

УДК 581.132:632.954:633.15

## ГЕНЕРУВАННЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ ЗА ДІЇ ГРАМІНІЦИДІВ І МОДИФІКАТОРІВ ЇХ АКТИВНОСТІ

М.П. ПАЛАНІЦЯ, В.В. ТРАЧ, Є.Ю. МОРДЕРЕР

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Досліджено вплив гербіциду групи грамініцидів галоксифоп-*R*-метилу (ГФ) та модифікаторів його фітотоксичної дії на індукування некрозів і генерування активних форм кисню у меристемах коренів проростків кукурудзи (*Zea mays* L.). Встановлено, що антиоксидант іонол як за сумісного застосування з ГФ, так і за попередньої обробки уповільнював появу некрозів у меристемах, а пероксид водню нефітотоксичної концентрації, навпаки, прискорював. Іонол також гальмував індуковані грамініцидом зміни в генеруванні активних форм кисню в меристемах, а екзогенний пероксид водню — прискорював. Отримані дані підтверджують безпосередню участь активних форм кисню в розвитку індукованого грамініцидами патогенезу.

*Ключові слова:* *Zea mays* L., грамініциди, галоксифоп-*R*-метил, активні форми кисню, пероксид водню, супероксидний радикал-аніон.

Гербіциди — інгібітори ацетил-КоА-карбоксилази (КФ 6.4.1.2), утворюють групу так званих грамініцидів, оскільки діють винятково на рослини родини злакових (Poaceae) [15]. Грамініциди є одним із найефективніших класів сучасних гербіцидів, однак проблемою є істотне ослаблення їх фітотоксичної дії на злакові бур'яни за несприятливих умов довкілля та комплексування з гербіцидами, ефективними проти дводольних видів бур'янів [7, 9]. Відомо, що зменшення фітотоксичності грамініцидів не пов'язане зі зменшенням їх інгібувальної активності у сайті дії [8], тому воно може бути зумовлене лише змінами у перебігу індукованого патогенезу. У зв'язку з цим для розробки методів запобігання втратам ефективності знищення злакових видів бур'янів треба з'ясувати механізм індукованого грамініцидами патогенезу.

У попередніх дослідженнях ми встановили, що поява некрозів у меристемах коренів проростків кукурудзи за дії грамініциду галоксифоп-*R*-метилу (ГФ) не супроводжується прискоренням реакцій пероксидного окиснення ліпідів. Водночас антиоксидант токоферол гальмував, а пероксид водню (ПВ) — прискорював появу некрозів [3]. Крім того, було виявлено, що екзогенний ПВ прискорював, а токоферол — гальмував, індуковані ГФ зміни активностей супероксиддисмутази (СОД), каталази та пероксидази, які беруть участь у трансформації активних форм кисню (АФК). Було також встановлено, що появі некрозів передують деградація ДНК [4]. Відомо, що АФК посилено утворюються й активують вільнорадикальні окиснювальні процеси за дії різних чинників, у тім числі й деяких гербіцидів [1, 13, 16]. Однак на сьогодні накопичено багато да-

них стосовно того, що АФК крім безпосередньої окиснювальної деструкції можуть відігравати роль сигнальних молекул [5, 23]. З огляду літературних джерел останніх років впливає, що серед усіх АФК на таку роль претендує саме ПВ [2, 11, 19], що очевидно обумовлено відносно тривалим періодом його існування порівняно з іншими АФК. За дії різних стресорів утворення АФК може призводити до різних наслідків, характер яких залежить від швидкості утворення АФК, їх вмісту та тривалості існування: незначне підвищення вмісту АФК здебільшого приводить до активації класичних антиоксидантних механізмів захисту та підвищення стійкості рослин до дії стресора [14], істотніше — може індукувати апоптоз або процес програмованої загибелі клітин [14, 18], а неконтрольоване підвищення вмісту АФК здатне призводити до глибоких пошкоджень біомакромолекул і некрозу тканин рослин [12]. Відомо, що донором АФК у клітині є НАДФ-оксидаза [21], однак останнім часом важливу роль у цьому процесі відводять і пероксидазам клітинних стінок (КС), які можуть виявляти й оксидазну активність, тобто продукувати супероксидні радикал-аніони (СРА) і ПВ [17].

