



УДК 581.1

DOI <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2019.30.16>

## Изучение цитотоксичности гербицидов диурана и флуородифена с использованием гетеротрофной суспензионной культуры клеток *Arabidopsis thaliana* L.

А. В. Федяева<sup>1</sup>, И Ли<sup>2</sup>, И. В. Любушкина<sup>1,3</sup>, И. В. Федосеева<sup>1</sup>,  
А. В. Сидоров<sup>1,4</sup>, Е. Г. Рихванов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия

<sup>2</sup> Иркутский государственный аграрный университет имени А. А. Ежевского, пос. Молодёжный, Россия

<sup>3</sup> Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

<sup>4</sup> Иркутский государственный медицинский университет, г. Иркутск, Россия

E-mail: [fedyeva.anna@mail.ru](mailto:fedyeva.anna@mail.ru)

**Аннотация.** Изучено цитотоксическое действие угнетающих фотосинтез и вызывающих развитие окислительного стресса гербицидов флуородифена и диурана на гетеротрофные растительные клетки. С помощью флюоресцентных зондов FDA, PI, H<sub>2</sub>DCF-DA и JC-1 проанализирована динамика гибели клеток *Arabidopsis thaliana* L в культуре, а также оценены изменения уровня АФК в клетках и электрохимического трансмембранного потенциала на внутренней митохондриальной мембране ( $\Delta\psi_m^+$ ). Полученные результаты свидетельствуют, что цитотоксическое действие гербицидов может быть не связано с развитием окислительного стресса в клетках и зависит от особенностей метаболизма клетки-мишени.

**Ключевые слова:** арабидопсис, суспензионная культура клеток, гербициды, диурон, флуородифен, активные формы кислорода, электрохимический трансмембранный митохондриальный потенциал.

**Для цитирования:** Изучение цитотоксичности гербицидов диурана и флуородифена с использованием гетеротрофной суспензионной культуры клеток *Arabidopsis thaliana* L. / А. В. Федяева, Ли И, И. В. Любушкина, И. В. Федосеева, А. В. Сидоров, Е. Г. Рихванов // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. 2019. Т. 30. С. 16–31. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2019.30.16>

### Введение

Гербициды широко применяются в сельском хозяйстве для снижения засорённости посевов зерновых и других культурных растений [Herbicides and Environment, 2011]. Однако их использование сопряжено с рядом рисков, основным из которых является накопление в почве, что представляет опасность для возделывания последующих культур в севообороте, поскольку в данном случае растения могут подвергаться токсическому воздействию уже на ранних этапах развития [Куликова, Лебедева, 2010]. Следует отметить, что устойчивость к гербицидам у культурных растений, в частности злаков, обусловлена во многом анатомо-морфологическими особенностями

растений на определённом этапе развития. Чаще всего гербициды применяются в посевах зерновых, когда злаки находятся в фазе кущения, их листья расположены практически вертикально и лишены опушения, что позволяет максимально снизить проникновение токсического агента [Сафаров, 2001]. В случае нахождения гербицида в почве его проникновение в ткани растения происходит непосредственно с поверхности почвенных частиц или из почвенного раствора в период наивысшей чувствительности – на этапе набухания семян и формирования всходов [Куликова, Лебедева, 2010].

В работе использовались гербициды диурон (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, PubChem CID: 3120) и флуородифен (2-nitro-1-(4-nitrophenoxy)-4-(trifluoromethyl)benzene, PubChem CID: 27295), негативное действие которых обусловлено в основном угнетением фотосинтеза. Диурон входит в класс гербицидов – производных мочевины и блокирует транспорт электронов между первичным пластохиноном  $Q_A$  и вторичным пластохиноном  $Q_B$  в фотосистеме II [Involvement of chloroplasts..., 2002]. Флуородифен является производным дифениловых эфиров. Он ингибирует протопорфириноген IX оксидазу – ключевой фермент биосинтеза гема и хлорофилла [Retzlaff, Boger, 1996]. Тем не менее, действие гербицидов является комплексным, т. е. они воздействуют на многие метаболические процессы в растительных клетках, однако это влияние практически не изучено. Большинство гербицидов представлены липофильными молекулами, могут легко проникать через митохондриальную мембрану и селективно накапливаться внутри митохондриального матрикса [Herbicides and Environment, 2011]. На ранних этапах развития растений, под землёй, до появления всходов, митохондрии – основной источник энергии, поэтому любое нарушение энергетических функций будет иметь отрицательные последствия и может привести к гибели растения [Schwarzländer, Finkemeier, 2013; Geigenberger, Fernie, 2014; Mitochondria are important ..., 2019]. В то же время влияние гербицидов на функционирование митохондрий практически не изучено. Так, в литературе имеются лишь разрозненные сведения о вероятном воздействии диурона и флуородифена на транспорт электронов в митохондриях и реакции окислительного фосфорилирования [Lundegårdh, 1965; Захаренко, 1990].

В целом для действия всех гербицидов характерно резкое увеличение содержания активных форм кислорода (АФК) в растительных клетках и развитие окислительного стресса [Triosephosphate isomerases in ..., 2009]. Показано, что флуородифен и диурон влияют на окислительно-восстановительный статус растительных клеток [Fufezan, Rutherford, Krieger-Liszka, 2002]. Прежде всего, это определяется их непосредственным влиянием на процесс фотосинтеза, однако, вероятно, и их воздействие на активность митохондрий может приводить к изменению уровня АФК. Этот вопрос также требует отдельного изучения.

Работа проводилась на гетеротрофной суспензионной культуре клеток *Arabidopsis thaliana* L., что позволило нам с помощью ряда флуоресцентных зондов оценить изменения, происходящие после проникновения гербицида, непосредственно на отдельно взятых клетках. Кроме того, на ранних этапах

развития растения находятся без доступа солнечного света, то есть в это время токсическое действие выбранных гербицидов не может быть лишь следствием нарушения фотосинтетических реакций. В связи с этим использование гетеротрофной культуры клеток позволило нам исключить фототрофный метаболизм и сосредоточиться на изучении влияния диурона и флуородифена на функционирование митохондрий.

Целью данной работы было выявление изменений метаболизма клеток в гетеротрофной суспензионной культуре *Arabidopsis thaliana*, вызванных обработкой гербицидами диуроном и флуородифеном в токсических концентрациях. Для оценки цитотоксического действия была проанализирована динамика гибели клеток в культуре, а также оценены изменения уровня АФК в клетках и электрохимического трансмембранного потенциала на внутренней митохондриальной мембране ( $\Delta\mu_{\text{H}}^+$ ) в условиях воздействия выбранными гербицидами. Применение флуоресцентных зондов позволяет провести такой анализ достаточно оперативно, в связи с чем указанные выше параметры можно использовать в качестве биоиндикаторов фитотоксического эффекта гербицидов.

