

József Attila Tudományegyetem

Biofizika Tanszék

A CONYZA /ERIGERON/ CANADENSIS CRONQ. /L./

HERBICID-REZISZTENCIÁJA

Doktori értekezés

Pölös Endre

SZEGED

1984.



B 2387

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi összefoglaló	5
2.1. Fotoszintézisgátló herbicidek hatásmechanizmusa	5
2.2. A triazin-rezisztencia megjelenése, a triazin-rezisztens gyombiotípusok elterjedése	13
2.3. A triazin-rezisztencia fiziológiai és biokémiai jellemzése	19
3. Disszertáció célkitűzései	35
4. Anyag és módszer	36
5. Kísérleti eredmények	46
5.1. A <i>Conyza canadensis</i> triazin érzékenységének vizsgálata levélkorong módszerrel	46
5.2. ^{14}C -atrazin felvétele és transzlokációja	48
5.3. $^{14}\text{CO}_2$ -fixáció	51
5.4. Hill-reakció gátlása herbicidekkel	51
5.5. Fotoszintetikus elektrontranszportlánc jellemzése fluoreszcencia indukció módszerével	56
5.6. Triazin-rezisztens és -szenzitív <i>Conyza canadensis</i> levelek alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia szinképe	60
5.7. A kloroplasztisz membrán lipid- és zsírsavanalízise	60
5.8. Hill-reakció aktivitásának vizsgálata a hőmérséklet függvényében	65
5.9. A triazin-rezisztens <i>Conyza canadensis</i> elleni kémiai védekezés lehetőségei	69
6. Eredmények megvitatása	79
7. Összefoglalás	89
8. Rövidítések	91
9. Irodalomjegyzék	93

1. BEVEZETÉS

A szántóföldi és a kertészeti növénytermesztésben a termés-csökkentő tényezők között elsődleges szerepük van a gyomnövényeknek. A veszteség világviszonylatban még napjainkban is elérheti a 20-25 %-ot. A mezőgazdaság kemizálódásának fejlődésével a gyomok elleni védelemben a gyomirtószer-ek, a herbicidek kerültek előtérbe. A herbicidkutatás történetében hormonbázisú gyomirtószer-ek gyakorlatba történő bevezetése után nagy előrelépést jelentett a gyökérherbicidként alkalmazott fotoszintézis gátló triazin herbicidek felfedezése. A herbicidkutatási eredmények birtokában a mezőgazdasági gyakorlat a teljes gyommentességet kívánta megvalósítani. A maximális gyommentességre való törekvés nemcsak a gyomflóra faji spektrumának kedvezőtlen megváltozását idézte elő /nehezebben leküzdhető, rezisztens fajok dominálnak/, hanem az egyes gyomfajok morfológiai /modifikációs/ és genetikai /mutációs/ megváltozásait is, új bio- és ökotípusok, toleráns /tűrőképes/ vagy éppen rezisztens /ellenállóképes/ biotípusok alakulnak ki.

Az elmúlt 10-15 évben különböző földrajzi körzetekből számolnak be a gyomnövények triazin rezisztenciájáról. Több mint 20 gyomnövényfaj triazin-rezisztens biotípusát irták le. E gyombiotípusok kö-

zős jellemzője, hogy olyan területeken fordultak elő és terjedtek el, amelyeken a triazin hatóanyagú herbicideket ismételten, más herbicidekkel nem, vagy csak kis mértékben váltogatva alkalmazták. Az *Amaranthus retroflexus*, a *Chenopodium album*, *Senecio vulgaris*, *Brassica campestris* rezisztencia mechanizmusát részletesen is tanulmányozták.

A triazin-rezisztencia kutatásakor kapott információk sokrétűen felhasználhatók:

1. A gyomnövények rezisztenciáját kialakító tényezők, és a rezisztencia mechanizmusának ismeretében megelőzhetjük a herbicid-rezisztencia kialakulását más herbicidek, gyomnövények esetén.
2. Alapját képezik eredményes gyomirtási technológiák kidolgozásának. A herbicidkutatás fejlődési tendenciáját tekintve nem valószínű, hogy új herbicidek bevezetésével a közeljövőben jelentősen bővülne a rendelkezésünkre álló herbicidek arzenálja. Így meg kell tanulnunk a rendelkezésre álló herbicidekkel "gazdálkodni".
3. A triazinok a II. fotokémiai rendszer /PS-2/ elektrontranszportjának inhibitorai, hatásmódjuk vizsgálatakor kapott eredmények a fotoszintézis-kutatásban is felhasználhatók.
4. Nemesítési program indult azzal a céllal, hogy triazin-rezisztencia tulajdonságot átvigyék a kulturnövényekbe.

Vizsgálati objektumunk, a *Conyza canadensis* napjainkban a szőlőültetvények legjelentősebb egy-nyári gyomnövényévé vált /1. ábra/. Hazánkban a szőlőültetvények gyomirtására több éven át sz-triazin hatóanyagú herbicideket /Aktikon, Hungazin PK, Hungazin DT, Buvinol 50 WP, Caragard Combi 50 WP/ alkalmaztak, amely a *Conyza canadensis* triazin-rezisztens biotípusának felszaporodását eredményezte /2. ábra/. A *Conyza canadensis* triazin-rezisztencia természetére és mechanizmusára vonatkozó adatokkal a szakirodalomban azonban nem találkozunk. A dolgozat célja a *Conyza canadensis* triazin-rezisztencia természetének és fiziológiai okainak felderítése, a herbicid-rezisztencia kutatásában általánosan alkalmazott módszerek segítségével, a rezisztens biotípus elleni hatékony gyomirtási technológia kidolgozása.



1. ábra

A szőlőültetvényekben elszaporodott *Coryza canadensis* jelentősen károsítja a szőlőt



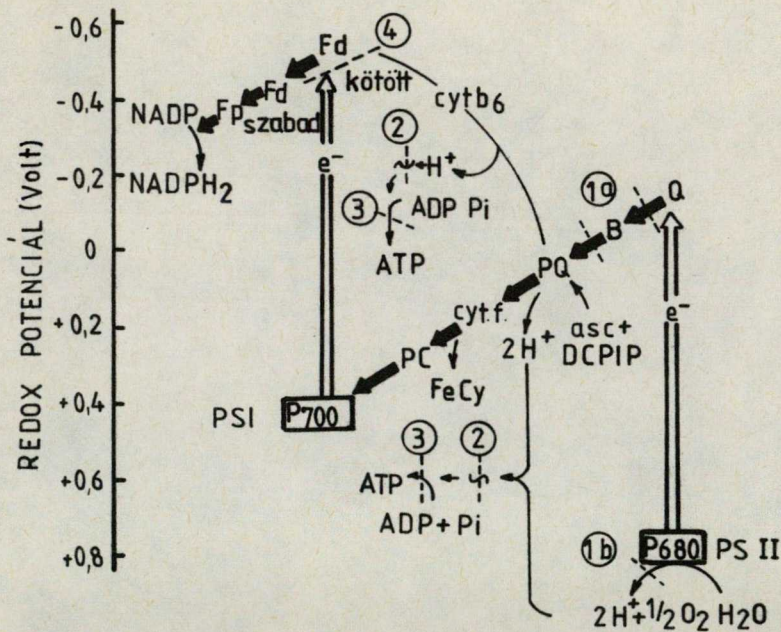
2. ábra

A Caragard Combi 50 WP-vel kezelt szőlősorokban a *Coryza canadensis* kisselektálódott

2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

2.1. Fotoszintézis-gátló herbicidek hatásmechaniz- musa

A fotoszintézis-gátló herbicidek, triazinok, karbamidok, karbamátok, uracilek hatásukat tekintve fotoszintetikus elektrontranszport lánc gátló vegyületek. Szerkezetileg különféle herbicidekről mondták ki, hogy gátolják a fényindukálta elektrontranszportot és az ahhoz kapcsolt foszforilációt. Ezek a kloroplaszt lamelláris membránjaiban végbemenő reakciók sematikusán a 3. ábra szerint vázolhatók. A fotoszintézis gátlása az elsődleges hatás, amelyet azután az ebből eredő, sokféle másodlagos hatás is követ /VARGA, 1980/.



3. ábra: A fényindukálta elektrontranszport és a fotofoszforilációs reakciók sémája /MORELAND, 1980/



Az 1a, 1b, 2, 3 és 4 számok jelzik a herbicidek hatásának feltételezett helyeit.

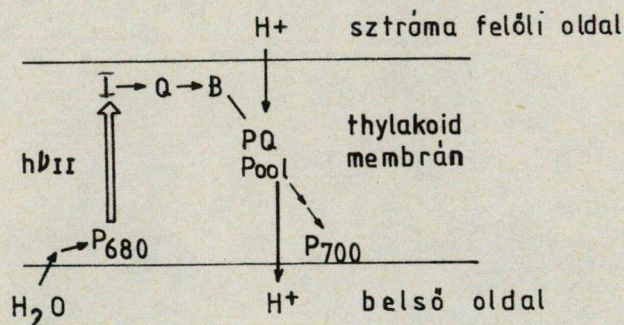
Moreland /1980/ a fotoszintézist gátló herbicideket, a frissen izolált kloroplasztokban előidézett hatásaik alapján az alábbi csoportokra különítette el:

- a./ elektrontranszport inhibitorok
- b./ szétkapcsolók
- c./ energiáttranszfer inhibitorok
- d./ gátló szétkapcsolók /többszörösen gátlók/
- e./ elektronakceptorok

A triazin herbicidek elektrontranszport inhibitorok, ezért e folyamatot tárgyaljuk részletesen.

2.1.1. A II. fotokémiai rendszer /PS-2/ elektrontranszportjának herbicidgátlása

A fénytől függő elektrontranszportot a II. fotokémiai rendszerben a 4. ábra szemlélteti.

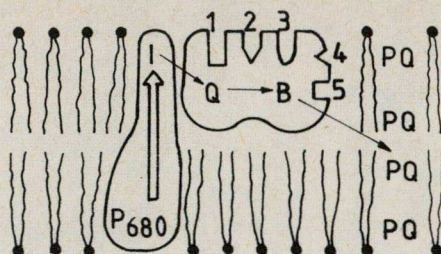


4. ábra: A PS-2 elektrontranszportja

A II. fotokémiai rendszer /P₆₈₀/ klorofill a-jának reakciócentruma megvilágítás hatására elektront küld

az elsődleges elektron-akceptornak /I./. Ez a legújabb vizsgálatok szerint feofitin is lehet /KLIMOV et. al. 1980/. Ez egy elektront szállít az első stabil akceptorhoz /Q/. Ezt a fényindukált fluoreszcencia hatásfokának csökkenése alapján kioltónak /quenchernek/ nevezték el /DUYSENS, - SWEERS 1963/. Feltételezik, hogy a Q speciális plasztokinon-molekula, és a megvilágítás hatására 1 ns-nál is rövidebb idő alatt $Q^{\cdot-}$ szemikinonná redukálódik, amely már nem kioltó. Ez tovább szállítja az elektronjait egy másik kötött kinonhoz, a másodlagos elektron-akceptorhoz, melyet Bouges-Bocquet /1973/ B-nek, Velthuys és Ames /1974/ R-nek nevez. A B 2 elektront szállít, párosával akumulálva őket, mielőtt a plasztokinongyűjtőhöz /PQ-pool/ szállítja. A PQ-pool-tól az elektronok az I. fotorendszerhez szállítódnak. Az elektron áramlás során a Q és a B nem válik protonálttá, mint a PQ. Ennek a különbségnek az oka valószínűleg az, hogy a Q-t és a B-t protein szerkezet védi a sztrómától /RENGER, 1976/. Mérsékelt tripszines emésztés hatására a Hill-reakció DCMU-gátlásának csökkenése tapasztalható. A tripszines kezelés részlegesen leemésztí a proteines védőburkot, amely a lipofil elektronakceptort a külső vizes fázistól védi. Ez a proteinkomponens a Q és a PQ-pool közötti elektrontransport allosztérikus szabályozója. Ez a protein tartalmazza a DCMU-típusú inhibitorok kötőhelyeit, ez

a gátlás allosztérikusan hat. Ezt a herbicidkötő proteint Q_B proteinnak nevezték el /5. ábra/.



5. ábra: A herbicidek és a bikarbonát kötőhelyeinek elhelyezkedése a Q_B proteinen /VAN RENSEN 1982/

1: urea-, 2,3: triazin-, 4: fenol-, 4,5: bikarbonátkötőhelyek

2.1.2. Urea és triazin herbicidek kötőhelye a Q_B proteinen

Ezen herbicidek kémiai szerkezetének közös vonása a -C-N-csoport. A kötőhelyük, hatásmódjuk ugyanaz, vagy hasonló. A lipofil oldalláncok okozzák az aktivitásbeli különbséget. A fotoszintézis kutatásban a DCMU /diuron/ és az atrazin hatásmódja a legtöbbet tanulmányozott és legismertebb. Wessels és Van der Veen /1956/ ismertette először, hogy a DCMU gátolja a Hill-reakciót izolált kloroplasztiszokban. A DCMU a fény indukálta fluoreszcencia növekedését eredményezi /DUYSENS,-SWEERS, 1963/, mert az inhibitor /herbicid/ gátolja a Q^- reoxidációját. Az urea és triazin herbicidek gátlóhelye a Q és a PQ között lokalizálódik. Az I. fotokémiai rendszer elektrontranszportját csak extrém magas dózisban gátolják. A ciklikus elektrontranszport stimulálható redox-egyensúlyban a herbicidek viszonylag

alacsony koncentrációjánál /AVRON, -NEUMANN, 1968/. Ezen herbicidek hatásmechanizmusának kutatását nagyban segítette a Tischer és Strotman /1977/ által bevezetett új technika. Miután egy izotóppal jelzett herbicid beépült, kötődött az izolált kloroplasztisz membránjaihoz, azt vizsgálták, hogy egy másik /nem jelölt/ herbicid helyébe tud-e lépni a megjelöltnek. Ezzel bizonyították, hogy a fenilureák, triazinok, triazinonok, piridazinonok és bikarbonátok ugyanarra a kötőhelyre "pályáznak". A speciális kötőhelyek relatív száma 1 volt 300-500 klorofill-molekulánként, és ≈ 1 volt elektrontranszport lánconként.

A herbicid inhibitorok hatása reverzibilis. Van Rensen és Van Steckelenburt /1965/ úgy találták, hogy a DCMU és simeton által előidézett oxigén-fejlődés gátlása mosással könnyen megszüntethető algákban.

Izawa és Good /1965/ kimutatták, hogy a DCMU reverzibilisen kapcsolódik a kloroplasztiszhoz. Ez a herbicid molekula és a tylakoid membrán receptormolekulája közötti gyenge kötőerőt bizonyítja. Tischer és Strotman /1979/ a metribuzin kötődésének ΔH -ját -50 KJ / mol-nak mérték. Shipman /1981/ szerint ez a kötési energia túl kicsi a proteinnel való kovalens kötésre, de a hidrogénkötés energiájával sem egyezik meg. A herbicidek poláros részei elektromos töltéssel kötődnek /elektrosztatikus kölcsönhatás/ a fehérje erősen poláros részéhez. Van Rensen és Kramer /1979/ a kloroplaszt mérsékelt tripszines e-

mésztesével csökkentették a Hill-reakció triazin és fenol herbiciddel szembeni érzékenységét. A Q_B protein tripszines kezelésének hatására a Q könnyen hozzáférhetővé válik az elektronakceptor ferricyanid számára, az így indukált gyors ciklikus elektrontranszport megkerüli a herbicid akcióhelyét. Mindamellet a tripszines kezelés eltávolítja a herbicidek kötőhelyeit is /TREBST, 1979, TISHER, -STROMAN, 1979, STEINBACK et. al. 1981/. Vermaas és van Rensen /1981/ a bikarbonátnak két kötési helyét állapították meg a Q-B proteinen. A Q-B protein feltehetően két fehérjealegységből áll, amelyre a Q-B protein alsó felszínén, a Q és B között levő bemélyedésből következhetnek. Az egyik tartalmazza az urea és a triazin kötőhelyet, a másik a fenol és a bicarbonát kötőhelyet. A herbicid kötődése és a bicarbonát hiánya szerkezeti változást okozhat a Q-B proteinben. Ennek a szerkezeti változásnak két következménye lehet:

1. Más herbicidnek vagy bicarbonátnak a kötődése "megrongálódik"
 2. A Q és B közötti elektrontranszport gátolt
- Velthuys és Ames /1974/ szerint a DCMU csökkenti a B redoxpotenciálját. Herbicid jelenlétében a $Q^{\cdot-}B \rightleftharpoons OB^{\cdot-}$ közötti egyensúly balra tolódik el. Mivel a B semikinon $B^{\cdot-}$ legalább néhány szekundumig stabil hidrofób közegben /SHIPMAN, 1981/ a Q-B proteinek kell biztosítani a $B^{\cdot-}$ stabilitását anionos

formában. Ez a stabilizáció történhet a protein protonálódásával, a proteinen keresztül, erős elektromos előtér fejlesztésével, vagy a B redukálódása utáni fehérjekonformáció relaxációjával. Ezért a herbicid kötődése befolyásolhatja a $Q^{\cdot-}B \rightleftharpoons QB^{\cdot-}$ egyensúlyt a $B^{\cdot-}$ stabilizáció biztosításával a Q-B proteinben. Shipman /1981/ szerint a B-t inhibitorok segítségével mozdíthatjuk ki a kötési helyéről.

Renger et al. /1981/ szerint a Q-B protein legalább két megkülönböztethető proteinegységből áll, az egyik burkolt Q, a másik burkolt B. Feltételezik, hogy a Q-B protein közvetíti az elektrontranszportot a Q és B között egy "elektron csatornán" keresztül, a funkcionális aminosavmaradékok speciális elrendeződése által. Az inhibitor kötődése a protein egységek térbeli szerkezeti változását okozhatja, így az "elektron csatorna" térségében is változást okoz. Így a Q és B közötti elektrontranszport kinetikája megváltozik. Bár a fenti megállapítások megalapozottak, néhány eredmény arra utal, hogy a "vizhasító" helynél szintén gátolnak az urea és triazin herbicidek. Fluoreszcencia vizsgálatokkal állapították meg /CODD, -SMITH 1980/, hogy a DCMU gátló hatása a II. fotorendszer oxigénfejlesztő részén is érvényesül.

2.1.3. A Q-B protein tulajdonságai

Először Renger /1976/ közölte, hogy a DCMU kötőhelyet a Q_B protein tartalmazza, amely szabályozza az elektronáramlást Q és B között. Azt a következtetést, hogy a DCMU kötőhely protein természetű, a tripszin emésztéses kísérletekből vonta le. A vizsgálatok kimutatták, hogy a különböző herbicidek ugyanannak a proteinnek a részben átfedett részeihez kapcsolódnak. A herbicid érzékenység csökkenése annak a tripszines emésztésnek a következménye, amely egy 32 kilodaltonos polipeptid eltávolítását eredményezi /CROZE et al. 1979, STEINBACK et al. 1981/. Az atrazingátlás csökkentését a II. fotorendszer részét képező 32 kilodaltonos polipeptid szelektív emésztése okozza /MULLET,-ARNTZEN 1981/. A fenolos herbicidekkel szembeni szenzitivitás nem változott, de az urea szenzitivitás kis csökkenést mutatott. Ezért szerintük a Q_B protein legalább két polipeptidből áll. Két alkalommal radioaktív fotoaffinitás segítségével határozták meg azt a proteint, amelyhez a herbicidek kapcsolódnak. 3H -val jelölt azido-i-dinoseb specifikusan jelöl egy 30-40 kilodaltonos polipeptidet /OETTMEIER et al. 1980/. A ^{14}C -azidoatrazin kovalensen kötődik a 32-34 kilodaltonos proteinhez /GARDNER 1981, PFISTER et al. 1981/. A Spirodella oligorrhiza-ban egy fényindukált, gyorsan metabolizálódott thylakoid protein változata fordul elő a 32 kilodaltonos polipeptidnek /c.f. MATTOO et.al.

