

УДК 581.32:632.954:633.15

ВПЛИВ ІНГІБІТОРА НАДФН-ОКСИДАЗИ ТА АНТАГОНІСТІВ КАЛЬЦІЮ НА ФІТОТОКСИЧНУ ДІЮ ГЕРБІЦИДІВ ІНГІБІТОРІВ АЦЕТИЛ-КоА-КАРБОКСИЛАЗИ ТА АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗИ

А.М. СИЧУК, Є.Ю. МОРДЕРЕР

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: SychukAnna@i.ua*

Для з'ясування вагомості внеску активних форм кисню (АФК), які можуть утворюватися внаслідок неспецифічної стресової реакції, зокрема активування НАДФН-оксидази, у розвиток патогенезу, індукованого гербіцидами інгібіторами ацетил-КоА-карбоксилази (АКК) і ацетолактатсинтази (АЛС), досліджено вплив інгібітора НАДФН-оксидази дифеніленійодхлориду (DPI), блокатора кальцієвих каналів хлориду лантану (LaCl_3) та антагоніста кальмодуліну хлорпромазину (ХП) на фітотоксичну дію гербіцидів цих класів. Встановлено, що вплив DPI, LaCl_3 і ХП на фітотоксичну дію інгібітора АЛС значно перевищував їх вплив на дію гербіциду інгібітора АКК. Зроблено висновок, що в патогенезі, індукованому гербіцидами інгібіторами АЛС, певну роль відіграють АФК, які утворюються в результаті неспецифічної стресової реакції рослин, а для гербіцидів інгібіторів АКК вагомим є внесок АФК, які походять з іншого джерела.

Ключові слова: НАДФН-оксидаза, дифеніленійодхлорид, хлорид лантану, хлорпромазин, активні форми кисню, програмована загибель клітин.

Вивчення індукованого гербіцидами патогенезу має велике значення для вдосконалення хімічного методу контролювання бур'янів [4, 5]. Розкриття механізмів патогенезу дасть змогу розробити методи підвищення ефективності застосування гербіцидів, визначити критерії відбору перспективних сайтів дії для створення нових гербіцидних препаратів, необхідних для контролювання резистентних до існуючих гербіцидів біотипів бур'янів.

Встановлено, що в патогенезі, індукованому гербіцидами, фітотоксичність яких зумовлена дезорганізацією фотосинтезу, задіяний процес програмованої загибелі клітин (ПЗК) [17, 18, 22, 27]. Свідчення участі ПЗК в індукованому патогенезі отримано також для гербіцидів інгібіторів ацетил-КоА-карбоксилази та ацетолактатсинтази [12, 13]. Зокрема доведено, що за дії цих гербіцидів відбувається фрагментація ДНК по моноолігонуклосомах [12, 13], а це є однією з основних ознак ПЗК [20, 29]. Підвищення виживаності клітин за дії гербіциду інгібітора АЛС за умови їх попередньої обробки інгібітором тваринної каспази також підтверджує участь ПЗК в індукованому цим гербіцидом патогенезі [13].

Відомо, що АФК є ключовими модуляторами ПЗК у різних груп організмів, у тому числі й рослин [16, 21, 24, 26]. Тому дані щодо участі

АФК у розвитку фітотоксичної дії [3, 7, 8] та впливу стану антиоксидантно-прооксидантної рівноваги рослин на їх чутливість до гербіцидів інгібіторів АКК [10, 30] додатково свідчать про участь АФК-залежної ПЗК у патогенезі, індукованому цими гербіцидами.

