

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

Гладышев М.И. Гладышев
подпись инициалы, фамилия
«1 » июля 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

код и наименование специальности

Действие ингибитора ацетолактатсинтазы на показатели

фотосинтеза растений

тема

Руководитель

Гаев
подпись, дата

профессор д.б.н.
должность, ученая степень

Н.А. Гаевский
инициалы, фамилия

Выпускник

Мелехова
подпись, дата

А.А. Мелехова
инициалы, фамилия

Красноярск 2020

Содержание

Содержание.....	2
Реферат	4
Введение.....	5
1 Обзор литературы	7
1.1 Гербициды	7
1.2 Классификация гербицидов	8
1.3 Способы внесения гербицидов	10
1.4 Действие трибенурон-метила. Химизм трибенурон-метила	12
1.5 Действие Метрибузина. Химизм метрибузина	15
1.6 Сорные растения	17
1.6.1 Амарант запрокинутый (<i>Amaránthus retrofléxus L.</i>)	20
1.6.2 Лебеда sp. (<i>Atriplex</i>)	21
1.7 Культурные растения.....	21
1.8 Фотосинтез.....	22
1.8.1 Фотохимические реакции	23
1.8.2 Флуоресценция хлорофилла	27
2 Материалы и методы	30
2.1 Культура лебеды (<i>Atriplex sp.</i>), и амаранта запрокинутого (<i>Amaránthus retrofléxus L.</i>)	30
2.2 Инфильтрация	30
2.3 Измерение активности фотосистемы II	31
2.4 Изучение пигментного состава.....	33
2.5 Анализ почвы	35
2.5.1 Содержание общего органического углерода.....	35
2.5.2 Содержание подвижного фосфора.....	36
2.5.3 Определение нитратного азота.....	37
2.5.4 Определение pH почвы	37
2.6 Статистическая обработка данных.....	38

2.6.1 t-критерий Стьюдента для независимых выборок	38
2.6.2 Критерий Даннета	39
3 Результаты и обсуждение	Ошибка! Закладка не определена.
3.1 Действие гербицидов на амарант запрокинутый (<i>Amaránthus retrofléxus L</i>) и лебеду (<i>Atriplex sp.</i>)	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Действие гербицидов на салат (<i>Lactúca satíva</i>).....	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Концентрация пигментов	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Характеристики почвы	Ошибка! Закладка не определена.
3.5 Статистическая обработка	Ошибка! Закладка не определена.
Заключение	41
Список использованных источников	42

Реферат

Выпускная квалификационная работа по теме «действие ингибитора ацетолактатсинтазы на показатели фотосинтеза растений» содержит 69 страниц текстового документа, 16 рисунков, 6 таблиц, 47 источников.
ГЕРБИЦИД, МЕТРИБУЗИН, ТРИБЕНУРОН-МЕТИЛ, ФОТОСИНТЕЗ, ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА, ФОТОСИСТЕМА II.

Цель работы: оценить характер действия гербицида ингибирующего ацетолактатсингазу на фотосинтетический аппарат культурных и сорных растений.

Задачи:

- 1) Оценить влияние гербицидов трибенурон-метил и метрибузин на фотосинтетические реакции растений;
- 2) Оценить влияние гербицидов трибенурон-метил и метрибузин на содержание фотосинтетических пигментов растений.
- 3) Сравнить механизм действия гербицида трибенурон-метил с механизмом действия гербицида метрибузина, для выявления его действия на фотосинтетическую систему высших растений.

В результате проведения серии экспериментов по изучению влияния гербицидов метрибузин и трибенурон-метил установлено, что трибенурон-метил не оказывает влияния на пигментный состав и реакционный центр высших растений, в отличии от гербицида метрибузин.

Введение

Сорные растения успешно конкурируют с культурными растениями, за необходимые для развития ресурсы: свет, минеральные вещества и воду. Потребляя эти ресурсы, сорные растения тем самым «отбирают» их у культурных, ослабляя и ухудшая их устойчивость к неблагоприятным факторам (Накаева, Оказова 2017). Также можно заметить, что наличие сорных растений снижает продуктивность культурных, так, произрастание на сельскохозяйственных угодьях сорняков, сокращает урожай зерновых на 15-50% (Никифоров и др., 2018). В настоящее время одним из самых применяемых методов для борьбы с сорными растениями является обработка гербицидами сельскохозяйственных площадей. Так, гербициды занимают долю до 40-70% от глобального агрохимического рынка (Чкаников и др., 2020).

Трибенурон-метил — это гербицид ингибирующий фермент ацетолактатсингазу, в результате чего нарушается синтез валина, лейцина и изолейцина, то есть аминокислот с разветвленной цепью, так как этот фермент катализирует первый этап биосинтеза этих аминокислот. Действие этого гербицида приводит к нарушению метаболизма у чувствительных растений, в результате чего, клетки перестают делиться и растение погибает (Qingyan et al., 2007).

Однако, есть вероятность того, что растения погибают не только из за угнетения роста, но и из за влияния гербицидов на их фотосистему, поскольку в ней так же содержатся белки, в частности, в цепи транспорта электрона при фотосинтезе выделяют как минимум 5 белковых комплексов (Гольд и др., 2008). Для выявления эффектов, оказываемых на фотосистему трибенурон-метилом, был так же рассмотрен механизм действия препарата — метрибузин-это препарат с достоверно доказанным эффектом ингибирования фотосинтеза.

Целью данной работы была оценка характера действия гербицида ингибирующего ацетолактатсингазу на фотосинтетический аппарат растений.

Задачи:

- 1) Оценить влияние гербицидов трибенурон-метил и метрибузин на фотосинтетические реакции растений;
- 2) Оценить влияние гербицидов трибенурон-метил и метрибузин на содержание фотосинтетических пигментов растений.
- 3) Сравнить механизм действия гербицида трибенурон-метил с механизмом действия гербицида метрибузина, для выявления его действия на фотосинтетическую систему высших растений.

Работа выполнена при поддержке Гранта Министерства науки и высшего образования РФ. РФ.074-02-2018-328. №ВУ-6 "Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация"

1 Обзор литературы

История мирового сельского хозяйства свидетельствует, отсутствие борьбы с вредными организмами на сельскохозяйственных угодьях всегда влечет за собой снижение как валового производства, так и качества сельскохозяйственной продукции (Попов, Дорожкина, Калинин, 2003). И в наше время, борьба с сорными растениями остается одной из наиболее важных задач земледелия. Необходимо предотвращать их массовое распространение и своевременно, а также эффективно уничтожать сорные растения в посевах сельскохозяйственных культур (Кошкин, 2016).

1.1 Гербициды

Гербициды — это химические вещества, применяемые для уничтожения сорных растений. Большая часть препаратов относится к органическим соединениям, хотя есть среди них и неорганические соединения (Груздев и др., 1987). Применение гербицида должно быть обоснованно, должны учитываться безопасность соединения, эффективность, биологические особенности сорного растения, против которого оно применяется. Так же, нужно обращать внимание на то, что генетический состав вида или сорта культурных растений может определять различные степени толерантности или восприимчивости к гербицидам. Применение гербицидов может вызвать стресс даже у устойчивых растений, что приведет к росту количества фитотоксичных веществ, что негативно скажется на росте, развитии и продуктивности растения (Agostinetto et al., 2016).

1.2 Классификация гербицидов

Существует несколько типов классификаций гербицидов в зависимости от их характеристик.

Первая классификация базируется на том, на какой спектр растений действуют гербициды. Согласно этой классификации, гербициды бывают сплошные, это те вещества, которые уничтожают любую травянистую растительность на обрабатываемой территории и избирательные (селективные) это те, которые применяются для устраниния конкретных видов растений. При выборе последних, обязательно учитывается устойчивость защищаемой культуры к препарату.

Вторая классификация базируется на разделении гербицидов по методу их проникновения. По этой классификации гербициды делятся на вещества контактного действия, то есть после обработки гибнет надземная часть сорняка и системные препараты, которые поступают в растения и передвигаясь по флоэме или ксилеме вызывают гибель всего растения. Системные гербициды при этом, более эффективны, так как для гибели сорного растения достаточно малых количеств препарата, нанесенного на листья или в почву, в отличии от контактных, для действия которых необходимо, что бы гербицид равномерно распределился по поверхности, поскольку препараты этого типа действуют только в точках соприкосновения растения и гербицида.

Третья классификация, основывается на количестве подавляемых видов. По этой характеристике гербициды делятся на препараты широкого спектра действия и препараты узкого спектра действия. Гербициды широкого спектра действия применяются в борьбе с большим количеством видов сорной растительности, а гербициды узкого спектра действия уничтожают растения в более узком видовом диапазоне (Филиппов, Немченко, 2016).

Так же, гербициды классифицируются по срокам применения. В зависимости от этого они бывают: предпосевные (или допосевные), которые вносят до посева или посадки культурных растений; предвсходовые (или довсходовые), которые вносят после посева или посадки сельскохозяйственных культур, но до появления их всходов; послевсходовые, которые вносят после появления всходов культурных растений, в различные периоды вегетации.

Еще одна классификация, это классификация по механизмам действия на угнетаемое растение. Существует несколько основных классов этих механизмов: гербициды, разрушающие мембрану- они образуют в тканях листа свободные радикалы, которые ее и разрушают; ингибиторы синтеза аминокислот- эти гербициды специфически ингибируют растительные энзимы, ответственные за синтез незаменимых аминокислот; гормоноподобные гербициды-вещества этого класса «маскируются» под естественные гормоны растений и влияют на рост и развитие; ингибиторы синтеза жиров-их действие основано на ингибции ацетил-коэнзим А карбоксилазы, необходимой для синтеза жирных кислот; ингибиторы фотосинтеза - гербициды этого типа связываются со специфическим белком электрон транспортной цепи (ЭТЦ), необратимо блокируя его, нарушая транспорт электронов по ЭТЦ, то есть световая энергия не может быть преобразована в энергию химических связей; ингибиторы синтеза пигментов- при применении гербицидов этого типа нарушается синтез фитоеновой десатуразы, что приводит к невозможности синтеза каротиноидов; ингибиторы меристематического митоза-после попадания гербицида в растение блокируется тубулин, в следствии чего нарушаются поздние стадии митоза (Куликова, Лебедева, 2010).

