



УДК 581.132:632.954:633.15

ЗАПРОГРАМОВАНА ЗАГИБЕЛЬ КЛІТИН У ПАТОГЕНЕЗІ, ІНДУКОВАНОМУ ГЕРБІЦИДАМИ – ІНГІБІТОРАМИ АЦЕТИЛ-КОА-КАРБОКСИЛАЗИ

А. М. Сичук, М. П. Радченко, Є. Ю. Мордерер

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

У статті обговорюється важливість патогенезу, індукованого гербіцидами, фітотоксична дія яких зумовлена впливом на процеси фотосинтезу. За дії гербіцидів даного класу показано участь запрограмованої загибелі клітин і роль активних форм кисню в індукованому ними патогенезі. Більш актуальним є вивчення патогенезу, індукованого гербіцидами іншого класу, що є інгібіторами ацетил-КоА-карбоксилази. Показано, що фітотоксична дія інгібіторів ацетил-КоА-карбоксилази опосередкована утворенням активних форм кисню. У даній роботі встановлено, що за дії гербіциду галоксифоп-*R*-метилу відбувається фрагментація ДНК клітин меристем коренів проростків кукурудзи (*Zea mays* L.) у моно-олігонуклеосомних сайтах, що є важливим маркером запрограмованої загибелі клітин. Отримані результати свідчать, що у патогенезі, індукованому гербіцидами інгібіторами ацетил-КоА-карбоксилази, задіяний процес запрограмованої загибелі клітин.

Ключові слова: *Zea mays*, гербіциди, індукований патогенез, ацетил-КоА-карбоксилаза, запрограмована загибель клітин, деградація ДНК.

ВСТУП

Незважаючи на те, що первинні сайти дії визначені для більшості груп гербіцидів, механізми індукованого ними патогенезу, тобто сукупності процесів, які є наслідком взаємодії гербіциду зі сайтом та є безпосередніми чинниками загибелі окремих клітин і цілісного рослинного організму, залишаються маловивченими. Особливе значення механізму індукованого патогенезу має для гербіцидів, фітотоксична дія яких пов'язана з інгібуванням ферменту ацетил-КоА-карбоксилази (АКК) (ЕС 6.4.1.2). Ці гербіциди утворюють групу так званих грамініцидів, які діють виключно на рослини з родини тонконогових/злакових (*Poaceae*), що пов'язано також із особливостями пластидної АКК рослин цієї родини [14]. Відомо, що у сумішах з гербіцидами, ефективними проти дводольних видів бур'янів, фітотоксична дія грамініцидів антагоністично зменшується [1]. Встановлено також, що антагоністичне зменшення фітотоксичності грамініцидів у сумішах не пов'язане зі зменшенням їхньої інгібувальної дії на активність АКК [7]. Це може пояснюватися змінами у проходженні індукованого

патогенезу. Тому для розробки методів подолання або уникнення антагоністичних втрат ефективності при комплексному застосуванні грамініцидів необхідно визначити природу індукованого ними патогенезу.

Найбільше даних стосовно механізму індукованого патогенезу отримано для гербіцидів, фітотоксична дія яких зумовлена взаємодією з процесом фотосинтезу. Незалежно від первинного сайту дії, дезорганізація гербіцидами процесу фотосинтезу призводить до утворення активних форм кисню (АФК), накопичення яких сприяє прискоренню вільнорадикальних, ланцюгових реакцій пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Пошкодження біополімерів АФК та мембран реакціями ПОЛ вважалося безпосереднім чинником руйнування фотосинтетичного апарату і загибелі рослин [11]. Відомо, що, окрім безпосереднього пошкодження біополімерів, АФК можуть індукувати процес запрограмованої загибелі клітин (ЗЗК) [4, 13]. Тому не дивно, що перші докази участі ЗЗК в індукованому патогенезі були отримані для гербіцидів, що впливають на фотосинтез, дія яких опосередкована утворенням АФК. Показано, що введення гена тваринного антиапоптозного білка Bcl-2 у хлоропласти тютюну приводило до підвищення стійкості рослин проти гербіцидів параквату, ацифлуорфену та сульфентразону [9].