### **Материалы и методы**

В работе использовали гетеротрофную суспензионную культуру клеток *A. thaliana* (экотип Columbia), находящуюся в экспоненциальной фазе роста. Культуру клеток выращивали при 26 °С в темноте в колбах (250 мл) при постоянном помешивании (на качалке) на среде Мурасиге – Скуга, содержащей 3,6 % сахарозы (Химреактивснаб, Россия), 0,6 мг/л никотиновой кислоты, 0,6 мг/л пиридоксина, 1,2 мг/л тиамина, 3 мг/л 2,4-Д, 120 мг/л инозитола, 6 мг/л дитиокарбамата натрия (все Sigma-Aldrich, США). Культуру клеток пересаживали каждые две недели с разведением новой средой в 6 раз и использовали для экспериментов на 7-е сутки после пересадки.

Клетки суспензионной культуры арабидопсиса обрабатывали гербицидами различных концентраций: диурон – 50, 100, 200 мкМ (Dr Ehrenstorfer, Германия); флуородифен – 10, 100, 200 мкМ (Sigma-Aldrich, США). После добавления гербицидов клетки инкубировали в темноте в течение 1, 24 и 48 ч на минитермошейкере TS-100 (BioSan, Латвия) при температуре 26 °С.

Для подсчёта доли живых и мёртвых клеток регистрировали флуоресценцию флуоресцеин диацетата (FDA) (Sigma-Aldrich, США) и пропидия иодида (PI) (Biotium-Uniscience, США) после инкубирования с указанными флуоресцентными зондами в течение двух минут в темноте при температуре 26 °С в конечных концентрациях 50 и 7,5 мкМ соответственно.

Для определения генерации АФК использовали  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат) (Fluka Biochemika, Дания) в конечной концентрации 10 мкМ. Результаты регистрировали после инкубации клеток с  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  при температуре 26 °С в темноте в течение 10 мин. В качестве положительного контроля использовали образцы, обработанные 50 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  («НеваРеактив», Россия) вместе с флуоресцентным зондом, а в качестве отрицательного контроля – образцы, обработанные 100 мМ аскорбино-

вой кислотой (Sigma-Aldrich, США) и зондом. Интенсивность флуоресценции H<sub>2</sub>DCF-DA оценивали в зелёном канале (EX BP 450-490, BS FT 510, EM BP 565).

Для качественной визуализации  $\Delta\psi_{H^+}$  использовали ратиометрический катионный флуоресцентный краситель JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',2,2'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин) (Biotium-Uniscience, США) в конечной концентрации 20 мкМ. Инкубирование клеток с JC-1 проводили в темноте в течение 10 мин при 26 °С. В качестве положительного и отрицательного контроля использовали образцы, обработанные вместе с JC-1 20 мкМ олигомицина (Sigma-Aldrich, США) и 5 мкМ СССР (карбонил-цианид-3-хлорофенилгидразон) (Sigma-Aldrich, США) соответственно, как описано ранее [Тепловой шок индуцирует ..., 2014]. Изменение интенсивности флуоресценции JC-1 оценивали в красном канале (EX BP 546/12, BS FT 580, EM LP 590).

В работе использовался инвертированный флуоресцентный микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss Microscopy, Германия) с цифровой монохромной камерой AxioCam MRm3 и пакетом программного обеспечения для анализа изображений AxioVision Rel.4.7. В каждом эксперименте оценивали 10 случайных полей зрения, полученных с одинаковыми программными настройками моторизованного флуоресцентного микроскопа.

Эксперименты проводили не менее чем в трёх независимых повторностях. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Excel из пакета Microsoft Office 2007.

### **Результаты**

Флуоресцентные зонды FDA и PI активно используются для регистрации живых и мёртвых клеток при изучении механизмов клеточной гибели растений [McCabe, Leaver, 2000; Truernit, Haseloff, 2008]. FDA окрашивает живые клетки: проникая в них, он под действием эндогенных эстераз превращается во флуоресцеин, который флуоресцирует в зелёном канале (EX BP 450–490, BS FT 510, EM BP 565). PI окрашивает мёртвые и погибающие клетки с нарушениями в проницаемости плазмалеммы. Он взаимодействует с нуклеиновыми кислотами, флуоресцируя в красном канале (EX BP 546/12, BS FT 580, EM LP 590) [McCabe, Leaver, 2000; Truernit, Haseloff, 2008].

На первом этапе анализировали фитотоксичное действие различных концентраций диурона и флуородифена, обрабатывая клетки в течение 24 ч при 26 °С. В контроле количество живых клеток (клеток, которые окрашивались FDA и не окрашивались PI) варьировало от 70 до 80 % (рис. 1). При воздействии диурона достоверное снижение жизнеспособности наступало только в случае инкубации клеток с максимально используемой концентрацией (200 мкМ), при этом доля живых клеток в культуре составляла 30 % (см. рис. 1, а, в). Флуородифен в концентрации 10 мкМ не вызывал гибели клеток арабидопсиса (см. рис. 1, б, г), однако повышение его концентрации до 100 и 200 мкМ приводило к гибели до 35 и 45 % клеток соответственно. Таким образом, окраска флуоресцентными зондами (FDA и PI) является быстрым и чувствительным методом оценки фитотоксичности гербицидов.

Использование зондов позволило определить концентрации используемых гербицидов, оказывающие ярко выраженный фитотоксичный эффект на культуру клеток *A. thaliana*.