При этом, одной из важнейших характеристик гербицидов, как химических веществ является их токсичность. Токсичность гербицидов характеризуют показателем ЛД₅₀- средней летальной (смертельной) дозой препарата, при которой погибают 50% подопытных животных.

По принятой на территории Российской Федерации классификации по степени токсичности (опасности для окружающей среды) гербициды подразделяются на 4 класса опасности: чрезвычайно опасные, высоко опасные, умеренно опасные, малоопасные (ГОСТ 12.1.007-76).

Нельзя забывать и о том, что гербициды не должны загрязнять окружающую среду и должны разлагаться в почве. В связи с этим выделяют такую характеристику как персистентность пестицидов — это длительность сохранения их биологической активности в почве. По этому критерию гербициды делятся: очень стойкие, время разложения которых на нетоксичные компоненты составляет более 2-х лет; стойкие, разлагающиеся от 6 месяцев до 2-х лет; умеренно стойкие, которые разлагаются от 1 до 6 месяцев; мало стойкие, относительно быстро разлагающиеся, до 1 месяца.

Так же, по этой характеристике выделяют еще одну классификацию, по периоду полуразложения. Выделяют: нестойкие — время полуразложения не превышает 7 суток; малостойкие — время полуразложения составляет 7-21 суток; среднестойкие - время полуразложения составляет 21-60 суток; стойкие - время полуразложения составляет 60-120 суток и очень стойкие - время полуразложения превышает 120 суток (Попов, Дорожкина, Калинин, 2003).

Препартивная форма гербицидов может быть различной, они выпускаются в виде порошков, жидкости, гранул, пасты, концентратов, растворов, суспензий, эмульсий и т.д. (Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации).

1.3 Способы внесения гербицидов

В настоящее время разработано множество препартивных форм гербицидов и соответственно способов их внесения.

Самыми популярными и часто применяемыми можно назвать следующие: опрыскивание, самый популярный метод внесения препаратов; ультрамалообъемное опрыскивание, при котором используются специальные опрыскиватели, сводящие расход раствора к минимуму; внесение гранулированных препаратов; внесение в виде пены; внесение с помощью валиков; внесение с поливной водой (Куликова, Лебедева, 2010).

Как было сказано выше, опрыскивание один из самых популярных методов обработки гербицидами. При этом, от размера и количества капель, зависит эффективность применения гербицида, так как это влияет на удерживаемость гербицида, проникновение в ткани, испаряемость и другие важные характеристики, например при размере капель более 400 мкм они уже будут стекать с листа и эффективность гербицида уменьшится.

Так же, при обработке гербицидами учитываются погодные условия, скорость ветра и метеорологические условия в ближайшее время (Филиппов, Немченко, 2016)

1.4 Действие трибенурон-метила. Химизм трибенурон-метила

Трибенурон-метил — это вещество, относящееся к производным мочевины (сульфонилмочевины), проникающее в растения через листья, и корни и классифицирующееся как малоопасный гербицид. Трибенурон-метил используется для защиты против однолетних двудольных сорных растений, а также некоторых однодольных, например щетинника, росички, пырея ползучего и других.

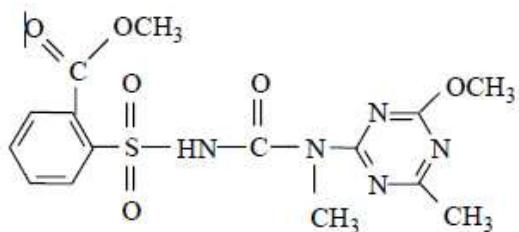


Рисунок 1 – Структурная формула трибенурон-метила (Леонтьев и др., 2013)

Этот гербицид ингибитирует ацетолактатсингазу, фермент, играющий важную роль в биосинтезе аминокислот с разветвленным углеродным скелетом (изолейцина, валина и лейцина), из-за дефицита которых нарушается синтез белка и замедляется деление клеток. В результате растение останавливается в росте и постепенно погибает (Леонтьев и др., 2013).

Подавление роста у чувствительных растений наблюдается уже через несколько часов после обработки, но полная гибель наступает через 1-2 недели, а иногда и позже. При этом наблюдается хлороз, в отдельных случаях возникает красная, оранжевая, пурпурная или темно-зеленая окраска листьев (Попов, Дорожкина, Калинин, 2003).

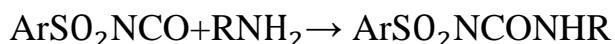
Культурные же растения, устойчивые к этому гербициду, невосприимчивы к нему, потому что гербицид в их организме быстро метаболизируется до нетоксичных соединений. Например, в листьях пшеницы за 24 ч метаболизируется 95% гербицида, тогда как у чувствительного вида сахарной свеклы только 3% (Куликова, Лебедева, 2010).

Однако, существуют и невосприимчивые сорные растения, которые стали такими из-за мутаций или передачи им измененного гена половым путем, так, мутация пролина в 197-м положении в гене AHAS является одной из наиболее распространенных мутаций, обнаруженных у растений, устойчивых к сульфонилмочевинам. Замена Pro197 на по меньшей мере восемь различных аминокислот дали устойчивость к гербицидам сульфонилмочевинового ряда таким родам как: кохия, капуста, гулявник и арадопсис (Ranjan et al., 2020).

Так же, трибенурон-метил влияет на размножение крестоцветных растений, так, при опрыскивании рапса, заметно изменение пыльцы, пыльников и соцветий, приводящих к стерильности растения (Lun et al., 2015; Lian et all., 2019).

Помимо этого, трибенурон метил снижает процент всхожести, но увеличивает количество сахаров, липидов и каратиноидов (Saja et al., 2016).

Общие схемы синтеза препаратов сульфанилмочевин относительно просты. Первый способ получения, это реакция сульфонилизоцианатов с соответствующими производными 2-амино-триазина и 2-амино-пиримидина:



Реакция протекает как в органических растворителях, так и без них. При этом, температура процесса зависит от строения исходных сульфонилизоцианата и амина.

Второй способ, это ацелирование мочевин сульфохлоридами по схеме:



При этом, препараты сульфонилмочевин достаточно неустойчивы, в окружающей среде, поэтому они так широко и интенсивно применяются в сельском хозяйстве.

Разложение гербицида в почве может происходить под действием химических (гидролиз), физических (свет) и биологических (микробная деградация) факторов (Леонтьев и др., 2013).

Химическая деградация гербицида происходит преимущественно при их адсорбции почвой, в почвенной влаге, где происходит гидролиз в условиях щелочного или кислотного катализа, в зависимости от типа почв. Основными продуктами гидролиза являются 1,2-бензизотназол-3(2Н)он-1,1-диоксид(сахарин), 2-(аиносульфонил)-бензойная кислота, 4-метокси-6-метил-2-аминометил-1,3,5-триазин.

При этом скорость гидролиза зависит от химической структуры гербицидов, а также от внешних условий – температуры, влажности, уровня кислотности и типа почв.

Так же, вещество разрушается под действием солнечного света. Имея хорошие хромофорные группы, эти вещества подвергаются фотодеструкции за свет поглощения УФ-части спектра солнечного света. Процесс протекает по радикальному механизму, но при этом могут образовываться высокореакционноспособные промежуточные продукты, например N-метилтриазинамин, 2-амино-4-метокси-6-метил-1,3,5-триазин, сахарин и другие (Кудрявец, 2010).

Но считается, что большую роль по сравнению с другими факторами, играет именно разложение под действием почвенных микроорганизмов (Леонтьев и др., 2013).

1.5 Действие Метрибузина. Химизм метрибузина

Метрибузин- вещество, относящееся к производным 1,2,4 триазина, его структурная формула представлена на рисунке 2 (Мельников, 1987). Он относится к группе системных гербицидов и ингибиторам фотосинтеза, а также к малоопасным веществам. Этот гербицид применяется против однолетних двудольных и злаковых сорняков, таких как канатик, щирица, василек синий, марь белая, ромашка лекарственная и т.д.

Однако есть и устойчивые виды: пырей ползучий, сыть, паслен черный, подмаренник цепкий, бодяк полевой и выюнок полевой (Захаренко, 1990).

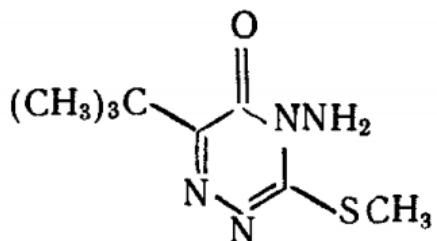


Рисунок 2- Структурная формула метрибузина (Мельников, 1987)

Под влиянием триазиновых гербицидов, к которым и относится метрибузин, у чувствительных растений прекращается рост, листья становятся хлоротичными. Механизм действия метрибузина заключается в следующем: гербицид ингибирует фотосинтетический транспорт электронов путем вытеснения вторичного акцептора электронов Qa из его связывающей ниши в белке D1 фотосистемы II (Schwenger-Erger, Barz, 2000). При этом так же наблюдаются нарушения фотолиза воды и реакции Хилла, не происходит образование АТФ и восстановление НАДФ, прекращается ассимиляции углекислоты, разрушаются хлоропласти, происходит нарушение минерального питания и процессов в корнях, нарушаются водный обмен и дыхание, происходит инактивация ферментов (Груздев и др., 1987).

Метрибузин подавляет фотосинтез, однако у устойчивых растений происходит быстрый гидролиз с образованием нетоксичного для растений 2-гидроксипроизводного. Процесс катализируется 2,4-гидрокси-7-метоксибенз-1,4-оксазиноном-3 (Захаренко, 1990).

Как правило, препарат вносят в почву путем опрыскивания, однако проведены исследования по внесению метрибузина в почву с помощью биоразлагаемых гранул, созданных из метрибузина (25%), и смеси поли-3 гидроксибутират и полиэтиленгликоля, этот материал показал более высокую степень высвобождения гербицида, на 60 % за 35 дней. Таким образом, можно контролировать скорость высвобождения гербицида с помощью состава гранул, включающих в себя метрибузин (Boyandin et al., 2016).