Отримані нами результати [3, 4] засвідчили можливу участь АФК у розвитку фітотоксичної дії грамініцидів. Однак безпосередньо динаміку генерування АФК не визначено. У зв'язку з цим метою нашої роботи було встановлення вмісту АФК, зокрема СРА і ПВ за дії грамініциду ГФ та модифікаторів його фітотоксичності (антиоксиданту іонолу й екзогенного ПВ), а також дослідження динаміки активності пероксидази КС за дії ГФ для визначення участі цього ферменту в генеруванні АФК.

### Методика

Об'єктом досліджень обрано меристеми коренів проростків кукурудзи (*Zea mays* L.) гібрида Нептун. У попередніх дослідженнях ми проводили обробку грамініцидом замочуванням насіння у розчині ГФ. Зміни активностей СОД та оксидоредуктаз свідчили, що початковий вміст АФК у зародку міг змінитися ще до прокльовування насіння. Тому в цій роботі ми проводили обробку ГФ, антиоксидантом іонолом та ПВ після його прокльовування. Насіння замочували на 24 год у воді в термостаті за температури 24 °С. Після цього його промивали водопровідною водою і пророщували на фільтрувальному папері у кюветах (по 100 насінин). Через 3 доби пророщування проростки вміщували на 15 хв у розчин грамініциду ГФ ( $5 \cdot 10^{-6}$  М). Для визначення впливу модифікаторів дії ГФ у розчин до гербіциду додавали ПВ ( $5 \cdot 10^{-2}$  М) або іонол ( $5 \cdot 10^{-4}$  М). В окремих варіантах обробку модифікаторами проводили перед обробкою гербіцидом. Для цього проростки витримували протягом 1 год у розчинах іонолу та ПВ таких самих концентрацій і через 2 год обробляли ГФ.

Біохімічні аналізи проводили протягом 1—3-ї, на 24-ту та 48-му години після обробки. Такий часовий інтервал було обрано з метою спостереження за перебігом процесів із початку досліду до початку появи некротичних зон.

Вміст у меристемах коренів проростків ендogenous ПВ визначали двома методами: феротіоціанатним методом Сагісакі за реакцією утворення роданіду заліза червоного кольору [22] та за реакцією із сульфатом титанію [10]. Генерування СРА виявляли методом Шорнінга [6], що ґрунтується на реакції відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) під час взаємодії із супероксидними радикал-аніонами. Активність іонозв'я-

заної пероксидази КС визначали в осаді фракції клітинних стінок, вилученням її за допомогою буферу Серенсена з додаванням 0,5 М NaCl та 2 % детергента тритону X-100 [20].

Результати оброблено статистично за допомогою стандартного комп'ютерного пакета Microsoft Excel. Визначення проведено у 4–6-разових повторностях.

### Результати та обговорення

За сумісної дії ГФ та екзогенного ПВ встановлено, що цей модифікатор прискорює появу некрозів меристем коренів кукурудзи, а іонол здатний дещо гальмувати процес (рис. 1, а). Попередня обробка модифікаторами приводила до істотнішої відмінності в появі некрозів (див. рис. 1, б). Крім того, рослини, піддані попередній обробці іонолом були здатні до часткового подальшого розвитку, а після дії екзогенного ПВ усі рослини гинули.

За вмістом у коренях проростків ендогенного ПВ не отримано вірогідної різниці між варіантами досліду. Водночас у меристемах коренів підвищення вмісту цієї АФК за дії ГФ спостерігалось лише протягом 1–3 год після обробки (рис. 2, а) з подальшою тенденцією до його зниження. З літературних даних відомо, що вміст ПВ збільшується і за дії гербіциду гліфосату [16], однак це призводить до ініціації реакцій ПОЛ, чого в разі дії грамініциду ГФ у наших дослідженнях не встановлено [3]. Очевидно, таке короткочасне накопичення ПВ за дії ГФ може бути сигналом, що запускає процеси, які ведуть до загибелі рослин. Щодо дії антиоксиданту іонолу, то він знижував короткочасне підвищення вмісту ПВ в меристемах порівняно з ГФ, а екзогенний ПВ — підвищував. У наших дослідженнях уже в 1-шу годину після обробки ГФ активність іонозв'язаної пероксидази КС зростала приблизно на 30 %, що може засвідчувати певний внесок цього ферменту у продукування АФК (таблиця). Зокрема це може стосуватися ПВ, вміст якого збільшувався лише протягом перших 3 год після обробки. У разі визначення вмісту ПВ за реакцією із сульфатом титанію тенденція змін динаміки АФК, отриманих методом Сагісакі, в основному зберігалася.