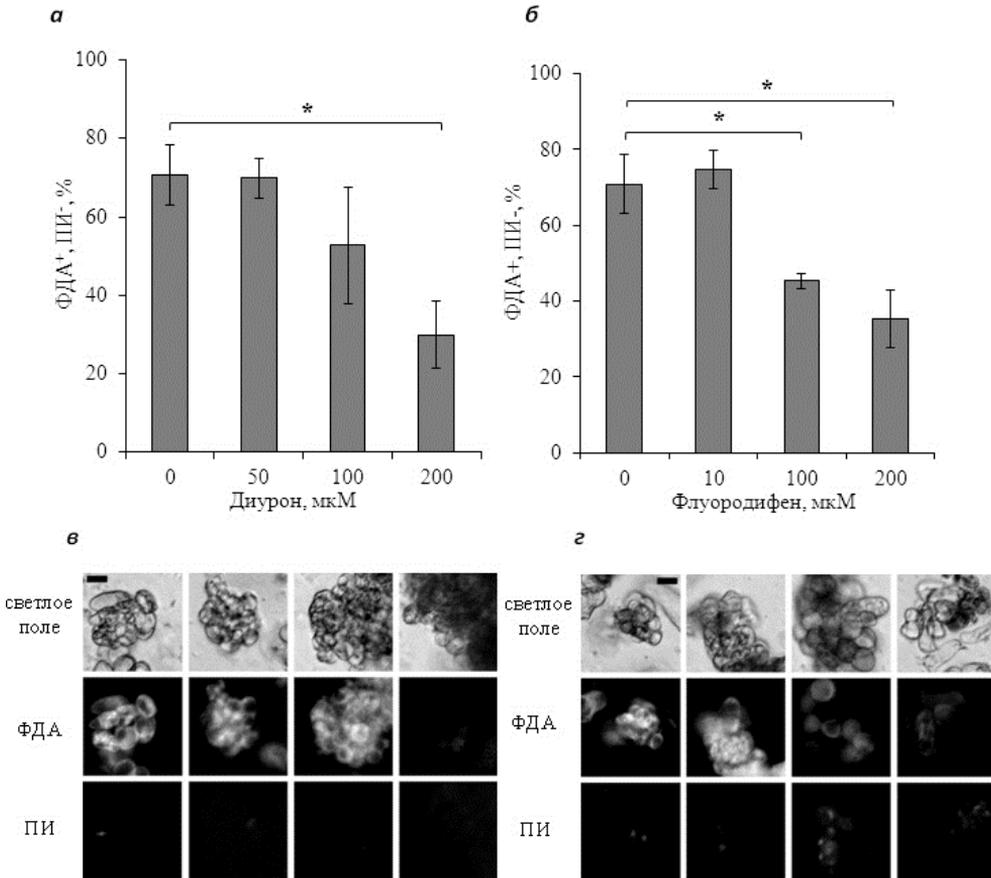


Рис. 1. Влияние гербицидов на долю живых клеток суспензионной культуры арабидопсиса. Представлены количественный обсчёт и микрофотографии клеток после обработки диуроном (а, в) и флуородифеном (б, г) в течение 24 ч. Флуоресценцию ФДА и ПИ измеряли сразу же после воздействия. Масштабная линейка – 20 мкм.  $n = 3$ ,  $M \pm S.E.$  \* – статистически значимые различия ( $t$ -критерий Стьюдента),  $p \leq 0,05$

На основании результатов эксперимента, представленных на рис. 1, были определены концентрации гербицидов, вызывающие примерно двукратное снижение жизнеспособности в течение 24 ч по сравнению с контролем: и для диурона, и для флуородифена они составили 200 мкМ. На следующем этапе был проведён анализ динамики гибели клеток в суспензионной культуре арабидопсиса в течение 48 ч в присутствии исследуемых гербицидов. Отметим, что гибели клеток в контрольных условиях не наблюдалось (рис. 2).

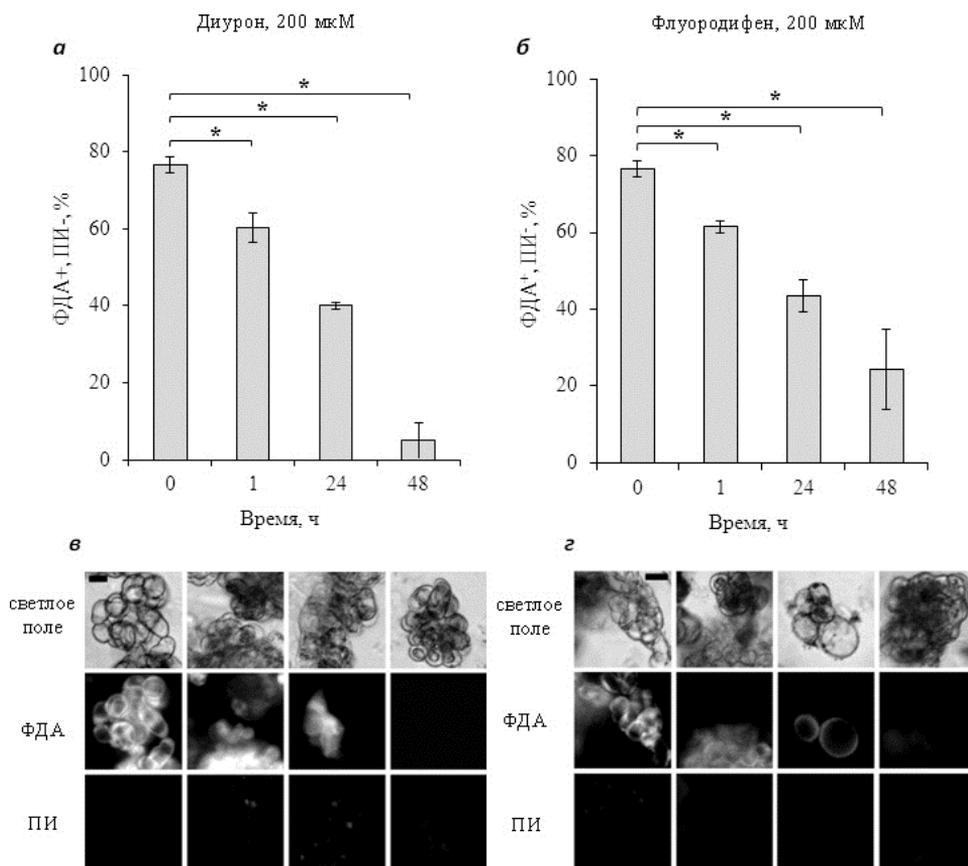


Рис. 2. Динамика гибели клеток суспензионной культуры арабидопсиса после воздействия гербицидами. Представлены количественный обсчёт и микрофотографии клеток после обработки диуроном (а, в), флуородифеном (б, з) в течение 1, 24 и 48 ч. Флуоресценцию ФДА и ПИ измеряли сразу же после воздействия. Масштабная линейка – 20 мкм.  $n = 3$ ,  $M \pm S.E.$ \* – статистически значимые различия ( $t$ -критерий Стьюдента),  $p \leq 0,05$

В целом полученные результаты подтвердили данные предыдущего эксперимента: 200 мкМ диурона и 200 мкМ флуородифена снижали долю живых клеток в культуре примерно в два раза через 24 ч обработки по сравнению с контролем (см. рис. 2). Следует отметить, что гибель клеток наблюдалась и уже на самом раннем этапе воздействия токсических агентов – через 1 ч обработки. Фитотоксический эффект изучаемых гербицидов во всех случаях возрастал при увеличении времени инкубации до 48 ч (см. рис. 2).

