



УДК 57.085.2

Образование супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в вакуолярном содержимом в присутствии гербицидов

О. Д. Нимаева¹, А. Б. Карпова², Е. В. Прадедова¹, Р. К. Саляев¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²Иркутский государственный университет, Иркутск

E-mail: sandra_ok@mail.ru

Аннотация. Исследовали образование активных форм кислорода (АФК) в вакуолях клеток корнеплодов столовой свёклы (*Beta vulgaris* L.) в присутствии НАДН и салициловой кислоты. В результате было выявлено повышение концентрации пероксида водорода (H_2O_2) и супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$). Кроме того, АФК-генерация в вакуолях наблюдалась и в присутствии различных гербицидов. Безусловными активаторами окислительных процессов можно считать такие используемые в работе гербициды, как 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота (2,4-Д) и диурон. В их присутствии повышалось содержание $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 . В присутствии других гербицидов происходило образование либо H_2O_2 , как в случае с фтородифеном и клопиралидом, либо $O_2^{\cdot-}$, как в случае с глифосатом. Образование активных форм кислорода (АФК), вызываемое гербицидами, подавляли признанные ингибиторы оксидоредуктаз NaN_3 и KCN , что могло свидетельствовать о причастности этих ферментов к АФК-генерации. Модельные эксперименты с пероксидазой хрена подтвердили это предположение. Образование H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$ в присутствии пероксидазы хрена наблюдали с гербицидами фтородифен и 2,4-Д. На данном этапе исследования можно предположить, что фенольная пероксидаза вакуолей служит генератором АФК, хотя для подтверждения этого факта требуются дополнительные исследования. Полученные в ходе исследования результаты, продемонстрировавшие образование $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 в вакуолярном содержимом, указывают на наличие в вакуолях редокс-систем, способных генерировать АФК и, кроме того, на наличие систем, способных взаимодействовать с гербицидами.

Ключевые слова: вакуоль, АФК, пероксид водорода, супероксид анион-радикал, гербициды.

Введение

Активные формы кислорода (АФК) образуются при любом стрессовом воздействии, что является одной из ранних реакций на стресс. Образование АФК – естественный процесс, который в различных клеточных структурах находится под контролем как систем, способных генерировать АФК, так и систем, их утилизирующих. АФК-генерирующая система растительных клеток активно исследуется в таких клеточных компартментах, как митохондрии, хлоропласты, клеточные стенки и ядра [5]. Что касается самого крупного компартмента центральной вакуоли, то в настоящее время о вакуолярной АФК-генерирующей активности известно совсем немного. На её нали-