1981/. Ezt a proteint a kloroplaszt 500 daltonos m RNS-e úgy írja át, hogy 33,5 kilodaltonos precursor molekulát szintetizál, amely gyorsan átalakul 32 kilodaltonos proteinné. Mattoo /1981/ bizonyítja, hogy ez a gyorsan metabolizált 32 kilodaltonos polipeptid szabályozza az elektrontranszportot a II. fotorendszer redukáló oldalán és érzékeny a DCMU-ra. Driesel et al. /1980/ közölte a spenótkloroplaszt DNS előzetes transzkripció térképét, amelyben a 32 kilodaltonos polipeptid génjének helyét jelölték.

2.2. A triazin-rezisztencia megjelenése, a triazin-rezisztens gyombiotipusok elterjedése

A triazin-rezisztens biotipusokat először kisebb helyi populációkban figyelték meg, amelyekben a triazin herbicidek huzamos alkalmazása megfelelő szelekciós nyomást gyakorolt ahhoz, hogy rezisztens gyombiotipus alakuljon ki.

Ryan /1970/ volt az első kutató, aki a triazin-rezisztens biotipusokról közölt adatokat. Egy oktatási intézmény területén, ahol 11 éven keresztül simazint alkalmaztak gyomirtásra, extrém rezisztenciát mutató *Senecio vulgaris* populációkat talált. Ezen populációkból vett mintákra semmiféle lényeges hatással nem voltak a tesztelésre alkalmazott hatóanyagok /simazin, atrazin/ 18 kg/ha dózisa sem.

Ugyanakkor más termőhelyekről származó minták ese-

tében már a 2,2 kg/ha dózis is letálisnak bizonyult. 1970 óta több, mint 20 gyomfaj triazin-rezisztenciáját mutatták ki a világ számos földrajzi körzetében /SOLYMOSI, 1982/, /I. táblázat/. Magyarországon az *Amaranthus retroflexus* /HARTMANN, 1979, SOLYMOSI 1981/, a *Chenopodium album* /SOLYMOSI, 1981/, a *Conyza* /ERIGERON/ *canadensis* /HARTMANN, 1981/ triazin-rezisztens biotípusát mutatták ki. A *Conyza canadensis* atrazin-rezisztens populációit először 1978-ban észlelték Basel és Valais környékén. Ezen populációkra hatástalannak bizonyult az atrazin 9 kg/ha dózisa /GRESSEL et al. 1982/. Hartmann Komárom megyében atrazin-rezisztens *Conyza canadensis* populációkat észlelt olyan ipari területeken, ahol totális gyomirtásra Buvinol 50 WP /25 % atrazin + 25 V klorinol/ herbicidet használtak éveken keresztül.

V 9/0

1. táblázat

ATRAZIN ÉS SIMAZIN REZISZTENS BIOTIPUSOK ÉS TOLERÁNS
TAXONOK MEGJELENÉSÉNEK IDŐBELI SORRENDJE

Rezisztens biotipusok	Az első ész- lelés időpont- ja	Az első ész- lelés helye
1. <i>Chenopodium album</i>	1970.	Svájc
2. <i>Sorghum halepense</i>	1972.	USA
3. <i>Stellaria media</i>	1974.	NSZK
4. <i>Solanum nigrum</i>	1974.	NSZK
5. <i>Echinochloa crus galli</i>	1974.	Franciao.
6. <i>Panicum capillare</i>	1976.	USA
7. <i>Poa annua</i>	1976.	Franciao.
8. <i>Amaranthus powellii</i> /nálunk <i>A.chlorostachys</i> var. <i>powel- lii</i> /	1976.	USA
9. <i>Polygonum lapathifolium</i>	1976.	Franciao.
10. <i>Brassica campestris</i>	1977.	Kanada
11. <i>Ambrosia elatior</i>	1977.	Kanada
12. <i>Amaranthus retroflexus</i>	1977.	USA
13. <i>Senecio vulgaris</i>	1977.	Nagy-Britannia
14. <i>Setaria glauca</i> és <i>viridis</i>	1978.	Franciao.
15. <i>Conyza</i> / <i>Erigeron</i> / <i>canadensis</i>	1978.	Svájc
16. <i>Chenopodium strictum</i>	1979.	Kanada
17. <i>Bidens tripartitus</i>	1979.	Ausztria
18. <i>Amaranthus lividus</i>	1979.	Svájc
19. <i>Amaranthus chlorostachys</i>	1979.	Svájc
20. <i>Chenopodium ficifolium</i>	1980.	NSZK

- | | | |
|------------------------------------|-------|-----------|
| 21. <i>Polygonum persicaria</i> | 1980. | Franciao. |
| 22. <i>Chenopodium polyspermum</i> | 1981. | Franciao. |

Változóan toleráns taxonok

- | | | |
|---------------------------------|-------|-------|
| 1. <i>Amaranthus blitoides</i> | 1980. | Svájc |
| 2. <i>Amaranthus bouchonii</i> | 1980. | Svájc |
| 3. <i>Amaranthus graecizans</i> | 1980. | Svájc |
-

2.2.1. A herbicidrezisztencia kialakulására ható tényezők

a./ A generációs idő

Ez alatt azt értjük, hogy a gyompopuláció hány generáción keresztül van kitéve herbicidhatásnak. A triazin herbicidek folyamatos /8-14 éves/ használata eredményeként a gyompopulációkban a triazin rezisztens biotípusu egyedek szaporodtak fel.

/1. táblázat/

b./ A populáció mutációs gyakorisága

A rezisztens gének gyakorisága a gyompopulációkban, amely mutáció eredményeként alakul ki, igen alacsony 10^{-10} /GRESSEL, 1979/.

c./ A herbicidek szelekciós nyomása

Adott területen a herbicidek szelekciós nyomását alapvetően három tulajdonságuk határozza meg, a gyomirtási spektrumuk, fitotoxikus hatásereőségük és a hatástartamuk. Minél szélesebb a gyomirtóhatás, minél toxikusabb és hosszabb a hatástartam, annál nagyobb a szelekciós nyomás. A hosszú hatástartamu, perzisztens /6-20 hónap/ klóraminotriazinok /simazin, atrazin/ hatására indukálódott a herbicidrezisztens gyombiotípusok legtöbbsége. A herbicidek szelekciós nyomására változik meg a populációkban a generációnkénti gén gyakoriság. Gressel matematikai modellt szerkesztett, melynek segítségével kiszámítható a rezisztens populáció kialakulásának várható időpontja. Feltételezve, hogy a mezőgazdasági terü-

leteken évente alkalmazott herbicidkezelések hatására a gyompopulációk 90 %-a pusztul el, valamint azt, hogy az ellenállóképes egyedek természetes gyakorisága 10^{-10} , a rezisztens tulajdonság évente tizszeresére növekszik. Ebből következik, hogy tíz év alatt kialakulhat a herbicidrezisztencia. Ezt a gyakorlat három gyomnövénynél igazolta /*Amaranthus* sp., *Chenopodium* sp., *Senecio vulgaris*/.

d./ Az ökológiai fitness /alkalmassági érték/

A fitness-nek egyik alapvető meghatározó tényezője a rezisztens biotípusok intra- és interspecifikus kompetíciós /versengő/ képessége. A herbicid használat kikapcsolja a kompetíciót a rezisztens egyedek javára. Conard és Radosevich /1979/ adatai szerint a *Senecio vulgaris* szenzitív biotípusának produktivitása herbicidmentes közegben meghaladja a rezisztens biotípusét. Az érzékeny biotípus magprodukciója is magasabbnak bizonyult, mint a rezisztens biotípusé.

e./ A talaj magtartaléka

A rezisztens biotípus állandósulását segíthetik a talajban levő életképes magvak. Jensen /1980/ vizsgálatai szerint a talaj 0-20 cm-es szintjében négyzetméterenként ≈ 50 ezer csiraképes mag található, amelynek 80 %-a a hét leggyakoribb gyomfajhoz tartozik. A legproduktívabb gyomfajoknak /mint pl. az *Amaranthus retroflexus* átlagosan 81153 mag/m^2 és a *Chenopodium album*, átlagosan 74693 mag/m^2 / a magkészlete a talajban ellensúlyozza a herbicidek okozta

mortalitást.

2.3. A triazin-rezisztencia fiziológiai és biokémiai jellemzése

2.3.1. A triazinok felvétele, adszorpciója és transzlokációja

A triazin herbicidek gyökéren keresztüli felvétele passzív folyamat, amely függ a talajoldatban levő herbicid koncentrációjától és a felvett víz mennyiségétől. A növényben a transzlokálódás az apoplaszt /xylem/ rendszerben történik. A transzlokálódás ezen egyszerű formája is segíti a triazin herbicidek hatásuk érvényesítésében.

Számos kutató tanulmányozta a triazin herbicidek akkumulációját a toleráns és érzékeny növényekben. Megállapították, hogy a toleráns növények /gyapot, fekete ribiszke/ gyökérzetében jelentős mennyiségben halmozódik fel a simazin és az atrazin /SHONE-WOOD, 1972, WARWICK, 1976/. A gyapot azért toleráns triazin herbicidekre, mert nagy részüket képes kivonni a transzspirációs áramból, és lizigén mirigyeibe raktározni. Ez az elkülönítés megakadályozza a herbicid fitotoxikus koncentrációban való felhalmozódását a hatáskifejtés helyén. Meg kell azonban jegyezni, hogy számos növény és herbicid esetében nem találtak számottevő összefüggést az érzékenység és a transzlokáció között.

A triazin-rezisztens és triazin-szenzitív biotípus gyomnövényekben ^{14}C -vel jelzett simazinnal hatá-

rozták meg a simazin felvételében és transzlokációjában való különbséget a két biotípus között. A *Senecio vulgaris* esetén a ^{14}C -simazin felvételében nem találtak /RADOSEVICH, -APPLEBY, 1973/ számottevő különbséget a rezisztens és szenzitív biotípus között. Autoradiográfiás mérési technikát alkalmazva kimutatták azt is, hogy nincs különbség a ^{14}C -simazin adszorpciójában és transzlokációjában a *Senecio vulgaris* rezisztens és szenzitív biotípusában /RADOSEVICH 1977, JENSEN et al. 1977/ az *Amaranthus* sp. és a *Chenopodium album* atrazin-rezisztens és triazin-szenzitív biotípusának vizsgálatakor is. Az eredmények bizonyítják, hogy a triazin-rezisztencia oka nem a herbicid felvételének és transzlokációjának gátlásában van.

2.3.2. A CO_2 -fixáció mérésének jelentősége a triazin-rezisztencia lokalizációjában

A triazin-rezisztencia mechanizmusának felderítésében nagy előrelépést jelentett, amikor ismertté vált, hogy a rezisztens biotípus kloroplasztjában az atrazin jelenléte nem gátolja a fotokémiai aktivitást /pl. CO_2 -fixációt/. Ezen felismerés irányította a kutatók figyelmét arra, hogy a rezisztencia mechanizmusát a kloroplasztok szintjén kell keresni. A fotoszintézis gázcseréjét a *Senecio vulgaris*, az *Amaranthus* sp. szenzitív és rezisztens levelében mérték /RADOSEVICH, -APPLEBY 1973, WEST et al. 1976/.

A *Senecio vulgaris*nál vizkulturás simazin kezelést alkalmaztak a mérés alatt, majd 24 óra elteltével megszüntették a simazin kezelést. Az *Amaranthus sp.* leveleit atrazinnal kezelték először, majd a netto CO_2 -fixációt mérték. A netto CO_2 -fixáció gyors gátlását okozta a simazin és az atrazin a szenzitív biotípus levelében. A rezisztens biotípus levelében a herbicidek nem csökkentették, számottevően a CO_2 -fixációt.

2.3.3. A Hill-reakció herbicid gátlása a triazinrezisztens és szenzitív kloroplasztokban

A fotoszintézisgátló herbicidek hatásmechanizmusa című fejezetben bemutattuk azt, hogy a triazin herbicidek a PS-2 redukáló oldalán a Q és PQ között gátolják az elektrontranszportot. Ennek következménye az oxigén termelés közvetett gátlása is. A triazinrezisztens gyomnövények kloroplasztjaiban herbicid jelenlétében sem gátolt az oxigén termelés, a mesterséges elektronakceptorok /FeCy, DCPIP/ redukálódnak. A DCPIP fotoredukciójának mérését használják leggyakrabban a herbicideknek a triazinrezisztens és érzékeny kloroplasztok PS-2-re kifejtett hatásának vizsgálatára. Ezeknek a vizsgálatoknak a célja, hogy meghatározzák a rezisztenciabeli különbségeket a PS-2 gátlók között az újonnan felfedezett triazinrezisztens gyombiotípusokban. Arntzen et. al./1979, 1980/ az *Amaranthus retroflexus* triazinrezisztens és szenzitív kloroplasztjában mérték a DCPIP foto-

redukciójának gátlását /a PS-2 aktivitás gátlását/ triazin herbicidekkel. Meghatározták a PS-2 aktivitásának 50 %-os gátlását előidéző inhibitor /herbicide/ koncentrációját, amelyet I_{50} -el jelölünk. A herbicide érzékeny kloroplasztok esetében az I_{50} értéke a 3×10^{-7} M - 4×10^{-8} M tartományban található. Ezzel szemben hozzávetőleg ezerszer magasabb koncentrációra volt szükség ahhoz, hogy az ellenálló kloroplasztokban ugyanezt a gátló hatást elérjék. A rezisztencia fokának megállapítására leggyakrabban alkalmazott módszer az, hogy összehasonlítjuk a rezisztens /R/ és a szenzitív /S/ biotípusok I_{50} értékeit és meghatározzuk a rezisztencia faktort

$$/R_{I_{50}} / S_{I_{50}} /.$$

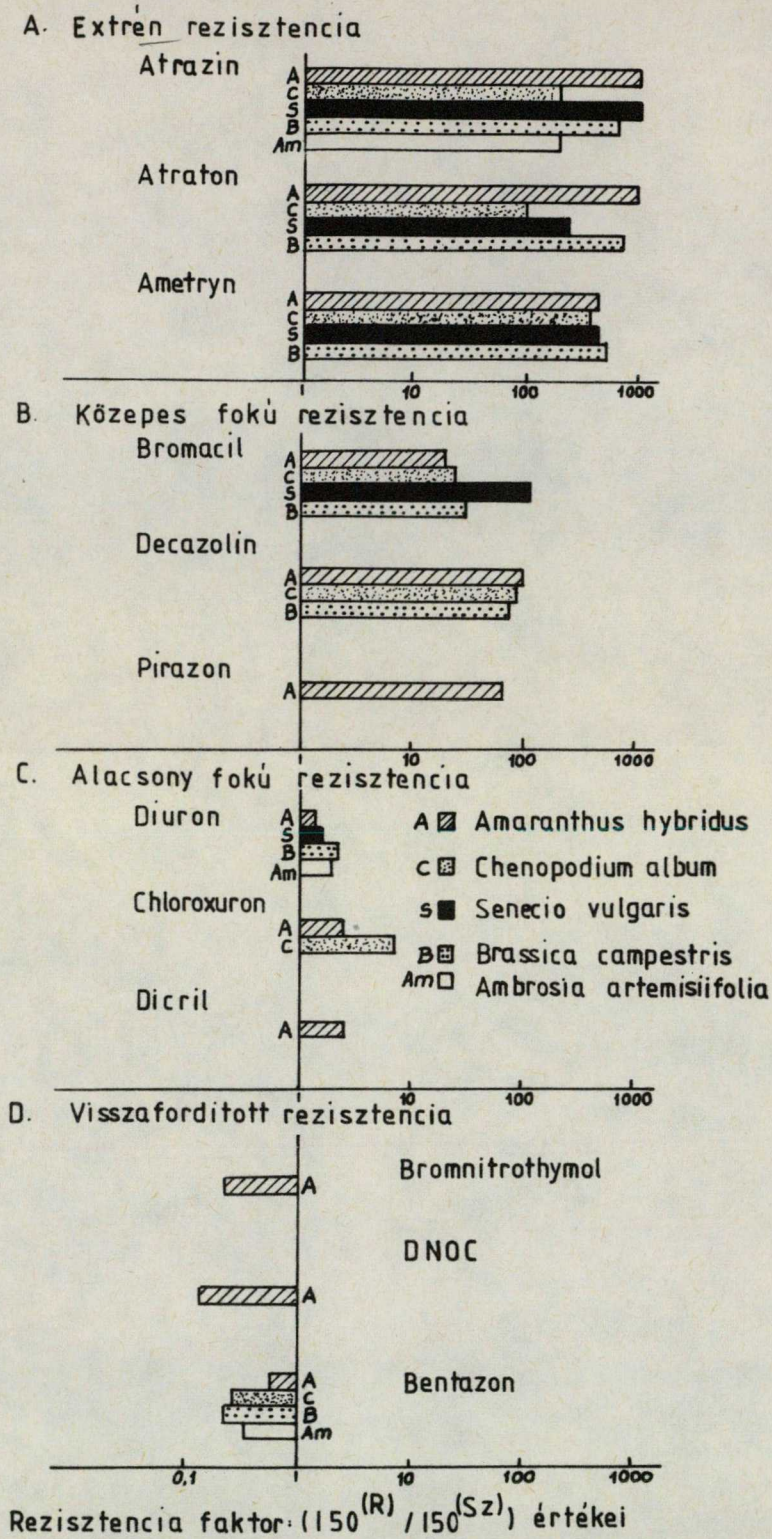
A 6. ábra bemutatja különböző érzékenyséű gyomfajokból izolált kloroplasztok R/S értékeit. Jelentéktelen eltérések vannak a tanulmányozott gyomfajok között, de a rezisztencia általános tendenciája állandónak mondható.