Метою даного дослідження було визначення участі ЗЗК у патогенезі, індукованому гербіцидами інгібіторами АКК. Оскільки важливим маркером ЗЗК є міжнуклеосомна фрагментація ДНК [26], для досягнення вказаної мети було проведено дослідження фрагментації ДНК у меристемах кореня проростків кукурудзи за дії грамініциду галоксифоп-R-метилу (ГМ). Її порівнювали із фрагментацією ДНК у листках гороху за дії гербіциду диквату, для якого існують вагомі докази участі ЗЗК в індукованому патогенезі [9, 10].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Вплив гербіциду ГМ на стан ДНК досліджували після замочування насіння кукурудзи (*Zea mays* L.) (модель однодольних злакових бур'янів) у розчині (50 мкМ) протягом 20 год. Після цього насіння промивали водопровідною водою і пророщували у кюветах із дистильованою водою на фільтрувальному папері в термостаті при 24°C. Для виділення ДНК відділяли меристеми коренів кожні 24 год з 1 по 5 добу пророщування. Для гербіциду диквату об'єктом слугували зелені листки гороху (*Pisum sativum* L.) (модель дводольних бур'янів), який вирощували в горщиках у лабораторних умовах при 16-годинному штучному освітленні. Із листків рослин на 14 добу вирощування робили висічки діаметром 7 мм, які замочували в розчині гербіциду диквату (10 мкМ) протягом 1 год і відбирали на 2 та 4 добу. Сумарну ДНК виділяли із використанням методу СТАБ [15]. Для цього здійснювали лізування клітин за допомогою буферу СТАБ (цетилтриметиламоніум бромід) (рН 8,0), що містив 2% СТАБ, 1,4 М NaCl, 100 мМ трис, 20 мМ EDTA. Отриманий гомогенат центрифугували, надосадову рідину депротейнізували хлороформом, після чергового центрифугування додавали СТАБ-осаджувальний буфер, який містив 2% СТАБ і 5 М NaCl та після центрифугування проводили осадження ДНК ізопропанолом.

Електрофоретичне дослідження ДНК проводили із використанням буфера TBE у 2% гелі агарози, що містив 3 мкл бромистого етидію для фарбування ДНК, при силі струму 25 мА і напрузі 120 В протягом 1 год. Для візуалізації гель поміщали під ультрафіолетове випромінювання. Зображення електрофореграм отримували за допомогою фотокамери FujiFilm FinePix S3200.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення природи патогенезу, індукованого грамініцидами, показало, що цей процес опосередкований утворенням АФК. Першим свідченням можливої участі АФК у індукованому патогенезі були дані щодо зменшення фітотоксичної дії грамініцидів екзогенними антиоксидантами [5]. Оскільки при обробці грамініцидами й екзогенними антиоксидантами захисний ефект останніх можна пов'язати зі зв'язуванням АФК, які утворюються при обробці гербіцидом [8], вивчення впливу речовин з прооксидантною і антиоксидантною активністю на фітотоксичну дію грамініциду ГМ проводили на етіольованих проростках кукурудзи. Отримані дані однозначно свідчили, що фітотоксична дія грамініцидів опосередкована утворенням АФК [3]. Оскільки в меристемах коренів проростків кукурудзи за дії ГМ не спостерігалось прискорення реакцій ПОЛ [2], логічно припустити, що роль АФК у патогенезі, індукованому грамініцидами, полягає у індукції ПЗК.

