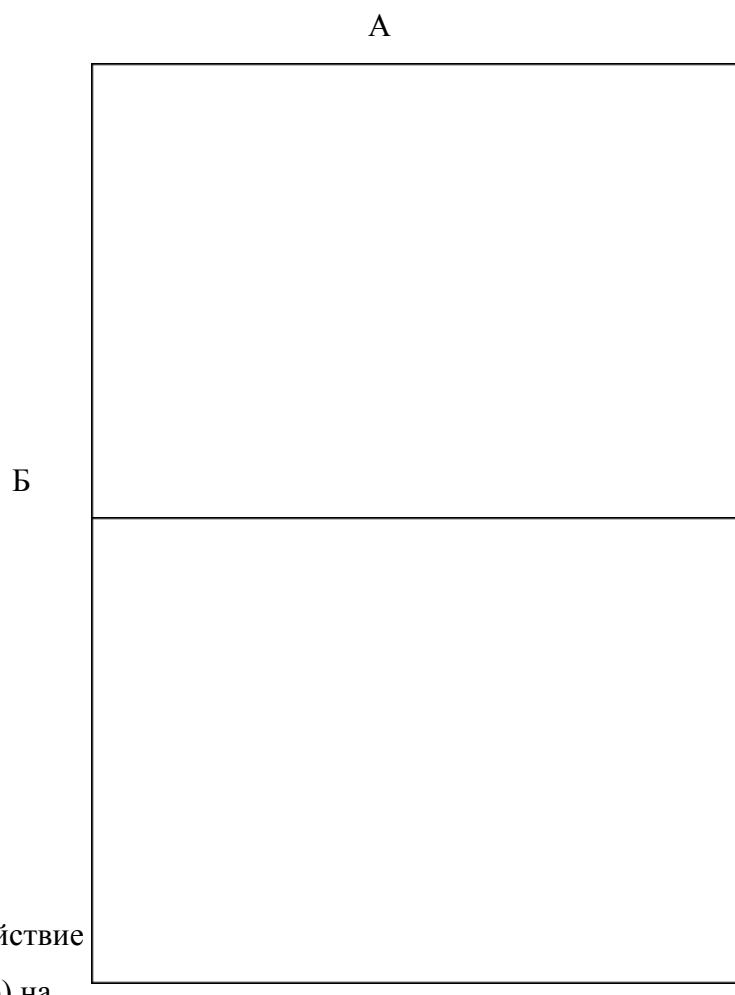


Рис. 3. Действие
(милагро) на

плазматической мембранны клеток *Nitella* в кратковременных (А, концентрации гербицида соответственно $10 \text{ мг/л} - 2,4 \times 10^{-5} \text{ моль/л}$) и длительных (Б, концентрация гербицида $20 \text{ мг/л} - 4,8 \times 10^{-5} \text{ моль/л}$) экспериментах

1 – проводимость при напряжении на мемbrane -160 мВ , измеренная по входящему току; 2 и 3 – проводимость для входящего и выходящего токов при напряжении -20 мВ . Стрелки показывают момент добавления и изъятия гербицида из раствора, звездочки – значения, достоверно ($P < 0,05$) отличающиеся от контрольных, полученных в момент времени 0.