Метрибузин получают из триметилпирровиноградной кислоты, тиокарбазида и йодистого метила по схеме, указанной на рисунке 3.

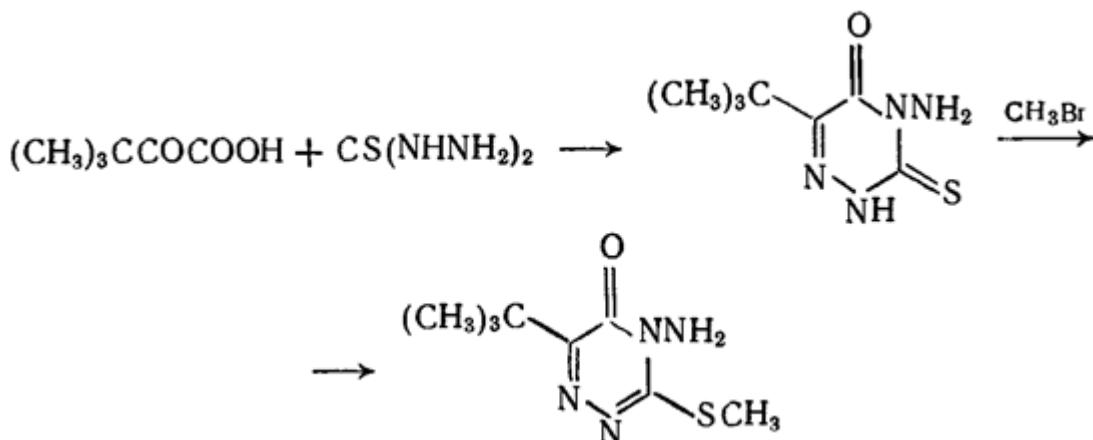


Рисунок 3- Схема получения метрибузина (Мельников, 1987)

Триазиновые гербициды ценятся из-за их низкой стоимости, умеренной стойкости и длительного периода борьбы с сорняками в агроэкосистемах.

В почве гербицид разлагается в течение 1-3 месяцев (Куликова, Лебедева, 2010). Так, метрибузин в дозе 5 мг на 100 грамм почвы для полного разложения потребовалось более 120 дней (Mehdizadeh et al., 2019).

Вещества триазинового ряда на глубине 0— 10 см подвергаются обычным процессам воздействия: фоторазложению, поглощению почвенными колloidами и растениями, в меньшей степени — испарению и вымыванию. Главный разрушающий фактор — почвенные микроорганизмы (Куликова, Лебедева, 2010).

В почве происходят процессыdealкилирования и дехлорирования через образование аммелина, аммелида и циануровой кислоты. При высокой влажности, повышении температуры и низком pH этот процесс происходит быстрее. В таких условиях усиливается химический гидролиз.

Разложение под действием почвенных организмов происходит в основном при участии грибов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* и других, а также, бактерий *Pseudomonas* ssp., *Corynebacterium* и др. При этом, важно подчеркнуть, что метрибузин не подавляет полезную микрофлору азотфиксацирующих и нитрофицирующих бактерий, следовательно, не оказывает отрицательного влияния на превращение азотистых соединений в почве (Груздев и др., 1987).

Дополнительно, было выяснено, что содержание органического вещества оказывает важное влияние на деградацию и перемещение гербицидов в почве, так, бесплодные почвы с малым содержанием органического вещества оказывают минимальное влияние на разрушение гербицидов.

Поэтому, для ускорения деградации гербицидов, в почву вносятся навоз, компосты и растительные остатки, это так же улучшает и характеристики почвы (Mehdizadeh et al., 2019).

1.6 Сорные растения

Сорные растения (сорняки) — это дикорастущие растения, обитающие на сельскохозяйственных угодьях и снижающие величину и качество продукции. Однако, существует так же понятие «засорители», и это не синоним сорняков. Под засорителями подразумеваются растения, относящиеся к культурным видам, но не возделываемые на данном поле. Пример засорителя это подсолнечник в посевах пшеницы. В сортовых посевах засорителями считаются все растения этого же вида, не принадлежащие к данному сорту.

Сорные растения затрудняют проведение полевых работ: обработку почвы, уход за растениями, уборку урожая. К тому же примесь семян сорняков снижает качество урожая, например, семена ярутки придают муке горький вкус, делая ее несъедобной (Попов, Дорожкина, Калинин, 2003).

Как было сказано выше, сорные растения усложняют уборку урожая на полях. Суммарные потери урожая и дополнительные затраты на очистку полей от сорной растительности удваивают общие потери в производстве продукции растениеводства. В процессе выращивания и обработки растений, тратится дополнительная энергия и ресурсы, так как быстрее изнашиваются рабочие органы культиваторов, дисковых орудий, снижается производительность комбайнов, встает необходимость в очистке зерна.

Так же, в результате того, что сорные растения конкурируют с культурными за ресурсы, снижается и количество урожая. Так, было выяснено, что для формирования 1 кг надземной массы, сорные растения тратят воды в 1,5-2 раза больше, чем культурные. Так же, сорняки затеняют посевы, снижают температуру почвы на 1-4 градуса, а также, некоторые виды проявляют и аллелопатические эффекты, например горчица полевая.

И в результате того, что сорные растения более конкурентоспособны, количество урожая падает. Например, при увеличении засоренности квадратного метра поля на 1 сорняк щирицы, урожай пшеницы снизится на 3,38 кг/га (Филиппов, Немченко, 2016). А овсюг снижает урожайность пшеницы на 40-50%, при произрастании 8-16 растений на одном квадратном метре (Кошкин, 2016).

На засоренных посевах использование минеральных удобрений, высокопродуктивных сортов и других факторов повышения урожая не так эффективно (Захаренко, 1990).

Помимо этого, сорняки являются своеобразными «переносчиками заболеваний». Сорняки, произрастающие на полях вместе с культурными растениями, поражаются патогенными грибами. А поскольку сроки заражения сорных трав и проявления заболеваний на них более растянуты во времени, то к моменту заражения грибная инфекция, как правило, уже дополнительно накоплена, а в случае грибов, имеющих в своем жизненном цикле половой процесс, генетически рекомбинирована и эта инфекция поражает и культурные растения, иногда и на зачаточном состоянии (Сибикеева, Боорисов, 2013).

Но как говорилось выше, применения гербицидов должно быть оправданным. И для окончательного решения о их применении вводится так называемый экономический порог вредности-это величина, отражающая минимальный уровень засоренности, при котором потери урожая в стоимостном выражении равны стоимости затрат на предотвращение этих потерь (Филиппов, Немченко 2016).

И если было принято решение о обработке почв и посевов гербицидов, то встает вопрос о выборе препарата. И для упрощения процедуры подбора гербицидов, была так же создана классификация сорняков. Исходя из нее, сорные растения бывают однодольными и двудольными. Каждая из этих групп так же делится на малолетние и многолетние. При этом малолетние однодольные так же подразделяются на яровые и озимые, а малолетние двудольные на яровые, а также зимующие или двулетние. Малолетние отличаются тем, что размножение происходит только семенами, в отличии от многолетних, которые распространяются как семенами, так и корнями, корневищами, отпрысками.

Но иногда, применение гербицида не принесет ощутимых результатов, так как сейчас встречаются и так называемые супер-сорняки, это те виды, которые получили резистентность к гербицидам в результате передачи им половым путем генов устойчивости к гербицидам или мутации (Ranjan et al., 2020).

1.6.1 Амарант запрокинутый (*Amaránthus retrofléxus L.*)

В эксперименте, использовался амарант запрокинутый (*Amaránthus retrofléxus L.*) как один из самых распространенных сорняков.

Это однолетнее растение, высотой от 20 до 100 см. Имеет прямой, стебель, опущенный короткими волосками. Листья длиной 4-14 см и шириной 2-6 см, яйцевидные или яйцевидно-ромбические, кверху суженные, на верхушке иногда выемчатые, бледно-зеленые. Цветки собраны в плотные цилиндрические, в нижней части ветвистые, зеленые соцветия. Прицветники превышают листочки околоцветника почти вдвое, длинно и тонко заостренные. Плод раскрывающийся; семя около 1 мм в диаметре, темно-бурое. Цветет с июня по август, плодоносит в июле-сентябре.

Североамериканский вид, широко расселившийся по всем континентам и ныне космополит. Произрастает почти во всех районах России, в том числе обычен во всех областях средней России.

Растет по окраинам полей, в огородах, садах, по обочинам дорог, в населенных пунктах, на свалках и пустырях (Губанов и др., 2003).

Амарант относится к растениям быстрого роста, развивающим большое число жизнеспособных семян и имеющих полиморфическое прорастание в результате воздействия экологических и генетических факторов. По наблюдениям Г. Николовой семена *A. retroflexus* прорастают поздней весной при температуре почвы более 20 °C и созревают в августе-сентябре (Москова Ц., 2016).

Относится к растениям с C-4 путем фотосинтеза, то есть в первичном продукте – оксалоацетате содержится 4 атома углерода (Слонов, Шугушина, 2016).

1.6.2 Лебеда (*Atriplex* sp.)

Это однолетнее травянистое растение высотой до 70 см. Стебель прямой, ветвистый. Листья простые, очередные, черешковые цельнокрайние или зубчатые, от удлиненно-яйцевидных до ланцетных, серо-зеленого цвета, иногда краснеющие. Цветки собраны в плотные колосовидные соцветия. Цветет с июля до сентября, плодоносит с августа.

Распространена в Европе, на Кавказе, в Малой и Средней Азии, Северной Америке. В России растет почти по всей территории европейской части, на Северном Кавказе и в Сибири.

Растет вдоль дорог, на пустырях, вдоль берегов рек, как сорняк на полях и огородах. В посевах часто встречается в виде специализированной формы, до 10 см в высоту. Размножается семенами, одно растение может дать до 6000 семян (Губанов и др., 2003).

Так же, как и амарант запрокинутый (*Amaránthus retrofлексus* L.) относится к растениям с C-4 путем фотосинтеза (Слонов, Шугушина, 2016).