чие указывают некоторые ферменты и соединения, которые способствуют образованию АФК. В вакуолярном содержимом выявлены редокс-ферменты (фенольная пероксидаза ЕС 1.11.1.7 и Cu,Zn-супероксиддисмутаза (Cu,Zn-СОД) ЕС 1.15.1.1), а также редокс-активные низкомолекулярные соединения (фенолы, аскорбат, глутатион) [5; 6]. Фенольная пероксидаза способна восстанавливать H_2O_2 до H_2O и генерировать супероксидный анион радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), это зависит от условий, определяющих редокс-состояние кофермента (гемина). СОД ускоряет дисмутацию $2\text{O}_2^{\cdot-}$, в результате образуется H_2O_2 [14]. Оба этих фермента относятся к антиоксидантам и в то же время могут генерировать АФК. Однако неизвестно, при каких условиях внутри вакуоли будет происходить их интенсивное образование. Возможно, таким условием будет эффект тяжёлых металлов. Например, у гороха (*Pisum sativum* L.), обработанного кадмием, наблюдалась стимуляция АФК в вакуолях в клетках обкладки сосудистых пучков, при этом H_2O_2 накапливался с цитоплазматической стороны, а $\text{O}_2^{\cdot-}$ – в вакуолярном содержимом [10]. Следовательно, условием для АФК-генерации в вакуолях служил токсический эффект тяжёлых металлов. Возможно, токсическое действие гербицидов тоже будет одним из таких условий. Гербициды в организме растений могут окисляться, некоторые из них являются субстратами для оксидаз (фенолоксидазы, пероксидазы и др.). Например, было показано, что определённые триазины при окислении или гидроксилировании пероксидазой кукурузы теряли гербицидную активность [2]. Пероксидаза хрена взаимодействовала с гербицидом 2,4-дихлорфеноксисукусной кислотой (2,4-Д) [7]. Некоторые соединения окисляются под действием оксидаз, затем вступают в реакцию с молекулярным кислородом, что способствует генерации АФК. Таким образом, они играют роль вторичных генераторов АФК. В качестве примера можно привести гербициды дипиридилы, которые в результате вторичного окисления кислородом служат источником гидроперекисных радикалов [2]. Из этого следует, что гербициды или продукты их химического преобразования способствуют генерации АФК. Некоторые из них могут вызывать у растений окислительный взрыв. Например, показана генерация H_2O_2 и $\text{O}_2^{\cdot-}$ после обработки 2,4-Д [10] у растений гороха, а при обработке растений паракватом наблюдалась повышенная генерация АФК в хлоропластах. При этом источником АФК служил радикал гербицида, являющийся продуктом реакции восстановления параквата дегидрогеназами [4]. В связи с этим можно предположить, что одним из механизмов, с помощью которого гербициды проявляют свою токсичность, служит АФК-генерация, приводящая к развитию окислительного стресса. Несмотря на то что физико-химические свойства гербицидов разных классов активно исследуются, некоторые аспекты их токсического действия, например, способность принимать участие в образовании АФК в различных клеточных структурах, остаются малоизученными. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение эффекта гербицидов на генерацию H_2O_2 и $\text{O}_2^{\cdot-}$ в вакуолях растительных клеток.

Материалы и методы

Объектом исследования служили корнеплоды столовой свёклы (*Beta vulgaris* L.) сорта Бордо. В экспериментах использовали корнеплоды в период физиологического покоя. Корнеплоды хранили при температуре +4 °С.

Выделение вакуолей из ткани корнеплодов столовой свёклы проводили с помощью модифицированного макрообъемного метода, разработанного в лаборатории физиологии растительной клетки СИФИБР СО РАН [1]. Фракцию изолированных вакуолей дополнительно очищали от примесей (пластид, ядер, клеточных стенок) в ступенчатом градиенте плотности (1,050–1,080–1,145–1,180 г/см³), составленном из матричных растворов 1 М КСl и 1,8 М сахарозы на основе 20 мМ трис-НСl (рН 7,4) [1]. Чистоту фракций контролировали под световым микроскопом NU-2E (Carl Zeiss, Германия) и с помощью биохимических методов [6].

Вакуолярные экстракты получали, разрушая изолированные вакуоли в гипотоническом растворе (50 мМ трис/НСl, рН 6,5). Полученный лизат центрифугировали при 13 500 g 10 мин на охлаждаемой центрифуге Eppendorf 5417R (Eppendorf, Германия).

При исследовании эффекта различных соединений на образование АФК использовали среду инкубации следующего состава: 25 мМ трис-пропан/НСl. В зависимости от поставленных задач рН среды инкубации составлял 8,0 или 5,5 [19]. В опытных вариантах среды инкубации содержали одно или несколько соединений: 10 мкМ НАДН; 5 у.е. эритроцитарной бычьей СОД; 1 мкг/мл каталазы из сыворотки крови быка; 50 мкМ салициловой кислоты; 10 мкМ 2,4-Д; 10 мкМ глифосата (N-(фосфонометил)-глицин); 10 мкМ диурона (3-[3,4-дихлорофенил]-1,1-диметилмочевина); 10 мкМ фтородифена (4-нитрофенил-2'-нитро- α,α,α -трифтор-*n*-толиловый эфир); 1 мкМ клопиралида (3,6-дихлорпиридин-2-карбоновая кислота). При определении эффекта ингибиторов оксидоредуктаз готовили отдельные варианты с вышеперечисленными гербицидами, в которые вносили 1 мМ KCN и 5 мМ NaN₃.