Оскільки конкретні механізми деструктивної та ефекторної стадій ПЗК у рослинах маловідомі, то з погляду можливості модифікації фітотоксичної дії гербіцидів найцікавішим є механізм сигнальної стадії ПЗК, який у разі АФК-залежної ПЗК, індукованої гербіцидами, пов'язаний з механізмом утворення АФК за дії зазначених гербіцидів. Якщо для гербіцидів, фітотоксична дія яких зумовлена взаємодією з фотосинтезом, інтенсифікація утворення АФК є прямим наслідком дезорганізації функціонування фотосинтезу [19], то гербіциди інгібітори АКК не взаємодіють безпосередньо з електронтранспортними ланцюгами пластид рослин. Відомо, що в генеруванні АФК у рослинах за дії стресорів можуть брати участь різні ферментні системи, зокрема пероксидази [15] та НАДФН-залежні оксидази [25, 31]. Висловлено припущення, що утворення АФК за дії гербіцидів інгібіторів АКК пов'язане з неспецифічною стресовою реакцією рослин на дію згаданих гербіцидів [7, 9]. Дослідженням активності іонозв'язаної пероксидази клітинної стінки [7] та НАДФН-оксидази [9] у меристемах кореня проростків кукурудзи виявлено різке підвищення активності цих ферментів за дії гербіциду інгібітора АКК галоксифоп-*R*-метилу. Однак активність ферментів продуцентів АФК зростала лише на початку розвитку фітотоксичної дії гербіциду. Оскільки вміст супероксидних аніон-радикалів (САР) у меристемах підвищувався протягом тривалішого періоду до появи некрозів у меристемах [7], було зроблено висновок, що за дії гербіцидів інгібіторів АКК окрім неспецифічної стресової реакції існує інше джерело утворення АФК [9]. У зв'язку з цим постало запитання щодо питомої ваги кожного з джерел утворення АФК у розвитку фітотоксичної дії гербіцидів інгібіторів АКК.

Відомо, що негативний вплив гербіцидів інгібіторів АЛС на відносно стійкі до них культурні рослини пов'язаний з оксидним стресом, індукованим дією цих гербіцидів [1, 6]. Однак питання щодо ролі АФК у патогенезі, індукованому гербіцидами інгібіторами АЛС, залишається дискусійним. З одного боку, доведено, що попередня обробка чутливих до гербіциду інгібітора АЛС трибенуронметилу проростків гороху антиоксидантом іонолом ослаблює, а екзогенним пероксидом водню — посилює фітотоксичну дію гербіциду, що підтверджує участь АФК у розвитку фітотоксичної дії [13]. З іншого боку, зміни фітотоксичності гербіциду інгібітора АЛС за дії анти- та прооксиданту були істотно меншими, ніж за дії гербіциду інгібітора АКК [3, 13], звідки можна дійти висновку, що внесок АФК у дію інгібіторів АЛС істотно менший, ніж у дію інгібіторів АКК. Водночас подібність ефектів взаємодії при комплексуванні гербіцидів інгібіторів АКК та АЛС із гербіцидом метрибузином, який як інгібітор транспорту електронів у ФС II хлоропластів виявляє прооксидантну активність [11], є свідченням того, що чутливість рослин до гербіцидів інгібіторів АЛС залежить від стану антиоксидантно-прооксидантної рівноваги, що підтверджує участь АФК в індукованому патогенезі.

У зв'язку з цим для з'ясування вагомості внеску АФК, які утворюються внаслідок активування НАДФН-оксидази, у розвиток патогенезу, індукованого гербіцидами інгібіторами АКК і АЛС, було досліджено

вплив інгібітора НАДФН-оксидази дифеніленийодхлориду на фітотоксичну дію гербіцидів цих класів. Оскільки НАДФН-оксидаза є кальційзалежним ферментом [2], ми дослідили також вплив блокатора кальцієвих каналів хлориду лантану (LaCl_3) та антагоніста кальмодуліну хлорпромазину на фітотоксичну дію гербіцидів.

Методика

Досліджували інгібітор АКК галоксифоп-*R*-метил (ГФ) (препарат зеллек супер) та інгібітор АЛС трибенуронметил (ТМ) (препарат гранстар). Об'єктами слугували чутливі до гербіцидів культурні рослини як модель чутливих видів бур'янів: до інгібітора АКК — кукурудза (*Zea mays* L.), до інгібітора АЛС — горох (*Pisum sativum* L.).