1.7 Культурные растения

Культурные растения (агрокультуры) — это растения, которые выращиваются человеком для получения пищевых продуктов, кормов, лекарств, промышленного и иного сырья и других целей. Потребляя их, человечество получает белки, углеводы, жирные масла, органические кислоты, витамины, глюкозиды и тд. (Жуковский, 1974).

Некоторые культурные растения из-за устройства своего генома изначально толерантны к гербицидам, но сейчас так же активно разрабатываются сорта с искусственной устойчивостью к действию гербицидов. Так, в 1984 году появился первый устойчивый к триазину сорт масличного рапса, он был получен путем селекции. Сейчас же, такие сорта можно получить путем применения генной инженерии.

Как правило, гербициды действуют на конкретный фермент, и небольшая искусственная мутация в конкретном сайте может стать источником толерантности.

Так же, толерантные растения можно получить при помощи сайт специфичного мутагенеза, как был получен сорт кукурузы с модифицированным ферментом ацетолактатсингазой и соответственно устойчивый к сульфонилмочевинам. Или же трансгенным путем, передавая ген, например от бактерий к растению (Ranjan et al., 2020).

В эксперименте, мы проводили инфильтрацию на растении латук посевной (*Lactuca sativa*). Это растение характеризуется голым стволом 30-70 см высотой, листьями постепенно кверху сильно уменьшающимися, почти горизонтальными, при этом нижние-крупные, округло-обратнояйцевидные или эллиптические, оттянутые в широкий черешок, по краю иногда волнистые и нередко шиповато-зубчатые; средние стеблевые листья-сидячие, с глубоко сердцевидным основанием.

Культурные сорта однолетники, разводимые от крайнего юга до севера, как в открытом, так и в закрытом грунте(теплицах). Листья салата богаты провитамином А и содержат витамины В1, В2, С, Р (по некоторым данным еще и витамином Е), так же в них много солей кальция и железа, растение содержит много фосфора (Шишгин и др., 1964).

1.8 Фотосинтез

Как источник энергии, свет является одним из важнейших факторов окружающей среды для роста и развития растений. Свет-одно из важнейших условий для реакций фотосинтеза (Xu et al., 2020).

Фотосинтез — это процесс, при котором энергия света превращается в химическую энергию. Для осуществления этого процесса, растения имеют в своей структуре специальные органеллы-хлоропласти.

В хлоропластах осуществляются многие важные метаболические пути, включая фотосинтез, производство жирных кислот и пигментов, синтез аминокислот. Они являются полуавтономными органеллами, то есть часть генетической информации находится и в их структуре, она называется пластомом и имеет длину 120-160 килобаз, а та часть что кодируется ядром посттрансляционно импортируется в хлоропласти (Kim et al., 2020).

Развитие хлоропластов в растениях регулируется скоординированной экспрессией генома ядер и хлоропластов, а также рядом скоординированных биологических процессов. Развитие хлоропластов начинается с пропластид, которые являются простыми, нефотосинтетическими, с малым количеством мембран круглыми органеллами. Процесс созревания индуцируется светом и начинается с образования длинных пластин внутри пропластиды, что приводит к образованию ювенильных хлоропластов, характеризующихся параллельными слоистыми гранами, но меньшими, чем у зрелых хлоропластов.

Позднее эти ламели превращаются в дискообразные структуры, которые собираются в стопки. В конце концов, сложная взаимосвязанная сеть тилакоидных мембран возникает в зрелых хлоропластах (Zhao et al., 2020).

Именно тилакоидные мембранны имеют огромную роль в процессе фотосинтеза. Эти высокоорганизованные мембранны вмещают практически все белковые комплексы и дополнительные соединения, осуществляющие световые реакции. Большинство регуляторных механизмов тонкой настройки фотосинтетических функций влияют на организацию тилакоидных мембранных на разных уровнях структурной сложности (Nagy, Garab, 2020). В состав тилакоидных мембранных входят фотосистемы I и II, АТФ-синтаза и b/f белковый комплекс.

1.8.1 Фотохимические реакции

Фотохимические реакции у зеленых растений осуществляются двумя фотосистемами: фотосистемой I и фотосистемой II. Фотосистема - это комплекс, состоящий из трех основных компонентов: светособирающего комплекса пигментов, поглощающих энергию света и передающих ее в реакционные центры, фотохимических реакционных центров, где происходит трансформация электромагнитной формы энергии в химическую и фотосинтетических электронтранспортных систем, обеспечивающих перенос электронов, сопряженный с запасанием энергии в молекулах АТФ.

Фотосистема, со всеми ее компонентами и ее стабильность необходимы для процесса фотосинтеза, и анализируя ее состояние, можно оценить фотосинтетическую активность или сделать вывод о характеристиках самого растения (Якушкина, 2004).

1.8.1.1 Светособирающие комплексы

Светособирающие комплексы, состоят из пигментов, связанных с тилакоидными белками, они поглощают световую энергию и направляют ее к реакционным центрам P680 в фотосистеме II и P700 в фотосистеме I (Koskela et al., 2020).

Пигменты — это окрашенные вещества, поглощающие свет определенной длины волны, считается что они поглощают до 90% входящего в лист света (Cavender-Bares, Gamon, Townsend, 2020). Выделяют особо важные для растения группы пигментов, такие как хлорофиллы, каротиноиды, ксантофиллы, антоцианы.

Хлорофиллы — это зеленые пигменты, у высших растений в составе преимущественно а и б.

По химическому строению хлорофиллы это сложные эфиры дикарбоновой органической кислоты-хлорофиллина и двух остатков спиртов фитола и метилового. Хлорофилл б отличается от хлорофилла а тем, что во втором пиррольном кольце метильная группа замещается на альдегидную (Якушкина, 2004).

В центре молекулы хлорофилла расположен атом магния, который соединен с четырьмя атомами азота пиррольных группировок. Он помогает поддерживать заряженное состояние электрона достаточно долго, чтобы перевести его в феофитин и оттуда до пластохинонов (Cavender-Bares, Gamon, Townsend, 2020). В пиррольных группировках хлорофилла имеется система чередующихся двойных и простых связей.

Это и есть хромофорная группа хлорофилла, обуславливающая поглощение определенных лучей солнечного света, так хлорофилл а в растворе имеет максимум поглощения на длинах волн 429 и 660 нм, а хлорофилл b на 453 и 642 нм.

Каратиноиды — это желтые и оранжевые пигменты алифатического строения, производные изопрена. Основные представители каратиноидов у высших растений это β -каротин и ксантофилл. Поглощение света, их окраска, а также способность к окислительно-восстановительным реакциям обусловлены наличием конъюгированных двойных связей. Поглощение каратиноидами происходит на длинах волн 482 и 452 нм.

Считается, что эти пигменты поглощают определенные участки солнечного спектра, передают энергию этих лучей на молекулы хлорофилла (Якушкина, 2004).

Каротиноиды, которые имеют кислород в своей структуре, известны как пигменты ксантофиллы. Они помогают регулировать энергию в хлоропласте и способствуют регуляции фотосинтетического функционирования. Например, обратимая связь между виолаксантином и зеаксантином изменяется, когда количество света растет от условий слабого освещения до условий высокого освещения, и вызывает небольшое увеличение отражательной способности около 530 нм, которое защищает реакционный центр фотосинтеза от излишка света (Cavender-Bares, Gamon, Townsend, 2020). Другие нефотосинтетические пигменты также поглощают свет, например антоцианы.

Антоцианы (и, в более общем случае, флавоноиды) обеспечивают фотозащиту от ультрафиолета, например, в альпийской среде или во время раннего развития листьев, когда механизм фотосинтеза не полностью развит. Наряду с фенольными соединениями антоцианы обеспечивают защиту молекул пигmenta во время старения (Cavender-Bares, Gamon, Townsend, 2020).

1.8.1.2. Фотохимические реакционные центры

Фотохимический реакционный центр — это образование, содержащее особую пару(димер) молекул хлорофилла а, которые характеризуются поглощением в наиболее длинноволновой части солнечного спектра и выполняют роль ловушки энергии возбуждения. Так же, в него входят молекулы первичного и вторичного акцептора электрона. Молекула хлорофилла, отдавая электрон первичному акцептору, окисляется, а электрон поступает в электрон-транспортную сеть. В соответствии с тем, что существует две фотосистемы, выделяют и два реакционных центра:

Фотохимический реакционный центр I-включает димер хлорофилла, поглощающий свет с длиной волны 700 нм;

Фотохимический реакционный центр II-включает димер хлорофилла, поглощающий свет с длиной волны 680 нм (Якушкина, 2004).

1.8.1.3 Электрон транспортная система

Это система, которая соединяет фотосистему I и фотосистему II, и позволяет передавать электроны от одной системы к другой. Она включает молекулы пластохинона, электрон транспортирующий белковый комплекс (b /f комплекс) и пластоцианин. Сами переносчики локализованы в мембранах ассиметрично, при этом чередуются переносчики электронов (цитохромы) с переносчиками электронов и протонов (пластохиноны).

Димер хлорофилла из реакционного центра II отдает возбужденный электрон далее по цепи переносчиков. Образовавшаяся «дыра» действует как сильный окислитель, и отнимает через ряд переносчиков электрон у воды. Этот электрон передаются на молекулы феофитина, затем на пластохиноны. Оттуда электроны передаются на электронтранспортирующий белковый комплекс, а затем через железосерный белок на цитохром f, в результате чего он восстанавливается и передает электрон пластоцианину, из-за чего снова окисляется.

Именно пластоцианин выполняет связующую роль между фотосистемой I и фотосистемой II, от пластоцианина электрон передается на фотосистему I (Якушкина, 2004).

Стоит добавить, что пул пластохинонов поддерживает окислительно-восстановительное равновесие между двумя фотосистемами, вызывая краткосрочные или долгосрочные ответы на изменение интенсивности света. Краткосрочная адаптация возникает за счет нефотохимического гашения и с помощью фосфорелирования и дефосфорелирования белков светособирающего комплекса II (Koskela et al., 2020).