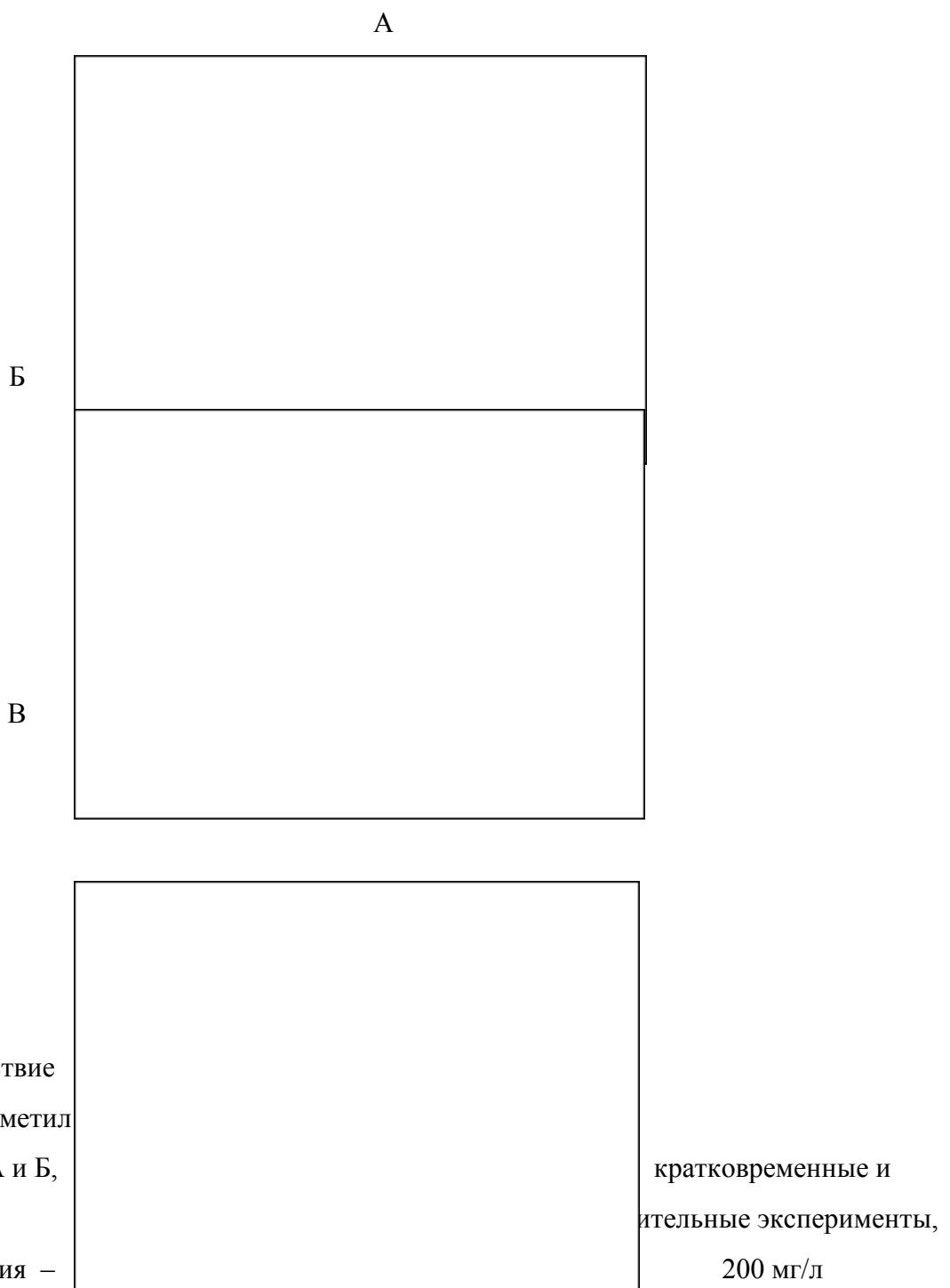
плазматической мембранны, рассчитанной по МВАХ, полученным в области деполяризации, начинаются после резкого и быстрого ее снижения сразу после введения гербицида в раствор. Величина эффекта составляла 35-40% от значений в контроле для токов обоих направлений. Период начинающихся вслед за этим колебаний составляет 15–20 мин, амплитуда – 20–30%. По форме колебания походят на гармонические, причем величина уровня проводимости, около которого они происходят, ниже значения в

контроле. Все происходит так, как будто гербицид индуцировал падение проводимости, которое сменяется ростом до уровня в контроле, затем опять падение, опять рост и т. д. При удалении гербицида из раствора проводимость быстро возрастает до практически контрольного уровня и больше не падает – колебания прекращаются, эффект обратим. Поскольку проводимость при гиперполяризации остается неизменной, очевидно, что неселективные каналы, также как и BBKK, не модифицируются никосульфуроном.