Метод определения H₂O₂, так называемый FOX-метод, основанный на изменении окраски ксиленолового оранжевого, был использован для определения H₂O₂ в вакуолярных экстрактах. Реакционный реагент включал: 500 мкМ сульфата аммония железа FeH₈N₂O₈S₂·6H₂O; 50 мМ H₂SO₄; 100 мМ сорбита; 250 мкМ ксиленолового оранжевого [18]. Измерения проводили на планшетном фотометре ImmunoChem-2100 (High Technology Inc., США) при длине волны 595 нм [8; 18]. Количество пероксида водорода рассчитывали с помощью калибровочных кривых, данные выражали в нмолях H₂O₂ на 1 мг белка.

Белок определяли по методу M. Bradford [9].

Метод определения O₂^{•-} основан на образовании диформаза – продукта восстановления супероксидным анион-радикалом нитросинего тетразолия (НСТ). Для элюирования формаза из водного экстракта, согласно методическому протоколу, использовали смесь диметилсульфоксид–хлороформ в объемном соотношении 2:1 [16]. Концентрацию окрашенного

формазана в анализируемых пробах определяли с помощью нанофотометра NP80 Spectrophotometer (Implen, Германия) при длине волны 540 нм.

С целью установить возможное участие пероксидаз в генерации $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 проводили модельный эксперимент с пероксидазой хрена. Готовили раствор пероксидазы из корней хрена (1 мг/10 мл) в среде, содержащей 25 мМ трис/HCl (pH 6,5). Ход анализа соответствовал опыту с вакуолярным экстрактом.

Исследования проводили в 4–5 биологических повторностях, каждая из которых была представлена тремя аналитическими. При статистической обработке материала использовали общепринятые показатели: среднее арифметическое значение, стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

Генерация АФК в вакуолярном содержимом в присутствии НАДН и салициловой кислоты. На первом этапе исследования необходимо было установить, может ли в вакуолярном содержимом клеток корнеплодов столовой свёклы образовываться пероксид водорода. Ранее в присутствии НАДН была продемонстрирована интенсивная генерация H_2O_2 в экстрактах апопласта клеток фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.). Её источником служили фенольные пероксидазы. Несмотря на то что pH апопласта близок к 5,5, обязательным условием для АФК-генерирующих реакций пероксидаз апопласта являлись относительно высокие значения водородного показателя (8,0) [17]. Также в апопласте ряда растений наблюдали генерацию H_2O_2 при взаимодействии фенольных пероксидаз с салициловой кислотой. Следует отметить, что основными продуктами такого взаимодействия были супероксид анион-радикал и радикал салициловой кислоты [15]. Вакуолярная среда характеризуется низким pH и содержит пероксидазы, в связи с чем можно предположить, что по аналогии с апопластом в вакуоли при определенных условиях также будут продуцироваться АФК.

Для подтверждения этого предположения провели ряд экспериментов, в которых к вакуолярным экстрактам добавляли НАДН и салициловую кислоту, при этом pH среды инкубации, согласно работе [19], был равен 8,0. В результате было отмечено увеличение содержания H_2O_2 в среднем на 20 % (рис. 1). В том случае, если опытные образцы содержали СОД быка, используемую как H_2O_2 -образующий агент, концентрация H_2O_2 возрастала на 40 % с НАДН и на 50 % с салициловой кислотой. По всей видимости, в образцах повышалась концентрация $O_2^{\cdot-}$, и дополнительно внесённая СОД ускоряла реакции дисмутации.

В образцах, содержащих каталазу, которая разлагает H_2O_2 до воды, происходило снижение содержания H_2O_2 на 60 % от значений опытного варианта и на 10–20 % от контрольного варианта. Каталаза в варианте с салициловой кислотой не давала выраженного результата, предположительно из-за того, что салициловая кислота ингибировала фермент. Ранее отмечали ингибирующий эффект салициловой кислоты на каталазу [7].