Arntzen és munkatársai a dipropetryn /ethylthio-triazin/ és metribuzin /aszimmetrikus triazin/ herbicideknek az *Amaranthus chlorostachys* érzékeny és ellenálló kloroplasztjára gyakorolt hatását vizsgálva azt tapasztalta, hogy az R/S értéke ezeknél a herbicideknél 270, illetve 290. Más gyomfajok esetében, ahol szintén metribuzint alkalmaztak, jelentős eltérés mutatkozott az R/S értékében, pl. a

Chenopodium albumnál 33, a Brassica campestrisnél 250 és az Ambrosia elatiornál 21. Ezek a különbségek valószínűleg azzal magyarázhatók, hogy a rezisztens típusok biokémiai sajátosságaikban eltérnek egymástól, ugyanis az I_{50} -érték minden szenzitív típusban azonos volt. Ez lehet az oka annak is, hogy módosulások tapasztalhatók különböző gyomfajok esetében a "kötő faktort", a Q_B proteint illetően /ARNTZEN et al. 1979, 1980, PFISTER et al. 1979/. Ugy vélik, hogy a herbicidrezisztencia kialakulása a "kötő faktor" módosulásának eredménye /ARNTZEN et al. 1980/. Az R/S értéke a szimmetrikus triazinok esetében 200-1000 között változott. Mindebből arra következtethetünk, hogy az extrém herbicidrezisztencia magyarázatát a kloroplasztmembrán megváltozott tulajdonságában kell keresni /ARNTZEN et al. 1979, PFISTER et al. 1979/. Más hatóanyagcsoportok után kutatva találtak rá a bromacilra /uracil/, a dekazolinra /quinazolin/ és a kloro- vagy bromopyrazonra /pyradazon/. Ezek R/S értéke 20-100 között mozog /6. ábra/. Ezt a csoportot úgy tekintették, mint ami közepes szintű rezisztenciát vált ki. A további vizsgálatokat diuronnal és chloroxuronnal /urea/, valamint dicryllettel /amid/ végezték, amelyek 1,4-7,5 R/S értéket mutattak. Ezeket a herbicideket úgy könyvelték el, mint jelentéktelen rezisztenciaágenset. Később, amikor különböző nitro-



fenolszármazékokat vizsgáltak, egy új irányvonal alakult ki, ugyanis a bromnitrothymol, a DNOC és a bentazon fokozott aktivitást mutattak a rezisztens kloroplasztokban. A nitrofenolszármazékok R/S értéke 0,1-0,6 között változott. Hasonló eredményre jutottak más, nem triazin herbicidek /dinoseb: R/S = 0,08, ioxynil: R/S = 0,6 benzanin: R/S = 0,8/ alkalmazásával /ARNTZEN et al. 1980/. Ezt a visszafordított rezisztencia mintájának tekintették. Ez ideig nem sikerült megállapítani, hogy a rezisztencia változó irányvonala ezeknek az egyedi herbicideknek, vagy a nitrofenol típusu herbicidekre való fokozott érzékenységnek köszönhető-e.



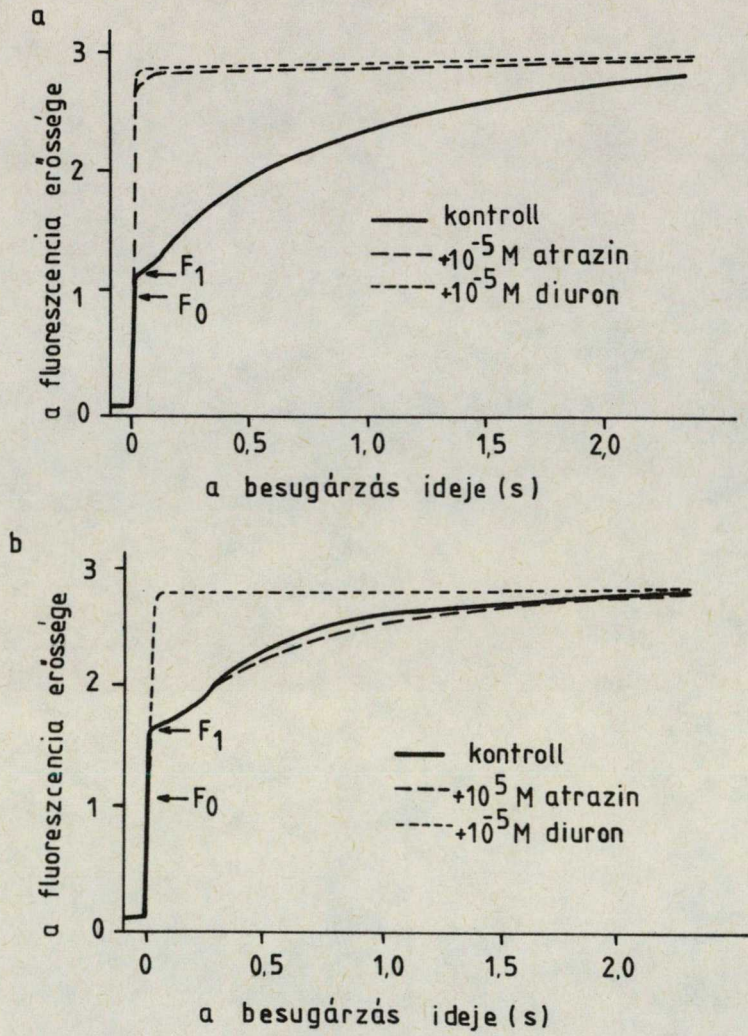
6. ábra: Triazin-rezisztens gyomfajok rezisztencia faktora /ARNTZEN nyomán/

2.3.4. A PS-2 elektrontranszportjának vizsgálata a klorofill fluoreszcenciájának mérésével

A kloroplaszt fluoreszcenciája szobahőmérsékleten majdnem teljes egészében a PS-2-ből származik /GOVINDJEE, 1975/. A sötét adaptált fotoszintetizáló szervezetek hirtelen megvilágítás hatására időben változó fluoreszcencia intenzitást /un. fluoreszcencia indukciót/ mutatnak, amely s - os időtartományban a Q/Q^{\cdot} arányváltozást mutatja. A triazin és urea típusu herbicidek a PS-2 redukáló oldalán a Q és PQ között fejtik ki gátló hatásukat. Ezért a fluoreszcencia időbeli kimutatására alkalmas módszerek /gyors fluoreszcencia indukció késleltetett fluoreszcencia jelensége/ használhatók a fotoszintézist befolyásoló herbicidek hatásának kimutatására.

A sötétadaptált kloroplasztok megvilágítása után a klorofill fluoreszcencia felemelkedik az F_0 -nak nevezett szintre. Ezt az F_0 fluoreszcenciát úgy tekintik, amely azokból az inaktív fotokémiai reakcióközpontokból keletkezhet, amelyeknek nagyon magas fluoreszcencia hozamuk van, vagy az antenna pigmentekből. Az F_0 elérését követően van egy idő-függő növekedése a fluoreszcenciának, az un. F_M maximális szintig. A fluoreszcencia F_M szintjének elérése azt mutatja, hogy a PS-2 összes elsődleges elektronakceptora /Q/ teljesen redukálva van. A fluoreszcencia maximális szintjének eléréséig eltelt idő információt szolgáltat a Q^{\cdot} teljes akkumulációját megelőző elektron-

transzport lépcsőiről /DUYSENS, -SWEERS 1963/. A herbicid kötődése után megváltozik a fluoreszcencia indukciós görbe karakterisztikája. Az atrazin és a diuron erősen stimulálja a fluoreszcencia indukció növekedését az F_M -szintre /7.a. ábra/. Ezek az érzékeny kloroplasztiszokkal végzett vizsgálatok bizonyítják, hogy a triazin és a diuron blokkolja az elektrontranszportot a FS-2 redukáló oldalán és Q és PQ között / Q^- gyors akumulációja következik be/. A rezisztens gyombiotipus kloroplasztjának herbicidkezelés után mért fluoreszcencia indukciós görbéje a 7.b. ábrán látható. Az atrazin nem változtatja meg az indukciós görbe karakterisztikáját, a diuron viszont igen. Ez azt jelenti, hogy a rezisztens biotipus fotoszintézise nem gátolható atrazinnal, a Q és PQ közötti elektrontranszport nem blokkolt. Azt találták, hogy a fluoreszcencia indukciós görbe kezdő, gyorsan növekedő részének F_1 magasabb a telítettségi szintje a triazin-rezisztens növényeknél. Ez jelzi, hogy a Q és B közötti elektrontranszport herbicid adagolás hiányában is kisebb hatékonyságu. Ez arra utal, hogy a Q és B körül egy módosult milliő létezik, amely termodinamikailag megnehezíti az elektronátadást /ARNTZEN et al. 1980/. Ismétlődő, rövid időtartamu fényimpulzusokkal gerjesztett késleltetett fluoreszcencia mérésével is hasonló következtetésre jutottak /ARNTZEN et al. 1979, 1980/.



7. ábra: A fluoreszcencia változása az *Amaranthus chlorostachys* biotípusok izolált kloroplastjában /ARNTZEN nyomán/

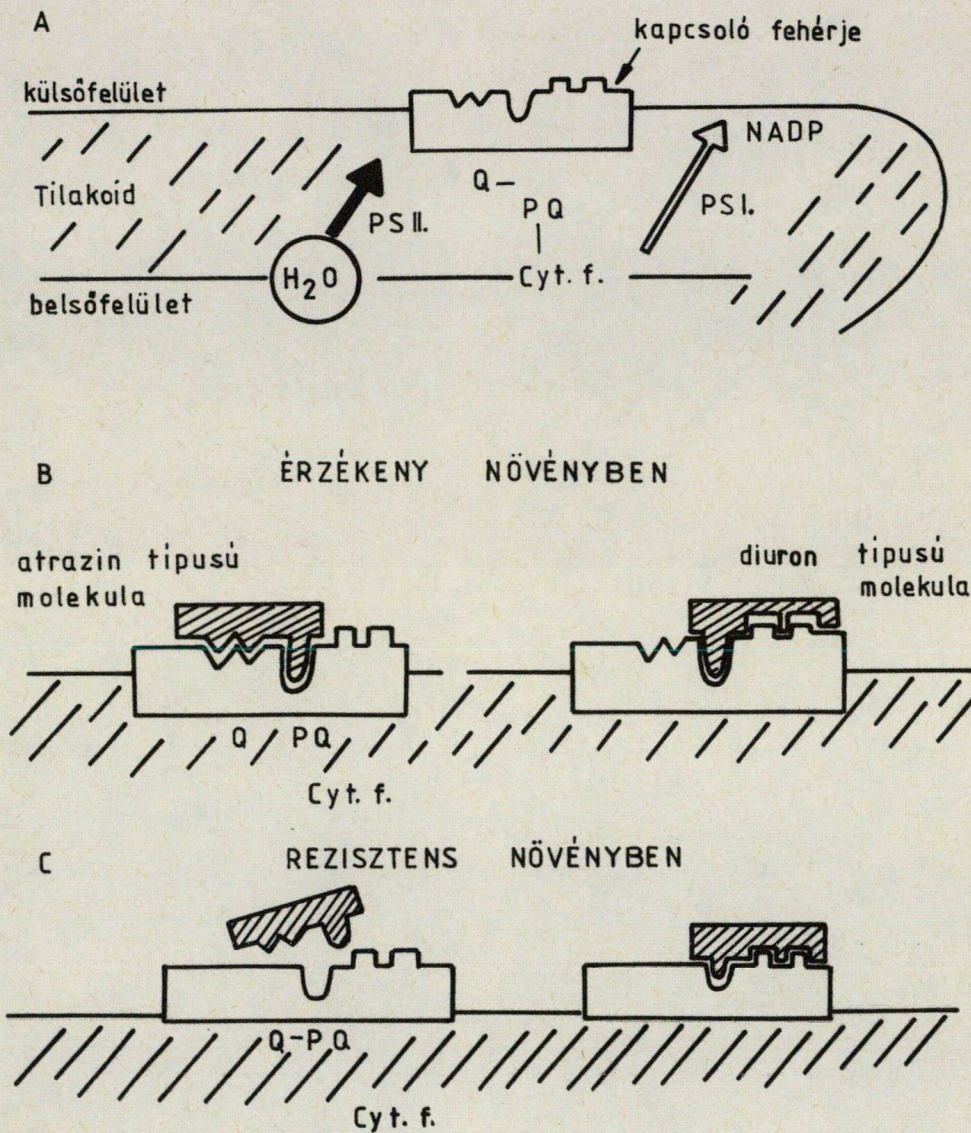
2.3.5. A Q_B protein szerepe a triazin-rezisztenciában

A triazin-szenzitiv kloroplasztban a diuron és az atrazin a 32 K daltonos Q_B protein részben átfedett részeihez kapcsolódik. Ezzel ellentétben kimutatták, hogy az atrazin hatástalan a rezisztens kloroplasztban, míg a diuron továbbra is hatékony marad /ARNTZEN et al. 1980/. Ennek az ellentmondásnak három magyarázata lehetséges:

1. az atrazin szelektíven kizáródik a rezisztens kloroplaszt membránjából,
2. az atrazin a rezisztens kloroplaszthoz kötődik ugyan, de hatástalan marad,
3. az atrazinkötődési sáv szelektíven elvész a rezisztens kloroplasztban.

Az első lehetőséget rövid vagy hosszú /10'/ inkubációs idővel, különböző koncentrációju atrazin vagy terbutryn herbicid alkalmazásával tanulmányozták. Az elektrontranszport lánc aktivitás mérésére a terbutrynt használják, mert ez egy különösen aktív triazin, amely lehetővé teszi az I_{50} -érték meghatározását még a rezisztens kloroplasztok esetében is. Az eredmények azt mutatják, hogy nincsenek nagy változások az érzékenységben növekvő inkubációs idő mellett sem. Radosevich et.al. /1980/ nem tapasztaltak eltérést a triazingátlás mértékében a *Senecio vulgaris* esetében három órás inkubálás után sem. További ellenőrzésként PS-2 részecskéket izoláltak, amelyek azonos

foku rezisztenciát mutattak a teljes membránnal Pfister et. al. /1979/ jelzett atrazint és diuront használtak a két herbicid kötődésének tanulmányozására a rezisztens és szenzitív kloroplasztban. A triazin rezisztens kloroplasztok esetén a diuron és az atrazin között csak gyenge kompetíciót figyeltek meg, a kapcsolódás helyén a diuron erős, az atrazin gyenge affinitását mutatták ki. Arntzen véleménye szerint a triazin-rezisztens biotípusban a Q_B proteinen módosult az atrazin-kötőhely. Gresselnek /1982/ triazin-rezisztens növényeknél a triazin-érzékenységet sikerült visszaállítani úgy, hogy egy 32 kilodaltonos tilakoid proteint / Q_B protein/ klór- amfenikolos kezeléssel eltávolított. A B. ábrán a herbicid molekulának a kloroplaszt tilakoid membránjához kapcsolódásának sematikus modellje látható. /PFISTER et. al. 1979/.



8. ábra: Az inhibitor herbicid molekulának a kloroplaszt thylakoid membránjához való kapcsolódásának modellje /PFISTER et.al. 1979. nyomán/

- A: A fotoszintézis elektrontranszport láncainak asszimmetrikus orientációja a thylakoid membránban.
- A herbicid molekulát "kapcsoló" fehérje komponens lokalizációja a thylakoid membrán külső felületén. A kapcsoló fehérje komponens és a II. fotoszisztéma Q és PQ elektrontranszport lánctagjai a thylakoid membránban azonos térségben helyezkednek el.
- B. A herbicidet kapcsoló fehérje komponens két különböző strukturális régiójával rendelkezik. Az "alapvető régiók" szerkezeti determináltságuk folytán kapcsolatba lépnek a különböző herbicidek alapvető strukturális részével $/-CO-NH-$ vagy $=\bar{C}-N/$ s olyan komplexet képeznek, mely az elektron-transzportlánc szétkapcsolásához vezet /Q és PQ között/ a II. fotoszisztéma redukciós oldalán.
- C. A rezisztens növény kloroplasztjában a thylakoid membrán külső felületén a herbicidet kapcsoló komponens egyik "alapvető régiójának" strukturája megváltozik, amely a herbicid kapcsoló képesség elvesztését jelenti.

2.3.6. A tilakoid membrán lipidösszetételének változása a triazin-rezisztens kloroplasztban

Pillai és St. John /1981/ az *Amaranthus retroflexus*, a *Chenopodium album* és a *Senecio vulgaris* triazin-rezisztens és szenzitív kloroplasztjának lipidanalízisét végezték el. Vizsgálataik szerint a poláris lipidek tartalmazzák a nagyobb részét a kloroplaszt összlipid tartalmának a három gyomnövény esetén.

A rezisztens biotípus kloroplasztjában a poláris lipidek mennyisége nagyobb, mint a szenzitív biotípusban. A poláris lipidek közül a rezisztens kloroplasztban az MGDG és PE nagyobb arányban, a DGDG és a PC kisebb arányban van jelen, mint a szenzitív kloroplasztban. A MGDG és a PE abszolút mennyisége is nagyobb a rezisztens kloroplasztban. A lipidosztályok zsírsav összetétele eltérő az atrazin-rezisztens és az atrazin-szenzitív biotípusban. A rezisztens kloroplaszt membránja aránylag gazdagabb, telitettebb zsírsavakban. A lipidosztályok mindegyikében nagyobb a linolénsav aránya a linolsavhoz viszonyítva a rezisztens biotípusban, kivétel ezalól a DGDG az *Amaranthus retroflexus*-ban. A MGDG/PL arány a *Senecio*-ban $R=1,91$ $S=1,28$, a *Chenopodium*-ban $R=2,38$ $S=2,15$, az *Amaranthus*-ban $R=2,48$ $S=1,89$.

Arntzen et.al. /1979/, Pfister et.al. /1979/ szerint a triazin rezisztencia oka, hogy a PS-2 herbicid-kötőhelyének Q_B proteinje genetikailag módosul, amely

a herbicidkötés képességét csökkenti. Hirschberg, -
Mcintosh /1983/ az *Amaranthus hybridus* triazin-re-
zisztens és szenzitív biotípusában a Q_B proteint kó-
doló *psb A* gén DNS szekvencia analizisét végezte el.
A DNS egyik kódjában keletkezett pontmutáció eredmé-
nyeként a Q_B protein 228. pozícióju aminosava glicin
a rezisztens biotípusban, a szenzitív biotípusban
ebben a pozícióban szerin található. Véleményük sze-
rint helyettesítés glicinnel a polipeptid 228. pozi-
ciójában eredményezheti a triazin molekula kötődési
affinitásának változását. Mivel a tényleges triazin-
kötőhely lokalizációja a Q_B proteinen nem ismert,
ezért nem tudni, hogy mely aminosav megváltozása okoz-
hatja a herbicid-kötődés módosulását. Ennek ellenére
feltételezik, hogy egy aminosav mutációs megváltozása
a polipeptid harmadlagos szerkezetének módosításával
befolyásolhatja a herbicidkötődés affinitását.

A Q_B protein módosulásán kívül irodalmi adatok /PILLAI, -
ST. JOHN 1981/ alapján azonban feltételezhető az is,
hogy a tilakoid lipidösszetétel változása közvetve,
vagy közvetlenül hozzájárulhat a herbicid-reziszten-
cia kialakulásához, a membrán natív szerkezetének át-
rendeződésével.

3. Értekezésem konkrét célkitűzései

1. A *Conyza canadensis* Cronq /L./ biokémiai herbicidrezisztenciájának kimutatása.
2. A triazin-rezisztens és szenzitív biotípusok fotoszintézisének összehasonlító vizsgálata.
3. A triazin-rezisztens biotípus tilakoid membránja lipidösszetételének meghatározása.
4. A kutatási eredményekre épülő gyomirtási technológia kidolgozása szőlőültetvényekben található triazin-rezisztens *Conyza canadensis* ellen.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Növényi anyag és kezelések

A *Conyza canadensis* atrazin-rezisztens egyedeit olyan szőlőültetvényekből gyűjtöttük, ahol tartósan alkalmaztak az előző években triazin hatóanyagú herbicideket a szőlő gyomirtására. A szenzitív növényeket ruderális területekről gyűjtöttük. A gyűjtés idején a növények tőlevélrózsás fenológiai stádiumban voltak. A növényeket laboratóriumi körülmények között neveltük további két hónapig 16/8 órás fény sötét periódusokkal, 10 Wm^{-2} intenzitású fehér fénnel megvilágítva, 25°C -on. Az egész növények kezelésekor azokat atrazin tartalmú (0,1M)Knop tápoldattal vizkultúrás rendszerbe állítottuk. A levelek kezelésekor azokat herbicidtartalmú tápoldattal infiltráltuk. Az oldat úgy készült, hogy a kívánt mennyiségű herbicidde 1 ml etanolban oldottuk, majd 6,5 pH-ju foszfát-pufferrel 500 ml-re egészítettük ki.