Совершенно другой характер имеют эффекты, зарегистрированные в длительных экспериментах. Не обнаружено никаких осцилляций; достоверный эффект состоит в снижении проводимости выходящего тока на 20% к исходу третьих суток при деполяризации мембранны. Отсутствие изменений других параметров означает, что в данном случае гербицид действует также на НВКК и направление длительного эффекта в целом совпадает с кратковременным. Следует отметить явную избирательность – ни неселективные каналы, ни BBKK не изменяются.

Эксперименты с метсульфурон-метилом (аккурат) показали, что в диапазоне концентраций 2–40 мг/л действие на проводимость мембранны при обоих значениях напряжения отсутствует. Эффекты, как видно из рис. 4 А и Б, начинают проявляться при использовании значительно более высокой концентрации гербицида – 200 мг/л. В кратковременных экспериментах можно отметить небольшое по величине (15–20%), но достоверное снижение проводимости для входящего тока при гиперполяризации мембранны, которое произошло к исходу 60 минут действия гербицида и продолжалось после его устранения из раствора. Отмыв в течении 30 минут не привел к возвращению до первоначального уровня. Поскольку остальные зависимости, показанные на этом рисунке, достоверных изменения не показали, это значит, что в данных условиях гербицид модифицировал только BBKK.

В длительных экспериментах картина иная. По кривым рис. 4 Б видно, что гербицид достоверно изменяет проводимость только для входящего тока при деполяризации мембранны. Отсутствие других эффектов, как и в первом случае, означает селективное действие вещества на НВКК, активирующиеся в этом диапазоне напряжения. Отмеченное снижение проводимости достигает стационарного значения (20-25%) к исходу первых суток. Таким образом, очевидно, что из всех испытанных гербицидов этой группы аккурат обладает наименьшим действием, его эффекты достаточно избирательны и проявляются как снижение проводимости входящих токов калиевых каналов обоих типов на мемbrane. Можно отметить подобие кратковременных эффектов близких в структурном отношении аккурата и



($3,9 \times 10^{-4}$ моль/л) и метрибузина (зенкор, В, 40 мг/л, $1,31 \times 10^{-4}$ моль/л, кратковременные эксперименты) на проводимость плазматической мембраны клеток *Nitella*

1 – проводимость при напряжении на мемbrane -160 мВ, входящий ток; 2 и 3 – проводимость для входящего и выходящего токов при напряжении -20 мВ. Стрелки показывают момент добавления и изъятия гербицида из раствора, звездочки – значения, достоверно ($P < 0,05$) отличающиеся от контрольных, полученных в момент времени 0.

кортеса (у обоих замещена арильная группа) – снижается проводимость ВВКК, но аккурат действует в десятикратно более высокой концентрации.

По-другому проявляется реакция мембраны на действие представителя группы почвенных гербицидов метрибузина – зенкора (рис. 4 В). При инкубации клеток *Nitella* в среде, содержащей 40 мг/л ($1,31 \times 10^{-4}$ моль/л) гербицида, зарегистрированы достоверные изменения проводимости мембранны только в деполяризованном состоянии, что означает модификацию проводимости НВКК. По данным рис. 4 В видно, что в этом случае изменяются проводимости как входящего, так и выходящего токов. Достоверное снижение на 20-25% происходит по истечении 30 мин, затем величина проводимости выходит на стационарный уровень. При отмыве первоначальное значение проводимости полностью восстанавливается в течение 15 мин.

Таким образом, по результатам работы можно заключить, что все испытанные гербициды проявили мембранный активность в кратковременных опытах, причем наблюдаемые эффекты весьма разнообразны. Так, никосульфурон (милагро) в концентрации 10 мг/л ($2,4 \times 10^{-5}$ моль/л) достаточно быстро, в течении 5-10 мин индуцировал осцилляции проводимости НВКК для обоих направлений тока с амплитудой 35-40 % в направлении уменьшения величины от уровня контроля. Мембранный характер эффекта подтверждается его быстрым (в течении 15 мин) исчезновением при отмыве.