Поскольку продукция АФК используется как биоиндикатор токсического действия ксенобиотиков, на следующем этапе было оценено влияние диурона и флуородифена на продукцию АФК в клетках суспензионной культуры арабидопсиса. Уровень АФК в клетках измеряли с использованием флуоресцентного зонда  $H_2DCF-DA$ . При деацетилировании эстеразами  $H_2DCF-DA$  превращается в  $H_2DCF$ . В присутствии АФК  $H_2DCF$  окисляется

до DCF, который флуоресцирует в зелёном канале (EX BP 450-490, BS FT 510, EM BP 565) [Methods to monitor ... , 2014; Relation between mitochondrial ... , 2018]. Интенсивность флуоресценции DCF оценивалась только в живых клетках. Окрашивание  $H_2DCF-DA$  проводили в течение 10 мин после обработки гербицидами 1, 24 и 48 ч. Показано, что воздействие флуородифена (200 мкМ) не повышало достоверно интенсивность флуоресценции DCF в клетках на протяжении всего эксперимента (рис. 3, б). Противоположный результат был получен при обработке диуроном. Внесение диурона (200 мкМ) уже через 1 ч приводило к достоверному увеличению флуоресценции DCF примерно на 50 % (см. рис. 3, а). Через 24 и 48 ч этот показатель снижался до контрольного уровня. Таким образом, обработка диуроном на ранних стадиях вызывала кратковременное усиление продукции АФК, однако при использовании флуородифена такого эффекта не наблюдалось.

Изменение  $\Delta\mu_H^+$  используется как биоиндикатор негативного воздействия ксенобиотиков на клетки млекопитающих [Mitochondrial membrane ... , 2002; Mandavilli, Aggeler, Chambers, 2018], поэтому на следующем этапе изучили влияние гербицидов на изменение  $\Delta\mu_H^+$  в культуре клеток арабидопсиса. Для оценки  $\Delta\mu_H^+$  использовали флуоресцентный зонд JC-1. Мономеры JC-1, избирательно накапливаясь в митохондриях, при повышении потенциала образуют J-агрегаты, которые флуоресцируют в красном канале [Relation between mitochondrial ... , 2018]. Из полученных результатов (см. рис. 3, з) видно, что флуородифен в концентрации 200 мкМ не оказывал влияния на изменение интенсивности флуоресценции JC-1, а следовательно, и на  $\Delta\mu_H^+$ . В то же время диурон в такой же концентрации (200 мкМ) через 1 ч после внесения в культуру клеток приводил к увеличению флуоресценции JC-1 примерно на 25 %, что указывает на повышение  $\Delta\mu_H^+$  (см. рис. 3, в). Это повышение, однако, было кратковременным, и через 24 и 48 ч после инкубации с данным агентом разницы с контролем обнаружено не было (см. рис. 3, в).

### **Обсуждение**

Чтобы адекватно оценить токсическое действие какого-либо химического агента, нужно вычислить долю выживших и погибших особей, в нашем случае – отдельных клеток. Для таких расчётов применяют разные методы – оценку ингибирования роста культур [Comparative effects of ... , 2008], восстановление бромидов тетразолия клетками [Toxicity of diuron ... , 2015], выход электролитов из тканей [Tobacco plants over-expressing ... , 2015]. Мы применяли метод двойного окрашивания флуоресцентными зондами PI и FDA, спектры поглощения и эмиссии которых различаются. Использование двух флуоресцентных красителей связано с тем, что часть клеток в суспензионной культуре погибает со значительными повреждениями плазмалеммы и быстрой деградацией нуклеиновых кислот. Такие клетки являются мертвыми, но PI не окрашиваются, поскольку не содержат молекул-мишеней. В связи с этим одновременно применялся и флуоресцентный зонд, проникающий в живые клетки.

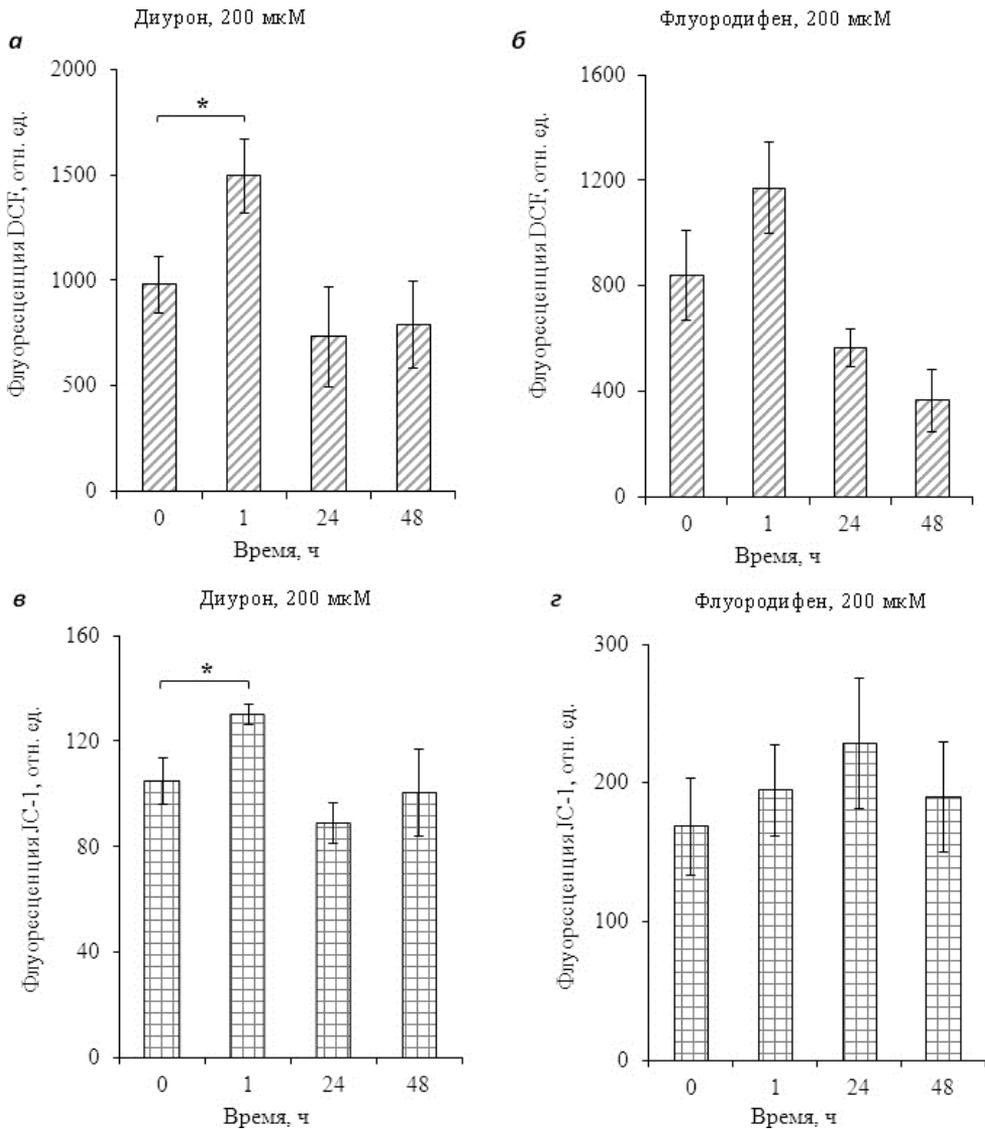


Рис. 3. Временная динамика изменения генерации активных форм кислорода (а, б) и митохондриального мембранного потенциала (в, г) в клетках суспензионной культуры арабидопсиса после воздействия гербицидами. Представлен количественный подсчёт интенсивности флуоресценции DCF и после обработки клеток диуроном (а, в) и флуородифеном (б, г) в течение 1, 24 и 48 ч. Флуоресценцию DCF и JC-1 измеряли сразу же после воздействия.  $n = 3$ ,  $M \pm S.E.$ \* – статистически значимые различия ( $t$ -критерий Стьюдента),  $p \leq 0,05$

