



УДК 581.132:632.954:633.15

СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ РІВНОВАГИ У СОЇ ЗА ДІЇ СИНЕРГІЧНОЇ СУМІШІ ГЕРБІЦИДІВ ПУЛЬСАР І ХАРМОНІ

Є. Ю. Мордерер, С. І. Сорокіна, М. П. Паланиця, А. М. Сичук, О. П. Родзевич

*Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
вул. Васильківська, 31/17, Київ 03022, Україна
e-mail: emorderer@mail.ru*

Досліджували вплив гербіцидів інгібіторів ацетолактатсинтази (АЛС) пульсару (імазамокс) і хармоні (тифенсульфурон) та їх сумішей на селективність щодо рослин сої. Встановлено, що за умови зменшення норм внесення даних гербіцидів у суміші до 5 та 0,75 л/га, відповідно, спостерігається підвищення селективності щодо культури. Підтвердженням цього є збільшення вмісту фотосинтетичних пігментів і показників ефективності соєво-ризобіального симбіозу. Показано високий рівень кореляції даних щодо впливу гербіцидів на рослини сої та її азотфіксувальну активність і даних щодо змін стану прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, що є можливим свідченням вкладу стресової реакції сої на дію гербіцидів на утворення та подальше функціонування апарату симбіотичної азотфіксації.

Ключові слова: селективність, інгібітори ацетолактатсинтази, фотосинтетичні пігменти, азотфіксувальна активність, гваяколпероксидаза, перексид водню, ТБК-активні речовини, *Glycine max* L.

ВСТУП

Соя є досить чутливою культурою до негативного впливу бур'янів протягом усього вегетаційного періоду [1,5]. Так, середні багаторічні втрати урожаю сої від забур'янення становлять 9,2 ц/га – 54% потенційно можливого [4].

Головна проблема захисту посівів сої від бур'янів полягає у тому, що селективні й ефективні гербіциди класу інгібіторів АЛС (а саме – похідні імідазолінону, які на сьогодні широко використовуються в посівах даної культури [13], зокрема і пульсар) є персистентними й несуть загрозу наступним у сівозміні культурам. Селективні препарати з іншими механізмами дії (бентазон, грамініциди) контролюють лише частину спектра видів бур'янів, а їх взаємодія при комплексуванні є вкрай небажаною: з одного боку, за рахунок антагоністичного впливу бентазону зменшується ефективність знищення грамініцидами злакових бур'янів [17], а з іншого – синергічне підвищення грамініцидами фітотоксичності бентазону призводить до пошкодження сої (дані не опубліковано).

Зменшити норму внесення імідазолінонів і, таким чином, зменшити ймовірність накопичення їх залишків у ґрунті можна шляхом застосування їх у суміші з препаратом хармоні, який має той самий сайт дії, й тому їх суміш характеризується синергічною взаємодією. Випробування у польовому досліді ефективності застосування суміші підтвердили синергічне підвищення фітотоксичної дії, яке дозволило досягти високої ефективності знищення бур'янів при зменшених нормах внесення компонентів (дані не опубліковано). У той же час, синергічна взаємодія компонентів може призвести до зменшення селективності щодо сої, оскільки відомо, що селективність тифенсульфуруну щодо сої є низькою. Відсутність видимих ознак негативного впливу гербіцидів на рослини сої не є достатньою гарантією високої селективності, оскільки не виключена можливість пригнічення гербіцидами симбіотичного апарату [6,11–12]. Можливий механізм такого негативного впливу може полягати у тому, що при формуванні азотфіксуючого апарату рослини реагують на проникнення азотфіксуючих бактерій так само, як на інфікування патогенами [8]. При цьому спостерігаються типові стресові реакції, зокрема стимуляція окиснювальних процесів [2, 14]. При помірній інтенсивності цієї реакції процес утворення симбіотичного апарату буде відбуватися нормальним шляхом, а при надмірному підсиленні окиснювальних процесів – не виключений патологічний характер взаємодії макро- та мікросимбіонтів. У той же час навіть селективні гербіциди можуть впливати на стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги і призводити до тимчасового зсуву рівноваги у бік окиснювальних процесів [9–10]. Таким чином, цілком можливо, що за рахунок додаткового впливу гербіцидів на стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги їхня дія може сприяти патологічному перебігу процесів при утворенні симбіотичного апарату.