4.2. Triazin érzékenység tesztelése levélkorong módszerrel

A *Conyza canadensis* triazin-rezisztens és szenzitív biotípusát Hensley /1981/ levélkorong módszerrel határoztuk meg szőlőtáblákból gyűjtött növények tesztelésekor.

A vizsgálati növények leveleiből 3 mm átmérőjű korongokat vágunk és 4 x 20 darabot egy-egy kémcsőbe helyeztünk.

A levélkorongokra 6,5 pH-ju foszfát-puffer oldatot öntöttünk, amely $1 \times 10^{-4} \text{M}$ atrazin herbicidhatóanyagot és 1 csepp Triton X-100 tapadásfokozót tartalmazott. Vizlégszivattyúval előállított vákuumos infiltrálással a levélkorongok intercelluláris járataiból eltávolítottuk a levegőt. A vákuum megszüntetése után az intercelluláris járatokból eltávozott levegő helyét az oldat tölti ki, így a korongok tömege nő és lesüllyednek a kémcső aljára. Az oldatot lecseréltük $1 \times 10^{-4} \text{M}$ atrazin herbicidet és 2000 ppm NaHCO_3 -t tartalmazó 6,5 pH-ju puffer-oldattal. Ezután a kémcsöveket 10 Wm^{-2} intenzitású, fehér fényel világítottuk meg egy órán keresztül. A fotoszintézishez szükséges $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -t a reakcióközegben levő NaHCO_3 biztosítja. Az egy órás megvilágítás után az oldat felszínén lebegő levélkorongokat megszámláltuk és százalékosan fejeztük ki. A kontroll vizsgálat esetén az oldat herbicidet nem tartalmazott.

4.3. ^{14}C -atrazin felvételének és transzlokációjának meghatározása

A rezisztens és szenzitív növényeket 72 órán keresztül kezeltük $1 \times 10^{-5} \text{ M } ^{14}\text{C}$ -atrazinnal, fajlagos aktivitása $26,1 \mu\text{Ci}/\text{mg}$, vizkulturás körülmények között, majd autoradiográfiás felvételeket készítettünk a gyökerekről és a levelekről. A felvételeket röntgenlapokra készítettük, amelyeket 4°C -on teljes sötétben exponáltunk 28 napig. Az atrazin transzlokációját a

a vizkulturában $1,5 \times 10^{-5} \text{M}$ ^{14}C -atrazinnal kezelt növények leveleiben felhalmozódott ^{14}C -atrazin mennyiségének mérésével határoztuk meg úgy, hogy a levelekből 5 mm átmérőjű korongokat preparáltunk, és Beckman LS-100 C folyadékszintillációs spektrofotométerrel megmértük a levélkorongok radioaktivitását.

4.4. CO_2 -fixálás vizsgálata

A rezisztens és szenzitív növényeket $1 \times 10^{-4} \text{M}$ atrazin-oldattal kezeltük gyökéren keresztül, külön-külön tenyészedényben. A méréseket a herbicidkezelés után 4, 10, 24, 47 és 72 órával végeztük. Az atrazinnak a CO_2 -megkötésre gyakorolt azonnali hatását úgy vizsgáltuk, hogy a rezisztens növények leveleit $1 \times 10^{-4} \text{M}$, a szenzitiveket $1 \times 10^{-5} \text{M}$ atrazin-oldattal infiltráltuk 10 percen keresztül. A méréseket közvetlenül az infiltrálás után végeztük. Az intakt leveleket $^{14}\text{CO}_2$ atmoszférában 2 percig világítottuk meg 10 Wm^{-2} intenzitású fehér fényel. A fixált $^{14}\text{CO}_2$ mennyiségét 5 mm átmérőjű levélkorongok /minden méréshez 50 levélkorongot használtunk/ radioaktivitásának mérésével határoztuk meg. A radioaktivitás mérésre Beckman LS-100 C folyadékszintillációs spektrofotométert alkalmaztunk. x 5

4.5. Hill-reakció mérése

A szenzitív és rezisztens levelekből kloroplasztiszokat izoláltunk az alábbi módon:

A leveleket jéghideg izoláló közegben /0,33 M szorbitol, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 4 mM MgCl_2 , 2 mM aszkorbinsav, 0,05 súly % bovin szérum albumin, pH 6,5/ 20 másodpercig homogenizáltuk Ultra-Turrax készülékkel. A homogenizátumot 8 rétegű gézpólyán szűrtük és 3 percig 5000 rpm-mel centrifugáltuk 4 °C-on. A felüluszt elöntöttük, a kloroplasztiszokat jéghideg reszuszpendáló közegben /0,05 M szorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MnCl_2 , 50 mM tricin, pH 6,5/ szuszpendáltuk.

4.5.1. Herbicidgátlás meghatározása

A kloroplasztiszok ferricianid Hill-reakciójának herbicidgátlását Clark típusu O_2 -elektródával határoztuk meg. A reakcióközeg 0,33 M szorbitolt, 50 mM tricint, 5 mM MgCl_2 -t, 5 mM NH_4Cl -t, 0,5 mM K-ferricianidot tartalmazott 6,5 pH-n. A herbicidhatóanyagokat etanolos oldatban adagoltuk a reakcióközeghez. A reakcióközeg herbicidkoncentrációja 1×10^{-4} - 1×10^{-8} M volt, amely lehetővé tette az I_{50} értékek /50 %-os herbicidgátlás/ meghatározását. A 40 μg klorofillnak megfelelő kloroplasztisz-mennyiséget fehér fényel világítottuk meg 25 °C-on. A szenzitív minták alapaktivitása 120 ± 30 , a rezisztenseké $80 \pm 20 \mu\text{M O}_2 \text{ mg klorofill}^{-1} \text{óra}^{-1}$ volt.

4.5.2. Hill-reakció aktivitásának mérése a hőmérséklet függvényében

A hőmérséklet hatását a Hill-reakció aktivitására 5-40 °C-os hőmérséklet intervallumban vizsáltuk

5 °C-onként. A Hill-aktivitást az O₂ termelés mérésével /lsd. előbb/ és a DCPIP fotoredukciójával mértük. A reakcióközegben /0,33 M szorbitol, 50 mM triclin, 5 mM MgCl₂, 5 mM NH₄Cl/ a DCPIP koncentrációja 50 mM volt.

A termosztált küvettákat 10 Wm⁻² intenzitású fehér fényel 2 percig világítottuk meg és azonnal mértük a DCPIP fotoredukcióját 600 nm-en Spektromom 402 spektrofotométerrel.

4.6. Fotoszintetikus elektrontranszportlánc vizsgálata fluoreszcencia indukció módszerével

Az intakt levelek fluoreszcencia indukciós görbéit házilag összeállított berendezéssel regisztráltuk. A fényforrás 450 W-os xenon lámpa volt. A fluoreszcencia aktiválására alkalmas λ_{\max} 410nm-es hullámhossztartományú és 5 mW/cm² intenzitású gerjesztő fényt BG-12 üvegszűrővel választottuk ki. A klorofill-a fluoreszcenciáját 674 nm-es interferenciaszűrőn keresztül, EMI 9558 A típusú fotoelektron-sokszorozóval detektáltuk, amelyből az elektromos jelet házi előállítású, un. tranziens regisztrálóba vittük át, amely a jelet tárolja és az indukciós görbét oszcilloszkópon megjeleníti. A tárolt jelet X-Y íróval regisztráltuk. A minta gyors megvilágítását fényrekesszel oldottuk meg, amelynek nyitási ideje 1-2 ms, a mérőberendezés elektronikus részének fel-

futási ideje 200 ns volt. A fluoreszcencia indukció mérését 1 ms-os időfelbontásban végeztük.

A vizkultúrában /Knop-oldat/ nevelt növényeket atrazinnal kezeltük, az infiltrált levelek esetében diuronnal és ioxynillal történő kezelést is végeztünk. A mérések előtt a növényeket 30 percig sötétben adaptáltuk. Minden esetben 16 egymástól független görbét rögzítettünk, majd a készülékbe épített átlagolóval átlagoltuk őket.

4.7. Alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia vizsgálatok

Az alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia-szinképek felvétele Perkin-Elmer MPF 44/A típusu spektrofluoriméter alacsony hőmérsékletű feltétjével történt. Ennek Dewar-palackját folyékony nitrogénnel töltöttük meg, az alacsony hőmérséklet -196°C / biztosítására. A levélmintákat kevés glicerinnel megfelelően kialakított rézrudra ragasztottuk, amelyet a folyékony nitrogénnel töltött mintatartóba helyeztünk. A szinképek felvételét az emisszió 640-790 nm-es hullámhossz tartományában végeztük 480 nm-es gerjesztő fény mellett. A gerjesztési monokromátort 4 nm, a megfigyelőt 1,5-2 nm sávszélességre állítottuk. A mérésekhez megfelelő keresztező szűrőket alkalmaztunk.

4.8. A lipidek és zsírsavak mennyiségi és minőségi meghatározása

A lipidek extrahálása

Az izolált kloroplasztiszokat /4. 5. fejezet/ kloroform: metanol = 2 : 1 arányu elegyében szuszpendáltuk /FOLC et.al. 1957/. A kicsapódott nem lipid természetű anyagokat szüréssel eltávolítottuk. A kloroform-metanolos oldathoz 20 tf%-ban 0,1 M KCl-oldatot adtunk, a felső vizes-metanolos fázist dekantáltuk, az alsó kloroformos fázist, amely a lipideket tartalmazta bepároltuk, majd 5 ml tiszta kloroformban felvettük. A későbbi vizsgálatokhoz ezt a kloroformos oldatot használtuk fel.

A lipidfrakciók elkülönítése

A lipidosztályokat vékonyréteg-kromatográfiával, szilikagél G-lapokon választottuk szét. A kromatografáló lapokat 105 °C-on 1 óráig aktiváltuk, majd az egyes minták kloroformos oldataiból vett azonos mennyiségeket a lapokra felvittük. A futtatást acetone : benzol : víz = 91 : 30 : 8 elegyében végeztük, majd az előhívást Rhodamin 6 G-vel lefujva végeztük /KHAN, - VILLIAMS 1977/. Az egyes lipidosztályokat UV fény alatt azonosítottuk, majd 3 ml sósavas metanolba felvettük.

Zsirsavak mennyiségi meghatározása

A zsirsavak gázkromatográfiás meghatározásához a lipidek zsirsavait metilészterré alakítottuk az alábbi módon: a sósavas metanolban felvett min-

tákat 80 °C-on, 2 óráig inkubáltuk leforrasztott kémcsövekben. 1 óra inkubálás után a mintákhoz 2 ml petroléter : deszt. viz = 1 : 1 arányu elegyét adtuk. Összerázás után a zsirsavak metilészterei a petroléteres fázisba kerültek. A vizes fázis dekantálása után a petroléteres fázist bepároltuk és 6 μ l benzolba fölvtük. A benzolos mintákból vittünk fel a gázkromatográfba 2-2 μ l aliquotot. A mennyiségi meghatározáshoz a metanolos kezelés után 10 μ l 1 %-os margarinsavat /17:0/ adtunk. Ez a sav nem fordul elő növényi objektumokban, ismert mennyiségének hozzáadásával a többi zsirsav és az egyes lipidosztályok mennyisége kiszámítható.

4.9. Szabadszíri gyomirtási kísérletek beállítása

A gyomirtási kísérletet Kecskemét-Miklóstelepen 1983. április 11-én állítottuk be termő szőlőültetvényben. A kísérletet 4 ismétlésben állítottuk be magas művelésű Ezerjó fajtájú szőlőtáblában 10 M²-es parcellákon. Az ültetvényt 1975-ben telepítették homok talajra, a sor- és tőtávolság 2,6 m x 1,2 m. A talajt 1982. tavaszán 2,5 kg/ha Aktikon PK-val és a nyár folyamán kétszer Gramoxone-val kezelték. A kísérleti terület tőlevélrózsás Conyza canadensis-szel erősen fertőzött volt. Az 1982. évi vizsgálataink /MIKULÁS,- PÖLÖS 1983/ szerint a kísérleti parcellák Conyza canadensis növényei tria-

zin rezisztensnek bizonyultak.

A vizsgált herbicideket Tee jet 11006 szórófejjel ellátott SHS japán háti permetezővel juttattuk ki 400 l/ha vízmennyiséggel. A kezelés időpontjában a levegő hőmérséklete 21,8 °C, relatív páratartalma 41 %, a talaj hőmérséklete 2 cm mélységben 22,4 °C volt. A kísérletbeállítás fontosabb adatait a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: A *Conyza canadensis* Cronq /L./ triazin-rezisztens biotipusa elleni szabadföldi gyomirtási kísérlet adatai

Kezelés száma	Gyomirtószer		dózis kg. v. l/ha	
	neve	/hatóanyag/		
1.	Gramaxone /paraquat/	+ Sencor 70 WP /metribuzin/	4	+ 0,5
2.	Gramaxone /paraquat/	+ Sencor 70 WP /metribuzin/	4	+ 1
3.	SYS 67 ME /MCPA/	+ Sencor 70 WP /metribuzin/	2	+ 0,5
4.	SYS 67 ME /MCPA/	+ Sencor 70 WP /metribuzin/	2	+ 1
5.	MG 02 50 EC /acetoklór/	+ Falisilvan 50 WP /fenuron/	5	+ 1,5
6.	Sencor 70 WP /metribuzin/		0,5	
7.	Sencor 70 WP /metribuzin/		1	
8.	Kontroll		-	
9.	Gramaxone /paraquat/	+ Maloran 50 WP /klórbrómuron/	4	+ 3
10.	Gramaxone /paraquat/	+ Maloran 50 WP /klórbrómuron/	4	+ 5
11.	SYS 67 ME /MCPA/	+ Maloran 50 WP /klórbrómuron/	2	+ 3
12.	SYS 67 ME /MCPA/	+ Maloran 50 WP /klórbrómuron/	2	+ 5
13.	Lucenit 80 WP /diuron/		2	
14.	Geonter 80 WP /terbacil/		1,5	
15.	Maloran 50 WP /klórbrómuron/		3	
16.	Maloran 50 WP /klórbrómuron/		5	
17.	Kontroll		-	

5. KISÉRLETI EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE

5.1. A *Conyza canadensis* triazin /atrazin/ érzékenységeinek vizsgálata levélkorong módszerrel

A triazin-rezisztens biotípus gyomnövények identifikálására több fiziológiai módszer használható /SOLYMOSI, 1982/. Ezen kísérleti metodikák nagy része azonban eszköz- és időigényes. Hensley /1981/ az un. levélkorong módszerrel a *Senecio vulgaris*, *Chenopodium album* és az *Amaranthus retroflexus* atrazin-rezisztens biotípusát határozta meg. Módszere nem eszközigényes és gyors. Magyarországon Hunyadi /1982/ a levélkorong módszerrel az *Amaranthus retroflexus* triazin-rezisztens biotípusát határozta meg.

Kutatási célunk a szőlőültetvényekben található *Conyza canadensis* triazin-érzékenységeinek gyors tesztelése, a levélkorong módszer adaptálásával /MIKULÁS, PÖLÖS, 1983/ az eredményes gyomirtási technológiák kidolgozása érdekében. Ezzel a gyors bioteszttel lehetőség van a triazin-rezisztens biotípusú növények célirányos begyűjtésére ill. maggyűjtésre.

Kísérleti eredményeink a 3. táblázatban láthatók.

Kontroll növényeknek herbicidmentes helyről, ruderaliáról /ut széle/ és házikertből gyűjtött növények levélkorongjai $< 2,5\%$ -ban lebegtek az atrazin $1,0 \times 10^{-4}$ M-os oldatában. Fotoszintézisük tehát gátolható atrazinnal, triazin-szenzitív biotípusba tartoznak. A Tarcal 3. vizsgálati minta levélkorongjai is 0% -

3. táblázat: A *Conyza canadensis* atrazin érzékenységének vizsgálata levélkorong módszerrel

Mintagyűjtés helye		Növény fenológiai stádiuma	1 óra megvilágítás után lebegő levélkorongok /%/	
			$1 \times 10^{-4} M$ atrazin	kontroll
Kecskemét-Miklóstelep szőlőültetvény		virágzó	100	100
		tőlevélrózsás	95,0	97,5
Hosszuhegyi ÁG	1. tábla	tőlevélrózsás	95,0	96,3
	2. tábla	tőlevélrózsás	96,3	98,8
	3. tábla	tőlevélrózsás	97,5	100,
	4. tábla	tőlevélrózsás	96,3	97,5
	5. tábla	tőlevélrózsás	100	100
Tokajhegy-aljai Borgazdasági Kombinát	Tarcal 1.	virágzó	100	100
	Tarcal 2.	virágzó	100	100
	Tarcal 3.	virágzó	0,0	100
	Tarcal 4.	virágzó	100	100
	Mád	virágzó	50,0	100
Balatonboglári ÁG szőlőültetvény	1. tábla	virágzás előtti	97,5	100
	2. tábla	virágzás előtti	95,0	97,5
	3. tábla	virágzás előtti	100	95,0
	4. tábla	virágzás előtti	97,5	97,5
Ruderália /ut széle/	tőlevélrózsás	2,5	100	
	virágzó	0,0	100	
Házikert	tőlevélrózsás	0,0	98,8	
	virágzás előtti	0,0	100	

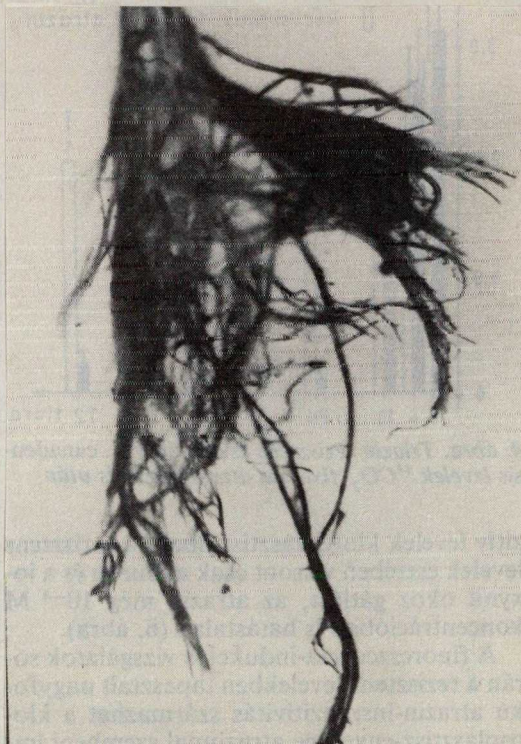
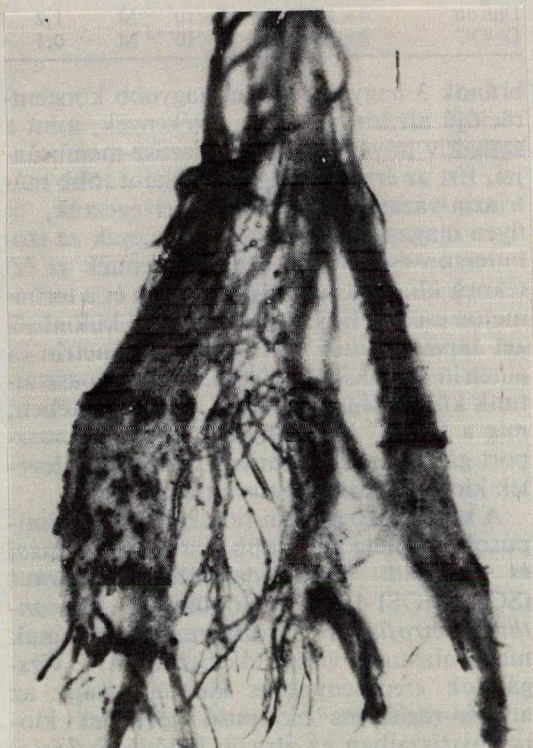


ban emelkedtek az oldat felszínére, a Mád-i minta levélkorongjainak 50 %-a lebeg az oldat felszínén. Az előbbi triazin-szenzitiv biotípusba tartozik, az utóbbi vegyes állományu /rezisztens, szenzitiv/ növénymintának számít. A szőlőtáblákból gyűjtött növényminták többségében a Conyza canadensis levélkorongjainak >95 %-a lebeg az atrazin-oldat felszínén. Fotoszintézisüket az atrazin nem gátolta, atrazin-rezisztens biotípusba tartoznak.