Насіння пророщували в термостаті за температури 24 °С в кюветах на фільтрувальному папері, змоченому дистильованою водою. Проростки обробляли ДРІ, LaCl_3 та ХП на 3-тю добу після початку пророщування їх замочуванням на 1 год у відповідних розчинах. Концентрації модифікаторів: ДРІ — 100, LaCl_3 — 100, ХП — 10 мкМ підбирали попередньо так, щоб вони не пригнічували наростання маси проростків. Потім їх промивали водопровідною водою й замочували на 15 хв у розчинах гербіцидів. Концентрації ГФ — $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л та ТМ — $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л підбирали з таким розрахунком, щоб істотно пригнітити наростання маси проростків, але не спричинити появи некрозів у меристемах коренів протягом періоду спостережень. Фітотоксичну дію гербіцидів визначали за пригніченням наростання маси сирі речовини коренів проростків. Зважували їх на 11-ту добу пророщування. Досліди проводили у чотириразовій повторності. Результати оброблено статистично методом дисперсійного аналізу за допомогою стандартного комп'ютерного пакета Microsoft Excel.

Результати та обговорення

Встановлено, що інгібітор НАДФН-оксидази майже не впливає на приріст маси коренів проростків кукурудзи й гороху. Водночас за попередньої обробки проростків ДРІ фітотоксична дія обох гербіцидів ослаблювалась, причому ДРІ впливав на фітотоксичну дію ТМ значно сильніше, ніж на дію ГФ (рис. 1).

Звідси випливає, що для розвитку фітотоксичної дії гербіцидів інгібіторів АЛС вагомою є роль АФК, які утворюються внаслідок активування НАДФН-оксидази. Водночас для гербіцидів інгібіторів АКК стресова АФК не відіграє головної ролі, вагомішим є внесок АФК, які утворилися з іншого джерела.

Цей висновок підтвердили результати досліджень впливу блокатора кальцієвих каналів LaCl_3 й антагоніста кальмодуліну ХП на фітотоксичну дію гербіцидів інгібіторів АКК й АЛС. LaCl_3 і ХП практично не вплинули на пригнічення ГФ наростання маси коренів кукурудзи, але істотно ослабили вплив ТМ на наростання маси коренів проростків гороху (рис. 2).

Отже, отримані дані підтвердили, що в розвитку фітотоксичної дії гербіцидів інгібіторів АЛС задіяні АФК, які утворюються внаслідок стресової реакції рослини, а за впливу гербіцидів інгібіторів АКК — головну роль відіграють АФК, які походять з іншого джерела. Врахувавши

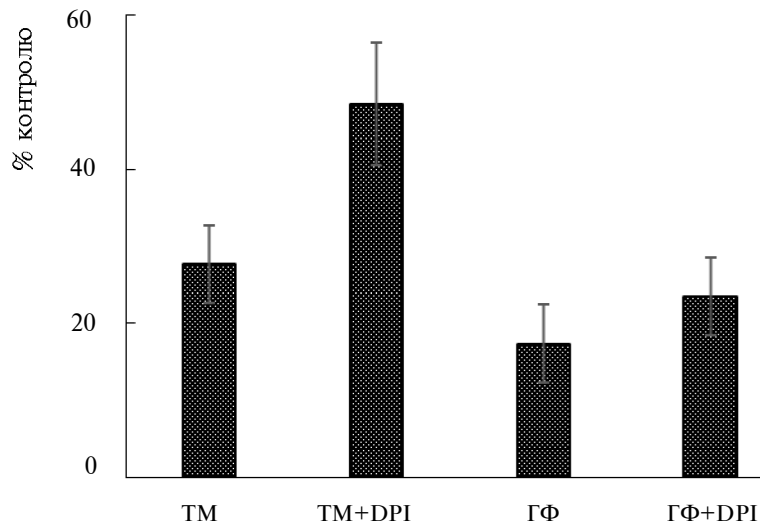


Рис. 1. Маса сирій речовини (% контролю) коренів проростків гороху за дії гербіциду ТМ та коренів проростків кукурудзи за дії гербіциду ГФ у разі попередньої обробки проростків інгібітором НАДФН-оксидази дифенілендіхлоридом