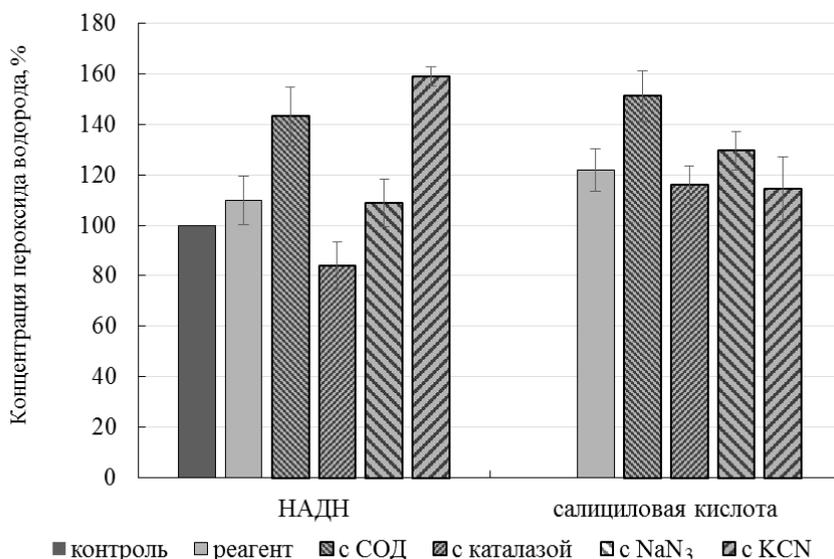


Рис. 1. Содержание пероксида водорода в вакуолярных экстрактах в присутствии таких реагентов, как НАДН и салициловая кислота, а также ферментов СОД и каталазы из сыворотки крови быка и ингибиторов NaN_3 и KCN

Согласно нашему мнению, источниками $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 в вакуолярном содержимом должны служить оксидоредуктазы. В испытуемые образцы вносили ингибиторы оксидоредуктаз NaN_3 и KCN. Ингибиторы давали неоднозначный эффект (см. рис. 1). В случае с НАДН образование H_2O_2 подавлял азид, а в случае с салициловой кислотой более эффективным был цианид. Возможно, основными генераторами H_2O_2 в вакуолях в присутствии НАДН служили флавинодержащие ферменты, нечувствительные к цианиду. Однако следует отметить, что такой фермент, как фенольная пероксидаза, не только активно утилизирует H_2O_2 , но может быть и его источником. Этот фермент в одних случаях более эффективно ингибируется азидом, а в других – цианидом. В пероксидазных реакциях происходит восстановление H_2O_2 до воды, этот тип реакций эффективно подавляет цианид. В оксидазных реакциях пероксидазы образуются $\text{O}_2^{\cdot-}$ и эти реакции с высокой эффективностью подавляются азидом [12]. Следовательно, азид интенсивно подавляет образование H_2O_2 , а цианид – его утилизацию, способствуя тем самым его накоплению. Эти факты, установленные ранее, отчасти объясняют повышение содержания H_2O_2 в опытных вариантах с цианидом.

Стимулирующий эффект СОД на образование H_2O_2 , наблюдаемый в присутствии НАДН и салициловой кислоты, как упоминалось выше, мог свидетельствовать о первичной генерации $\text{O}_2^{\cdot-}$. Результаты измерения $\text{O}_2^{\cdot-}$ это подтвердили. $\text{O}_2^{\cdot-}$ образуется в вакуолярном содержимом в присутствии испытуемых агентов, особенно выражено – салициловой кислоты (рис. 2). Проверить специфичность образования $\text{O}_2^{\cdot-}$, которое определяли в НСТ-системе с помощью таких нейтрализующих агентов, как СОД и низкомоле-

кулярные антиоксиданты, оказалось довольно сложно из-за чувствительности реакционной системы к ярко выраженным восстановителям. Поэтому была предпринята попытка оценить влияние ингибиторов оксидоредуктаз на образование O_2^- , что так же, как и в случае определения H_2O_2 , давало возможность установить причастность ферментов к этому процессу и специфичность образования O_2^- .