Полученные в работе данные свидетельствуют о ярко выраженном цитотоксическом эффекте, оказываемом гербицидами диуроном и флуородифеном на клетки суспензионной культуры *A. thaliana*. Установленные нами токсические концентрации диурона и флуородифена (200 мкМ для обоих токсикантов) соответствуют тем, которые применяются в работах по

изучению влияния этих гербицидов не только на интактные растения (например, табак), но и на клетки человека [Toxicity of diuron ... , 2015; Tobacco plants over-expressing ... , 2015]. На основании этого можно заключить, что гетеротрофная суспензионная культура растительных клеток является адекватным модельным объектом для оценки фитотоксичности гербицидов. Интересно отметить, что в нашей работе цитотоксическое воздействие проявлялось уже на ранних стадиях обработки (через 1 ч) и усиливалось с увеличением времени инкубации (см. рис. 1, 2).

Известно, что обработка гербицидами в ряде случаев приводит к усилению продукции АФК, что может обуславливать их фитотоксический эффект [Herbicides and environment, 2011]. Более того, продукцию АФК предлагается использовать как один из биомаркеров фитотоксичности ксенобиотиков [Brain, Cedergreen, 2009]. Результаты, полученные при выполнении данной работы, не подтверждают прямой связи между гибелью клеток в культуре и продукцией АФК. Несмотря на то что оба изученных гербицида имели ярко выраженный фитотоксический эффект (см. рис. 1, 2), только диурон на ранних стадиях обработки приводил к достоверному увеличению уровня АФК в клетках арабидопсиса (см. рис. 3, а). Интересно, что увеличение содержания АФК в растительных клетках под воздействием диурона обычно обусловлено нарушениями в фотосинтетическом электронном транспорте [Fufezan, Rutherford, Krieger-Liszkay, 2002]. Однако в нашей работе использовалась гетеротрофная культура растительных клеток, а значит, ключевые мишени для действия данного гербицида в клетках отсутствовали. Аналогичные результаты были получены при изучении влияния диурона в концентрации 200 мкМ на клетки аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7) и плацентарной хориокарциномы человека (BeWo) [Toxicity of diuron..., 2015]. Вероятно, увеличение содержания АФК в клетках под воздействием диурона обусловлено его влиянием на процесс дыхания. В пользу данного предположения свидетельствуют результаты, полученные нами при изучении влияния гербицидов на  $\Delta\mu_{\text{H}}^{+}$ : показано, что обработка клеток арабидопсиса диуроном вызывала кратковременное повышение данного показателя (см. рис. 3, в). Следует, однако, указать на имеющиеся в литературе сведения о том, что диурон способен снижать уровень АТФ в клетках печени крысы [The metabolic effects..., 2017] и ингибировать окисление/восстановление цитохрома *b* на участке убихинона у дрожжей [Di Rago, Colson, 1988]. Таким образом, теоретически он должен не повышать, а снижать  $\Delta\mu_{\text{H}}^{+}$ . В этой связи заметим следующее. Во-первых, повышение  $\Delta\mu_{\text{H}}^{+}$  в нашем случае было кратковременным, наблюдалось исключительно на ранних стадиях обработки и могло быть следствием кратковременного нарушения функционирования дыхательной цепи под действием указанного гербицида. Во-вторых, как правило, исследования по изучению эффекта диурона на  $\Delta\mu_{\text{H}}^{+}$  проводились с использованием изолированных митохондрий, а в нашей работе эффект диурона на  $\Delta\mu_{\text{H}}^{+}$  изучался с использованием целых клеток. Возможно, его влияние на  $\Delta\mu_{\text{H}}^{+}$  зависит от того, действует ли химический агент на целые клетки или изолированные митохондрии. Аналогич-

ным примером может служить антиаритмический препарат амиодарон. Он снижает  $\Delta\mu_{\text{H}}^+$ , вызывая разобщение окислительного фосфорилирования, а также ингибирует комплексы I и II электрон-транспортной цепи при воздействии на изолированные митохондрии [Dual effect of ... , 1990]. В то же время обработка амиодароном целых клеток дрожжей [Role of mitochondria ... , 2005] и растений приводит к повышению  $\Delta\mu_{\text{H}}^+$  [Митохондриальная ретроградная регуляция ... , 2014]. В последнем случае эффект амиодарона на  $\Delta\mu_{\text{H}}^+$  обуславливается, скорее всего, его способностью вызывать кратковременное повышение уровня кальция в цитозоле, что, в свою очередь, инициирует повышение  $\Delta\mu_{\text{H}}^+$ . Можно предположить, что диурон аналогичным образом повышает  $\Delta\mu_{\text{H}}^+$  в клетках арабидопсиса, действуя на митохондрии косвенно через увеличение уровня кальция в цитозоле.

Результаты, полученные при изучении действия флуородифена, напротив, свидетельствуют о том, что цитотоксическое действие гербицидов может быть обусловлено не только развитием окислительного стресса в клетках. Нами показано, что флуородифен в концентрации 200 мкМ хотя и вызывал гибель клеток в культуре, но не влиял на содержание АФК и  $\Delta\mu_{\text{H}}^+$  (см. рис. 1, б; 2, б; 3, б, з). Основной причиной образования АФК при действии данного гербицида считается накопление в мембранах протопорфириногена IX, который в последующих неферментативных реакциях даёт протопорфирин IX, что в свою очередь приводит к образованию АФК [Triosephosphate isomerases in ... , 2009]. Однако эти реакции преимущественно протекают в фотосинтезирующих клетках, в которых активно идёт синтез хлорофилла. Поскольку в гетеротрофной суспензионной культуре синтез порфириновых производных ограничен синтезом гема, то образование цитотоксических соединений может не давать ярко выраженного эффекта. Тем не менее, вопрос о механизмах его цитотоксического действия остаётся открытым и требует дальнейшего изучения.