5.2. ^{14}C -atrazin felvétele és transzlokációja

A ^{14}C -atrazin felvételének és transzlokációjának mérésével triazin-rezisztencia természetére keressük a választ.

A gyökerek /9.ábra/ és levelek /10.ábra/ autoradiográfiás képe azt mutatja, hogy a gyökerek a jelzett atrazint felveszik és a levelekbe továbbítják a szenzitiv és a rezisztens növényekben egyaránt. A 11. ábrán a jelzett atrazin levelekben történő felhalmozódása látható, amely azt mutatja, hogy a kezelési idő növekedésével gyakorlatilag azonos mértékben egyre több atrazin halmozódik fel a szenzitiv és a rezisztens biotípus leveleiben.



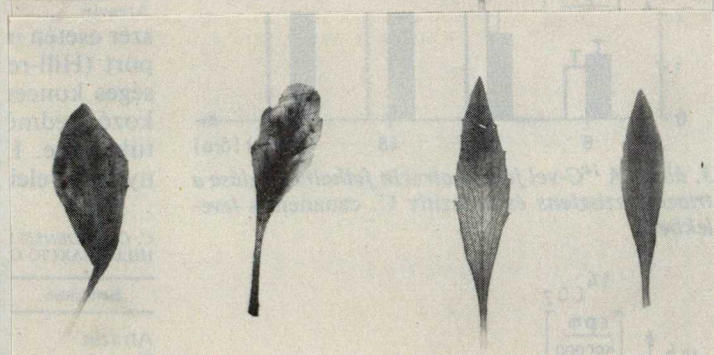
Rezisztens gyökér

szenzitiv gyökér

9. ábra: Triazin-rezisztens és triazin-szenzitiv Conyza canadensis gyökerek autoradiográfias felvétele $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ^{14}C -atrazin kezelés után

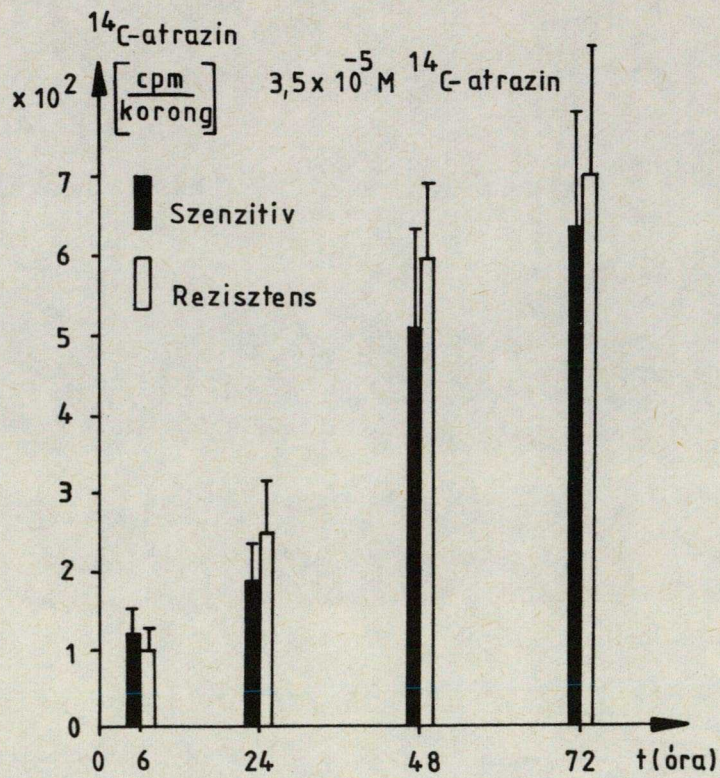


Rezisztens levelek



Szenzitiv levelek

10. ábra: Triazin-rezisztens és triazin-szenzitiv Conyza canadensis levelek autoradiográfias felvétele $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ^{14}C -atrazin kezelés után



11. ábra: ¹⁴C-atrazin felhalmozódása Conyza canadensis triazin-rezisztens és triazin-szenzitiv biotípusának levelében

5.3. $^{14}\text{CO}_2$ -fixáció

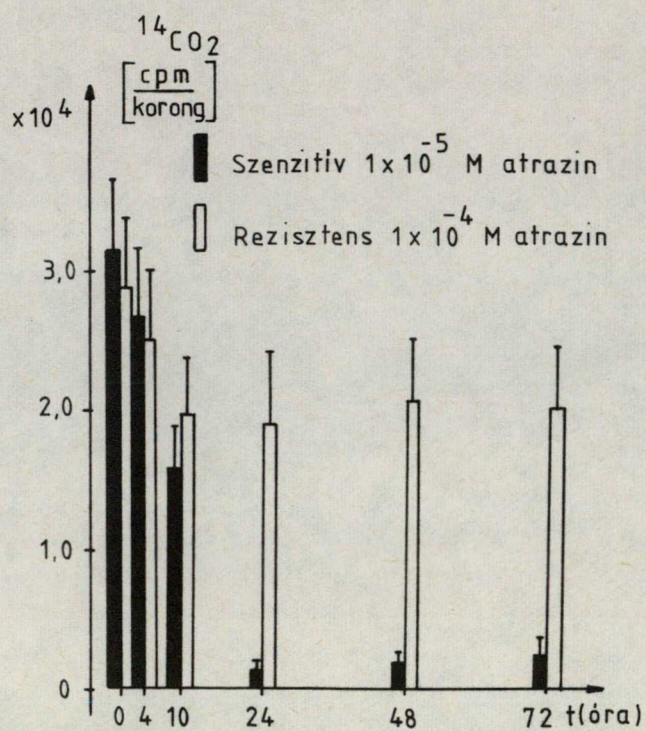
A triazin-rezisztens és szenzitív növények fotokémiai aktivitását $^{14}\text{CO}_2$ -fixációjuk alapján mértük. A 4. táblázatban az atrazin-kezelésnek a levelek CO_2 -fixálására gyakorolt azonnali hatását mutatjuk be. A szenzitív levelek esetében $1 \times 10^{-5}\text{M}$ atrazin 95 %-os csökkenést okozott, míg az egy nagyságrenddel nagyobb $1 \times 10^{-4}\text{M}$ atrazin is csak 40 %-kal csökkentette a rezisztens levelek CO_2 -fixációját. A növények az atrazint vizkulturás kezeléssel kapták, a levelek CO_2 -fixáló képességének időbeli változását is nyomon követtük /12. ábra/. Az érzékeny növények leveleiben $1 \times 10^{-5}\text{M}$ atrazin hatására a CO_2 -fixálás fokozatos csökkenése figyelhető meg, míg $1 \times 10^{-4}\text{M}$ atrazin 30 %-os csökkenést okoz a rezisztens levelek CO_2 -fixációjában.

5.4. Hill-reakció gátlása herbicidekkel

A $^{14}\text{CO}_2$ -fixáció vizsgálata során a triazin-rezisztens levelekben tapasztalt nagyfokú atrazin-inszenzitivitás származhat a kloroplasztisz-envelope atrazinnal szembeni impermeabilitásából, vagy magának az elektron-transzport láncnak olyan módosulásából, aminek következtében az atrazin gátló hatása nem érvényesül. Annak eldöntésére, hogy melyik mechanizmus valószínűségével számolhatunk, megvizsgáltuk a szenzitív és rezisztens levelekből izolált kloroplasztiszok Hill-reakciójának triazin herbicidekkel

4. táblázat: A *Conyza canadensis* $^{14}\text{CO}_2$ fixálása
atrazin kezelés után azonnal

	Szenzitiv /cpm/korong/	Rezisztens /cpm/korong/
Kontroll	29000 ± 3600	26600 ± 3900
Atrazin	1500 ± 500	17100 ± 2200



12. ábra: *Conyza canadensis* levelek ¹⁴CO₂-fixálású atrazin kezelés után

és egyéb elektrontranszport gátlókkal szembeni érzékenységet. Minden gátlószer esetén meghatároztuk az elektrontranszport /Hill-reakció/ 50 %-os gátlásához szükséges herbicid koncentráció I_{50} értéket. Erre vonatkozó eredményeinket az 5. táblázatban foglaltuk össze.

Herbicidek	Szenzitív I_{50}	Rezisztens I_{50}	R/S
Atrazin	$3 \times 10^{-7} M$	$3 \times 10^{-4} M$	1000
Simazin	$5 \times 10^{-7} M$	$3 \times 10^{-4} M$	600
Terbutilazin	$4 \times 10^{-7} M$	$3 \times 10^{-4} M$	720
Ametrin	$3 \times 10^{-7} M$	$3 \times 10^{-6} M$	10
Prometrin	$3 \times 10^{-7} M$	$5 \times 10^{-6} M$	14
Terbutrin	$1 \times 10^{-7} M$	$3 \times 10^{-6} M$	30
Terbumeton	$5 \times 10^{-7} M$	$3 \times 10^{-6} M$	6,0
Metribuzin	$5 \times 10^{-8} M$	$5 \times 10^{-6} M$	100
Diuron	$4 \times 10^{-8} M$	$5 \times 10^{-8} M$	1,2
Ioxynil	$4 \times 10^{-8} M$	$8 \times 10^{-8} M$	2,0
DNOC	$2 \times 10^{-4} M$	$2 \times 10^{-5} M$	0,1

5. táblázat: A *Conyza canadensis* izolált kloroplasztjainak Hill-reakció gátlása herbicidekkel

Látható, hogy a rezisztens növények leveleiből izolált kloroplasztok 3 nagyságrenddel nagyobb koncentrációju $R/S = 1000$ atrazinra voltak érzékenyek, mint a szenzitív növények kloroplaszt-membránjai. Magas rezisztencia faktort R/S kaptunk még a terbutilazin $R/S=720$ és a simazin $R/S=600$ esetén. A megvizsgált három klóramino-triazin /atrazin, simazin, terbutilazin/ ext-

rém magas rezisztencia értéket mutat.

Az asszimmetrikus triazinokhoz tartozó metribuzin rezisztencia faktora 100, amely közepes szintű rezisztenciát jelent. Egy nagyságrendnyi különbséget tapasztaltunk a rezisztens és a szenzitív kloroplasztok herbicid érzékenységében a metiltiotriazin prometrin, ametrin, terbutrin és a metoxi-triazin terbumeton esetén. Ez alacsony szintű rezisztenciát jelent. A karbamid herbicidekhez tartozó diuron $R/S=1,2/$ és a fenol herbicidekhez tartozó ioxynil $R/S=2/$ nem számítanak rezisztencia-ágensnek. A DNOC $R/S=0,1/$ hatékonyabb elektrontranszport gátlószernek bizonyult a rezisztens levelek kloroplasztisz membránjaiban. Ez a visszafordított rezisztencia mintájának tekinthető. A rezisztencia faktor értékek meghatározásával tehát összehasonlíthatjuk a különböző herbicidek Hill-reakció /elektrontranszportlánc/ gátló hatását a triazin-rezisztens és szenzitív kloroplasztokban.

5.5. Fotoszintetikus elektrontranszportlánc jellemzése fluoreszcencia indukció módszerével

A *Conyza canadensis* triazin-rezisztens és triazin-szenzitiv biotípusában a fotoszintetikus elektrontranszportlánc intaktságáról és a különböző herbicidekkel szembeni érzékenységről fluoreszcencia-indukciós vizsgálatokkal kaptunk információt.

A növények vizkulturás atrazin kezelése után a levelek fluoreszcencia indukciós görbéje a 13. ábrán látható. A szenzitiv biotípus fluoreszcencia indukciós görbéjének kinetikája $1 \times 10^{-5} \text{M}$ atrazin hatására megváltozott. A herbicid erősen stimulálta a fluoreszcencia indukció növekedését a F_M szintre. Ez alátámasztja, hogy az atrazin gátolja a fotoszintetikus elektrontranszportot a PS-2 redukáló oldalán a Q és PQ között. A Q^- gyors akkumulációja következik be, amely a fluoreszcencia intenzitást telítésbe viszi. A rezisztens biotípusnál az $1 \times 10^{-4} \text{M}$ atrazin nem változtatta meg az indukciós görbe kinetikáját. Ez azt jelenti, hogy atrazinnal a fotoszintetikus elektrontranszport nem gátolható a rezisztens biotípusú növényekben.

A levelek atrazinnal, diuronnal és ioxynillal történő infiltrálása után mért fluoreszcencia indukciós görbéi a 14. ábrán láthatók. Az atrazin hatása megegyezik a vizkulturás kezelés után kapott eredményekkel. A diuron és az ioxynil az atrazinhoz hasonlóan

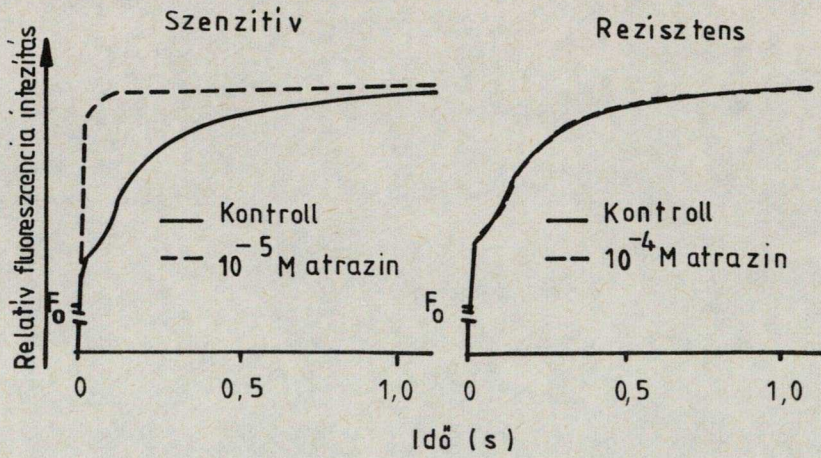
gátolja a fotoszintetikus elektrontranszportot a szenzitiv levelekben. A rezisztens levelekben az atrazinnal ellentétben a diuron és az ioxynil megváltoztatja a fluoreszcencia indukciós görbe kinetikáját, gátolják az elektrontranszportot a PS-II akceptoroldalán.

Az előzőekben ismertetett kísérleti eredmények megegyeznek a triazin-rezisztens és szenzitiv *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Senecio vulgaris* fotoszintetikus elektrontranszportjának fluoreszcencia indukciós vizsgálata során mért irodalmi adatokkal

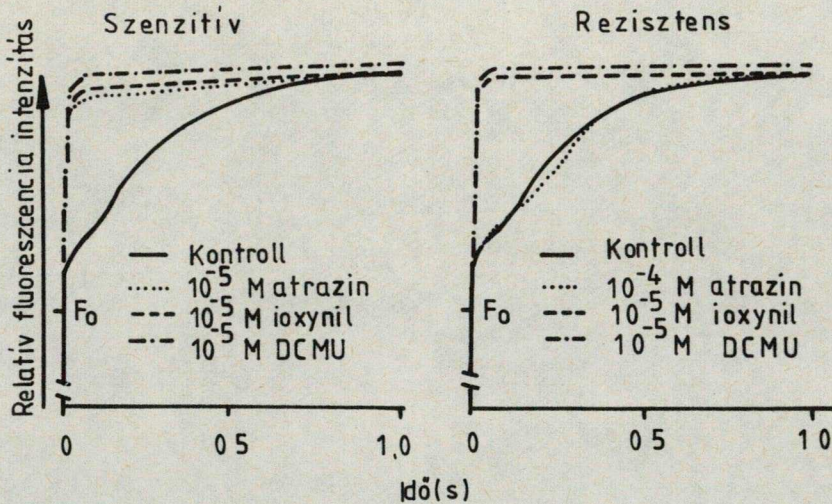
/ARNTZEN et.al. 1979, 1980/.

Az *Amaranthus retroflexus* és az *Amaranthus chlorostachys* vizsgálata során azt találták, hogy az atrazin érzékeny növényekből izolált kloroplasztiszok fluoreszcencia indukciós görbéinek amplitudója /változó fluoreszcenciája/ nagyobb, mint a rezisztenseké. A fluoreszcencia intenzitás időbeli változása alapján megállapítható volt, hogy a kezeltlen rezisztens minták fluoreszcencia indukciós görbéi meredekebbek és magasabb szintre emelkednek, mint a nem kezelt atrazin-érzékeny mintáké. Ebből következik, hogy a PS-2-ben a $Q^{\cdot-}$ reoxidációjának sebessége csökkentett a szenzitiv mintákhoz képest. Erre utal a rezisztens minták fluoreszcencia intenzitás változásának lelassulása is, ami kisebb aktivitású elektrontranszport jelenlétét feltételezi /ARNTZEN, 1980, SOLYMOSI, 1983/. Az eddigi irodalmi adatoktól eltérő a *Conyza canadensis* leveleken mért fluoreszcencia indukciós görbék menete, her-

bicidmentes közegben a triazin-rezisztens és -szen-
zitiv növények fluoreszcencia indukció görbéinek
amplitudója megegyezik.