1.8.2 Флуоресценция хлорофилла

Поглощение видимого фотона молекулой хлорофилла переводит электрон поглощающей молекулы на более высокий энергетический уровень. Обычно это возбужденное состояние хлорофилла является кратковременным и быстро возвращается в основное состояние. Возврат в основное состояние происходит при испускании кванта красной флуоресценции или испускании теплового излучения на ближней инфракрасной и более длинных длинах волн, или в фотосинтетических мембранах при выполнении фотохимических работ. Последние три пути конкурируют друг с другом. (Якушкина, 2004).

Используя флуориметрические методы анализа, можно определить некоторые параметры фотосистемы II, по ее состоянию можно адекватно оценить показатели фотосинтеза, к тому же, ее характеристики более стабильны (Ghassemi-Golezani, Hosseinzadeh-Mahootchi, Farhangi-Abriz, 2020).

Результатом флуоресцентного анализа являются кривые светового отклика или световые кривые, пример такой кривой на рисунке 4. Они описывают, как скорость фотосинтеза изменяется как функция света. Они предоставляют информацию о максимальной фотосинтетической способности, квантовом выходе, точке световой компенсации и эффективности использования листьев (Herrmann, Schwartz, Johnson, 2020).

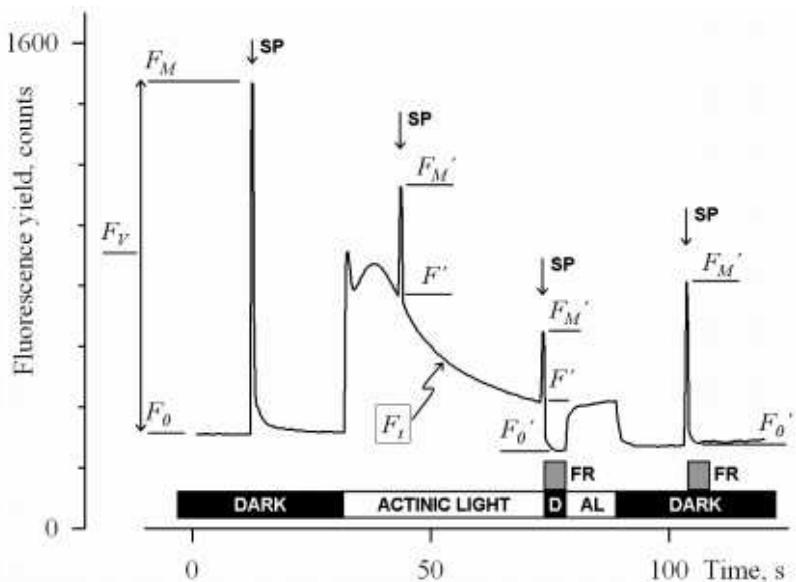


Рисунок 4-Пример кривой, полученной на флуориметре.

Оценка фотосистемы II и фотосинтетических реакций может проводиться по следующим коэффициентам и критериям:

F_0 -начальный(минимальный) уровень флуоресценции хлорофиллов при низкой интенсивности света, не вызывающий фотохимических реакций;

F_M -максимальный уровень флуоресценции хлорофиллов, вызванный импульсом света после адаптации тканей к темноте;

F'_M - максимальный уровень флуоресценции хлорофиллов, вызванный импульсом света после адаптации тканей к свету;

F_V - «вариабельность» Флуоресценции хлорофиллов, рассчитывается как разность F_0 и F_M ;

F' -флуоресценция хлорофиллов во время опыта и незадолго до применения насыщающего импульса;

$Y(II)$ -эффективный фотохимический квантовый выход-это та часть энергии возбуждения молекул хлорофиллов в составе фотосистемы II которая используется в процессе электронного транспорта;

$Y(II)_{max}$ -максимальный квантовый выход фотосистемы II-описывает фотохимический потенциал реакционных центров фотосистемы II (Ghassemi-Golezani, Hosseinzadeh-Mahootchi, Farhangi-Abriz, 2020);

Y(NPQ)-выход нефотохимического тушения- это механизм, существующий для защиты реакционных центров от излишка света, интенсивность которого превышает возможности электронного транспорта. Излишки энергии после поглощения квантов света частично диссирируются в виде тепла, этот механизм связан с взаимопревращениями ксантофиллов, как говорилось выше, само рассеивание происходит в виолаксантиновом цикле.

α -тангенс угла наклона световой кривой, отношение электроны/фотоны (Walz, 2009).

ETR_{max}-максимальная скорость переноса электронов по электрон транспортной цепи. По мере увеличения интенсивности ФАР плотность переноса электронов увеличивается. При этом реакционные центры ФС II остаются «открытыми».

Когда интенсивность ФАР превышает способность темновых реакций фотосинтеза усваивать накопленную энергию в виде НАД(Ф)-Н и АТФ, электроны начинают накапливаться, скорость окисления пулов пластохинонов снижается и реакционные центры ФС II «закрываются». Этот процесс регулируется скоростью фиксации СО₂ с участием РУБИСКО. В момент «закрытия» реакционных центров происходит так называемое «насыщение» фотосинтеза и дополнительное освещение не приводит к возрастанию плотности переноса электронов по ЭТЦ тилакоидных мембран. Поэтому при слишком сильной интенсивности ФАР или слишком длительном освещении, перенос электронов по ЭТЦ может начать снижаться (Смоликова и др., 2015).

2 Материалы и методы

2.1 Культура лебеды (*Atriplex sp.*), и амаранта запрокинутого (*Amaránthus retrofлексus L*)

Для эксперимента были использованы дикорастущие образцы амаранта запрокинутого (*Amaránthus retrofлексus L.*) и лебеды (*Atriplex sp.*), на стадии 2-3 настоящих листьев, всего 28 образцов, по 14 каждого вида. Они были пикированы и пересажены в 6 кювет, содержащих по четыре ячейки размером 8 см на 6 см, и высотой 6 см. На дне каждой ячейки был 1 сантиметр промытого и продезинфицированного мелкозернистого керамзита, остальной объем занимала почва, взятая из места произрастания растений. Кюветы с растениями размещались под люминесцентными лампами с фотопериодом 24 часа и поливались отстоянной водопроводной водой по мере необходимости, в течении недели, дабы отсеять не прижившиеся экземпляры. В течении эксперимента поддерживалась влажность на уровне 65% от насыщения.

Далее, готовились растворы гербицидов трибенурон-метила и метрибузина, концентрацией 0,5 мг/л. Этими растворами объемом 20 миллилитров однократно обрабатывалась почва в кюветах, не задевая само растение, в контрольные образцы вместо растворов гербицидов добавляли отстоянную водопроводную воду. Через 7, 8 и 12 дней были сняты показатели фотосинтетической активности.

2.2 Инфильтрация

Инфильтрация-метод, при котором межклетники листа заполняются какой-либо жидкостью, вместо воздуха.

Для проведения эксперимента нами были сделаны высечки из листа салата (*Lactuca sativa L.*), диаметром 1 см. После, высечки помещали в медицинский шприц объемом 20 мл, в который набирались растворы определенной концентрации, в частности 0,05; 0,5; 1; 2,5; 5 мг/л для метрибузина и 0,5; 1; 2,5 ; 5 мг/л для трибенурон-метила, и отстоянная водопроводная вода для инфильтрации контрольных образцов.

Далее, несколько раз оттягивался поршень шприца, до попадания в межклетники растворов. Это можно определить визуально, лист становился прозрачным и терял интенсивность окраски. После инфильтрации проводился флуориметрический анализ на приборе Junior-Pam. Для этого использовали магнитный фиксатор со смоченной дистиллированной водой фильтровальной бумагой и световод, который фиксировался на высечке. В ходе записи световой кривой фиксировались $Y(\text{II})$ -эффективный фотохимический квантовый выход фотосистемы II, $Y(\text{NPQ})$ -энергия не фотохимического тушения, ETR_{max} -максимальная скорость электронного транспорта, а-тangенс угла наклона линейного участка световой кривой.

2.3 Измерение активности фотосистемы II

Для анализа активности фотосинтетической системы, листья растений, выросших на почве, размещались на специальной площадке с флуоресцирующей бумагой размерами 1 на 1 см, и помещались в темноту приблизительно на 10 минут, а после в прибор Imaging-Pam MAXI, для измерения флуоресценции. Максимальный уровень флуоресценции, вызванный импульсом света после адаптации тканей растения к свету, выход нефотохимического тушения и флуоресценцию образца, замеренную незадолго до вспышки, записывали в режиме «световая кривая». Достоинством этого прибора является то, что возможно одновременно регистрировать параметры нескольких объектов, принадлежащих к разным видам и визуализировать основные показатели, а именно $Y(\text{II})$, $Y(\text{NPQ})$ и другие. Пример такой визуализации представлен на рисунках 5-6.