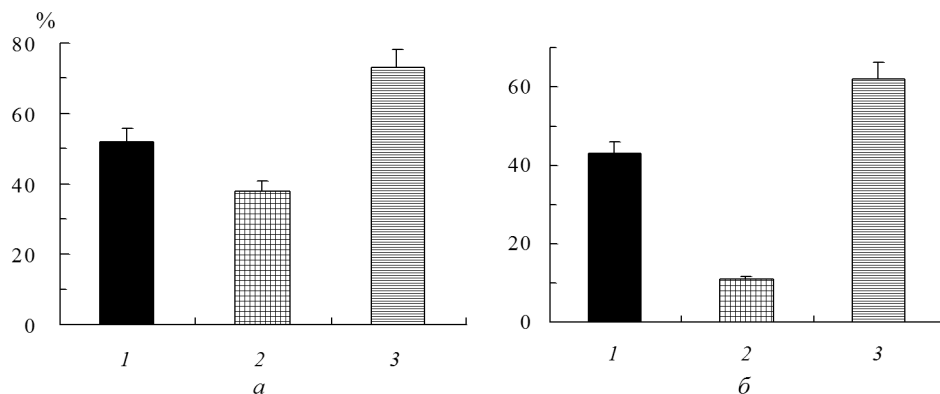


Рис. 1. Кількість некрозів (%) у меристемах коренів 3-добових проростків кукурудзи (*Zea mays* L.), індукованих дією ГФ, за одночасної (а) та попередньої (б) обробки рослин іонолом і ПВ:

1 — ГФ ( $5 \cdot 10^{-5}$  М); 2 — ГФ + іонол ( $5 \cdot 10^{-4}$  М); 3 — ГФ + ПВ ( $5 \cdot 10^{-2}$ )

ГЕНЕРИРОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

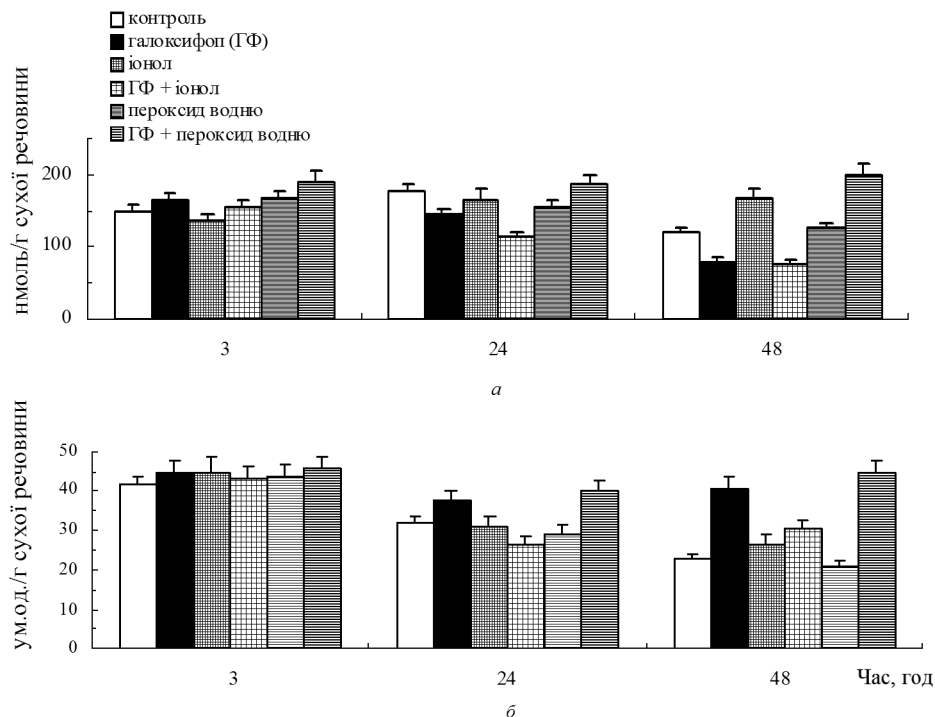


Рис. 2. Вміст (нмоль/г сухої речовини) ендогенного перексиду водню (а) та генерування (ум.од./г сухої речовини) супероксидних радикал-аніонів (б) у меристемах коренів кукурудзи за сумісної обробки ГФ та модифікаторами його фітотоксичності ПВ ( $5 \cdot 10^{-2}$  М) й іонолом ( $5 \cdot 10^{-4}$  М)