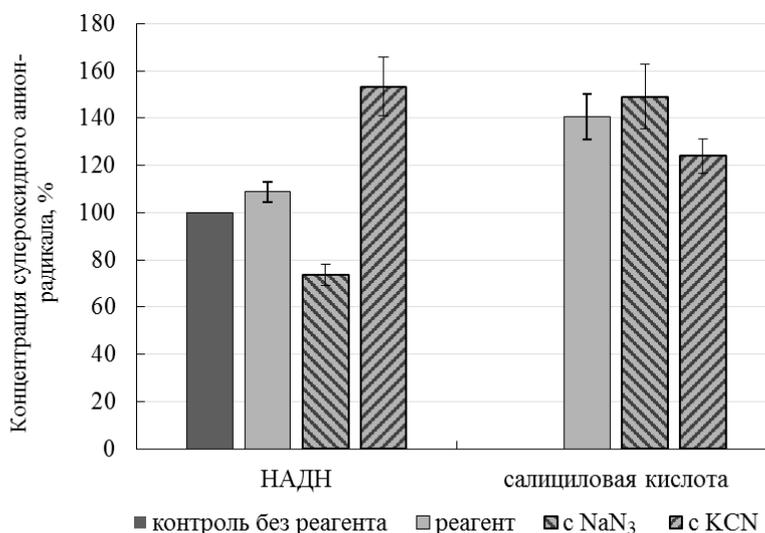


Рис. 2. Содержание супероксидного анион-радикала в вакуолярных экстрактах при наличии НАДН и салициловой кислоты, ингибиторов оксидоредуктаз NaN_3 и KCN

Результаты экспериментов показали, что АФК-генерацию в пробах с салициловой кислотой слабо подавлял только цианид калия. Вероятно, O_2^- в присутствии салициловой кислоты образуется не только в ферментативных, но и, возможно, в неферментативных реакциях.

Выраженные эффекты ингибиторов наблюдали в варианте с НАДН. Цианид, как и в случае исследования H_2O_2 -генерации, способствовал накоплению O_2^- . С одной стороны, цианид является эффективным ингибитором оксидоредуктаз, которые утилизируют O_2^- , например, супероксиддисмутаза, катализирующих реакцию дисмутации $2O_2^-$ до H_2O_2 или H_2O . При ингибировании ферментов, утилизирующих O_2^- , могло происходить его накопление. Однако, как и в случае с H_2O_2 , такой эффект возможен и тогда, когда генерирующие O_2^- ферменты не подавляются цианидом, а утилизирующие ферменты им инактивируются, т. е. равновесие сдвигается в сторону накопления O_2^- . Азид, в присутствии которого в образцах с НАДН не образовывались ни O_2^- , ни H_2O_2 , по всей видимости, подавлял источник генерации АФК (см. рис. 1 и 2).

Полученные результаты в совокупности указывали на образование O_2^- и H_2O_2 в вакуолярном содержимом, что говорило о наличии в вакуолях систем, способных генерировать АФК.

Эффект гербицидов на образование АФК в вакуолярном содержимом. Некоторые гербициды вызывают у растений окислительный взрыв, сопряжённый с интенсивной АФК-генерацией. С помощью гербицидов предстояло установить, могут ли усиливаться окислительные процессы в вакуолях растительных клеток: если в их присутствии такое усиление происходит, либо динамическое равновесие сдвигается в сторону накопления H_2O_2 или O_2^- , это свидетельствует о наличии в вакуолях систем, взаимодействующих с гербицидами. Для подтверждения этого предположения были проведены эксперименты, в которых определяли уровень H_2O_2 и O_2^- в вакуолярных экстрактах после их инкубации с гербицидами фтородифеном, глифосатом, 2,4-Д, клопиралидом и диуроном.

Гербициды, добавленные к вакуолярному содержимому, оказывали различные эффекты (рис. 3). Диурон, фтородифен и клопиралид вызывали увеличение концентрации H_2O_2 в среднем на 30–40 % от контроля. Не все из исследуемых гербицидов способствовали выраженной активизации генерации H_2O_2 . При внесении в опытные образцы 2,4-Д содержание H_2O_2 возрастало в среднем на 20 %, глифосат же вовсе не вызывал повышения H_2O_2 .

При внесении каталазы в среду инкубации, содержащую гербицид, было отмечено снижение содержания H_2O_2 . Не происходило повышения концентрации H_2O_2 при наличии в среде одного из ингибиторов – KCN или NaN_3 . По всей видимости, гербициды взаимодействовали с ферментами, которые были чувствительны к обоим соединениям.