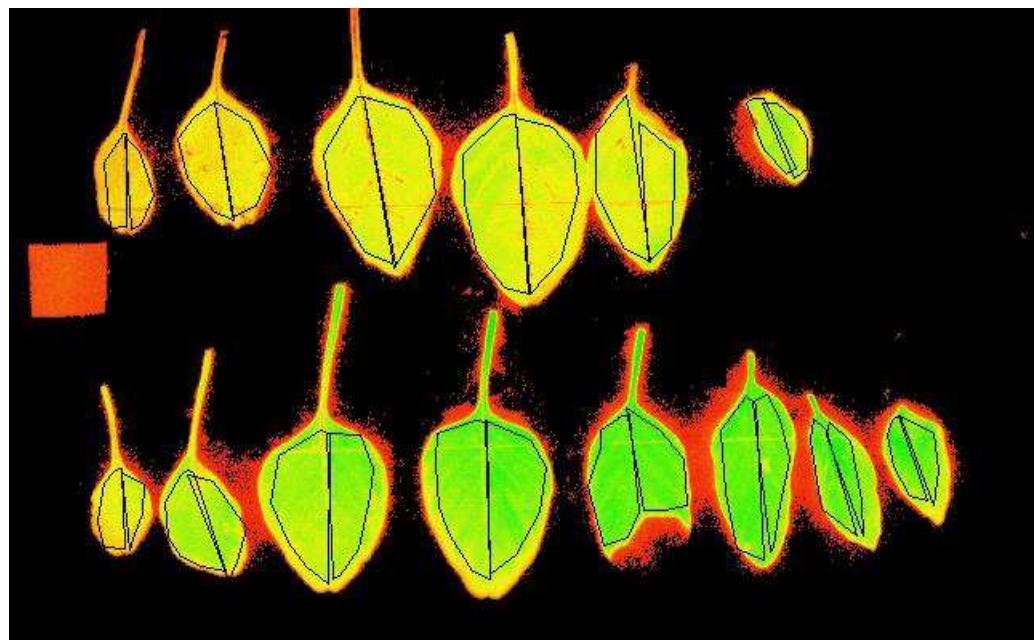


Рисунок 5-Пример визуализации F_{max} для амаранта запрокинутого (*Amaránthus retrofléxus L.*) на 7 сутки после полива, контрольные (верхний ряд) и обработанные метрибузином (нижний ряд) образцы

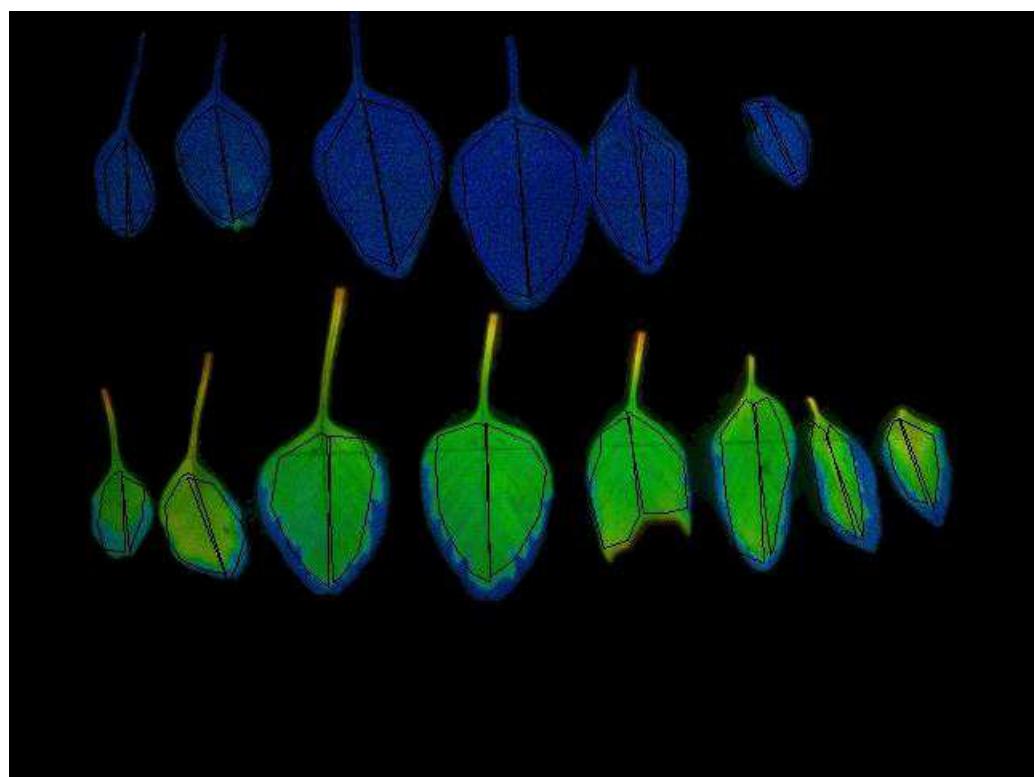


Рисунок 6-Пример визуализации Y(II)_{max} для амаранта запрокинутого (*Amaránthus retrofléxus L.*) на 7 сутки после полива, контрольные (верхний ряд) и обработанные метрибузином (нижний ряд) образцы

Эффективный фотохимический квантовый выход, тангенс угла наклона световой прямой и максимальная скорость переноса по электрон транспортной цепи высчитывались по формулам (1)-(3), приведенным ниже:

$$Y(II) = \frac{F'_M - F}{F'_M}, \quad (1)$$

где $Y(II)$ -Эффективный фотохимический квантовый выход;

F -флуоресценция образца незадолго до вспышки;

F'_M -максимальный уровень флуоресценции, вызванный импульсом света после адаптации тканей растения к свету.

$$ETR_{max} = PAR * Y(II) * ETR - factor * P_{PS2}/P_{PS1+2}, \quad (2)$$

где ETR_{max} -максимальная скорость переноса электронов по электрон транспортной цепи;

PAR -квантовая плотность потока фотосинтетически активной радиации, падающей на образец;

ETR -factor-описывает долю падающих фотонов, поглощенных образцом, как правило равен 0,84;

P_{PS2}/P_{PS1+2} -относительное распределение поглощенной ФАР в фотосистеме II, по умолчанию равно 0,5.

$$\alpha = 0,5 * 0,84 * Y(II)_{20}, \quad (3)$$

где α -это тангенс угла наклона световой кривой;

0,5 и 0,84-константы;

$Y(II)_{20}$ -эффективный фотохимический квантовый выход при $PAR=20$ (Walz ,2009).

2.4 Изучение пигментного состава

После проведения анализа флуоресценции, образцы помещались в бумажные пакеты с подписанным номером, и высушивались при комнатной температуре до воздушно-сухой массы и помещались в пакеты из фольги, после чего, хранились в темном месте, в холодильнике.

Для извлечения пигментов, образцы изымались из пакетов, взвешивались на торсионных весах и измельчались в керамической ступке, с добавлением стекла и карбоната кальция. В ступку добавлялось 2 мл 96% этанолового спирта, и через стеклянную воронку переливалось в пробирку, после 5 мл спирта промывалась воронка и ступка, их содержимое так же сливалось в пробирку. После каждого образца, ступка тщательно вымывалась и протиралась насухо. Полученные растворы ставили на водяную баню, нагретую до 75 градусов на 40 минут. Полученные экстракты вынимались, охлаждались и проводился спектрофотометрический анализ пигментного содержания.

Для этого, образец из пробирки переливался с помощью пипетки в стеклянную кювету толщиной 3 мм, кювета помещалась в спектрофотометр и замерялась оптическая плотность образца на длинах волн: 470, 649, 665, 720 нм. Оптическая плотность образца (A) на длине волны 470 нм позволяет вычислить концентрацию ксантофилов и каратиноидов, на длине волны 649 нм хлорофилла b, на длине 665 нм концентрацию хлорофилла a, а замер оптической плотности образца на длине волны 720 нм, позволяет исключить влияния на результаты мутности раствора и загрязнений на кювете (Кудряшов и др., 2011).

Далее, данные полученные на спектрофотометре обрабатывались, используя следующие формулы (4)-(7), приведенные ниже:

$$C_a = 13,36 * (A_{665} - A_{720}) - 5,19 * (A_{649} - A_{720}), \quad (4)$$

где C_a концентрация хлорофилла a в мг/л;

$$C_b = 27,43 * (A_{649} - A_{720}) - 8,12 * (A_{665} - A_{720}), \quad (5)$$

Где C_b концентрация хлорофилла b в мг/л;

$$C_k + C_{kc} = \frac{1000 * (A_{470} - A_{720}) - 2,13 * C_a - 97,64 * C_b}{209}, \quad (6)$$

где $C_k + C_{kc}$ - концентрация каратиноидов и ксантофиллов в мг/л;

Концентрацию пигментов в мкг/г сухой массы высчитывали о формуле (7):

$$C = \frac{C_p * V}{m}, \quad (7)$$

где С-концентрация пигмента в мкг/г сухой массы;

V-объем экстракта, то есть 7 мл;

m-масса сухой навески (Санникова и др.,2019).

2.5 Анализ почвы

Так же, нами был проведен анализ почвы, где произрастали растения.

Были определены такие характеристики как: содержание общего органического углерода, содержание подвижного фосфора, определение нитратного азота и pH почвы.

2.5.1 Содержание общего органического углерода

Содержание общего органического углерода вычислялось по методике Тюрина.

Для этого навеску почвы весом 0,05 грамм, помещали в колбу на 100 мл и заливали 10 мл 0,4 н раствора бихромата калия в разбавленной 1 к 1 серной кислоте. Содержимое аккуратно перемешивали, колбу закрывали холодильником для охлаждения водяных паров и помещали в нагретый до 140 градусов термостат на 20 минут. После извлечения пробы из термостата, холодильник обмывается небольшим количеством дистиллированной воды. Далее, к пробе добавляется 5-6 капель фенилантраниловой кислоты и смесь титруется 0,2 н раствором соли Мора до перехода окраски в зеленую.

Процент содержания органического углерода рассчитывают по формуле (8):

$$\frac{(a * N_{K_2Cr_2O_7} - b * N_{соли Мора}) * 0,003 * 100 * 1,724}{m}, \quad (8)$$

где а-количество раствора $K_2Cr_2O_7$ взятое для окисления;

б-количество соли Мора затрачено на титрование избытка хромовой кислоты;

m-масса навески;

0,003-молярная масса эквивалента углерода, г/моль;
 $N_{K_2Cr_2O_7}$ -нормальность $K_2Cr_2O_7$;
 $N_{\text{соли Мора}}$ -нормальность соли Мора;
1,724-соответствие содержания гумуса в 1 грамме углерода (Некрасова, 2008)

2.5.2 Содержание подвижного фосфора

Определение подвижного фосфора осуществлялось методом Чирикова. Для этого, в колбу объемом 100 мл помещалось 2 грамма почвы. После добавлялось 50 мл уксусной кислоты и взбалтывалось на ротаторе в течении 2-х часов. Полученную суспензию отфильтровывали через сухой бумажный фильтр. В мерную колбу добавлялось 5 миллилитров суспензии и доводилось до метки раствором, состоящим из смеси молибденовокислого аммония, сурьмяновиннокислого калия, аскорбиновой кислоты и дистиллированной воды, после чего смесь хорошо перемешивалась. После появления синей окраски раствор отстаивается 10 минут, и его колориметрируют на фотоэлектроколориметре, используя красный светофильтр с максимумом пропускания 600-750 нм и чувствительностью равной 2.