Протягом усього періоду після обробки вміст СРА за дії ГФ підвищувався (див. рис. 2, б). Іонол знижував індуковане ГФ збільшення вмісту в меристемах цієї АФК, а екзогенний ПВ — підвищував (див. рис. 2, б). Однак такі зміни в генеруванні СРА за сумісної дії були більш вираженими на 24-ту й особливо на 48-му години, коли спостерігалась індукція некрозів. Як уже зазначалось, екзогенний ПВ прискорював появу некрозів меристем коренів кукурудзи, а іонол був здатний дещо гальмувати цей процес, тобто проглядається певна кореляція між появою некрозів меристем і вмістом у них СРА. Крім того, вміст цієї АФК у коренях на порядок нижчий, ніж у меристемах, що підтверджує інтенсивний перебіг процесів саме у меристемах, й отже, правильність обраного нами об'єкта. Відомо, що рослини і за відсутності стресів потребують АФК для регуляції процесів росту і розвитку [6], що також засвідчує отримана нами динаміка генерування СРА у контрольному варіанті.

Попередня обробка модифікаторами привела до більш виражених змін і в динаміці утворення АФК, які ми спостерігали вже на 3-тю го-

*Питома активність (ум. од./г сухої речовини · хв) іонозв'язаної пероксидази КС у меристемах коренів кукурудзи*

Варіант	Час, год		
	1	24	48
Контроль	160,6 ± 9,6	150,8 ± 6,8	145,9 ± 6,7
ГФ	210 ± 8,5	140,5 ± 5,3	104,9 ± 6,3