### ***Заключение***

Результаты исследования показали, что токсический эффект гербицидов диурона и флуородифена на растительные клетки не ограничивается только нарушением процесса фотосинтеза, обычно упоминаемым в публикациях. Оба гербицида вызывают гибель гетеротрофных растительных клеток в тех же концентрациях, что и гибель фотосинтезирующих клеток, причём механизмы этой гибели значительно различаются. Так, гибели клеток арабидопсиса в культуре, вызванной действием диурона, предшествовало кратковременное повышение содержания АФК, которое могло быть вызвано нарушением функционирования митохондрий. В то же время флуородифен таких изменений в клетках арабидопсиса не вызывал, следовательно, его цитотоксическое действие было иным. Таким образом, характер его воздействия на растительный организм ещё предстоит изучить. Следует отметить, что всесторонние исследования токсического воздействия гербицидов весьма актуальны. Несмотря на то что некоторые гербициды (к которым относится и изучаемый нами диурон) ныне запрещены для применения на терри-

тории Российской Федерации, они отличаются высокой устойчивостью к фото- и биоразложению в окружающей среде, а значит, продолжают оказывать негативное влияние на организмы и экосистемы.

*Работа выполнена с использованием коллекций ЦКП «Биоресурсный центр» и оборудования ЦКП «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН.*

#### Список литературы

- Захаренко В. А. Гербициды. М. : Агропромиздат. 1990. 240 с.
- Куликова Н. А., Лебедева Г. Ф. Гербициды и экологические аспекты их применения. М. : Либроком, 2010. 152 с.
- Митохондриальная ретроградная регуляция экспрессии HSP101 *Arabidopsis thaliana* при тепловом стрессе и действии амиодарона / Д. В. Пятрикас, Е. Г. Рихванов, И. В. Федосеева, Н. Н. Варакина, Т. М. Русалева, Е. Л. Таусон, А. В. Степанов, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Физиология растений. 2014. Т. 61, № 1. С. 88–98. <https://doi.org/10.7868/S0015330314010114>
- Сафаров М. Г. Гербициды: 2,4-Д // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7, № 9. С. 57–62.
- Тепловой шок индуцирует продукцию активных форм кислорода и повышает потенциал на внутренней митохондриальной мембране в клетках озимой пшеницы / А. В. Федяева, А. В. Степанов, И. В. Любушкина, Т. П. Побежимова, Е. Г. Рихванов // Биохимия. 2014. Т. 79, № 11. С. 1476–1486. <https://doi.org/10.1134/S0006297914110078>
- Brain R.A., Cedergreen N. Biomarkers in aquatic plants: selection and utility // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 2009. Vol. 198. P. 49–109. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-09647-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-09647-6_2)
- Comparative effects of the herbicides dicamba, 2, 4-D and paraquat on non-green potato tuber calli / F. P. Peixoto, J. Gomes-Laranjo, J. A. Vicente, V. M. Madeira // J. Plant Physiol. 2008. Vol. 165. P. 1125–1133. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.12.013>
- Di Rago J. P., Colson A. M. Molecular basis for resistance to antimycin and diuron, Q-cycle inhibitors acting at the Qi site in the mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263, N 25. P. 12564–12570.
- Dual effect of amiodarone on mitochondrial respiration. Initial protonophoric uncoupling effect followed by inhibition of the respiratory chain at the levels of complex I and complex II / B. Fromenty, C. Fisch, A. Berson, P. Letteron, D. Larrey, D. Pessayre // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1990. Vol. 255, N 3. P. 1377–1384.
- Fufezan C., Rutherford A.W., Krieger-Liszka A. Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II // FEBS Letters. 2002. Vol. 532. P. 407–410. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03724-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03724-9)
- Geigenberger P., Fernie A. R. Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants // Antioxidants & Redox Sign. 2014. Vol. 21, N 9. P.1389–1421. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6018>
- Herbicides and Environment / A. Jurado, M. Fernandes, R. Videira, F. Peixoto, J. Vicente // Kortekamp A.E., (ed.) Croatia, China. 2011. pp. 3–44. <https://doi.org/10.5772/12976>
- Involvement of chloroplasts in the programmed death of plant cells / V. D. Samuilov, E. M. Lagunova, E. V. Dzyubinskaya, D. S. Izyumov, D. B. Kiselevsky, Ya. V. Makarova // Biochemistry (Moscow). 2002. Vol. 67, N 6. P. 627–634. <https://doi.org/10.1023/a:1016138003183>
- Lundegårdh B.H. The influence of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the respiratory and photosynthetic systems of plants // Proceed. Nat. Acad. Sci. 1965. Vol. 53, N 4. P. 703–710.

Mandavilli B. S., Aggeler R. J., Chambers K. M. Tools to measure cell health and cytotoxicity using high content imaging and analysis // *Methods Mol. Biol.* 2018. Vol. 1683. P. 33–46. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7357-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7357-6_3)

McCabe P. F., Leaver C. J. Programmed cell death in cell cultures // *Plant Mol. Biol.* 2000. Vol. 44. P. 359–368. <https://doi.org/10.1023/a:1026500810877>

Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry / A. Wojtala, M. Bonora, D. Malinska, P. Pinton, J. Duszynski, M.R. Wieckowski // *Methods Enzymol.* 2014. Vol. 542. P. 243–262. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00013-3>

Mitochondria are important determinants of the aging of seeds / E. Ratajczak, A. Małecka, I. Ciereszko, A.M. Staszak // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, 1568. <https://doi.org/10.3390/ijms20071568>.

Mitochondrial membrane potential: a novel biomarker of oxidative environmental stress / M. Vayssier-Taussat, S. E. Kreps, C. Adrie, J. Dall'Ava, D. Christiani, B. S. Polla // *Environ Health Perspect.* 2002. Vol. 110, N 3. P. 301–305. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110301>

Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation / J. M. Suski, M. Lebieczinska, M. Bonora, P. Pinton, J. Duszynski, M. R. Wieckowski // *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* 2018. Vol. 1782. P. 357–381. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1_22)

Retzlaff K., Boger P. An endoplasmatic plant enzyme has protoporphyrinogen IX oxidase activity // *Pestic. Biochem. Physiol.* 1996. Vol. 54. P. 105–114.

Role of mitochondria in the pheromone- and amidarone-induced programmed death of yeast / A. I. Pozniakovsky, D. A. Knorre, O. V. Markova, A. A. Hyman, V. P. Skulachev, F. F. Severin // *J. Cell Biol.* 2005. Vol. 168, N 2. P. 257–269. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408145>

Schwarzländer M., Finkemeier I. Mitochondrial energy and redox signaling in plants // *Antioxidants & Redox Signaling.* 2013. Vol. 18, N 16. P. 2122–2144. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5104>

The metabolic effects of diuron in the rat liver / M. da Silva Simões, L. Bracht, A. V. Parizotto, J. F. Comar, R. M. Peralta, A. Bracht // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2017. Vol. 54. P. 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.06.024>

Tobacco plants over-expressing the sweet orange tau glutathione transferases (CsGSTUs) acquire tolerance to the diphenyl ether herbicide fluorodifen and to salt and drought stresses / L. Lo Cicero, P. Madesis, A. Tsaftaris, A. R. Lo Piero // *Phytochemistry.* 2015. Vol. 116. P. 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.004>

Toxicity of diuron in human cancer cells / M. Huovinen, J. Loikkanen, J. Naarala, K. Vähäkangas // *Toxicol In Vitro.* 2015. Vol. 29. P. 1577–1586. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.013>

Triosephosphate isomerases in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*): characterization and susceptibility to herbicides / D. Del Buono, B. Prinsi, L. Espen, L. Scarponi // *J. Agric. Food Chem.* 2009. Vol. 57. P. 7924–7930. <https://doi.org/10.1021/jf901681q>

Truernit E., Haseloff J. A simple way to identify non-viable cells within living plant tissue using confocal microscopy // *Plant Methods.* 2008. Vol. 4, N 15. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-15>

## Study of the Cytotoxicity of the Herbicides of Diuron and Fluorodifen using a Heterotrophic Suspension Cell Culture of *Arabidopsis thaliana* L.