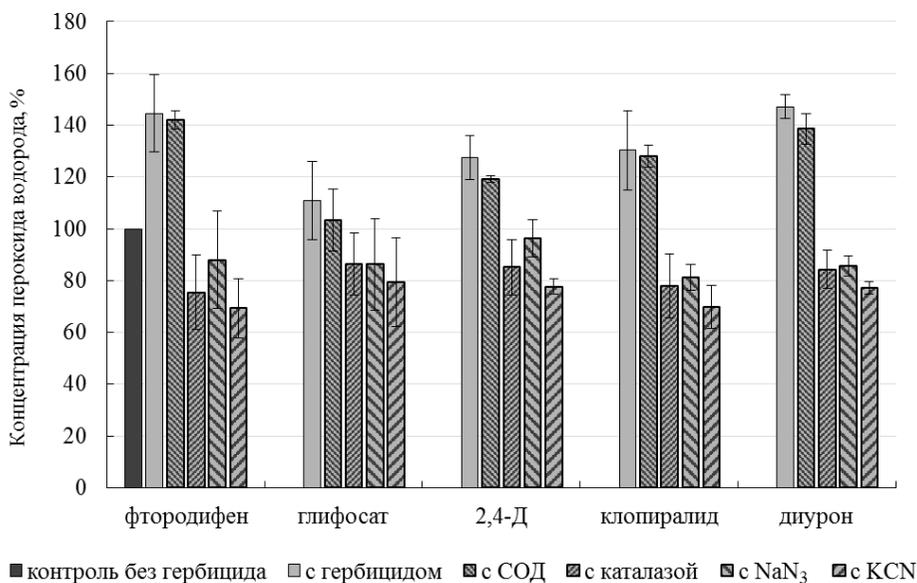


Рис. 3. Содержание пероксида водорода в вакуолярных экстрактах в присутствии гербицидов (фтородифен, глифосат, 2,4-Д, клопиралид, диурон), ферментов СОД и каталазы из сыворотки крови быка, ингибиторов оксидоредуктаз NaN_3 и KCN

Результаты исследования показали, что часть гербицидов, используемых в настоящем исследовании в качестве АФК-генерирующих ксенобиотических соединений, вызвали образование $O_2^{\cdot-}$ в вакуолярном содержимом (рис. 4).

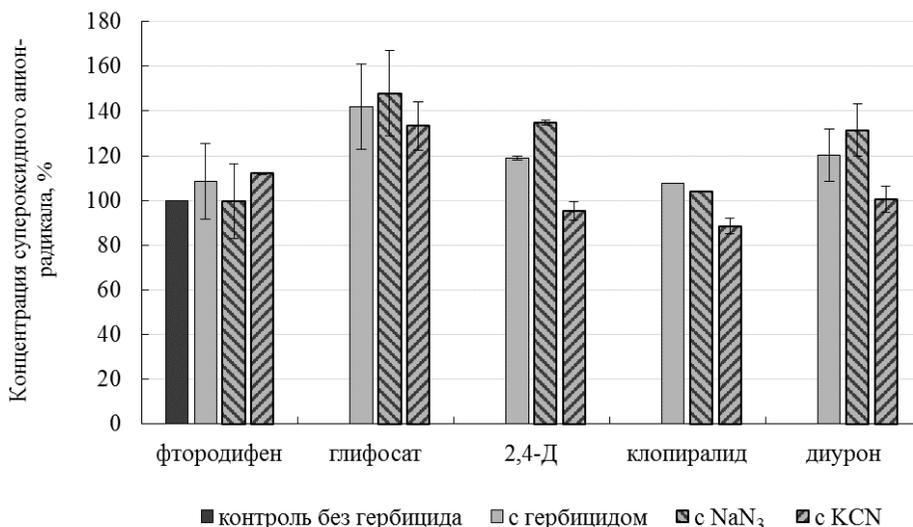


Рис. 4. Содержание супероксидного анион-радикала в вакуолярных экстрактах при наличии гербицидов (фтородифен, глифосат, 2,4-Д, клопиралид, диурон) и ингибиторов оксидоредуктаз NaN_3 и KCN