Кратковременные эффекты хлорсульфурана (кортес) развиваются медленнее и их характер зависит от концентрации. При концентрации 10 мг/л ($2,1 \times 10^{-5}$ моль/л) после 30 минутной инкубации снижалась проводимость ВВКК; при повышении концентрации до 200 мг/л ($4,2 \times 10^{-4}$ моль/л) этот эффект не наблюдался, зато также медленно существенно снижалась проводимость выходящего тока других каналов – НВКК. Значительно меньшую мембранный активность продемонстрировал метсульфурон-метил (аккурат), для которого зарегистрировано снижение проводимости ВВКК только при повышении концентрации до 200 мг/л ($3,9 \times 10^{-4}$ моль/л).

Как видно из представленных результатов, структурно близкие кортес и аккурат (у обоих замещена арильная группа) оказывают сходное действие на мембрану. Оба избирательно ингибируют проводимость ВВКК с сходными временными параметрами, но концентрация аккурата в 20 раз выше. Эффект обоих гербицидов негативный, так именно по ВВКК калий преимущественно входит в клетку и снижение проводимости этих каналов может снизить поступление этого катиона в растение. Таким образом, с точки зрения мембранныго действия очевидно, что замещение арильной группы карбоксилом (а не хлором, как в молекуле кортеса) значительно снижает негативный негербицидный эффект производных сульфонилмочевины.

В случае длительной инкубации клеток с гербицидами наибольшую активность продемонстрировал хлорсульфурон: при концентрации 20 мг/л ($4,2 \times 10^{-5}$ моль/л) к исходу вторых суток в два – два с половиной раза возрастает проводимость НВКК, в то время как метсульфурон-метил в концентрации на порядок большей немного снизил входящий ток тех же каналов. Очевидно, что и в этом случае аккурат может оказывать негативное воздействие на калийное питание растения, увеличив проводимость каналов, по которым катион выходит из клетки.

В целом результаты работы позволяют сказать, что гербициды нового поколения способны оказывать негативное действие на минеральное питание растений и оно может быть существенно снижено путем химической модификации структуры молекулы вещества в направлении, которое можно определить, если в ходе разработки гербицидов проводить тестирование их мембранных действий.

1. Ганиев М.М. Химическая защита растений / М.М. Ганиев, В.Д. Недорезков - Уфа: Изд-во БГАУ, 2002. – 391 с.
2. Зинченко В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность / Москва: Колос, 2005. – 232 с.
3. Грабов А.М. Потенциалзависимые калиевые каналы в плазмалемме корневого волоска. / А.М. Грабов // Физиология растений – 1990 – Т. 37. Вып. 2. – С. 323-330.
4. Юрин В.М. Перенос ионов через мембранные растительных клеток / В.М. Юрин, М.Н. Гончарик., С.Г. Галактионов. - Минск: Наука и техника, , 1977. – 160 с.
5. Demidchik V.V. The effect of Cu²⁺ on ion transport systems of the plant cell plasmalemma / V.V. Demidchik, A.I. Sokolik , V.M. Yurin // Plant Physiol – 1997 – Vol. 114 – p. 1313-1325.
6. Юрин В.М. Регуляция ионного транспорта через мембранные растительных клеток / В.М. Юрин, А.И. Соколик, А.П. Кудряшов - Минск: Навука і тэхніка, 1991. – 271 с.
7. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. / Минск: Вышэйшая школа, 1973. – 319 с.

MEMBRANE EFFECTS of NEW GENERATION HERBICIDES

A.I. Sokolik, E.I. Spivak, V.M. Yurin

Belarussian State University, Minsk, Republic Belarus

Using of the modeling object - cells of freshwater alga *Nitella flexilis*, on the basis of registration of electrophysiological characteristics of a plasma membrane the membranotrophic effects of new generation herbicides – derivants of sulfonolurea: chlorsulfuron, nicosulfuron and metsulfuron-methyl – were investigated. It was shown, that these herbicides modify ions-transport systems of membrane and are capable to render negative effect on a mineral nutrition of plants. The effect can be essentially reduced by chemical modification of substance molecular structure, in a direction, which could be revealed as a result of testing their membrane effects.