Під час дослідження впливу гербіциду галоксифоп-*R*-метилу на ДНК кореневої меристеми проростків кукурудзи результати показали, що у контрольному варіанті ДНК залишалася інтактною протягом усього періоду спостережень. За дії ГМ електрофоретичне розділення ДНК не відрізнялося від контролю протягом 1-ї та 2-ї доби пророщування (рис. 1). На 3-тю добу за дії гербіциду спостерігалася часткова фрагментація ДНК, але без розділення на олігонуклеосомні частини. Починаючи з 4-ї доби, за дії ГМ на електрофореграмі ДНК були виявлені фрагменти, молекулярна маса яких приблизно кратна 180–200 п.н., що відповідає нуклеосомі. Електрофоретичне дослідження ДНК, виділеної з листків гороху, оброблених

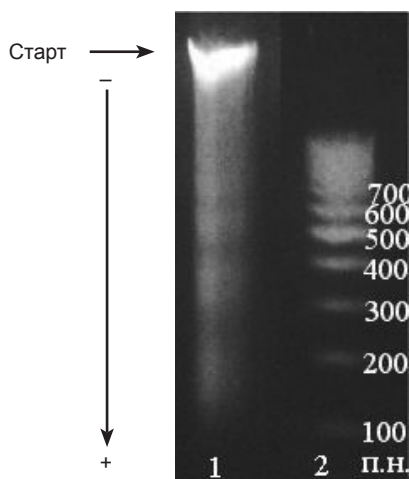


Рис. 1. Електрофореграма сумарної ДНК меристем коренів етіольованих проростків кукурудзи (*Zea mays* L.), оброблених гербіцидом галоксифоп-*R*-метилом (ГМ). Варіанти: 1 – ГМ, 4 доба; 2 – маркер молекулярної маси М15, SibEnzyme (1000 п.н.)

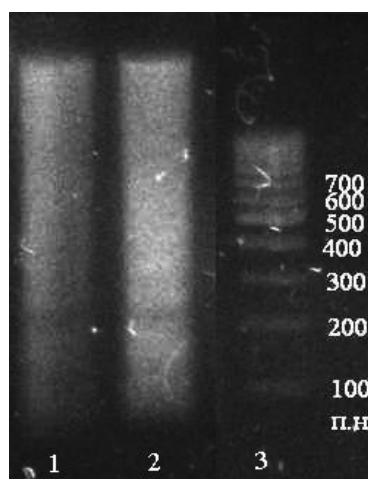


Рис. 2. Електрофореграма сумарної ДНК листків гороху (*Pisum sativum* L.), оброблених гербіцидом дикватом. Варіанти: 1 – дикват, 2 доба; 2 – дикват, 4 доба; 3 – маркер молекулярної маси М15, SibEnzyme (1000 п.н.)

Fig. 1. Gel electrophoresis of total DNA isolated from root meristem of seedlings of *Zea mays* L. treated by herbicide haloxyfop-*R*-methyl (HM). Variants: 1 – HM, day 4; 2 – molecular weight marker M15, SibEnzyme (1000 b.p.)

Fig. 2. Gel electrophoresis of total DNA isolated from leaves of *Pisum sativum* L. treated by herbicide diquat. Variants: 1 – diquat, day 2; 2 – diquat, day 4; 3 – molecular weight marker M15, SibEnzyme (1000 b.p.)

гербіцидом дикватом, показало, що у варіантах, відібраних на 2-гу та 4-ту добу, також спостерігається дискретна фрагментація, при якій окремі фрагменти відповідають нуклеосомі (рис. 2). З рис. 1 та 2 видно, що характер фрагментації ДНК за дії обох гербіцидів в основному є аналогічним. Враховуючи те, що для дії диквату отримано найбільш вагомі докази наявності ЗЗК [9, 10], можна зробити висновок, що у патогенезі, індукованому грамініцидом, також задіяний процес ЗЗК.