13. ábra: *Conyza canadensis* levelek fluoreszcencia indukciója vizkulturás atrazinnal történő kezelés előtt és után



14. ábra: *Conyza canadensis* levelek fluoreszcencia indukciója atrazinnal, DCMU-val, ioxynillal történt infiltrálás után 1 óra múlva

5.6. Triazin-rezisztens és -szenzitiv *Conyza cana-* *densis* levelek alacsony hőmérsékletű fluoresz- cencia szinképe

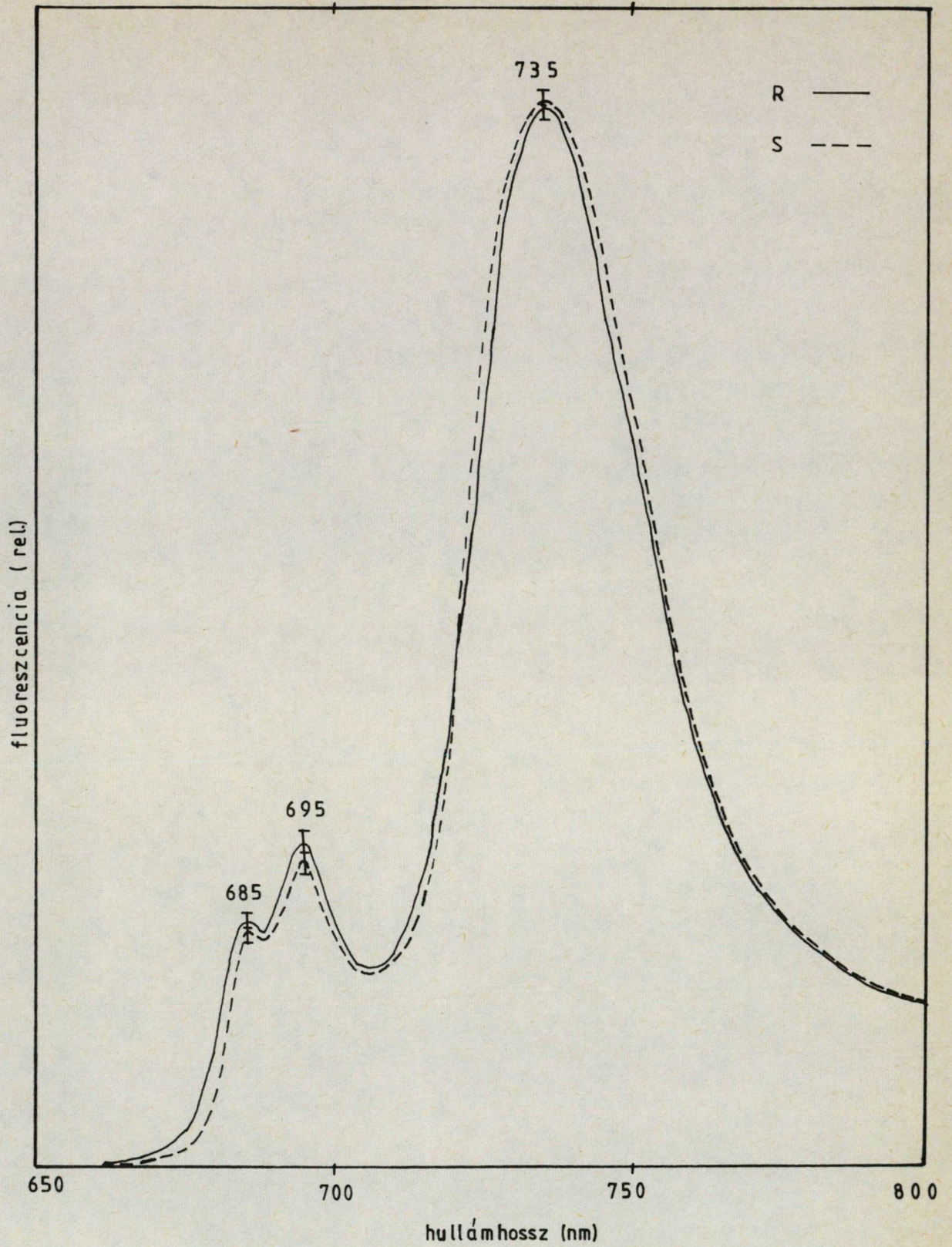
A fényindukálta fluoreszcencia indukciós vizsgálattal megállapítottuk, hogy PS-2 aktivitása herbicidmentes közegben a triazin rezisztens és a szenzitiv növénynél megegyezik.

Alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia szinképek felvételével akartuk tisztázni az előző jelenség strukturális alapját. Az 15. ábrán látható, hogy a rezisztens és szenzitiv biotípusú levél alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia-szinképe között nincs szignifikáns különbség. A zöld növényekre jellemző hármas strukturáltságot mutat, a fénygyűjtő klorofill a/b-protein komplexnek megfelelő 685 nm-es, a PS-2-nek megfelelő, 695 nm-es és a PS-1-nek megfelelő 735 nm-es fluoreszcencia maximummal.

A PS-2, amely az atrazin és diuron típusú herbicidek akcióhelye, fluoreszcencia maximuma gyakorlatilag megegyezik a triazin-rezisztens és -szenzitiv biotípusú növények leveleiben.

5.7. A kloroplasztisz membrán lipid- és zsírsav- analízise

A vizsgálat célja annak megállapítása, hogy a kloroplasztisz lipidösszetételének milyen mértékű módosulása eredményezheti a triazin-rezisztencia kialakulását.



15. ábra: Triazin-rezisztens és -szenzitív *Conyza canadensis* levelek alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia szinképe

A lipidosztályok mennyiségi eloszlása a triazin-rezisztens és -szenzitív biotípus kloroplasztjaiban a 6. táblázatban látható. A rezisztens növények kloroplasztjainak összlipid tartalma 50 %-kal alacsonyabb, mint a szenzitív növényeké. Mivel nincs szignifikáns különbség az összfoszfolipid /PL/ mennyisége között a szenzitív és a rezisztens biotípusban, az összlipid tartalom csökkenés a galaktolipidek mennyiségének csökkenésével magyarázható. A digalaktoszil-diglicerid /DGDG/ mennyisége jóval kevesebb a rezisztens biotípusban, a monogalaktoszil-diglicerid /MGDG/ tartalom 30 %-a a szenzitív biotípusának.

Az $\frac{MGDG}{DGDG}$ arány a szenzitív kloroplasztokban 1,6, a rezisztens kloroplasztokban 9,0. A galaktolipidek közül a DGDG mennyisége csökken legnagyobb mértékben /70 %-kal/ a rezisztens növények kloroplasztjaiban. A galaktolipid /foszfolipid/ Gl/PL/arány a szenzitív kloroplasztokban 3,3, a rezisztens kloroplasztokban 0,7. A poláris lipidek /GL, PL/ mennyisége kevesebb a triazin-rezisztens kloroplasztokban.

A lipidosztályok zsírsav összetétele /7. táblázat/ eltérő a triazin-rezisztens és a triazin-szenzitív kloroplasztokban. A PG kivételével a lipidosztályok mindegyikében nagyobb a linolénsav /18:3/ aránya a linolsavhoz /18:2/ viszonyítva a rezisztens biotípusban. Az összlipid 18:3/18:2 hányadosa szintén a rezisztens növények kloroplasztjában nagyobb. A telített zsírsavakhoz tartozó palmitinsav /16:0/ a re-

zisztens kloroplasztokban az MGDG-ben, a DGDG-ben és a PE-ben kisebb százalékban fordul elő, mint a szenzitiv kloroplasztokban. A telitetlen és a telített zsírsavak aránya az MGDG-ben, a DGDG-ben és a PE-ben nagyobb, a PG-ben és a PC-ben kisebb a triazin-rezisztens növények kloroplasztjaiban. A kloroplaszt összlipidjében a palmitinsav nagyobb százalékban fordul elő a rezisztens növényekben. A magasabb palmitinsav szint eredményeként a rezisztens kloroplaszt összlipidjében a telitetlen zsírsav/telített zsírsav arány kisebb, mint a szenzitiv növények esetén.

6. táblázat: Triazin-rezisztens és -szenzitiv *Conyza canadensis* kloroplasztiszok lipidösszetétele

Lipidosztályok	Lipidek mennyisége /mmol/mg klorofill/			
	Szenzitiv		Rezisztens	
MGDG	5,4	\pm 0,6	1,8	\pm 0,2
DGDG	3,4	\pm 0,4	0,2	\pm 0,1
GL	8,8	\pm 1,0	2,0	\pm 0,1
PL	2,8	\pm 0,4	2,9	\pm 0,5
Totál	13,0	\pm 2,0	5,7	\pm 0,9
$\frac{\text{MGDG}}{\text{DGDG}}$	1,6		9,0	
$\frac{\text{GL}}{\text{PL}}$	3,3		0,7	

7. táblázat: A *Conyza canadensis* triazin-rezisztens /R/ és -szenzitív /S/ kloro-
 plasztjában a lipidosztályok zsírsavösszetétele /%/

Lipidek		Totál	MGDG	DGDG	PG	PC	PE
Zsírsavak							
16:0	R	25,6	1,0 \pm 0,1	8,3 \pm 0,2	58,7 \pm 1,0	36,3 \pm 0,8	54,2 \pm 1,0
	S	15,2	5,4 \pm 0,2	13,2 \pm 0,3	47,3 \pm 0,6	31,9 \pm 0,5	65,6 \pm 0,7
18:0	R	1,1	-	1,2 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1
	S	2,3	-	2,0 \pm 0,4	0,8 \pm 0,1	2,5 \pm 0,2	-
18:1	R	2,0	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	2,9 \pm 0,2	3,3 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1
	S	2,4	0,7 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1	5,3 \pm 0,3	10,8 \pm 0,4	-
18:2	R	9,5	5,4 \pm 0,1	3,9 \pm 1,0	14,6 \pm 0,6	26,5 \pm 0,5	27,1 \pm 0,3
	S	16,5	7,3 \pm 0,3	12,3 \pm 0,5	14,3 \pm 0,4	29,6 \pm 0,7	28,1 \pm 0,8
18:3	R	61,7	93,0 \pm 0,5	86,0 \pm 5,0	23,0 \pm 1,0	31,4 \pm 0,3	16,0 \pm 0,4
	S	64,2	86,3 \pm 1,5	70,4 \pm 0,4	32,3 \pm 0,8	25,2 \pm 0,8	6,3 \pm 0,2
18:3	R	7,2	17,2	22,0	1,6	1,2	0,6
18:2	S	4,0	11,8	5,72	2,3	0,9	0,2
telítetlen	R	2,9	99,0	6,6	0,7	1,6	0,9
telített	S	5,6	17,5	1,8	1,1	1,9	0,5

5.8. A Hill-reakció aktivitásának vizsgálata a hőmérséklet függvényében

Az előző fejezetben bemutattuk, hogy a rezisztens és szenzitív növény kloroplasztjának lipid- és zsírsavösszetétele eltér.

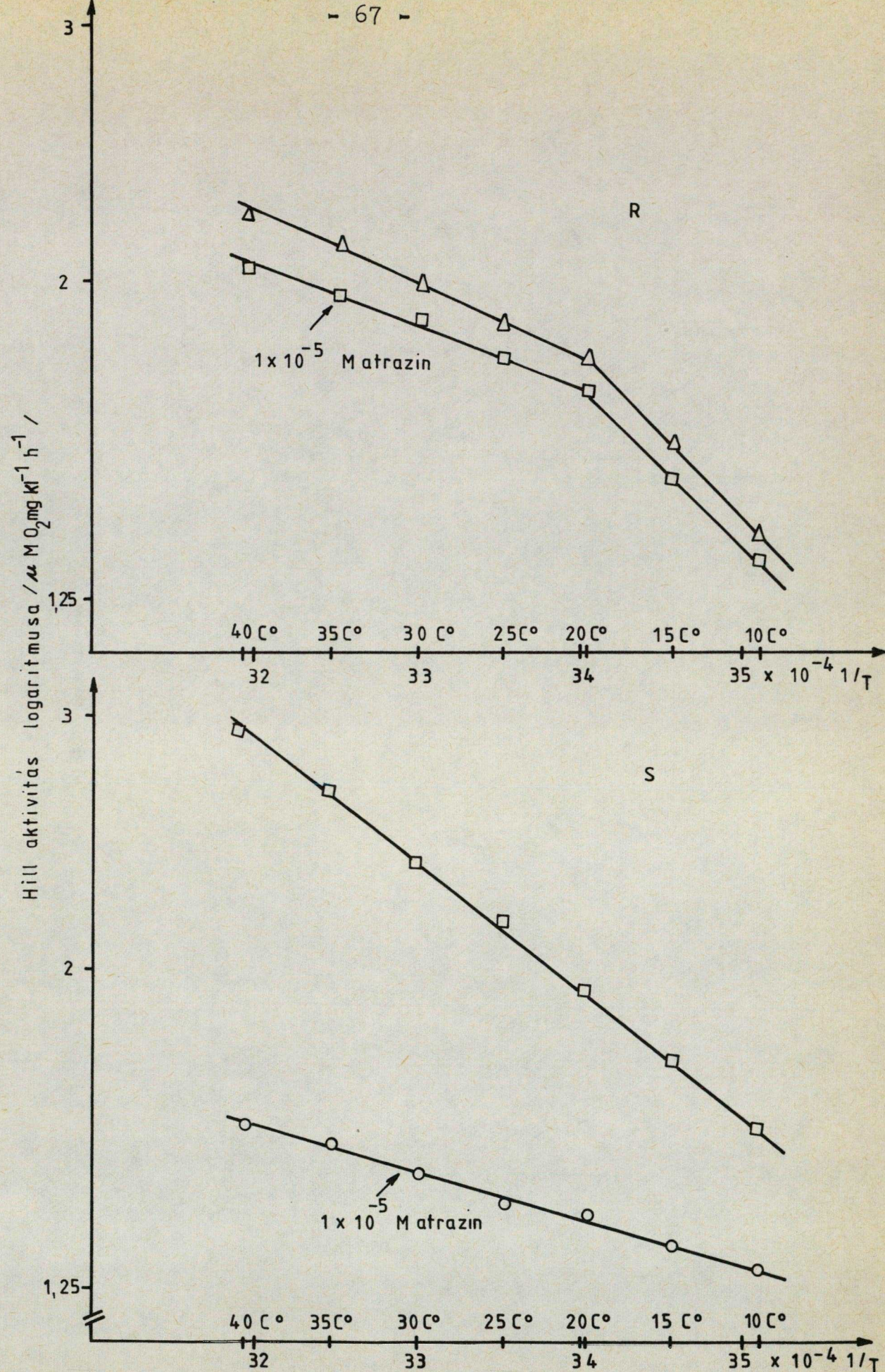
A Hill-reakció aktivitásának / O_2 termelés, DCPIP fotoredukciója/ hőmérséklet függésével vizsgáltuk a ti-lakoid membrán fiziko-kémiai állapotváltozásának hatását a fotoszintézis folyamatában. A Hill-reakció aktivitásának logaritmusát az abszolút hőmérséklet reciprokának / $1/T$ / függvényében ábrázoltuk /Arrhenius-féle fgv./. Az Arrhenius egyenes hajlásszögének tangense alapján, a $E_a = \text{tg} \alpha \cdot 2,303 R$ egyenlet alapján meghatároztuk a Hill-reakció aktivációs energiáját / E_a /. A Hill-reakció O_2 termelésének / $\mu\text{M}O_2\text{mg kl}^{-1}\text{h}^{-1}$ / és DCPIP fotoredukciójának /redukált $\mu\text{M DCPIP mg kl}^{-1}\text{h}^{-1}$ / aktivitása a hőmérséklet függvényében a 16. és 17. ábrán látható. Az aktivációs energiák értékei a 8. táblázatban vannak feltüntetve.

8. táblázat: A Hill-reakció aktivációs energiája a *Conyza canadensis* izolált kloroplasztiszsaiban

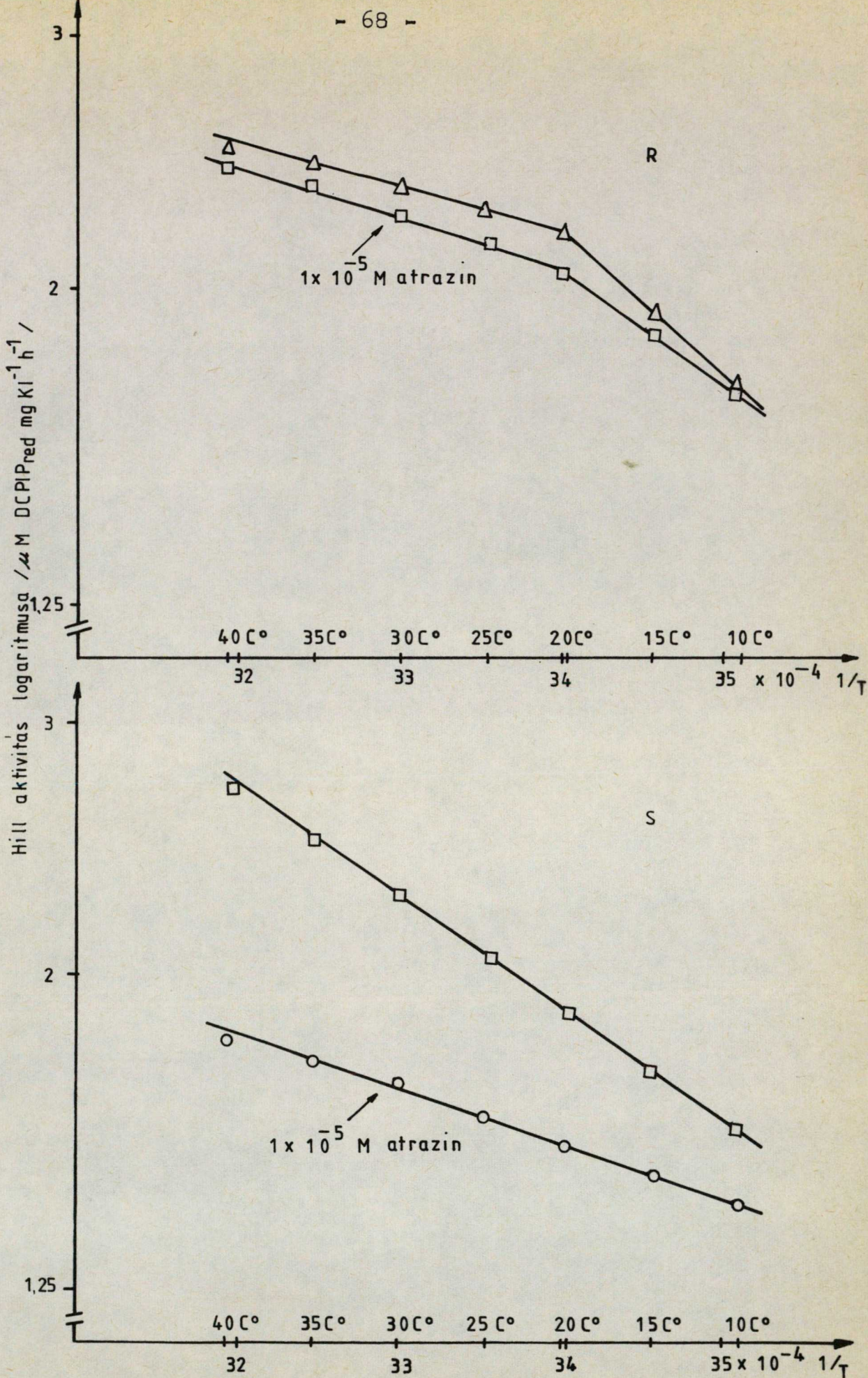
	O_2 termelés	DCPIP red.
R_{10-20}	20,1 KJ mol ⁻¹	19,1 KJ mol ⁻¹
R_{20-40}	8,2 "	6,4 "
$R_{10-20} + 1 \times 10^{-5}$ M Atr.	19,5 "	15,3 "
$R_{20-40} + 1 \times 10^{-5}$ M Atr.	6,9 "	7,7 "

	O ₂ termelés	DCPIP red.
S	15,3 KJ mol ⁻¹	11,5 KJ mol ⁻¹
S+1x10 ⁻⁵ M Atr.	5,6 "	4,8 "

A szenzitív biotípusból izolált kloroplasztiszok Hill-reakciójának Arrhenius egyenes meredeksége a 10-40 °C tartományban nem változik, az aktivációs energia állandó értéket mutat. A rezisztens biotípus kloroplasztisza Hill-reakciójának aktivációs energiája 20 °C-nál megváltozik, a 20-40 °C-os hőmérséklet tartomány aktivációs energiája kisebb, mint a 10-20 °C-os tartományé.