У зв'язку з вищезазначеним метою даної роботи було дослідити селективність сумішей гербіцидів хармоні та пульсар на рослини сої шляхом визначення вмісту фотосинтетичних пігментів у листках сої та оцінки показників ефективності бобоворизобіального симбіозу. Для встановлення можливого механізму впливу гербіцидів і їхніх сумішей на рослини сої досліджували стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вегетаційні досліді проводили на вегетаційному майданчику Інституту фізіології рослин і генетики НАН України при вологості субстрату 60% і природному освітленні. Рослини сої вирощували по 6–8 штук у пластикових посудинах на 8 кг ґрунту, збагаченого сумішшю Гельрігеля, яка містила 0,25 н азоту (1 норма відповідає $708 \text{ мг } \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ на 1 кг ґрунту). Перед посівом насіння сої сорту Аннушка стерилізували 70% розчином етанолу, промивали проточною водою та протягом 1 години інокулювали суспензією штаму *Bradyrhizobium japonicum* 6346.

У досліді використовували такі гербіцидні препарати: пульсар 40, в.р. (водний розчин) (імазамокс, 40 г/л), виробництва компанії БАСФ, хармоні 75, в.г. (водорозчинні гранули (тифенсульфурун-метил, 750 г/кг), виробництва компанії Дюпон.

Дослід закладали за такою схемою:

№	Варіант досліду
1	Контроль
2	Пульсар (0,75 л/га)
3	Хармоні + пульсар (3 г/га + 0,5 л/га)
4	Хармоні + пульсар (3 г/га + 0,75 л/га)
5	Хармоні + пульсар (5 г/га + 0,5 л/га)
6	Хармоні + пульсар (5 г/га + 0,75 л/га)

Для визначення активності розчинної форми гваяколпероксидази використовували метод Ріджа і Осборна [18]. Наважку рослинного матеріалу гомогенізували в 0,06 М буфері Серенсена (рН=6,2). Активність визначали в супернатанті після центрифугування гомогенату при 1000 g протягом 15 хвилин. У реакційній кюветі змішували 0,5 мл 0,007% гваяколу, 1,5 мл фосфатного буферу, 0,5 мл екстракту ферменту і запускали реакцію 0,5 мл 0,15% H_2O_2 . Екстинкцію визначали при 470 нм, а отримані дані виражали в ум.од./г сухої р-ни·хв.

Вміст пероксиду водню визначали за реакцією зі сульфатом титанію [15]. Для визначення ендогенного пероксиду водню до 1 мл екстракту додавали 3 мл 0,1% сульфату титанію, а інтенсивність забарвлення визначали спектрофотометрично при 410 нм. Вміст пероксиду водню розраховували за калібрувальним графіком, побудованим на основі H_2O_2 .

Вміст фотосинтетичних пігментів визначали методом екстракції наважки рослинного матеріалу в ДМСО на водяній бані при 67°C протягом 3 годин [19]. Вміст пігментів розраховували в мкг/мг маси сирої речовини.

Активність азотфіксації визначали загальноприйнятим ацетиленовим методом, модифікованим у лабораторії симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України [7,16].

Статистична обробка результатів здійснювалася за допомогою стандартного комп'ютерного пакету Microsoft Excel (середнє арифметичне, стандартне відхилення, кореляційний аналіз, НІР). Під час проведення біохімічних аналізів біологічна повторність у межах кожного експерименту була 3-разовою, крім того, кожен дослід відтворювали незалежно 3–4 рази.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Дія гербіциду пульсар у нормі внесення 0,75 л/га, незважаючи на високу селективність імідазолінонів щодо сої, призводила до певного зниження у рослин вмісту хлорофілів *a* і *b* (табл. 1, варіант 2). Зниження вмісту фотосинтетичних пігментів було найбільш суттєвим у суміші хармоні з пульсаром при їх найвищих нормах внесення (варіант 6), а найбільш селективною за вмістом пігментів була суміш з найменшими нормами внесення даних гербіцидів (варіант 3).

Відомо, що одним із значимих критеріїв оцінки ефективності соєво-ризобіального симбіозу є азотфіксувальна активність, яка корелює з масою кореневих бульбочок [3]. За дії пульсару ми спостерігали зниження азотфіксувальної активності та маси бульбочок у 1,7 та 1,9 разу, відповідно (табл. 2, варіант 2). Зменшення ж концентрації даного гербіциду в суміші з найменшою із норм внесення хармоні

частково повернуло значення даних показників до контролю (варіант 3). У двох інших сумішах гербіцидів пульсар і хармоні, де ми зменшували норми внесення одного з компонентів, показники азотфіксувальної активності та маси бульбочок були ще нижчими, ніж у варіанті з одним пульсаром, і найнижчими ці показники були, як і показники вмісту хлорофілів, при нормах внесення 5 г/га+0,75 л/га даних гербіцидів у суміші. За показниками ефективності бобово-ризобіального симбіозу підвищення норми пульсару є більш безпечним, а при зростанні норми хармоні селективність щодо культури зменшується.