Апоптоз є генетично запрограмованим і контрольованим процесом самоликвідації клітини, що відбувається після завершення виконання клітиною її функцій, або внаслідок пошкодження, викликаного фізіологічно активними чинниками біотичного чи абіотичного походження [12, 24, 30]. Більшість даних щодо механізмів ЗЗК були встановлені для тваринних організмів, але основні біохімічні та морфологічні ознаки цього процесу у рослин подібні до таких у тваринних організмів [6, 12, 18, 21–23]. Зокрема, як у тварин, так і у рослин універсальною є роль АФК в індукуванні ПЗК [13, 17, 19, 28]. За дії параквату спостерігалось входження з апопласту до цитоплазми клітин каспазоподібної протеази, аналогічне тому, як це відбувалося при ПЗК, індукованому NaCl [10]. Гербіцид лактофен викликав у стійких рослин сої утворення некротичних плям, подібних до тих, що утворюються при реакції гіперчутливості. Було встановлено, що загибель клітин при цьому супроводжувалася експресією гомолога гена Hsr203j, який є маркером ЗЗК, пов'язаної з гіперчутливою відповіддю на інфікування патогеном [20]. Також встановлено, що трансгенні рослини маракуйї, у геном яких було введено ген антиапоптозного білка p53 бакуловірусу, відзначалися стійкістю до глюфосинату [16].

1. Мордерер Є.Ю., Мережинський Ю.Г. Гербіциди. Т. 1. **Механізми дії та практика застосування**. Київ: Логос, 2009. 379 с.
2. 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): 56–62.
3. Паланиця М.П., Трач В.В., Мордерер Є.Ю. Генерування активних форм кисню за дії грамініцидів та модифікаторів їх активності. **Физиология и биохимия культ. растений**, 2009; 41(4): 328–334.
4. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 2004; 55: 373–399.
5. Banas A., Johansson G., Stenlid G. et al. Free radical scavengers and inhibitors of lipoxygenases as antagonists against the herbicides haloxyfop and alloxymid. **Swed. J. Agric. Res.**, 1993; 23: 65–67.
6. Beers E. Programmed cell death during plant growth and development. **Cell Death and Differentiation**, 1997; 4: 649–661.
7. Bjelk L., Monaco T. Effect of chlorimuron and quizalofop on fatty acid biosynthesis. **Weed Sci.**, 1992; 40: 1–6.
8. Chandrasena J., Sagar G. Effect of fluazifop-butyl on the chlorophyll content, fluorescence and chloroplast ultrastructure of *Elymus repens* leaves. **Weed Res.**, 1987; 27: 103–112.
9. Chen S., Dickman M. Bcl-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. **J. Exp. Bot.**, 2004; 55: 2617–2623.
10. Chichkova N., Shaw J., Galiullina R. et al. Phytaspase, a relocatable cell death promoting plant protease with caspase specificity. **The EMBO Journal**, 2010; 29: 1149–1161.
11. Dan Hess F. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Sci.**, 2000: 160–170.
12. Danon A., Delorme V., Mailhac N., Gallois P. Plant programmed cell death: A common way to die. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2000; 8: 647–655.