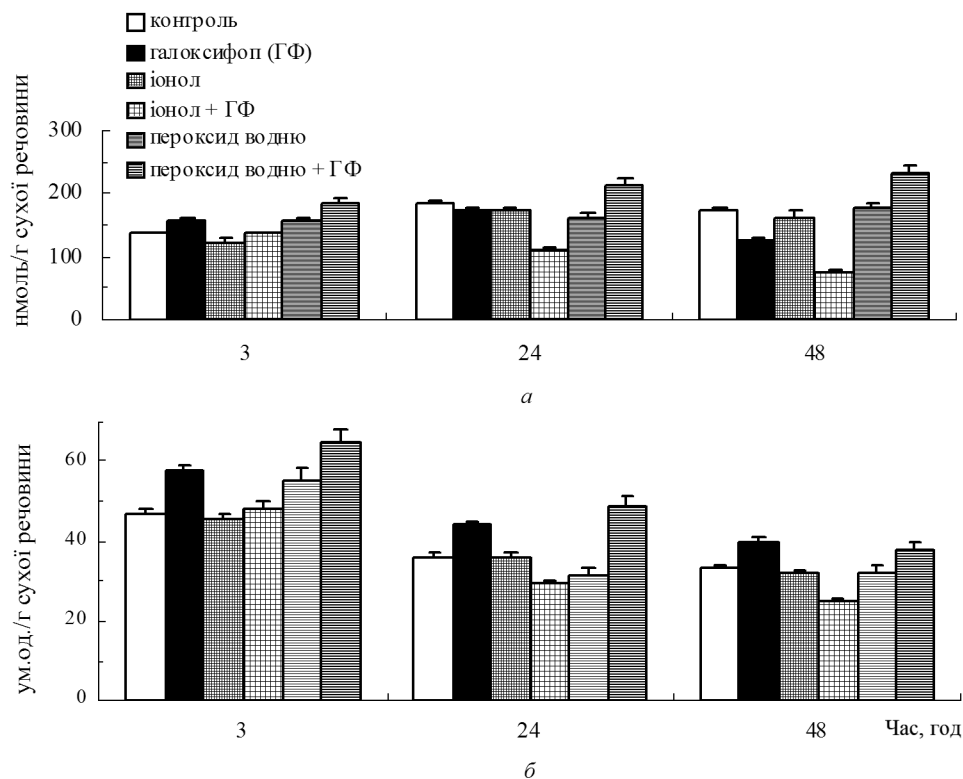


Рис. 3. Вміст (нмоль/г сухої речовини) ендогенного перексиду водню (а) та генерування (ум.од./г сухої речовини) супероксидних радикал-аніонів (б) у меристемах коренів кукурудзи за попередньої обробки модифікаторами фітотоксичності ГФ — ПВ ( $5 \cdot 10^{-2}$  М) й іонолом ( $5 \cdot 10^{-4}$  М)

дину (рис. 3). Так, у разі передобробки іонолом генерування ПВ, індуковане ГФ, знижувалось на 14,3 %, а за дії екзогенного ПВ — підвищувалось на 38,2 % (див. рис. 3, а). За сумісної дії ці показники були нижчими і становили відповідно 7,3 і 15,4 %. Для СРА ця різниця була ще більшою (див. рис. 3, б). Так, генерування СРА, індуковане ГФ, за попередньої обробки іонолом на 15,3 % спадало, за дії екзогенного ПВ — на 13,1 % зростало, за сумісної дії — відповідно лише на 4 і 2 %. Очевидно, саме такі зміни протягом перших годин у разі попередньої обробки можуть бути причиною часткового відростання рослин кукурудзи після дії іонолу та загибелі — внаслідок дії екзогенного ПВ. Як і в разі сумісної дії, на наступних етапах досліджень іонол знижував індуковані ГФ зміни в генеруванні АФК, а екзогенний ПВ — підвищував. За окремої дії модифікаторів іонол дещо знижував рівень генерування АФК або підтримував його на рівні контролю, а ПВ вірогідно підвищував рівень генерування АФК порівняно з контролем лише на 3-тю годину.

Отже, на підставі отриманих даних можна констатувати, що за дії грамніцидів у меристемах коренів проростків кукурудзи короткочасно підвищується вміст ендогенного ПВ і тривало збільшується вміст СРА. Протягом перших годин після обробки ГФ активність іонозв'язаної пероксидази КС зростає, що може підтверджувати внесок цього ферменту в утворення АФК, зокрема ПВ, вміст якого підвищується лише протягом кількох перших годин. Антиоксидант іонол зменшує індуковані ГФ

зміни генерування АФК, а екзогенний ПВ — збільшує. Дія антиоксиданту іонулу й екзогенного ПВ за попередньої обробки протягом 1 год призвела до істотної різниці змін генерування АФК, ніж за короткочасної сумісної дії цих речовин із ГФ.

Отже, отримані нами результати є прямим підтвердженням того, що фітотоксична дія грамініцидів у рослинах злакових бур'янів реалізується індукуванням оксидативного стресу. Інгібування грамініцидами ацетил-КоА-карбоксилази призводить до генерування АФК, які можуть зумовлювати деградацію ДНК, що є причиною некрозу меристем і загибелі рослин.