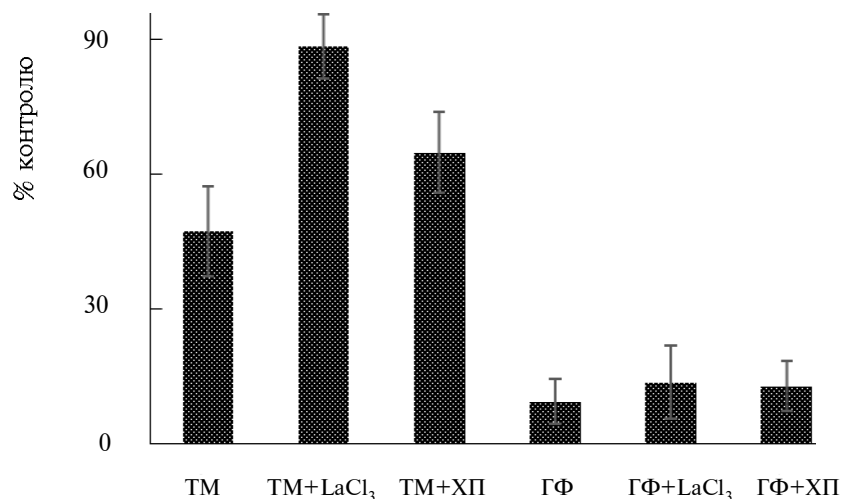


Рис. 2. Маса сирій речовини (% контролю) коренів проростків гороху за дії гербіциду ТМ та коренів проростків кукурудзи за дії гербіциду ГФ у разі попередньої обробки проростків блокатором кальцевих каналів LaCl₃ та антагоністом кальмодуліну ХП

відмінності джерел утворення АФК, а також той факт, що дія гербіцидів інгібіторів АЛС менш чутлива до впливу анти- і прооксидантів, ніж дія гербіцидів інгібіторів АКК [13], логічно зробити висновок, що ці гербіциди відрізняються за механізмом ініціації ПЗК. Оскільки гербіцидна дія інгібіторів АКК зумовлена виключно впливом на чутливу форму цього ферменту, яка локалізована у пластидах рослин родини тонконогових [23], можна припустити, що джерелом утворення АФК, які відігра-

ють основну роль у розвитку фітотоксичної дії цих гербіцидів, є електронтранспортні ланцюги хлоропластів і мітохондрій, функціонування яких порушується внаслідок блокування гербіцидом синтезу жирних кислот, необхідних для оновлення ліпідів мембран у пластидах. У такому разі ПЗК, індукована гербіцидами інгібіторами АКК та гербіцидами, які взаємодіють із процесом фотосинтезу, є подібною, тобто АФК-залежною, оскільки в обох випадках розвиток фітотоксичної дії опосередкований утворенням АФК, зумовленим порушеннями в електронтранспортних ланцюгах пластид.

Водночас фітотоксична дія гербіцидів інгібіторів АЛС зумовлена тим, що в разі блокування активності цього ферменту пригнічується синтез амінокислот із розгалуженим ланцюгом, дефіцит яких спричинює гальмування синтезу ДНК і пригнічує поділ клітин [32]. Тому логічно припустити, що за дії гербіцидів інгібіторів АЛС ПЗК ініціюється за так званим ядерним механізмом [28]. Відомо також, що різні шляхи ініціації ПЗК не відокремлені один від одного. Зокрема білок р53, що є фактором транскрипції і відіграє основну роль у функціонуванні ядерного механізму ПЗК, здатний переміщуватися з ядра в мітохондрії й ініціювати низку подій, характерних для АФК-залежної ПЗК [14]. Тому АФК, які утворилися внаслідок неспецифічної стресової реакції рослин на дію гербіцидів інгібіторів АЛС, можуть робити певний внесок у розвиток їх фітотоксичної дії, хоча механізм ініціації ПЗК за дії цих гербіцидів відмінний від АФК-залежної ПЗК, притаманної гербіцидам, які взаємодіють із процесом фотосинтезу, та інгібіторам АКК.