16. ábra: Hill-reakció aktivitása / $\mu\text{M O}_2 \text{ mg kl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ / a hőmérséklet függvényében



17. ábra: Hill reakció aktivitása / μ M DCPIP_{red} mg Kl⁻¹ h⁻¹ / a hőmérséklet függvényében

5.9. A triazin-rezisztens *Conyza canadensis* elleni
kémiai védekezés lehetőségei

A triazin-rezisztens betyárkóróval fertőzött szőlőültetvényekben a triazin-herbicidek alkalmazása hatástalan. Ezért szükséges felváltani e herbicideket más hatóanyagú gyomirtószerrel. Ezt szolgálták a szabadföldi gyomirtási kísérleteink. A vizsgálat célja az volt, hogy megállapítsuk néhány herbicid ill. herbicidkombináció gyomirtó hatását a triazin-rezisztens biotípusu *Conyza canadensis* ellen. A fluoreszcencia indukciós vizsgálatok a Hill-reakció herbicidgátlásának tanulmányozásakor mért rezisztencia faktor értékek alapján tudjuk, hogy a triazin-rezisztens növények fotoszintetikus elektrontranszportját a karbamid biotípusu herbicidek gátolják. Ezen kísérleti eredmények alapján alkalmaztunk herbamid hatóanyagú herbicideket /Lucenit 80 % diuron , Maloran 50 % klórbrómuron , Falisilvan 30 % fenuron / gyomirtási kísérletünkben. A herbamid herbicidek vizoldékony-sága gyenge, jó gyomirtó hatást csak kellő mennyiségű bemosó csapadék után biztosítanak. A gyors, kezdeti gyomirtóhatás biztosítására a Maloránt a MCPA hatóanyagú SYS 67 Me-vel kombináltuk. A kísérleti parcellákban közvetlenül a kezelés előtt megállapítottuk a gyomflóra összetételét és a gyomborítási %-ot. Az adatokat a 9. táblázat tartalmazza. A kezeléseket május 10-én, 17-én, június 1-én és július 8-án EWRC-skála segítségével értékeltük. Az értékelés eredményét

kar

lk

a 10. táblázat szemlélteti.

A parcellák értékelésekor azt tapasztaltuk, hogy azok a kezelések adtak jó gyomirtó hatást, ahol herbicidkombinációkat juttattunk ki. Így legjobb eredményt adott a Gramoxone 4l/ha + Sencor 70 WP 1 kg/ha /18. ábra/ és az MG 02 50 EC 5 l/ha + Falisilvan 50 WP 1,5 kg/ha /19. ábra/ kombinációja /mindkettő EWRC 1,31/. Az MG 02 50 EC 5 l/ha + Falisilvan 50 WP 0,5 kg/ha kombinációja az előző évtől eltérően 1983-ban erősen fitotoxikus /20, 21. ábra/ volt a szőlőre. A SYS 67 ME 2 kg/ha + Sencor 70 WP 1 kg/ha /22. ábra/ szintén jó hatású volt /EWRC 1,87/. A Lucenit 80 WP már 2 kg/ha dózisban /23. ábra/ elpusztította a magról kelő *E. canadensist* /EWRC 2/. Kicsivel gyengébb gyomirtó hatása volt a Gramoxone 4 l/ha + Sencor 70 WP 0,5 kg/ha /24. ábra/, illetve a SYS 67 ME 2 kg/ha + Sencor 70 WP 0,5 kg/ha /25. ábra/ kombinációknak /EWRC 2,31 illetve 2,37/. Elfogadható eredményt adott még a Geonter 80 WP 1,5 kg/ha /26. ábra/ és a SYS 67 Me 2 kg/ha + Maloran 50 WP 5 kg/ha /EWRC 3,56, 27. ábra/, valamint ugyanez a kombináció 2 + 3 kg/ha dózisban /EWRC 3,56, 28. ábra/. A többi herbicid hatása nem volt elfogadható. A kontroll parcella látható a 29. ábrán.

9. táblázat: A kísérleti parcellák gyomborítása /%/ a 4 ismétlés átlagában

Miklóstelep 1983.

Gyom- fajok	k e z e l é s e k s z á m a																
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.
1. CER VU					+		+		1,25						+	+	
2. CON AR											3,75	7,50			2,50		
3. DIG SA												+					
4. CON CA	11,50	11,25	15,00	17,50	9,50	11,50	17,00	12,50	22,50	17,50	16,25	18,75	14,00	15,00	23,75	21,25	27,00
5. ERO CI																	
6. GER RO															1,25		
7. LAM AM	5,50	2,50	5,00	5,00	2,00	2,50	4,25	2,50	10,00	7,90	11,25	6,25	6,00	7,50	8,75	8,75	6,25
8. LEP DR											1,25	7,50					1,25
9. SEN VE		+					+		+				+	+	0,75	+	0,50
0. STE ME	1,25			+	1,00			+							2,50		
1. SYS SO															0,50		
2. TAR OF															+		
3. VIC CR																	
	17,00	13,75	20,00	22,50	12,50	13,75	21,25	15,00	33,75	25,00	32,50	40,00	20,00	22,50	37,50	32,50	35,00

10. táblázat: A herbicidek gyomirtó hatása a triazin-
rezisztens *Conyza canadensis*-re

Kezelés száma	EWRC-értékek a 4 ismétlés átlagában				A 4 ér- tékelés átlaga
	május 10.	május 17.	június 1.	július	
1.	1,5	1,75	2,75	3,25	2,31
2.	1	1	1,25	2	1,31
3.	2	2	2	3,5	2,37
4.	1,5	1,75	2	2,25	1,87
5.	1,25	1	2	1	1,31
6.	8,25	8,5	8	8	8,19
7.	7,5	7,5	8	7	7,5
8.	9	9	9	9	9
9.	5,25	6,5	6,25	7,5	6,37
10.	4	3,75	4,25	6	4,5
11.	2,25	2,5	2,75	6,5	3,5
12.	3	2,75	2,5	6	3,56
13.	3	2	1,25	1,63	2
14.	4	4,25	1,75	2,88	2,22
15.	8,25	8,25	7,5	8,25	8,03
16.	8,25	8,75	7,5	8,25	8,31
17.	9	9	9	9	9



18. ábra:

Gramoxone + Sencor jó gyomirtóhatást biztosított a *Conyza canadensis* ellen.

Előtérben a Kontroll parcella látható.

19. ábra:

MG02 + Falisilvan hatására a kezelt parcellákban a *Conyza canadensis* elpusztult





20. ábra:
MG02 + Falisil-
van hatására a
szőlő erősen
károsodott



21. ábra: Fitotoxikus hatás az Ezerjő szőlő levelén MG02
+ Falisilvan hatására





22. ábra:

SYS 67 ME + Sencor
70 WP hatása a Conyza
canadensisre

23. ábra:

2 kg/ha Lucenit 80 WP
hatása a Conyza cana-
densisre, háttérben a
Kontroll parcella





24. ábra:

A 4 l/ha Gramoxone +
0,5 kg/ha Sencor 70 WP
jó gyomirtó hatású a
Conyza canadensis ellen

25. ábra:

2 kg/ha SYS 67 ME +
0,5 kg/ha Sencor
70 WP hatása a
*Conyza canadensis*re





26. ábra:

Geonter 80 WP hatására a szőlősorok gyommentessé váltak

27. ábra:

2 kg/ha SYS 67 ME +
5 kg/ha Maloran 50
WP hatása a Conyza
canadensisre





28. ábra:

2 kg/ha SYS 67 ME +
3 kg/ha Maloran 50 WP
hatása a Conyza cana-
densisre

29. ábra:

Kontroll parcella



6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A *Conyza canadensis* triazin /atrazin/ -rezisztens és triazin-szenzitiv biotípusát levélkorong módszerrel el lehet különíteni. A rezisztens biotípusú növények levélkorongjaiban az atrazin nem gátolta a Hill-reakciót. A zavartalan O_2 -fejlődés lehetővé tette a levélkorongok felemelkedését az oldat felszínére. A vákumos infiltrálással a levélkorongok intercelluláris járataiból az eltávolított levegő helyét a pufferoldat tölti ki, a korongok a kémcső alján maradnak. A fotoszintézis alapfeltételeit megteremtve /megvilágítás, CO_2 / a Hill-reakció által termelt O_2 az intercelluláris járatokból kiszorítja az oldatot, a levélkorongok fajsúlya csökken, az oldat felszínére tudnak emelkedni és ott lebegnek.

Az érzékeny biotípusú növények levélkorongjaiban a fotoszintézis gátlása miatt nem fejlődött oxigén, ezért a levélkorongok a kémcső alján maradtak.

Ezzel a módszerrel nagyszámu növény minta rövid idő alatt tesztelhető. Alkalmos bioteszt eljárás a szőlőültetvényekben található *Conyza canadensis* triazin érzékenységének vizsgálatára.

A ^{14}C -atrazin felvételének és transzlokációjának mérésekor kapott kísérleti eredmények azt mutatják, hogy az atrazin felvételében és transzlokációjában

nincs számottevő különbség a triazin-rezisztens és szenzitív biotípus között, sőt a kezelés első 24 órájában a rezisztens levelek még több atrazint akkumulálnak, mint a szenzitivek. A triazin herbicideket a rezisztens növények gyökerei felveszik és a hatáskifejtés helyére, a levelek felé továbbítják, ahol azok felhalmozódnak és minden valószínűség szerint bejutnak a kloroplasztiszba. Az eredmények tehát bizonyítják, hogy a triazin-rezisztencia oka nem a herbicid felvételének a transzlokációjának gátlásában van.

Az atrazin a szenzitív növények CO_2 -fixációját szignifikánsan nagyobb mértékben gátolta, mint a rezisztens növényekben. A rezisztens növényekben herbicid jelenlétében mért fotokémiai aktivitás / $^{14}\text{CO}_2$ -fixáció/ értékek azt mutatják, hogy a fotoszintézis nem gátolható atrazinnal. Az intakt levelek fotokémiai aktivitásának / $^{14}\text{CO}_2$ -fixáció/ mérésével bizonyítottuk azt is, hogy a *Conyza canadensis* triazin-rezisztencia okát a fotoszintetizáló apparatus szerveződésben kell keresni.

A triazin-rezisztens és szenzitív növényekből izolált kloroplasztok Hill-reakciójának herbicid gátlását több inhibitor esetén is meghatároztuk. A klóraminó-triazinok /atrazin, simazin, terbutilazin/ nagy rezisztencia faktor értékei bizonyítják,

hogy nem blokkolják az elektrontranszport láncot a rezisztens növényekben, így a Hill-reakció aktivitása sem gátolt. Az eredményekből látható, hogy a triazin-rezisztens kloroplasztba valószínűleg bejut a herbicid, de valószínűleg a herbicid kötőhely módosulása következtében nem tudja gátló hatását kifejteni. Ez megerősíti a korábbi megfigyeléseket, ugyanis a triazin-rezisztens gyombiotípusok többsége atrazin és simazin hatására szelektálódott ki.

A metiltio- és metoxi-triazinok közel azonos mértékben képesek a rezisztens növények elektrontranszport láncát blokkolni, mint a szenzitív növényekét. Ezek a herbicidek $-OCH_3$ és $-SCH_3$ csoportot tartalmaznak abban a pozícióban, ahol az atrazinban $-Cl$ fordul elő. Ez a megfigyelés hozzájárulhat a triazin-receptor régió molekuláris feltérképezéséhez, másrészt felhívja a figyelmet ezen herbicidek gyakorlati alkalmazhatóságára a klóramino-triazinokra rezisztens növények esetén.

A karbamid herbicidekhez tartozó diuron az atrazin-rezisztens kloroplasztokban hatékony elektrontranszport lánc inhibitornak bizonyult. Valószínű, hogy a diuron kötődése a herbicid-receptorhelyen / Q_B -protein/ nem károsodott a triazin-rezisztens kloroplasztok tilakoid membránjaiban, így gátló hatása is érvényesülhet az elektrontranszport folyamatában.

Ez a herbicidcsalád perspektivikusan felhasználható a triazin-rezisztens biotípusu *Conyza canadensis* gyomirtására.

A Hill-reakció herbicidgátlásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a klóramino-triazinokkal szemben inszenzitív a triazin-rezisztens kloroplastok Hill-aktivitása. A fényindukálta gyors fluoreszcencia változásának mérésével kerestük a pontos választ a jelenség magyarázatára. Vizsgáltuk, hogy a különböző fotoszintézisgátló herbicidek képesek-e gátolni a fotoszintetikus elektron transzport láncot a PS-2 redukáló oldalán a Q és PQ között a triazin-rezisztens kloroplastokban.

A fluoreszcencia indukciós görbe kinetikáját nem változtatta meg az atrazin a triazin-rezisztens kloroplastban, ellentétben az urea típusu diuronnal és a fenol típusu ioxynillel. A triazin-szenzitív kloroplastban az atrazin erősen stimulálta a fluoreszcencia növekedését a maximális F_M szintre.

Általánosan elfogadott, hogy a triazin és urea típusu herbicidek a PS-2 redukáló oldalán a Q és PQ között fejtik ki gátló hatásukat. Herbicidek jelenlétében a Q-ról történő elektronátvitel gátolt /2. 3. 4. fejezet, 9. ábra/, a nem fluoreszcencia-kioltó Q^- felhalmozódik, emiatt a fluoreszcencia intenzitás gyors növekedése figyelhető meg időben vál-

tozó komponensek nélkül. A $Q/Q^{\cdot-}$ arány változása tehát a fényindukálta fluoreszcencia jellegzetes időbeli változásában tükröződik.

A triazin-szenzitiv kloroplaszt fluoreszcencia indukciós görbéje atrazin jelenlétében a $Q^{\cdot-}$ akkumulációját jelzi, tehát az elektronátmenet gátolt a PQ irányába. A triazin-rezisztens kloroplasztban atrazin jelenlétében a fluoreszcencia indukciós görbe kinetikája megegyezik a kontroll görbéjével, ami a $Q^{\cdot-}$ reoxidációjának normális ütemét jelzi. A $Q^{\cdot-}$ -tól a PQ irányába az elektronátmenet tehát nem gátolt. Az atrazin kötődése a Q_B proteinen valószínűleg "károsodott", ezért az atrazin-allosztérikus gátlóhatását nem tudja kifejteni a $Q^{\cdot-}$ reoxidációjában, így az elektrontranszport lánc nem gátolt.

A rezisztens és szenzitiv levelekben a fotoszintetikus elektrontranszport aktivitása herbicidmentes közegben megegyezik, amely a kontroll fluoreszcencia indukciós görbék kinetikájából leolvasható. Az alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia szinkép alapján megállapítható, hogy a triazin-rezisztens és -szenzitiv növények PS-2-je strukturálisan megegyezik.

A tilakoid membrán lipid- és zsírsav összetételének vizsgálatával tanulmányoztuk azokat a strukturális változásokat, amelyek a herbicid kötődés gátlásához vezethetnek. A kloroplaszt lipid- és zsír-

savanalízis eredményei szerint a triazin-rezisztens növényekben 50 %-kal csökken az össz lipid mennyisége, ezen belül a galaktolipidek /MGDG 30 %-kal, DGDG 70 %-kal/ mennyisége csökken jelentősen. Ez a változás a poláris lipidek arányát csökkenti a kloroplaszt összlipidjében. A rezisztens kloroplasztban a foszfolipidek mennyisége nagyobb, mint a GL. A rezisztens kloroplasztok lipidosztályaiban a 18 : 3 / 18 : 2 és a telitetlen / telített zsírsav arány nagyobb, mint a szenzitív növényekben. A rezisztens kloroplasztban a membránlipidek gazdagabban telitetlen zsírsavakban.

A kloroplasztiszok lipid eloszlására általában jellemző - egyéb sejtalkotókkal összehasonlítva - a magas galaktolipid /GL/ és alacsonyabb foszfolipid /PL/ tartalom /QUINN,- WILLIAMS 1978/.

A kloroplasztiszok lipidek strukturális és funkcionális szerepéről az alábbi elképzelések születtek:

a./ A lipidek alapvető strukturális szerepe a fotoszintetikus membránok apoláris régiójának létrehozása.

b./ A lipidek membránon belüli eloszlása és különösen a telitetlen/telített zsírsavak aránya a membrán fizikokémiai paramétereire döntő hatással van, a membrán fluiditásának megváltozása vagy megváltoztatása olyan élettani-funkcionális jelenségeket tesz értelmezhetővé, mint a növények fagyűrőképessége /QUINN,- WILLIAMS 1978/.

c./ A galaktolipideknek főleg strukturális szerepet tulajdonítanak, ugyanis oldalláncaik révén a klorofilok fitol részével interakcióba kerülve stabilizálhatják a membránstruktúrát /SELLDEN,-SELLSTAM 1976/.

d./ A plasztisz lipidek magas linolénsav /18:3/ tartalmának membrán fluiditás növelő és a membránfehérjéket a szabad gyökök általi degradációtól megvédő szerepet tulajdonítanak.

A lipidanalízis eredményei alapján feltételezhető, hogy a triazin-rezisztens biotípusból izolált tilakoid membrán fluidabb, mint a triazin-szenzitív biotípusé.

Általánosan elfogadott, hogy az atrazin-kötő Q_B protein strukturális megváltozása felelős az atrazin-kötődés, és így a herbicidérzékenység csökkenéséért a triazin-rezisztens biotípusú gyomnövényekben.

Az atrazin-szenzitív és -rezisztens biotípusból izolált Q_B -protein aminosav összetételének és szekenciájának analízise /a Q_B -protein 228. pozíciójú aminosava glicin, szerin helyett, a rezisztens biotípusban/ a Q_B -protein strukturájában jelentős változás nem feltételezhető, ami nem jelenthet jelentősebb funkcionális módosulást.

Az eredményeink azt mutatják, hogy a tilakoid membrán lipidösszetételének módosulása is szerepet játszik herbicid-rezisztencia kialakulásában. A lipidösszetétel változása /GL csökkenés, a linolénsav arányának növekedése/ módosítja a tilakoidmembrán lipidfázisának fizikokémiai állapotát, ami a triazin-

rezisztens biotípus Hill-reakciója aktivációs energiájának 20 °C-on bekövetkezett változásában is megfigyelhető. A lipidkörnyezet módosulása hozzájárulhat a tilakoid membrán külső felszínén elhelyezkedő herbicidkötő Q_B -protein térszerkezetének változásához, aminek eredményeként a herbicidek nem képesek kötődni a receptor helyen, így a Q és a PQ közötti elektrontranszportot sem blokkolják.

A *Conyza canadensis* triazin-rezisztens biotípusa elleni gyomirtási kísérletben több herbicid, ill. herbicidkombináció jó eredményt adott. A metribuzin hatóanyagú Sencor 70WP herbicidkombinációban a Gramoxone-val /paraquat/ és a SYS 67 Me-vel /MCPA/ az egész vegetáció alatt jó tartamhatást biztosított. A metribuzin asszimetrikus triazin rezisztencia faktora ugyan közepes értéket /R/S=100/ mutat, de a magról kelő *Conyza* ellen hatékony. A tőlevélrózsás növényeket a paraquat és az MCPA posztemergensen elpusztítja, a talajban levő magkészletből a metribuzin hatására nem tudnak életképes gyomnövények fejlődni. Természetesen a szőlősorokban levő gyomtársulásban a *Conyza canadensis* mellett található többi gyomnövény ellen is kell védekezni. A paraquat az egyszikűek, az MCPA az évelő kétszikűek ellen szélesíti a gyomirtási spektrumot.