A.V. Fedyaeva<sup>1</sup>, I. Li<sup>2</sup>, I.V. Lyubushkina<sup>1,3</sup>, I.V. Fedoseeva<sup>1</sup>,  
A.V. Sidorov<sup>1,4</sup>, E.G. Rikhvanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Irkutsk State Agricultural University named after A.A. Ezhevsky, Molodezhny settl., Russian Federation

<sup>3</sup> Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

<sup>4</sup> Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation

**Abstract.** The widespread use of herbicides in agriculture leads to their accumulation in the soil, which is dangerous not only for plants, but also for soil microorganisms, animals and humans. At the same time, the effect of many commonly used herbicides on cell metabolism is still not well understood. In this work, we studied the cytotoxic effect of the herbicides fluorodifen and diuron on heterotrophic plant cells. It is known that the negative effect of these chemical agents on weeds is mainly due to inhibition of photosynthesis and the associated oxidative stress however heterotrophic plant cells lack the main targets for their action. A 7-day suspension culture of *Arabidopsis thaliana* L. cells was chosen as the object of study. The cell culture was grown in the dark at 26 °C in flasks (250 ml) with constant stirring in Murashige-Skoog medium containing sucrose (36 g/L), nicotinic acid (0.6 mg/L), pyridoxine (0.6 mg/L), thiamine (1.2 mg/L), 2,4-D (3 mg/L), inositol (120 mg/L), and sodium dithiocarbamate (6 mg/L). The cell culture was transplanted every two weeks with a new medium dilution of 6 times and used for experiments on the 7th day after transplantation. *Arabidopsis* suspension culture cells were treated with herbicides of various concentrations: diuron – 50, 100, 200 µM; fluorodifene – 10, 100, 200 µM. To assess the effect of herbicides on cell metabolism, fluorescent probes were used: FDA (fluorescein diacetate), PI (propidium iodide), H<sub>2</sub>DCF-DA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) and JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',2,2'-tetraethylbenzimidazolocarbo-cyanine). An Axio Observer Z1 inverted fluorescence microscope (Carl Zeiss Microscopy, Germany) with an AxioCam MRm3 digital monochrome camera and an AxioVision Rel.4.7 image analysis software package were used. At the first stage, the phytotoxic effect of various concentrations of diuron and fluorodifene was analyzed, treating the cells for 24 hours at 26 °C. At the control condition, the number of living cells (cells that were stained with FDA and not stained with PI) ranged from 70 to 80 %. Diuron caused a significant decrease in cell viability only in the case of incubation of cells with the maximum used concentration (200 µM). The proportion of living cells in the culture in that condition was 30 %. Fluorodifene at a concentration of 10 µM did not cause the death of *Arabidopsis* cells, however, an increase in its concentration to 100 and 200 µM led to death to 35 and 45 % of the cells, respectively. Thus, the concentrations of herbicides that caused an approximately two-fold decrease in viability within 24 h as compared with the control were determined: for diuron and fluorodifene they amounted to 200 µM. It should be noted the toxic effect of these herbicides manifested itself after 1 h of treatment. In this case, the death of *Arabidopsis* cells under the influence of diuron was accompanied by an increase in the reactive oxygen species (ROS) level and a short-term increase in the electrochemical transmembrane potential on the inner mitochondrial membrane ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) in the cells. At the same time, the toxic effect of fluorodifen was excellent – cell death in the culture was not accompanied by changes in the levels of ROS and  $\Delta\mu\text{H}^+$ . The results obtained indicate that the cytotoxic effect of herbicides may not be associated with the development of oxidative stress in cells and depends on the characteristics of the metabolism of the target cell.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana* L., suspension cell culture, herbicides, diuron, fluorodifen, reactive oxygen species, electrochemical transmembrane mitochondrial potential.

**For citation:** Fedyayeva A.V., Li I., Lyubushkina I.V., Fedoseeva I.V., Sidorov A.V., Rikhvanov E.G. Study of the Cytotoxicity of the Herbicides of Diuron and Fluorodifen using a Heterotrophic Suspension Cell Culture of *Arabidopsis thaliana* L. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2019, vol. 30, pp. 16-31. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2019.30.16> (in Russian)

#### References

- Zakharenko V.A. *Herbicides* [Herbicides]. Moscow, Agropromizdat Publ., 1990, 240 p. (in Russian)
- Kulikova N.A. Lebedeva G.F. *Herbicides i jekologicheskie aspekty ih primenenija* [Herbicides and ecological aspects of their application]. Moscow, Librokom Publ., 2010, 152 p. (in Russian)
- Pyatrikas D.V., Rikhvanov E.G., Fedoseeva I.V., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Tauson E.L., Stepanov A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. Mitochondrialna retrogradnaja reguljacija jekspressii hsp101 arabidopsis thaliana pri teplovom stresse i dejstvii amiodarona [Mitochondrial retrograde regulation of HSP101 expression in *Arabidopsis thaliana* under heat stress and amiodarone action]. *Fiziologija rastenij* [Plant physiology], 2014, vol. 61, no. 1, pp. 88-98. (in Russian). <https://doi.org/10.7868/S0015330314010114>
- Safarov M.G. *Herbicides:2,4-D* [Herbicides:2,4-D]. // *Sorosovskij obrazovatelnyj zhurnal* [Soros Educat. J.], 2001, vol.7, no 9. pp. 57-62. (in Russian)
- Fedyayeva A.V., Stepanov A.V., Lyubushkina I.V., Pobezhimova T.P., Rikhvanov E.G. Heat shock induces production of reactive oxygen species and increases inner mitochondrial membrane potential in winter wheat cells [Teplovoj shok induciruet produkciju aktivnyh form kisloroda i povyshaet potencial na vnutrennej mitohondrialnoj membrane v kletkah ozimoy pshenicy]. *Biohimija* [Biochemistry], 2014, vol. 79, no. 11. pp. 1476-1486. (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0006297914110078>
- Brain R.A., Cedergreen N. Biomarkers in aquatic plants: selection and utility. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2009, vol. 198, pp. 49-109. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-09647-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-09647-6_2)
- Peixoto F.P., Gomes-Laranjo J., Vicente J.A., Madeira V.M. Comparative effects of the herbicides dicamba, 2, 4-D and paraquat on non-green potato tuber calli. *J. Plant Physiol.*, 2008, vol. 165, pp. 1125-1133. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.12.013>
- Di Rago J.P., Colson A.M. Molecular basis for resistance to antimycin and diuron, Q-cycle inhibitors acting at the Qi site in the mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, no. 25, pp. 12564-12570.
- Fromenty B., Fisch C., Berson A., Letteron P., Larrey D., Pessayre D. Dual effect of amiodarone on mitochondrial respiration. Initial protonophoric uncoupling effect followed by inhibition of the respiratory chain at the levels of complex I and complex II. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1990, vol. 255, no. 3, pp. 1377-1384.
- Fufezan C., Rutherford A.W., Krieger-Liszky A. Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. *FEBS Letters*, 2002, vol. 532, pp. 407-410. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03724-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03724-9)
- Geigenberger P., Fernie A.R. Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants. *Antioxidants & Redox Sign.*, 2014, vol. 21, no. 9, pp. 1389-1421. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6018>
- Jurado A., Fernandes M., Videira R., Peixoto F., Vicente J. *Herbicides and Environment*. Kortekamp A.E., (ed.). Croatia, China. 2011. pp. 3-44. <https://doi.org/10.5772/12976>
- Samuilov V.D., Lagunova E.M., Dzyubinskaya E.V., Izyumov D.S., Kiselevsky D.B., Makarova Ya.V. Involvement of chloroplasts in the programmed death of plant cells. *Biochemistry* (Moscow), 2002, vol. 67, no. 6, pp. 627-634. <https://doi.org/10.1023/a:1016138003183>
- Lundegårdh B.H. The influence of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the respiratory and photosynthetic systems of plants. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1965, vol. 53, no. 4, pp. 703-710.