1. *Гарькова А.Н., Русяева М.М., Нуштаева О.В. и др.* Обработка гербицидом гранстар вызывает окислительный стресс в листьях злаков // Физиология растений. — 2011. — **58**, № 6. — С. 935–944.
2. *Глянько А.К., Ищенко А.А., Митанова Н.Б., Васильева Г.Г.* НАДФН-оксидаза растений // Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2009. — Вип. 2 (17). — С. 6–18.
3. *Мордерер Є.Ю., Паланиця М.П., Родзевич О.П.* Дослідження участі вільнорадикальних окиснювальних реакцій у розвитку фітотоксичної дії грамініцидів // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — **40**, № 1. — С. 56–62.
4. *Мордерер Є.Ю.* Сучасний стан, проблеми та перспективи розвитку хімічного методу боротьби з бур'янами // Там само. — № 6. — С. 492–502.
5. *Мордерер Є.Ю.* Фізіологічні аспекти захисту посівів від бур'янів // Физиология растений: проблемы та перспективи розвитку. — К.: Логос, 2009. — Т 2. — С. 12–39.
6. *Паланиця П.М., Сорокіна С.І., Мордерер Є.Ю.* Активні форми кисню та їх трансформація під час формування бобово-ризобіального симбіозу за дії гербіцидів // Физиология и биохимия культ. растений. — 2012. — **44**, № 4. — С. 302–311.
7. *Паланиця М.П., Трач В.В., Мордерер Є.Ю.* Генерування активних форм кисню за дії грамініцидів і модифікаторів їх активності // Там само. — 2009. — **41**, № 4. — С. 328–334.
8. *Паланиця М.П., Трач В.В., Родзевич О.П., Мордерер Є.Ю.* Можлива участь активних форм кисню у розвитку фітотоксичної дії грамініцидів // Там само. — 2008. — **40**, № 4. — С. 355–361.
9. *Радченко М.П., Сичук А.М., Мордерер Є.Ю.* Активність НАДФН-оксидази у меристемах коренів проростків кукурудзи за дії гербіциду інгібітору ацетил-КоА-карбоксилази // Физиология растений и генетика. — 2016. — **48**, № 6. — С. 544–547.
10. *Радченко М.П., Сичук А.М., Мордерер Є.Ю.* Зменшення антагонізму в сумішах гербіцидів за допомогою специфічного інгібітора активності супероксиддисмутази // Уч. записки Таврич. нац. ун-та ім. В.И. Вернадского. Сер. Біологія, хімія. — 2013. — **26** (65), № 3. — С. 161–168.
11. *Сичук А.М., Нізков Є.І., Родзевич О.П., Мордерер Є.Ю.* Ефекти взаємодії у сумішах гербіцидів інгібіторів ацетолататсинтази з гербіцидом метрибузином // Карантин і захист рослин. — 2016. — № 2-3. — С. 27–29.

12. Сичук А.М., Радченко М.П., Мордерер Е.Ю. Запрограммована загибель клітин у патогенезі, індукованому гербіцидами — інгібіторами ацетил-КоА-карбоксилази // Біологічні студії. — 2013. — 2. — С. 101—106.
13. Сичук А.М. Участь запрограмованої загибелі клітин у індукованому гербіцидами патогенезі: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2015. — 21 с.
14. Bates S., Vousden K.H. Mechanisms of p53-mediated apoptosis // Cell. Mol. Life Sci. — 1999. — 55. — P. 28—37.
15. Bindschedler L.V., Dewdney I., Blee K.A. et al. Peroxidase-dependent apoptotic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance // Plant J. — 2006. — 47. — P. 851—863.
16. Burbidge E., Diamond M., Dix P.J., McCabe P.F. Use of a cell morphology to evaluate the effect of a peroxidase gene on the cell death induction thresholds in tobacco // Plant Sci. — 2007. — 172. — P. 853—860.
17. Chen S., Dickman M. Bc1-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides // J. Exp. Bot. — 2004. — 55. — P. 2617—2623.
18. Chichkova N.V., Shaw J., Galiullina R.A. et al. Phytaspase, a relocatable cell death promoting plant protease with caspase specificity // EMBO J. — 2010. — 29. — P. 1149—1161.
19. Dan Hess F. Light-dependent herbicides: an overview // Weed Sci. — 2000. — 48. — P. 160—170.
20. Danon A., Delorme V., Mailhac N., Gallois P. Plant programmed cell death: a common way to die // Plant Physiol. Biochem. — 2000. — 38. — P. 647—655.
21. Dat J.F., Pellinen R., Beeckman T. et al. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco // Plant J. — 2003. — 33. — P. 621—632.
22. De Freitas D., Coelho M., Souza M. et al. Introduction of the anti-apoptotic baculovirus *p35* gene in passion fruit induces herbicide tolerance, reduced bacterial lesions, but does not inhibit passion fruit woodiness disease progress induced by cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) // Biotechnol. Lett. — 2007. — 29. — P. 79—87.
23. Delye C. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update // Weed Sci. — 2005. — 53. — P. 728—746.
24. De Pinto M., Locato V., de Gara L. Redox regulation in plant programmed cell death // Plant Cell Environ. — 2012. — 35. — P. 234—244.
25. Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H. et al. Reactive oxygen species produced by NADPH-oxidase regulate plant cell growth // Nature. — 2003. — 6. — P. 422—442.
26. Gechev T.S., Breusegem F. Van, Stone J.M. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death // Bioassays. — 2006. — 28 (11). — P. 1091—1101.
27. Graham M.Y. The diphenylether herbicide lactofen induces cell death and expression of defense-related genes in soybean // Plant Physiol. — 2005. — 139. — P. 1784—1794.
28. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis // Nature. — 2000. — 407. — P. 770—776.
29. O'Brien E.W., Baguley B.C., Murray B.G. et al. Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible // Plant J. — 1998. — 13. — P. 803—814.
30. Radchenko M.P., Sychuk A.M., Mordeyer Ye.Yu. Decrease of the herbicide fenoxaprop phytotoxicity in the drought condition: the role of antioxidant enzymatic system // J. Plant. Protection Res. — 2014. — 54, Iss 4. — P. 390—394.
31. Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // Plant Physiol. — 2006. — 141. — P. 336—340.
32. Stidham M.A. Herbicides that inhibit acetohydroxyacid synthase // Weed Sci. — 1991. — 39. — P. 428—434.