13. *Dat J., Pellinen R., Beeckman T.* et al. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. **Plant J**, 2003; 33: 621–632.
14. *Delye C.* Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: un update. **Weed Sci**, 2005; 53: 728–746.
15. *Doyle J.J., Doyle J.L.* A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 1987; 19: 11–15.
16. *de Freitas D., Coelho M., Souza M.* et al. Introduction of 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: 79–87.
17. *de Pinto M., Locato V., de Gara L.* Redox regulation in plant programmed cell death. **Plant, Cell and Environment**, 2012; 35: 234–244.
18. *Drew M., He C., Morgan P.* Programmed Cell Death in Animals and Plants. **Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd**, 2000: 183–192.
19. *Gadjev I., Stone J., Gechev T.* Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. **International Review of Cell and Molecular Biology**, 2008; 270: 87–144.
20. *Graham M.* The diphenylether herbicide lactofen induces cell death and expression of defense-related genes in Soybean. **Plant Physiology**, 2005; 139: 1784–1794.
21. *Gray J.* **Programmed Cell Death in Plants**. London: Blackwell Publishing, 2004. 287 p.
22. *Greenberg J.* Programmed cell death: a way of life for plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1996; 93: 12094–12097.
23. *Kuriyama H., Fukuda H.* Developmental programmed cell death in plants. **Curr. Opin. Plant Biol**, 2002; 5: 568–573.
24. *Lam E.* Controlled cell death, plant survival and development. **Nature Rev. Mol. Cell Biol**, 2004; 5: 305–15.
25. *Mitter R., Hallak H.* Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1999; 96: 4165–4170.
26. *O'Brien E., Baguley B., Murray B.* et al. Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible. **Plant J**, 1998; 13: 803–814.
27. *Pennell R., Lamb C.* Programmed cell death in plants. **Plant Cell**, 1997; 9: 1157–1168.
28. *Reape T., Molony E., McCabe P.* Programmed cell death in plants: Distinguishing between different modes. **Exp. Bot**, 2008; 59: 435–44.
29. *Solomon M., Belenghi B., Delledonne M.* et al. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**, 1999; 11: 431–444.
30. *Wyllie A., Kerr J., Currie A.* Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol**, 1980; 68: 251–306.

PROGRAMMED CELL DEATH IN PATHOGENESIS INDUCED BY HERBICIDES INHIBITORS OF ACETYL-CoA-CARBOXYLASE

A. M. Sychuk, M. P. Radchenko, Ye. Yu. Morderer

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

Importance of pathogenesis induced by herbicides whose phytotoxic action is caused by the interaction with photosynthesis is discussed. For this class of herbicides, the participation of programmed cell death and the role of reactive oxygen species

(ROS) in the induced pathogenesis are shown. However, study of pathogenesis induced by another class of herbicides, inhibitors of acetyl-CoA carboxylase is most important. Previous studies have shown that the phytotoxic action of inhibitors of acetyl-CoA carboxylase are mediated by ROS generation. This investigation showed that herbicide haloxyfop-*R*-methyl induced fragmentation of DNA isolated from root meristem of maize seedlings (*Zea mays* L.) in mono-oligonucleosomic sites that is an important marker of the programmed cell death. These data suggest that the programmed cell death is participating in pathogenesis induced by herbicides inhibitors of acetyl-CoA-carboxylase.

Keywords: *Zea mays*, herbicides, induced pathogenesis, acetyl-CoA-carboxylase, programmed cell death, DNA degradation.

ЗАПРОГРАММИРОВАННАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК В ПАТОГЕНЕЗЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ ГЕРБИЦИДАМИ ИНГИБИТОРАМИ АЦЕТИЛ-КОА-КАРБОКСИЛАЗЫ

А. М. Сычук, М. П. Радченко, Е. Ю. Мордерер

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

В статье обсуждается важность патогенеза, индуцированного гербицидами, фитотоксическое действие которых обусловлено взаимодействием с процессом фотосинтеза. При действии гербицидов данного класса показано участие процесса запрограммированной гибели клеток и роль активных форм кислорода (АФК) в индуцированном ими патогенезе. Однако более актуальным является изучение патогенеза, индуцированного гербицидами другого класса, к которому принадлежат ингибиторы ацетил-КоА-карбоксилазы. В предыдущих исследованиях показано, что фитотоксическое действие ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы связано с образованием АФК. В данной работе установлено, что при действии гербицида галоксифоп-*R*-метила происходит фрагментация ДНК клеток меристем корней проростков кукурузы (*Zea mays* L.) в моно-олигонуклеосомных сайтах, что является важным маркером запрограммированной гибели клеток. Полученные результаты свидетельствуют, что в патогенезе, индуцированном гербицидами ингибиторами ацетил-КоА-карбоксилазы, задействован процесс запрограммированной гибели клеток.

Ключевые слова: *Zea mays*, гербициды, индуцированный патогенез, ацетил-КоА-карбоксилаза, запрограммированная гибель клеток, деградация ДНК.

Одержано: 14.05.2013