1. *Веселов А.П., Курганова Л.Н., Лихачева А.В., Сушкова У.А.* Возможное регуляторное влияние перекисного окисления липидов на активность  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы в условиях стресса // Физиология растений. — 2002. — **49**, № 3. — С. 385—389.
2. *Колупаев Ю.Е.* Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2007. — Вип. 3 (12). — С. 6—26.
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. *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.
5. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. — М.: Наука, 2002. — 294 с.
6. *Шорнинг Б.Ю., Смирнова Е.Г., Ягужинский Л.С., Ванюшин Б.Ф.* Необходимость образования супероксида для развития этиолированных проростков пшеницы // Биохимия. — 2000. — **65**, № 12. — С. 1612—1618.
7. *Aquero-Alvorado R., Appleby A., Armstrong D.* Antagonism of haloxyfop activity in tall fescue by dicamba and bentazon // Weed Sci. — 1991. — **39**. — P. 1—5.
8. *Bjelk L., Monaco T.* Effect of chlorimuron and quizalofop on fatty acid biosynthesis // Ibid. — 1992. — **40**. — P. 1—6.
9. *Boydston R.* Drought stress reduces fluazifop-P-activity on green foxtail // Ibid. — 1992. — **40**. — P. 20—24.
10. *Chen Li-Men, Kao Ching-Huei.* Effect of excess copper on rice leaves: evidence for involvement of lipid peroxidation // Bot. Bull. Acad. Sin. — 1999. — **40**. — P. 283—287.
11. *Gong M., Chen B., Li Z-G., Guo L-H.* Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of hydrogen peroxide // Plant Physiol. — 2001. — **158**. — P. 1125—1130.
12. *Kasperska A.* Sensor types of signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? // Physiol. plant. — 2004. — **122**. — P. 159—168.
13. *Knorz O.C., Lederer B., Durner J., Boger P.* Antioxidative defense activation in soybean cells // Ibid. — 1999. — **107**, N 3. — P. 294—302.
14. *Levine A., Tenhaken R., Dixon R.*  $H_2O_2$  from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response // Cell. — 1994. — **79**. — P. 583—593.
15. *Mallory-Smith C.A., Retzinger E.J.* Revised classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies // Weed Technol. — 2003. — **17**. — P. 605—619.
16. *Miteva L., Ivanov S., Alexieva V.* Comparative effect of 2,4-D on the glutathione levels, glutathione-S-transferase and glutathione reductase activities in pea (*Pisum sativum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) // Докл. Българ. АН. — 2003. — **56**, N 3. — P. 53—58.
17. *Mittler R.* Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. — 2002. — **7**, N 9. — P. 405—410.
18. *Neill S.T., Desikan R., Clarke A. et al.* Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // J. Exp. Bot. — 2002. — **53**. — P. 1237—1247.
19. *Polidoros A.N.* Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidant in the regulation of catalase and glutathione-S-transferase gene expression in maize // Physiol. plant. — 1999. — **106**. — P. 112—120.
20. *Ridge I., Osborne D.J.* Hydroxyproline and peroxidases in cell walls of *Pisum sativum*: regulation by ethylene // J. Exp. Bot. — 1970. — **21**, N 69. — P. 843—856.
21. *Sagi M., Fluhr R.* Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // Plant Physiol. — 2006. — **141**. — P. 336—340.

22. *Sagisaka S.* The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // *Ibid.* — 1976. — 57. — P. 308—309.
23. *Scandalios J.G.* Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // *Braz. J. Med. and Biol. Res.* — 2005. — 38, N 7. — P. 995—1014.

Отримано 31.03.2009

#### ГЕНЕРИРОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПРИ ДЕЙСТВИИ ГРАМИНИЦИДОВ И МОДИФИКАТОРОВ ИХ АКТИВНОСТИ

*М.П. Паланица, В.В. Трач, Е.Ю. Мордерер*

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследовано влияние гербицида группы граминицидов галоксифоп-*R*-метила (ГФ) и модификаторов его фитотоксического действия на индукцию некрозов и генерацию активных форм кислорода в меристемах корней проростков кукурузы (*Zea mays* L.). Установлено, что антиоксидант ионол как при совместном применении с ГФ, так и при предварительной обработке замедлял появление некрозов в меристемах, а пероксид водорода нетоксической концентрации, наоборот, ускорял. Ионол также замедлял индуцированные граминицидом изменения в генерации активных форм кислорода в меристемах, а экзогенный пероксид водорода — ускорял. Полученные данные подтверждают непосредственное участие активных форм кислорода в развитии индуцированного граминицидами патогенеза.

#### THE GENERATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES UNDER THE ACTION OF GRAMINICIDES AND MODIFIERS OF THEIR PHYTOTOXICITY

*M.P. Palanytsya, V.V. Trach, Ye.Yu. Morderer*

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

Effect of haloxyfop-*R*-methyl (HF) on induction of necrosis and generation of reactive oxygen species (ROS) in meristematic regions of maize (*Zea mays* L.) roots was investigated. It was shown that the amount of necrosis, induced by HF, under the effect of unphytotoxic concentration of hydrogen peroxide increased and under the effect of ionol decreased. When ionol was used with HF, the generation of ROS decreased and under the effect of hydrogen peroxide increased. The conclusion about participation of ROS in the development of the pathogenesis induced by graminicides was made.

*Key words:* *Zea mays* L., graminicides, haloxyfop-*R*-methyl, reactive oxygen species (ROS), hydrogen peroxide.