Отримано 31.08.2016

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА НАДФН-ОКСИДАЗЫ И АНТАГОНИСТОВ КАЛЬЦИЯ НА ФИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЕРБИЦИДОВ ИНГИБИТОРОВ АЦЕТИЛ-КоА-КАРБОКСИЛАЗЫ И АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗЫ

А.М. Сычук, Е.Ю. Мордерер

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Для выяснения весомости вклада активных форм кислорода (АФК), которые могут образовываться в результате неспецифической стрессовой реакции, в частности активации НАДФН-оксидазы, в развитие патогенеза, индуцированного гербицидами ингибиторами ацетил-КоА-карбоксилазы (АКК) и ацетолактатсинтазы (АЛС), исследовано влияние ин-

гибитора НАДФН-оксидазы дифенилениодхлорида (DPI), блокатора кальциевых каналов хлорида лантана (LaCl_3) и антагониста кальмодулина хлорпромазина (ХП) на фитотоксическое действие гербицидов этих классов. Установлено, что влияние DPI, LaCl_3 и ХП на фитотоксическое действие ингибитора АЛС значительно превышало их влияние на действие гербицида ингибитора АКК. Сделан вывод, что в патогенезе, индуцированном гербицидами ингибиторами АЛС, определенную роль играют АФК, образующиеся в результате неспецифической стрессовой реакции растений, а для гербицидов ингибиторов АКК более весомым является вклад АФК, которые происходят из другого источника.

THE INFLUENCE OF NADPH OXIDASE INHIBITOR AND CALCIUM ANTAGONISTS ON HERBICIDES ACETYL-CoA-CARBOXYLASE AND ACETOLACTATE SYNTHASE INHIBITORS PHYTOTOXIC ACTION

A.M. Sychuk, Ye.Yu. Morderer

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium chloride (DPI), calcium channel blocker lanthanum chloride (LaCl_3) and calmodulin antagonist chlorpromazine (CP) impact on phytotoxic action of herbicides acetyl-CoA-carboxylase (ACC) and acetolactate synthase (ALS) inhibitors had been investigated, for understanding the significance of reactive oxygen species (ROS), formed as a result of non-specific stress response, including activation of NADPH oxidase, contribution to the pathogenesis induced by herbicides. It was established that the influence of DPI, LaCl_3 and HP on ALS inhibitor phytotoxic action significantly exceeded their impact on the effect of the ACC inhibitor. It was concluded that in the pathogenesis induced by ALS inhibiting herbicides a basic value have ROS, which are formed as a result of non-specific stress response of plants to herbicides, on the other hand for ACC inhibitors — more significant is the contribution of the ROS, coming from another source.

Key words: NADPH oxidase, diphenyleneiodonium chloride, lanthanum chloride, chlorpromazine, reactive oxygen species, programmed cell death.