Mandavilli B.S., Aggeler R.J., Chambers K.M. Tools to measure cell health and cytotoxicity using high content imaging and analysis. *Methods Mol. Biol.*, 2018, vol. 1683, pp. 33-46. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7357-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7357-6_3)

McCabe P.F., Leaver C.J. Programmed cell death in cell cultures. *Plant Mol. Biol.*, 2000, vol. 44, pp. 359-368. <https://doi.org/10.1023/a:1026500810877>

Wojtala A., Bonora M., Malinska D., Pinton P., Duszynski J., Wieckowski M.R. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods Enzymol.* 2014, vol. 542, pp. 243-262. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00013-3>

Ratajczak E., Malecka A., Ciereszko I., Staszak A.M. Mitochondria are important determinants of the aging of seeds. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, p. 1568. <https://doi.org/10.3390/ijms20071568>.

Vayssier-Taussat M., Kreps S.E., Adrie C., Dall'Ava J., Christiani D., Polla B.S. Mitochondrial membrane potential: a novel biomarker of oxidative environmental stress. *Environ Health Perspect.*, 2002, vol. 110, no. 3, pp. 301-305. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110301>

Suski J.M., Lebiezinska M., Bonora M., Pinton P., Duszynski J., Wieckowski M.R. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 2018, vol. 1782, pp. 357-381. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1_22)

Retzlaff K., Boger P. An endoplasmic plant enzyme has protoporphyrinogen IX oxidase activity. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1996, vol. 54, pp. 105-114.

Pozniakovskiy A.I., Knorre D.A., Markova O.V., Hyman A.A., Skulachev V.P., Severin F.F. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J. Cell Biol.*, 2005, vol. 168, no 2, pp. 257-269. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408145>

Schwarzländer M., Finkemeier I. Mitochondrial energy and redox signaling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling.*, 2013, vol. 18, no. 16, pp. 2122-2144. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5104>

Simões M. da S., Bracht L., Parizotto A.V., Comar J.F., Peralta R.M., Bracht A. The metabolic effects of diuron in the rat liver. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2017, vol. 54, pp. 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.06.024>

Cicero L.L., Madesis P., Tsaftaris A., Piero A.R.L. Tobacco plants over-expressing the sweet orange tau glutathione transferases (CsGSTUs) acquire tolerance to the diphenyl ether herbicide fluorodifen and to salt and drought stresses. *Phytochemistry*, 2015, vol. 116, pp. 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.004>

Huovinen M., Loikkanen J., Naarala J., Vähäkangas K. Toxicity of diuron in human cancer cells. *Toxicol In Vitro*, 2015, vol. 29, pp. 1577-1586. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.013>

Buono D.D., Prinsi B., Espen L., Scarponi L. Triosephosphate isomerases in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*): characterization and susceptibility to herbicides. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, vol. 57, pp. 7924-7930. <https://doi.org/10.1021/jf901681q>

Truernit E., Haseloff J. A simple way to identify non-viable cells within living plant tissue using confocal microscopy. *Plant Methods.*, 2008, vol. 4, p. 15. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-15>

Федяева Анна Валерьевна  
кандидат биологических наук,  
научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
e-mail: fedyaeva.anna@mail.ru

Fedyayeva Anna Valeryevna  
Candidate of Science (Biology),  
Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: fedyaeva.anna@mail.ru

Ли И  
аспирант  
Иркутский государственный аграрный

Li I  
Postgraduate  
Irkutsk State Agrarian University

университет имени А.А. Ежовского  
Россия, 664038, Иркутская область,  
Иркутский район, п. Молодёжный  
e-mail: li05161020@163.com

named after A.A. Ezhevsky  
Molodezhny settl., Irkutsk Region, 664038,  
Russian Federation  
e-mail: li05161020@163.com

Любушкина Ирина Викторовна  
кандидат биологических наук,  
научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
доцент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003 Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
e-mail: ostrov1873@yandex.ru

Lyubushkina Irina Viktorovna  
Candidate of Science (Biology),  
Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
Assistant Professor  
Irkutsk State University  
1, Lenin st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: ostrov1873@yandex.ru

Федосеева Ирина Владимировна  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
e-mail: fedoseeva@sifibr.irk.ru

Fedoseeva Irina Vladimirovna  
Candidate of Science (Biology),  
Senior Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: fedoseeva@sifibr.irk.ru

Сидоров Александр Владимирович  
ведущий инженер  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
Ассистент  
Иркутский государственный медицинский  
университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. Красного  
Восстания, 1  
e-mail: a\_v\_sidorov@mail.ru

Sidorov Aleksandr Vladimirovich  
Lead Engineer  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
Assistant  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstaniya st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: a\_v\_sidorov@mail.ru

Рихванов Евгений Геннадьевич  
доктор биологических наук,  
главный научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонто-  
ва, 132  
e-mail: eugene@sifibr.irk.ru

Rikhvanov Evgenij Gennad'evich  
Doctor of Sciences (Biology)  
Principal Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: eugene@sifibr.irk.ru