Таблиця 1. Вміст пігментів у листках рослин сої на 12-ту добу після дії гербіцидів

Table 1. The content of pigments in leaves of soybean plants on the 12th day after the herbicides action

Варіант досліджу	Вміст пігментів, мкг/мг сирої речовини, $M \pm m$		
	хлорофіл а	хлорофіл b	каротиноїди
1	2,53±0,21	0,73±0,09	0,59±0,03
2	2,07±0,14	0,59±0,04	0,52±0,03
3	2,42±0,21	0,77±0,08	0,54±0,05
4	2,09±0,18	0,62±0,06	0,52±0,05
5	2,19±0,04	0,64±0,07	0,50±0,02
6	1,78±0,30	0,53±0,12	0,39±0,05

Таблиця 2. Азотфіксувальна активність і маса бульбочок сої на 15-ту добу після дії гербіцидів

Table 2. Nitrogen fixation activity and nodule mass of soybean on the 15th day after the herbicides action

Варіант досліджу	Загальна азотфіксувальна активність, мкмоль C_2H_4 /рослину·год	Маса бульбочок, г
1	0,13	0,15
2	0,08	0,08
3	0,12	0,15
4	0,04	0,07
5	0,02	0,03
6	0,01	0,03
НІР, 0,95	0,01	0,02

За дії пульсару (табл. 3, варіант 2) ми спостерігали підвищення активності розчинної форми гваяколпероксидази у 2 рази порівняно з контролем. При додаванні до пульсару гербіцида хармоні у найвищій з досліджуваних норм внесення активність гваяколпероксидази збільшилася ще на 30%, порівняно із застосуванням одного

пульсару (варіант 6). Зменшення ж норми внесення хоча б одного з компонентів суміші, навпаки – призводило до зниження активності гваяколпероксидази. Найбільш суттєвим зниження активності даного ферменту було при найменших нормах внесення досліджуваних гербіцидів у суміші (варіант 3). Показники активності гваяколпероксидази показали сильну негативну кореляцію з вмістом фотосинтетичних пігментів: коефіцієнт кореляції між активністю даного фермента і, зокрема, вмістом хлорофілу а становив – 0,93.

Таблиця 3. Активність гваяколпероксидази (Е, ум.од. /г сух. р-ни· хв.), вміст пероксиду водню (мкмоль H_2O_2 /г сух. р-ни) та ТБК-активних речовин (мкг/г сух. р-ни) у листках сої на 14-ту добу після дії гербіцидів

Table 3. Guaiacol peroxidase activity (E, r.u./g of dry matter·min), content of hydrogen peroxide ($\mu\text{mol/g}$ of dry matter) and TBA-active substances ($\mu\text{g/g}$ of dry matter) in leaves of soybean on the 14th day after the herbicides action

Варіант досліджу	Гваяколпероксидаза, $\text{M}\pm\text{m}$	Пероксид водню, $\text{M}\pm\text{m}$	ТБК-активні речовини, $\text{M}\pm\text{m}$
1	30,7 \pm 2,1	15,9 \pm 0,4	2,60 \pm 0,01
2	67,1 \pm 3,4	19,2 \pm 1,9	1,02 \pm 0,12
3	25,8 \pm 1,7	13,1 \pm 0,5	1,09 \pm 0,03
4	51,6 \pm 1,5	15,4 \pm 1,2	1,06 \pm 0,02
5	38,2 \pm 1,7	14,6 \pm 0,7	1,09 \pm 0,01
6	92,2 \pm 3,3	19,6 \pm 1,5	0,52 \pm 0,04

Дія інгібіторів АЛС призводила до певних змін в утворенні пероксиду водню. Так, лише за дії пульсару та при додаванні до пульсару хармоні у нормі внесення 5 г/га вміст пероксиду водню збільшився на 20% порівняно з контролем (варіант 2, 6). Таке незначне, порівняно з активністю гваяколпероксидази, зростання вмісту пероксиду водню було, очевидно, пов'язане з активною детоксикацією пероксиду водню даним ферментом. В інших варіантах суміші вміст пероксиду водню був на рівні контролю або дещо нижче, що також позитивно корелювало з показниками активності гваяколпероксидази.