Так же, был построен калибровочный график. После, для расчета подвижных форм фосфора используется формула (9):

$$C = \frac{a * P * 100 * k}{H}, \quad (9)$$

где C-содержание P_2O_5 в мг на 100 грамм сухой почвы;

a-содержание фосфора в образце, выявленное по калибровочному графику;

P-разведение (равно 10);

100-100 г почвы;

K-коэффициент влажности почвы;

H-навеска почвы, в граммах (ГОСТ 26204-84).

2.5.3 Определение нитратного азота

Определение нитратного азота осуществлялось ионометрическим методом. Для этого пробу почвы массой 10 грамм помещают в колбу на 100 мл и приливают 50 мл 1% раствора алюмокалиевых квасцов, после чего помешивают в течении 3х минут и фильтруют через сухой бумажный фильтр. Электроды иономера опускают в фильтрат и считывают показания прибора, не ранее чем через 1 минуту после прекращения дрейфа показаний. Так же, был построен калибровочный график, и значения, полученные из графика, были переведены в мг/кг, с помощью специальной таблицы, а так же в нитратный азот, используя формулу (10):

$$N\text{-NO}_3 = NO_3^- * 0,226, \quad (10)$$

где $N\text{-NO}_3$ нитратный азот, мг/кг почвы;

0,226-коэффициент пересчета содержания нитратов в нитратный азот;

NO_3^- —содержание нитратов по калибровочному графику (Мудрых, Алешин, 2011).

2.5.4 Определение pH почвы

Для определения в почве pH применялся потенциометрический метод. Для этого 10 г почвы помещают в стакан на 100 мл и заливают 25 мл дистиллированной воды. Содержимое перемешивают 1-2 минуты и оставляют отстаиваться на 5 минут. Перед измерением суспензию еще раз перемешивают и опускают в нее электроды измерения и сравнения, через минуту, отсчитывают по шкале pH соответствующее измеряемой почвенной суспензии. Для измерения pH солевой суспензии, вместо воды добавляется 25 мл 1 н раствора KCl (Мудрых, Алешин, 2011)

2.6 Статистическая обработка данных

2.6.1 t-критерий Стьюдента для независимых выборок

Для статистической обработки данных использовался t-критерий Стьюдента, формулы для расчета которых с (11) по (14) приведены ниже. Для его применения сначала находится среднее арифметическое в выборке, по формуле (11):

$$M_x = \frac{\sum x_i}{n}, \quad (11)$$

где M_x – среднее арифметическое;

$\sum x_i$ – сумма значений;

n -количество значений.

Так же, вычисляем стандартное отклонение, по формуле (12):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - M_x)^2}{n-1}}, \quad (12)$$

где x_i -значение параметра.

После, рассчитываем t-критерий Стьюдента, применяя формулу (13):

$$t = \frac{M_{x1} - M_{x2}}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}}, \quad (13)$$

где M_{x1} -среднее арифметическое первой выборки;

M_{x2} -среднее арифметическое второй выборки;

σ_1 -стандартная ошибка среднего первой выборки;

σ_2 -стандартная ошибка среднего второй выборки;

Высчитываем количество степеней свободы, по формуле (14):

$$F = (n_1 + n_2) - 2, \quad (14)$$

где n_1 -количество значений в первой выборке;

n_2 -количество значений во второй выборке;

После, по таблице определяется критическое значение t-критерия Стьюдента.

Сравниваем полученный по формуле t-критерий Стьюдента и критическое значение t-критерия Стьюдента из таблицы. Если рассчитанное значение t-критерия Стьюдента равно или больше критического значения t-критерия Стьюдента, значит различия между сравниваемыми значениями статистически значимы. Если же рассчитанное значение t-критерия Стьюдента менее критического значения t-критерия Стьюдента из таблицы, значит различия между сравниваемыми значениями статистически не значимы. Для выяснения t-критического значения был выбран уровень значимости 0,02 (Гланц, 1999).

2.6.2 Критерий Даннета

Поскольку в исследовании опытные группы сравниваются с контрольной, то логично использовать один из критериев для множественного сравнения с контрольной группой. Критерий Даннетта вычисляется по формулам с (15) по (17). Они приведены ниже. Уровень значимости был равен 0,05.

Сам критерий высчитывается по формуле (15):

$$q' = \frac{\bar{X}_{\text{кон}} - \bar{X}_a}{\sqrt{s_{\text{вну}}^2 * \left(\frac{1}{n_{\text{кон}}} + \frac{1}{n_a} \right)}}, \quad (15)$$

где $\bar{X}_{\text{кон}}$ -среднее арифметическое контрольной выборки;

\bar{X}_a -среднее арифметическое опытной выборки;

$s_{\text{вну}}$ -оценка внутригрупповой дисперсии;

$n_{\text{кон}}$ -количество значений в контрольной выборке;

n_a -количество значений в опытной выборке;

При этом количество степеней свободы вычисляется по формуле (16):

$$v=N-m, \quad (16)$$

где m-число групп;

N-сумма численностей всех групп.

А $s_{вну}^2$ рассчитывается с применением формулы (17):

$$s_{вну}^2 = \frac{1}{m} (\sum \sigma_i^2), \quad (17)$$

где σ_i -стандартные отклонения выборок.

Так же, для сравнения ищем в специальных значениях критическое q' , для выбранного уровня значимости (Гланц, 1999).

Все расчетные задачи рассчитывались с помощью пакета Microsoft Office Excel.

Заключение

Анализируя представленные выше данные, можно сделать следующие выводы:

1)Послевсходовое внесение гербицида трибенурон-метил, ингибирующего ацетолактатсингазу не оказало достоверного влияния на фотосинтетическую активность двух сорных видов амаранта запрокинутого (*Amaránthus retrofлексus L.*) и лебеды (*Atriplex sp.*), что подтверждается на основе изучения следующих характеристик: тангенса угла наклона световой кривой, максимальной скорости электронного транспорта, квантового выхода и нефотохимического тушения флуоресценции.

2)Послевсходовая обработка препаратом метрибузин, ингибирующим фотосинтез приводит к снижению тангенса угла наклона световой кривой, максимальной скорости электронного транспорта, квантового выхода и нефотохимического тушения флуоресценции для лебеды (*Atriplex sp.*) и амаранта запрокинутого (*Amaránthus retrofлексus L.*)

3)Два вида изученных сорных растений показали различную устойчивость к препаратам трибенурон-метилу и метрибузину: по показателям нефотохимического и фотохимического транспорта более устойчив вид амарант запрокинутый (*Amaránthus retrofлексus L.*), а по показателям световой кривой электронного транспорта-большую устойчивость имеет лебеда (*Atriplex sp.*).

4) Послевсходовая обработка гербицидами не оказала достоверного влияния на состав фотосинтетических пигментов.

5)Инфильтрация раствора в межклетники листа салата (*Lactúca satíva*) в концентрации, существенно превышающей рекомендованные нормы внесения гербицида, оказывает влияние на световую зависимость нефотохимического тушения флуоресценции.

Список использованных источников

- 1) Гольд В.М. Физиология растений: конспект лекций [Электронный ресурс]/ В. М. Гольд, Н. А. Гаевский, Т. И. Голованова, Н. П. Белоног, Т. Б. Горбанева.-Красноярск: ИПК СФУ,2008 .-148с.
- 2) ГОСТ 26204-84 Почвы. Определение подвижных форм фосфора и калия по методу Чирикова в модификации ЦИНАО.-Введ.01.07.1993.-Москва: Стандартинформ,2007.-8с.
- 3)ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.-Введ. 01.01.1997.-Москва: Стандартинформ, 2007.-10 с.
- 4)Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации по состоянию на 16 июня 2020 г. Часть I. Пестициды. М:Минсельхоз России, 2020.-775 с.
- 5)Гланц.С. Медико биологическая статистика/С.Гланц, пер. с анг.-М:Практика,1998.-459 с.
- 6) Груздев, Г.С. Химическая защита растений/Г.С. Груздев, В.А. Зинченко, В.А. Калинин, Р.И Словцов, Л.Г. Груздев. -3-е изд. перераб и доп.-М: Агропромиздат,1987.-415 с.
- 7) Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России в 3т./И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров.-М:Т-во науч. изд. КМК, Ин-т технолог. иссл., 2003. — Т. 2.-663 с.
- 8) Жуковский, П.М. Культурные растения // Жизнь растений : в 6 т. / гл. ред. Ал. А. Фёдоров. — М. : Просвещение, 1974. — Т. 1. — 487 с.
- 9) Захаренко В.А. Гербициды/В. А. Захаренко.-М: Агропромиздат,1990.-240 с.
- 10)Кошкин, Е.И. К проблеме конкуренции культурных и сорных растений в агрофитоценозе/Е.И. Кошкин//Известия ТСХА.-2016.-№ 4.- с. 53-68.

- 11)Кудрявец, Ю.А. Биологически активные соединения в ряду сульфонилмочевины/Ю.А. Кудрявец, В.Н. Леонтьев, Т.И. Ахрамович, С.В. Сорока//Труды БГУ.-Минск:БГУ.-2010.-Т.5, ч.1.-с. 236-242.
- 12) Кудряшов, А.П. Физиология растений : лабораторный практикум для студентов биологического факультета [Электронный ресурс] / А. П. Кудряшов, Т.И. Дитченко, О.В. Молчан, И.И. Смолич, О.Г. Яковец. – Минск : БГУ, 2011.-76 с.
- 13) Куликова, Н.А. Гербициды и экологические аспекты их применения: учебное пособие/Н.А.Куликова, Г.Ф. Лебедева.-М: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2010.-152 с.
- 14) Леонтьев, В.Н. Естественные пути деградации гербицидов ряда сульфонилмочевины/В.Н Леонтьев, Т.И Ахрамович, О.С. Игнатовец, О.И. Лазовская//Труды БГТУ.Химия, технология органических веществ и биотехнология.-2013.-№4(160).-с. 197-204
- 15) Мельников, Н.Н. Пестициды. Химия, технология и применение/Н.Н. Мельников-М.:Изд. Химия, 1987.-712 с.
- 16)Москова, Ц. Фенология Amaranthus blitoides L. И A. Albus L. в агрометеорологических условиях Болгарии/ Ц. Москва, М. Титянов, Б. Благоев.///Плодоводство и ягодоводство России.-2016.-№46.-с.237-241
- 17) Мудрых Н.М. Пособие к лабораторным занятиям по агрохимии [Электронный ресурс]/Н.М. Мудрых, В.А. Алёшин.-Пермь: ФГБОУ ВПО Пермская ГСХА,2011.-52 с.
- 18) Накаева А.А.О конкурентоспособности полевых культур/А.А. Накаева, З.П. Оказова//Успехи современной науки.-2017.-Т.2-№12.-с.191-194
- 19) Некрасова О.А. Методы анализа органического вещества почв: руководство к лабораторным занятиям [Электронный ресурс]/О.А. Некрасова.-Екатеринбург: УрГУ им. Горького, 2008.-107с.