Так, в присутствии глифосата содержание $O_2^{\cdot-}$ повышалось на 40 %, а 2,4-Д и диурона – на 20 %. Последующие эксперименты с ингибиторами показали низкую эффективность азидов, но довольно высокую эффективность цианида (см. рис. 4). Последний снижал интенсивность образования $O_2^{\cdot-}$ в вариантах с 2,4-Д и диуроном. В варианте с глифосатом используемые ингибиторы были неэффективными. Азид в опыте с гербицидами не подавлял $O_2^{\cdot-}$ -генерацию так же, как и в опыте с салициловой кислотой. Возможно, основным источником $O_2^{\cdot-}$ были продукты окисления гербицидов, т. е. происходило вторичное взаимодействие окисленных продуктов гербицидов с кислородом. Системы, окисляющие гербициды, не подавлялись азидом, но ингибировались цианидом. Ингибирование цианидом образования $O_2^{\cdot-}$ в вакуолярном содержимом косвенно указывало на причастность редокс-ферментов к АФК-генерации.

Суммируя все полученные результаты, можно отметить, что специфичную реакцию, т. е. АФК-генерацию, показали только два гербицида из всех исследуемых: 2,4-Д и диурон. В их присутствии повышалось содержание $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 . Другие же гербициды, например, фтородифен и клопиралид, не способствовали повышению содержания H_2O_2 , а глифосат – $O_2^{\cdot-}$.

Резкое увеличение концентрации H_2O_2 после обработки 2,4-Д было показано на растениях гороха, однако источник АФК не был установлен [10].

В нашей работе 2,4-Д способствовал АФК-генерации в вакуолярном содержимом. Что касается клопиралида, то, по всей видимости, он взаимодействовал с оксидоредуктазами вакуолей, на это указывала окислительная реакция, которая подавлялась ингибиторами. Ранее высказывали предположение, что дипиридилы, к которым относится клопиралид, могут окисляться молекулярным кислородом и служить вторичными генераторами АФК [2]. Вероятно, ферментативными системами вакуолей клопиралид «распознаётся» как субстрат. В то же время 2,4-Д также мог служить субстратом для оксидоредуктаз вакуолей. На сегодняшний день установлены различные пути детоксикации 2,4-Д у растений, в том числе окисление и гидроксилирование с последующей конъюгацией с глутатионом, аминокислотами, углеводами и т. д. [13]. Эти пути предполагают взаимодействие гербицида с оксидоредуктазами и полученные нами результаты могут служить косвенным тому подтверждением.

При добавлении к вакуолярному экстракту глифосата не происходило повышения содержания H_2O_2 , тогда как концентрация $O_2^{\cdot-}$ заметно увеличивалась. Это можно объяснить неспецифическим взаимодействием химически трансформированного глифосата с элементами реакционной среды. Глифосат относится к системным гербицидам сплошного действия. Он действует исключительно как контактный гербицид. У чувствительных растений его действие направлено на подавление синтеза жизненно необходимых аминокислот. В последние годы выявлена АФК-генерирующая активность глифосата. В почве глифосат образует устойчивые хелаты с ионами тяжёлых металлов и особенно с железом, вследствие чего его эффективность резко снижается [2; 4]. При определении пероксида водорода FOX-методом мы учли эту особенность и ввели контрольный вариант, содержащий только реакционный раствор и гербицид, позволяющий учитывать неспецифические взаимодействия.

Модельный эксперимент с пероксидазой хрена. Ингибирующее действие KCN и NaN_3 свидетельствовало об участии в процессах генерации H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$ каталитических белков, вероятнее всего металлсодержащих оксидоредуктаз. На роль АФК-генерирующего фермента в вакуолях более всего подходит фенольная пероксидаза. Основываясь на данных о широкой субстратной специфичности изоформ пероксидаз, предположили, что некоторые из исследуемых гербицидов могли служить субстратом для пероксидазы вакуолей. Проверить это предположение было возможно с помощью модельного эксперимента с пероксидазой из корней хрена (*Armoracia rusticana* G.Gaertn., B. Mey. & Scherb.).