На 14-ту добу після дії гербіцидів і їхніх сумішей ми спостерігали зменшення вмісту ТБК-активних речовин у листках рослин сої порівняно з контролем. Такий результат наводить на думку, що дія даних селективних гербіцидів не пов'язана з прискоренням реакцій пероксидного окиснення ліпідів, а отже, викликаний ними стрес, підтверджений змінами в активності гваяколпероксидази, у рослин сої є незначним.

Слід зазначити, що обробка рослин гороху іншим гербіцидом із класу імідазолінонів імазетапіром також приводила до зростання активності гваяколпероксидази у листках рослин, тоді як зміни у показниках інших окиснювальних і антиоксидантних маркерів були незначними [20].

За усіма досліджуваними нами критеріями найбільш селективною щодо сої є суміш хармоні з пульсаром у нормах внесення 3 г/га+0,5 л/га. За селективністю ця

суміш дещо навіть перевищує селективність пульсару в нормі 0,75 л/га. Підвищення норми хармоні та пульсару, відповідно, до 5 і 0,75 л/га, призводить до зменшення селективності, при цьому підвищення норми пульсару є більш безпечним, а зростання норми хармоні має наслідком найбільш драматичну втрату селективності. Високий рівень кореляції даних щодо впливу гербіцидів на рослини сої та її азотфіксувальну активність і даних щодо змін стану прооксидантно-антиоксидантної рівноваги сої свідчить, що стресова реакція сої на дію гербіцидів справді є ймовірним чинником негативного впливу гербіцидів на утворення та подальше функціонування апарату симбіотичної азотфіксації сої.

1. Бакай І.Д. Забур'яненість посівів сої. **Карантин і захист рослин**, 2005; 3: 24.
2. Васильева Г.Т., Миронова Н.В., Лузова Г.Б. и др. Влияние инокуляции азотфиксирующими бактериями разной эффективности и совместимости на содержание перекиси водорода и активность каталазы в проростках гороха. **Агрохимия**, 2004; 6: 68–73.
3. Даценко В.К., Лагута С.К., Старченков Е.П. и др. Эффективность бобово-ризобияльного симбиоза различных сортов сои и штаммов *Bradyrhizobium japonicum*. **Физиология и биохимия культурных растений**, 1997; 29(4): 299–303.
4. Жеребко Ю.В. Забур'яненість сої. **Захист рослин**, 1998; 8: 12–13.
5. Кліщенко С.В., Чернега Т.О. Контроль бур'янів у посівах сої. **Захист рослин**, 2003; 5: 13.
6. Ковальжиу А.И., Апостолов С.Д., Сабельникова В.И. Эффективность симбиоза люцерны с клубеньковыми бактериями в условиях применения гербицидов. **Изв. АН МССР. Сер. биол. и хим. наук**, 1990; 5: 13–18.
7. Крикунець В.М. Ацетиленвідновлювальний метод у дослідженні фізіології бобово-ризобіального симбіозу. **Физиология и биохимия культурных растений**, 1993; 2: 419–430.
8. Кругова Е.Д. Специфические стратегии клубеньковых и фитопатогенных бактерий при инфицировании растений. **Физиология и биохимия культурных растений**, 2009; 41(1): 3–15.
9. Мордерер Є.Ю., Паланиця М.П., Трач В.В. Синергічне підвищення фітотоксичної дії грамініциду феноксапроп-Р-етилу у сумішах з метрибузином. **Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку**. Матер. з'їзду Товариства фізіологів рослин, Київ, 2009; 2: 46–50.
10. Паланиця М.П., Мордерер Є.Ю., Родзевич О.П. та ін. Підвищення вибіркової фітотоксичності грамініциду феноксапроп-Р-етилу. **Рослини-бур'яни та ефективні системи захисту від них посівів сільськогосподарських культур**. Матер. VII наук.-теор. конф. Українського наук. товариства гербологів м. Київ, 4–5 березня 2010 р. Київ, 2010: 158–164.
11. Пароменская Л.Н., Кожемяков А.П., Чеботарь Н.И. и др. Эффективность симбиотической азотфиксации в условиях применения гербицидов. **Сельскохозяйственная биология**, 1987; 2: 40–42.
12. Патики В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін. **Біологічний азот**. Київ, 2003. 424 с.
13. Пономарев Г.В., Гиневский Н.К., Алтухова Т.В. Гербициды в посевах сои. **Защита и карантин растений**, 2003; 11: 31.
14. Buffard D., Esnault R., Kondorosi A. Role of plant defence in alfalfa during symbiosis. **World J. Microbiol. Biotech**, 1996; 12(2): 175–188.
15. Chen L.-M. Effect of excess copper on rice leaves: evidence for involvement of lipid peroxidation. **Bot. Bull. Acad. Sin**, 1999; 40: 283–287.
16. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K. et al. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiol**, 1968; 43(8): 1185–1207.
17. Jordan D.L. Influence of Adjuvants on the Antagonism of Graminicides by broadleaf herbicides. **Weed Tech**, 1995; 9(4): 741–747.