- 20) Никифоров, В.М. Применение современных гербицидов при возделывании яровой пшеницы/В.М. Никифоров, А.Л. Силаев, Г.В Чекин, Е.В. Смольский, М.И Никифоров, М.М. Нечаев//Вестник Брянской Государственной Сельскохозяйственной академии.-2018.-№1(65).-с.23-27
- 21) Попов, С.Я. Основы химической защиты растений/С.Я. Попов, Л.А. Дорожкина, В.А. Калинин/под ред. С. Я. Попова.-М: Арт-Лион,2003.-208 с.
- 22) Санникова Е.Г. Определение пигментов в сырье ивы трехтычинковой (*salix triandra L.*) методами тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии/Е.Г. Санникова, Е.В Компанцева, О.И. Попова, А.Ю. Айрапетова//Химия растительного сырья.-2019.-№2.-с. 119-127
- 23) Сибикеева, Ю.Е. Сорняки-союзники грибов-фитопатогенов/Ю.Е.Сибикеева,С.Ю.Борисов//Защита и карантин растений. - 2013.-№3.-с.54-56
- 24) Слонов Л.Х. Фотосинтетический аппарат и продуктивность амаранта-С4 группы растений [Электронный ресурс]/Л.Х.Слонов, Л.Х. Шугушева, Т.Л. Слонов//Современные проблемы науки и образования.-2016.-№2.-режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24191>
- 25) Смоликова, Г.Н. Динамика фотохимической активности фотосистемы II при формировании семян *Brassica Nigra L.*/ Г.Н Смоликова, В.Н. Лебедев, В.Е. Лопатов, В.А, Тимощук, С.С. Медведев//Вестник Санкт-Петербургского университета.-2015.-№3.-с.53-65
- 26)Филиппов А.С. Технологии применения гербицидов на зерновых культурах в условиях минимализации обработки почвы/А.С. Филиппов, В.В. Немченко.-Куртамыш:ООО «Куртамышская типография», 2016.-100 с.
- 27) Чкаников Н.Д. Пути снижения фитотоксичности остатков сульфонилмочевин в почве с помощью антидотов/Н.Д Чкаников, Ю.Я. Спиридонов, С.С. Халиков, А.М.Музрафов //Агрохимия.-2020.-№5.-с.86-96

28)Шишкин, К.Б. Флора СССР:в 30-и т./К.Б. Шишкин, А,Г Борисова, В.Н. Васильев,И.Т Васильченко, М.Э. Кирпичников, Т.Г. Леонова, С.Ю. Липшиц, Н.Н. Цвелеи, С.К. Черепанов/ред. Е.Г. Бобров, Н.Н. Цвелев.-М.-Л.: «Наука», 1964.-т.29.-797с.

29) Якушкина, Н.И. Физиология растений/Н.И. Якушкина, Е.Ю. Бахтенко.-М:ВЛАДОС, 2004.-463с.

30)Agostinetto D.Changes in photosynthesis and oxidative stress in wheat plants submmited to herbicides application/D. Agostinetto, L.T. Perboni,A.C. Langaro,J.Gomes, D.S. Fraga, J.J. Franco//*Planta Daninha*.-2016.-V.34.-№ 1.-p. 1-9

31)Boyandin A.N. Constructing Slow-Release Formulations of Metribuzin Based on Degradable Poly(3-hydroxybutyrate)/ A. N. Boyandin, N. O. Zhila, E. G. Kiselev, T. G. Volova//*Journal of agricultural and food chemistry*.-2016.-№64.-p.5625-5632

32) Cavender-Bares J. Remote sensing of plant biodiversity[Электронный ресурс]/J. Cavender-Bares, J.A. Gamon, P.A. Townsend.-Springer Open.-Режим доступа: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-33157-3>.-2020.-581 p.

33)Ghassemi-Golezani K. Chlorophyll *a* fluorescence of safflower affected by salt stress and hormonal treatments[Электронный ресурс]/ K. Ghassemi-Golezani, A. Hosseinzadeh-Mahootchi, S. Farhangi-Abriz// *SN Applied Sciences*.-2020.-№2:1306.-режим доступа: <https://doi.org/10.1007/s42452-020-3133-1>

34) Herrmann H. A. From empirical to theoretical models of light response curves - linking photosynthetic and metabolic acclimation/ H. A. Herrmann, J.M. Schwartz, G. N. Johnson// *Photosynthesis Research*.-2020.-№145.-p.5-14

35)Kim G.B. Comparative chloroplast genome analysis of *Artemisia* (Asteraceae) in East Asia: insights into evolutionary divergence and phylogenomic implications[Электронный ресурс]/ G.B. Kim, C. E. Lim, J.S. Kim, K. Kim, J. H.Lee, H.J. Yu, J.-H. Mun// *BMC Genomics*.-2020.-№21:(415).-режим доступа: <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06812-7>

36) Koskela M.M. Comparative analysis of thylakoid protein complexes in state transition mutants *nsi* and *stn7*: focus on PSI and LHCII/ M. M. Koskela, A. Вънje, A. Ivanauskaite, L. S. Lopez, D. Schneider, R. A. De Tar, H.H. Kunz, I. Finkemeier, P. Mulo// Photosynthesis Research.-2020.-№145.-p.15-30

37)Lian J. How exposure to ALS-inhibiting gametocide tribenuron-methyl induces male sterility in rapeseed[Электронный ресурс]/ Jing-long Lian, Li-Suo Ren, Cong Zhang, Cheng-Yu Yu, Zhen Huang, Ai-Xia Xu, Jun-Gang Dong//BMC Plant Biology.-2019.-№19(1):124.-режим доступа: 10.1186 / s12870-019-1722-1.-22 p.

38) Lun Zhao, Tribenuron-Methyl Induces Male Sterility through Anther-Specific Inhibition of Acetolactate Synthase Leading to Autophagic Cell Death/Xue Jing, Li Chen, Yingjun Liu, Yanan Su, Tingting Liu, Changbin Gao, Bin Yi, Jing Wen, Chaozhi Ma, Jinxing Tu, Jitao Zou, Tingdong Fu, Jinxióng Shen//Molecular Plant. -2015.-Volume 8, issue 12.-p.1710-1724

39)Mehdizadeh M. Impacts of different organic amendments on soil degradation and phytotoxicity of metribuzin/Mohammad Mehdizadeh, Ebrahim Izadi-Darbandi, Mohammad Taghi Naseri Pour Yazdi, Mehdi Rastgoo, Bizhan Malaekah-Nikouei, Hooriyeh Nassir//International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture.-2019.-№8.-p.113-121

40)Nagy G. Neutron scattering in photosynthesis research: recent advances and perspectives for testing crop plants[Электронный ресурс]/ G. Nagy, G. Garab// Photosynthesis Research.-2020.-режим доступа: <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00763-6>

41) Qingyan Zhou. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides/ Zhou Qingyan, Liu Weiping, Zhang Yongsong, Liu K.Kevin//Pesticide biochemistry and Physiology.-2007.-№89(2).-p.89-96

42)Ranjan P. N. Breeding for herbicide tolerance in crops: a review/ Prakash Nitish Ranjan, Chaudhary Jeet Ram, Tripathi Anurag ,Joshi Nilesh, Padhan Birendra Kumar, Yadav Suresh, Kumar Santosh, Kumar Rahul// Research journal of biotechnology.-2020.-V. 15(4).-p.154-162

43)Saja D. Metabolic response of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) exposed to tribenuron-methyl: one of the active substances of sulfonylurea herbicides/ Diana Saja, Magdalena Rys, Iwona Stawoska, Andrzej Skoczowski//Acta physiologiae Plantarum.-2016.-№38(168).-13 p.

43)Schwenger-Erger C. Decreased Rate of Degradation of the D1 Protein in Metribuzin-resistant Photoautotrophic *Chenopodium rubrum* Cell Cultures/ C. Schwenger-Erger, W. Barz// Journal of plant physiology.-2000.-V.156.-p.458-462

45)Walz H. Junior-PAM. Chlorophyll fluorometer. Operator's guide.-2009.-58 p.

46) Xu Y. Effects of LED photoperiods and light qualities on in vitro growth and chlorophyll fluorescence of Cunninghamia lanceolate[электронный ресурс]/ Y.Xu, M. Yang, F. Cheng, S. Liu, Y. Liang// BMC Plant Biology.-2020.-№20:269.-режим доступа: <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02480-7>

47)Zhao X. Disruption of carotene biosynthesis leads to abnormal plastids and variegated leaves in *Brassica napus*/ Xiaobin Zhao, Kaining Hu, Mengjiao Yan, Bin Yi, Jing Wen, Chaozhi Ma, Jinxiong Shen, Tingdong Fu, Jinxing Tu// Molecular Genetics and Genomics.-2020.-№295.-p. 981-99

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

Гладышев

подпись

М.И. Гладышев

инициалы, фамилия

«1 » июля 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

код и наименование специальности

Действие ингибитора ацетолактатсинтазы на показатели

фотосинтеза растений

тема

Руководитель

Гаев

подпись, дата

профессор д.б.н.

должность, ученая степень

Н.А. Гаевский

инициалы, фамилия

Выпускник

Мелехова

подпись, дата

А.А. Мелехова

инициалы, фамилия

Красноярск 2020