A klórbrómuron hatóanyagu Malorán is a paraquat-val és a MCPA-val kombinálva adott jó gyomirtó hatást.

A Maloran rossz vizoldékonysága miatt sok bemosó csapadékot igényel, a gyökérzónába megkésve juthat, ezért a gyors kezdeti gyomirtóhatást a kombinációs partner biztosítja.

A Hill-reakció herbicidgátlásának vizsgálatakor a diuron rezisztencia faktor értéke $R/S=1,2$ alacsony volt, a Hill-aktivitást a triazin-rezisztens kloroplasztokban is hatékonyan gátolta. A fényindukálta fluoreszcencia indukció mérésével bizonyítottuk, hogy blokkolja az elektron transzport láncot a rezisztens és a szenzitív növényekben egyaránt. A diuron hatóanyagu Lucenit 80 WP herbicid 2 kg/ha dózisban kitűnő gyomirtó hatást mutatott a triazin-rezisztens *Conyza canadensis* ellen. Perspektivikusan felhasználható a *Conyza canadensis* gyomirtására.

A terbacil /uracil herbicid/ hatóanyagu Geonter 80 WP 1,5 kg/ha dózisban szintén hatékonyan felhasználható a triazin-rezisztens biotípus ellen. Az évelő egyszikűek, az évelő kétszikűek /kivételesen a *Convolvulus arvensis*/ elleni hatása miatt széles gyomirtási spektrumot biztosít. A Geonter hatás kifejtéséhez a megfelelő mennyiségű bemosó csapadék alapvetően fontos.

Az MGO2 50 EC /acetoklór/ + Falisilvan /fenuron/ herbicidkombináció a szőlőre fitotoxikus volt, ami

a felhasználhatóságát kétségessé teszi. A Lucenit 80 WP, a Geonter 80 WP és Sencor 70 WP + Gramoxone herbicidkombináció nagyüzemi kísérletekben is megerősítette a kisparcellás gyomirtási eredményeket. Ezek a herbicidek eredményesen használhatók a triazin-rezisztens *Conyza canadensis* gyomirtására.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben a *Conyza canadensis* triazin-rezisztenciájának fiziológiai, biokémiai okait vizsgáltuk. A disszertáció célkitűzésében megfogalmazott feladatok megvalósításával kapcsolatban eredményeinket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. Levélkorongos bioteszttel triazin-rezisztens és -szenzitív biotípust határoztunk meg.
2. A ^{14}C -atrazin felvételében és transzlokációjában nincs szignifikáns különbség a triazin-rezisztens és -szenzitív biotípus között.
3. CO_2 -fixációs vizsgálattal bizonyítottuk, hogy a triazin-rezisztencia oka a fotoszintetizáló apparátus szerveződésében, működésében van.
4. A Hill-reakció herbicidgátlásának mérése alapján megállapítottuk, hogy a klóramino-triazinok nem, a karbamid herbicidok gátolják a rezisztens biotípus fotoszintetikus elektrontranszportját. Meghatároztuk a herbicidok rezisztencia faktor /R/S/ értékeit.
5. A fluoreszcencia indukciós vizsgálattal bizonyítottuk, hogy a fotoszintetikus elektrontranszport a PS-2 redukáló oldalán a Q és a PQ között nem blokkolható atrazinnal a triazin-rezisztens biotípusban. A diuron és az ioxynil hatékony

elektrontranszport lánc inhibitornak bizonyult.

6. A triazin-rezisztens és -szenzitív növények tilakoid membránjának lipid és zsírsavösszetétele eltérő. Ez a változás módosíthatja a herbicidkötő Q_B protein térszerkezetét, amely a herbicidkötés "károsodásához", a Q és PQ közötti elektrontranszport gátlásának elmaradásához vezethet.
7. Kutatási eredményekre épülő gyomirtási technológiát dolgoztunk ki a triazin-rezisztens *Conyza canadensis* ellen.

Vizsgálataink során a *Conyza canadensis* biokémiai herbicid-rezisztenciáját bizonyítottuk, a triazin-rezisztencia mechanizmusának új alternatív lehetőségét vetettük fel, gyomirtási technológiát dolgoztunk ki a rezisztens biotípusu *Conyza canadensis* ellen.

8. RÖVIDÍTÉSEK

Asc =	aszkorbát
B =	a fotoszintézis 2. fotokémia rendszerének másodlagos elektron akceptora
CON AR =	Convolvulus arvensis
CON CA =	Conyza canadensis
CER VU =	Cerastium vulgare
cyt f =	Citokróm-f
cyt b =	Citokróm-b
DIG SA =	Digitaria sanguinalis
DGDG =	Digalaktoszil diglicerid
DCPIP =	Diklórfenol - indofenol
ERO CI =	Erodium cicutarium
EWRC skála /1-9/=	Az Európai Gyomkutatási Tanács /European Weed Research Council/ által elfogadott gyomirtási skála, legalacsonyabb értéke a legjobb gyomirtóhatást jelzi
FeCy=	Ferricianid
Fd=	Ferredoxin
FP =	Ferredoxin - NADP oxi-reduktáz
GL =	Galaktolipid
GER RO =	Geranium rotundifolium
LAM AM =	Lamium amplexicaule
LEP DR =	Lepidium draba
MGDG =	Monogalaktoszil - diglicerid
P 680 =	2. fotokémiai rendszer reakciócentruma
P 700 =	1. fotokémiai rendszer reakciócentruma
PC =	Foszfatidilkolin

PE =	Foszfatidiletanolamin
PG =	Foszfatidil-glicerol
PL =	Foszfolipid
PS-1 =	A fotoszintézis 1. fotokémiai rendszere
PS-2 =	A fotoszintézis 2. fotokémiai rendszere
PQ =	Plasztokinon
Q =	1. fotokémiai rendszer elsődleges elekt- ronakceptora
SEN VE =	Senecio vernalis
STE ME =	Stellaria media
SYS SO =	Symbrium sophiae
TAR OF =	Taraxacum officinale
VIC CR =	Vicia cracca
16 : 0 =	palmitinsav
17 : 0 =	margarinsav
18 : 0 =	sztearinsav
18 : 1 =	olajsav
18 : 2 =	linolsav
18 : 3 =	linolénsav

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. ARNTZEN, C. J., DITTO, C., BREWER, P.E. /1979/:
Chloroplast membrane alterations in triazine-resistant *Amaranthus* biotypes
Proc. nat. Acad. Sci /Wash./ 76:278-282
2. ARNTZEN, C. J., PFISTER, K., STEINBACK, K.E. /1980/:
The mechanism of chloroplast Triazine-resistance. Alterations in the Herbicide site of Action
In: Herbicide Resistance in Plant /eds. Le Baron, H. and Gressel, J./ Wiley, New York
3. AVRON, M., NEUMAN, J. /1968/:
Photophosphorylation in chloroplast s
Annu. Rev. Plant. Physiol. 19:137-166
4. AVRON, P., KUNERT, K.J. /1979/:
Differential effects of herbicides upon trypsin-treated chloroplast
Z. Naturforsch. 34 c:1015-1025
5. BOUGES-BOCQUET, B. /1973/:
Electron transfer between the two photosystems in spinach chloroplast
Biochim. Biophys. Acta 314:250-256
6. CODD, G.A., SCHMID, G.H. /1980/:
Effects of 3-/3,4 - dichlorophehyl/ -N, N' - dimethylurea on oxygen evolution and fluorescence by whole filaments and isolated thylakoids of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*

Z. Naturf. ~~or~~ Sch. 35 c:649-655

7. CONARD, S.G., RADOSEVICH, S.R. /1979/:
Ecological fitness of *Senecio vulgaris* and *Amaranthus retroflexus* biotypes susceptible or resistant to triazine
J. Appl. Ecol. 16:171
8. CROZE, E., KELLY, M., HORTON, P. /1979/:
Loss of sensitivity to diuron after trypsin digestion of chloroplast photosystem II particles
FEBS Lett. 103:22-26.
9. DRIESEL, A. J., SPEIRS, J., BOHNERT, H.J. /1980/:
Spinach chloroplast m RNA for a 32,000 dalton polypeptide. Size and localization on the physical map of the chloroplast DNA
Biochim. Biophys. Acta 610:297-310
10. DUYSSENS, L.N.M., SWEERS, M.E. /1963/:
Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence
/In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria.
JAPAN Soc. Plant. Physiol. /ed./ /
University of Tokyo Press, Tokyo
11. FOLCH, J, LEES, M., SLOANE - STANLEY, G.H. /1957/:
A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues
J. Biol. Chem. 226:497-509

12. GARDNER, G. /1981/:

Azidoatrazine: photoaffinity label for the site of triazine herbicide action in chloroplasts.

Science 211:937-940

13. GOVINDJEE, R. /1975/:

Introduction to photosynthesis /In: Bioenergetics of photosynthesis, Govindjee /Ed./

Acad, Press, New York - San Francisco - London

14. GRESSEL, J. /1979/:

Genetic herbicide resistance: projections on appearance in weeds and breeding for it in crops

In: Plant regulation and world Agriculture

Ed.: Scott, T. K. Plenum, New York

15. GRESSEL, J. AMMON, H.U. FOGELFORS, H. GASQUES, J.,

KAY, Q. O. N., KEES, H. /1982/:

Discovery and distribution of herbicide resistant - weeds outside North-America

In: Herbicide Resistance in Plant /eds. Le Baron, H. and Gressel, J./

Wiley, New York

16. HARTMANN, F. /1979/:

Az Amaratnhus retroflexus L. atrazinnal szembeni rezisztenciája és a rezisztens biotípus elterjedése Magyarországon

Növényvédelem 12:491-495

17. HARTMANN, F. /1981/:

Az *Erigeron canadensis* L. atrazinnal szembeni rezisztenciája és terjedése Komárom megyében
Növényvédelem 3:133-137

18. HENSLEY, J. R. /1981/:

A method for identification of triazine resistant and susceptible biotypes of several weeds
Weed Sci., Champaign, Ill., 29:70-73

19. HIRSCHBERG, J., MCINTOSH, L. /1983/:

Molecular Basis of Herbicide Resistance in *Amaranthus hybridus*
SCIENCE 222:1346-1349

20. HUNYADI, K. /1982/:

Gyors módszer a gyomnövények triazin-rezisztens és érzékeny biotípusának meghatározására
MTA Növényvédelmi Tudományos Napokon elhangzott előadás Bp.

21. IZAWA, S., GOOD, N.E. /1965/:

The number of sites sensitive to 3-/3,4-dichlorophenyl/-1,1-dimethylurea, 3-/4-chlorophenyl/-1,1-dimethylurea and 2 chloro-4-/2-propylamino/-6-ethylamino-s-triazine in isolated chloroplasts
Biochim. Biophys. Acta 505:183-213.

22. JENSEN, K. I. N., BANDEEN, J.D., SOUZA MAXHADO V.
/1977/:

Studies on the differential tolerance of two lambsqu-

arters selections to s-triazine herbicides
Can. J. Plant Sci. 57:1169

23. JENSEN, K. I. N. /1980/:

The role of uptake translocation and metabolism in
the differential intraspecific responses to herbi-
cides

Mscr.

24. KHAN, M. V., WILLIAMS, J. P. /1977/:

Improved thin-layer chromatographic method for the
separation of major phospholipids and glycolipids from
plant extracts and phosphatidyl glycerol and bis /mo-
noacylglycerol/ phosphate from animal lipid extracts

J. Chromatography 140:179-185

25. KLIMOV, V. V., DOLANE, E., KE, B. /1980/:

EPR properties of an intermediary electron acceptor
/pheophytin/ in photosystem II reaction centers at
cryogenic temperatures

FEBS lett. 112. 97-100

26. MATTOO, A. K., PICK, U., HOFFMAN-FALK, H., EDELMAN,
M. /1981/:

The rapidly metabolized 32,000-dalton polypeptide
of the chloroplast is the proteinaceous shield,
regulating photosystem II. electron transport and
mediating diuron herbicide sensitivity.

Proc. Natl. Acad. Sci USA 78:1572-1576

27. MIKULÁS, J., PÖLÖS, E. /1983/:
Erigeron canadensis L. térhódítása szőlőültetvényekben és visszaszorításának lehetősége
Növényvédelem, 4 : 149-153
28. MORELAND, D. E. /1980/:
Mechanism of action of herbicides
Ann. Rev. Plant. Physiol. 31 597-638
29. MULLET, J. E., ARNTZEN, C. J. /1981/:
Identification of a 32-34-kilodalton polypeptide as a herbicide receptor protein in photosystem II.
Biochim. Biophys. Acta 635:236-248
30. OETTMER, V., MASSON, K., JOHANNINGMEIER, U. /1980/:
Photoaffinity labelling of the photosystem II herbicide binding protein
FEBS Lett. 118:267-270
31. PFISTER, K., ARNTZEN, C. J. /1979/:
The mode of action of photosystem II-specific inhibitors in herbicide-resistant weed biotypes
Z. Naturforsch. 34 c:996-1009
32. PFISTER, K., RADOSEVICH, S.R. ARNTZEN, C. J. /1979/:
Modification of herbicide Binding to Photosystem II. in two biotypes of Senecio vulgaris L.
Plant Physiol. 64:999
33. PILLAI, P., ST. JOHN, J. B. /1981/:
Lipid composition of chloroplast membranes from

weed biotypes differentially sensitive to triazine herbicides

Plant Physiol. 68:585-587

34. QUINN, P. J., WILLIAMS, W. P. /1978/:

Plant lipids and their role in membrane function

Prog. Biophys. Molec. Biol. 34:109-173

35. RADOSEVICH, S.R., APPLEBY, A. P. /1973/:

Relative susceptibility of two common groundsel

/Senecio vulgaris L./ biotypes to six s-triazines

Argon. J., Madison, Wis., 65:553-555

36. RADOSEVICH, S.R. /1977/:

Mechanism of atrazine resistance in lambsquarters and pigweed

Weed Sci., Champaign, Ill 25:316-318

37. RADOSEVICH, S.R., STEIBACH, T., ARNTZEN, C.J. /1980/:

Effects of Photosystem II. inhibitors on thylakoid

membranes of two common groundsel /Senecio vulgaris/ biotypes

Weed Sci. 27:116

38. RENGER, G. /1976/:

Studies on the structural and functional organization of system II of photosynthesis; the use of trypsin as a structurally selective inhibitor at the outer surface of the thylakoid membrane

Biochim. Biohys. Acta 440:287-300

39. RENGER, G., HAGEMANN, R., DOHNT, G. /1981/:
Properties of the proteinaceous component acting as
apoenzyme for the functional plastoquinone redox
groups on the acceptor side of system II
Biochim. Biophys. Acta 636: 17-26
40. RYAN, G. F. /1970/:
Resistance of common groundsel to simazine and
atrazine
Weed Sci. 18:614-616
41. SELLDEN, G., SELLSTAM, E. /1976/:
Changes in chloroplast lipids during the develop-
ment of photosynthetic activity in barley etio-
chloroplasts.
Plant. Physiol. 37:35-41
42. SHIPMAN, L. L. /1981/:
Theoretical study of the binding site and mode of
action for photosystem II. herbicides
J. Theor. Biol. 90:123-148
43. SHONE, M. G. T., WOOD, A. V. /1972/:
Factors responsible for the tolerance of blackcur-
rants to simazine
Weed Res., Oxford 12:337
44. SOLYMOSI, P. /1980/:
Az Amaranthus retroflexus triazinrezisztens bioti-
pusa érzékenységének vizsgálata pre-emergensen al-

kalmazott herbicidekkel szemben

Növényvédelem 11:543-546

45. SOLYMOSI, P. /1981/:

Amaranthus és Chenopodium gyomfajok, valamint rezisztens típusaik csirázásának dinamikája

Növényvédelem 3:114-121

46. SOLYMOSI, P. /1982/:

Herbicid-rezisztens biotípusok és toleráns taxonok földrajzi elterjedése

Növényvédelem 10:453-459

47. SOLYMOSI, P. /1982/:

Fiziológiai módszerek a herbicid-rezisztens biotípusok gyors felismerésére

Növényvédelem, 6:252-254

48. SOLYMOSI, P., LEHOCZKY, E. /1983/:

Különböző termőhelyről származó atrazin-rezisztens minták összehasonlító vizsgálata az Amaranthus retroflexus esetén

Növénytermelés, 5:427-434

49. STEINBACK, K. E., PFISTER, K., ARNTZEN, C.J. /1981/:

Trypsin-mediated removal of herbicide binding sites within the photosystem II. complex

Z. Naturforsch. 36C: 98-108.

50. TISCHER, W., STROTMANN, H. /1977/:

Relationship between inhibitor binding by chloroplasts

- and inhibition of photosynthetic electron transport
Biochim. Biophys. Acta 460:113-125.
51. TISCHER, W., STROTMANN, H. /1979/:
Some properties of the DCMU-binding site in chloroplasts
Z. Naturforsch. 34 c:992-995.
52. TREBST, A. /1979/:
Inhibition of photosynthetic electron flow by phenol and diphenylether herbicides in control and trypsin-treated chloroplasts
Z. Naturforsch. 34 c:986-991.
53. VAN RENSEN, J.J.S., VAN STEGKELBURG, P.A. /1965/:
The effect of the herbicides simetone and DCMU on photosynthesis
Meded. Landbonwhogesch Wageningen 65 /13/:1-8.
54. VAN RENSEN, J.J.S., KRAMER, H.J.M. /1979/:
Short circuit electron transport insensitive to diuron-type herbicides induced by treatment of isolated chloroplasts with trypsin
Plant. Sci. lett. 17:21-27.
55. VARGA, M. /1980/:
A vegyszeres gyomirtás elméleti alapjai
JATE Növényélettani Tanszék
Jegyzet 150-158.

56. VELTHUYS, B. R., AMESZ, J. /1974/:
Charge accumulation at the reducing side of system
2 of photosynthesis
Biochim. Biophys. Acta 333:85-94.
57. VERMAAS, W. F. J., VAN RENSEN, J. J. S. /1981/:
Mechanism of bicarbonate action on photosynthetic
electron transport in broken chloroplasts
Biochim. Biophys. Acta 636:168-174.
58. WARWICK, D. D. /1976/:
Plant variability in triazine resistance
Residue Rev., Springer Verlag, New York, 65:56-63.
59. WESSELS, J. S., VAN DER VEEN, R. /1956/:
The action of some derivatives of phenylurethan and
of 3-phenyl - 1,1 - dimethylurea on the hill reaction
Biochim, Biophys. Acta 19:548-549.
60. WEST, L. D., MUZIK, T. J. WITTER, R. E. /1976/:
Differential gas exchange responses of two biotypes
of redroot pigweed to atrazine
Weed Sci. 24:68.

Ez a dolgozat a József Attila Tudomány-
egyetem Biofizika Tanszékén készült. Tiszte-
lettel fejezem ki köszönetemet dr. Szalay László
egyetemi tanárnak, hogy kísérleteim elvégzését le-
hetővé tette.

Ezuton is szeretném megköszönni dr. Lehoczky
Endrének, dr. Laskay Gábornak és dr. Mikulás
Józsefnek értékes szakmai és módszertani taná-
csait, mellyel munkámat mindvégig segítették.