18. Ridge I., Osborne D. Hydroxyproline and peroxidases in cell walls of *Pisum sativum*: regulation by ethylene. **J. Exp. Bot.**, 1970; 21(69): 843–856.
19. Welburn A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b as well as total carotenoids using various solvents with spectrophotometry of different resolution. **Journal of Plant Physiol**, 1994; 144(3): 248–254.
20. Zabalza A., Gastona S., Sandalio L. et al. Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase. **Environ. Exp. Bot.**, 2007; 59(2): 150–159.

STATE OF ANTIOXIDANT AND PROOXIDANT BALANCE IN SOYBEAN PLANTS UNDER THE ACTION OF SYNERGISTIC MIXTURE OF HERBICIDES PULSAR (IMAZAMOX) AND HARMONY (THIFENSULFURON)

Ye. Yu. Morderer, S. I. Sorokina, M. P. Palanytsya, A. M. Sichuk, O. P. Rodzevich

*Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine
31/17, Vasylykivska St., Kyiv 03022, Ukraine
e-mail: emorderer@mail.ru*

The influence of herbicides inhibitors of acetolactate synthase (ALS), pulsar (imazamox) and harmony (thifensulfuron) and their mixtures on the selective phytotoxicity of soybean plants were investigated. It was established that under the conditions of the reduction of herbicide norms in a mixture to 5 and 0.75 l/ha, respectively, the selectivity for culture increased. This is confirmed by the increasing contents of photosynthetic pigments and efficiency of soybean-rhizobium symbiosis. It was shown a high level of correlation of data regarding the impact of herbicides on soybean plants and its nitrogen fixation activity and data on changes in status of anti-prooxidant balance. Perhaps, this is an evidence of the contribution of stress reaction to soybean herbicide action on the formation and functioning of the symbiotic nitrogen fixation.

Key words: selective phytotoxicity, inhibitors of acetolactate synthase, photosynthetic pigments, guaiacol peroxidase, hydrogen peroxide, TBA-active substances, *Glycine max* L.

СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО РАВНОВЕСИЯ В СОИ ПРИ ДЕЙСТВИИ СИНЕРГИЧЕСКОЙ СМЕСИ ГЕРБИЦИДОВ ПУЛЬСАР И ХАРМОНИ

Е. Ю. Мордерер, С. И. Сорокина, М. П. Паланица, А. М. Сычук, О. П. Родзевич

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
ул. Васильковская, 31/17, Киев 03022, Украина
e-mail: emorderer@mail.ru*

Исследовано влияние гербицидов ингибиторов ацетолактатсинтазы (АЛС), пульсара (имозамокс) и хармони (тифенсульфурон) и их смесей на избирательную фитотоксичность. Установлено, что при уменьшении норм внесения данных гербицидов в смеси к 5 и 0,75 л/га, соответственно, увеличивается избирательность относительно сои. Доказательством этого является увеличение содержания

фотосинтетических пигментов и показателей эффективности бобово-ризобийного симбиоза. Высокий уровень корреляции данных относительно влияния гербицидов на растения сои и её азотфиксирующей активности и данных об изменениях в состоянии прооксидантно-антиоксидантного равновесия, вероятно, является свидетельством вклада стрессовой реакции растений на действие гербицидов на формирование и функционирование симбиотического аппарата.

Ключевые слова: избирательная фитотоксичность, ингибиторы ацетолактат-синтазы, фотосинтетические пигменты, азотфиксирующая активность, гваяколпероксидаза, перекись водорода, ТБК-активные вещества, *Glycine max* L.

Одержано: 27.07.2011