Как в случае с вакуолярными экстрактами, провели исследование с использованием НАДН и салициловой кислоты с целью оценить способность изоформ пероксидазы хрена генерировать АФК в условиях нашего эксперимента (рис. 5).

Только при взаимодействии пероксидазы с салициловой кислотой происходило образование $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 . Источником H_2O_2 , по всей видимости, была некаталитическая дисмутация $O_2^{\cdot-}$ [12]. В условиях нашего экспери-

мента, которые характеризовались слабощелочными рН, в присутствии НАДН не происходило образования АФК пероксидазой.

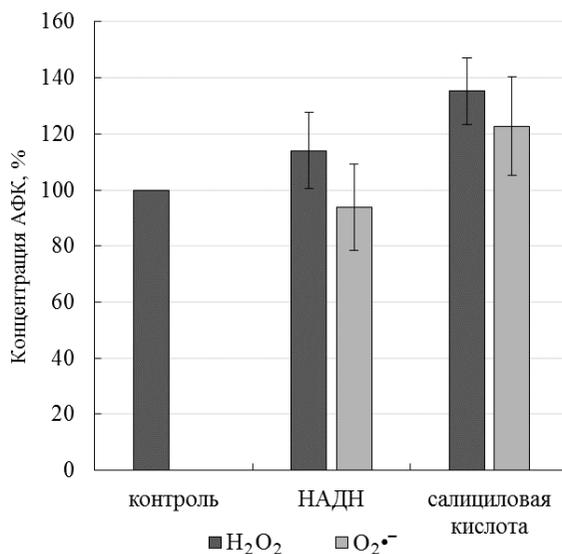


Рис. 5. Содержание АФК при их генерации пероксидазой хрена в присутствии НАДН и салициловой кислоты

Дальнейшее исследование взаимодействия пероксидазы хрена с гербицидами позволило выявить эффект некоторых из них (рис. 6). Фтородифен вызывал повышение H_2O_2 в среднем на 60 %, а в присутствии СОД – на 80 %. В то же время содержание $\text{O}_2^{\bullet-}$ в его присутствии повышалось в среднем на 40 %. Присутствие 2,4-Д, как и в экспериментах с вакуолярным экстрактом, не показывало столь выраженного повышения содержания АФК. Концентрация H_2O_2 и $\text{O}_2^{\bullet-}$ увеличивалась в среднем на 20–30 %. Диурон и клопиралид не влияли на содержание АФК. В то же время глифосат оказывал действие, которое на данном этапе исследования трудно объяснить. В его присутствии содержание H_2O_2 не повышалось, зато содержание $\text{O}_2^{\bullet-}$ увеличивалось на 40 %. Такой же эффект этот гербицид проявил в экспериментах с вакуолярными экстрактами. Возможно, пероксидаза взаимодействует с глифосатом, и продукт реакции восстанавливает НСТ, т. е. происходит неспецифическое взаимодействие. Однако даже такое взаимодействие говорит о реакции между пероксидазой и глифосатом.

Эффект фтородифена на генерацию АФК в вакуолярных экстрактах был, скорее всего, неспецифичным, поскольку в его присутствии увеличивалось содержание только H_2O_2 . Однако в случае с пероксидазой хрена эффект фтородифена можно оценить, как вполне специфичный, поскольку росла концентрация всех исследуемых форм АФК. Вероятно, фтородифен является субстратом для пероксидазы хрена. Не исключено, что он служит субстратом для оксидоредуктаз вакуолей. В образцах, содержащих фтородифен, окислительные процессы в FOX-системе оказались наиболее интен-

сивными. С другой стороны, было показано, что при фотохимическом разложении диарилловых эфиров в водных растворах может происходить отщепление заместителей в ароматическом ядре, а также замена галогенов на гидроксильную группу [3]. Возможно, в нашем исследовании оксидоредуктазы вакуолей и пероксидаза хрена взаимодействовали с гидроксильрованной в водном растворе формой фтородифена. Чтобы подтвердить это, требуются дополнительные исследования.

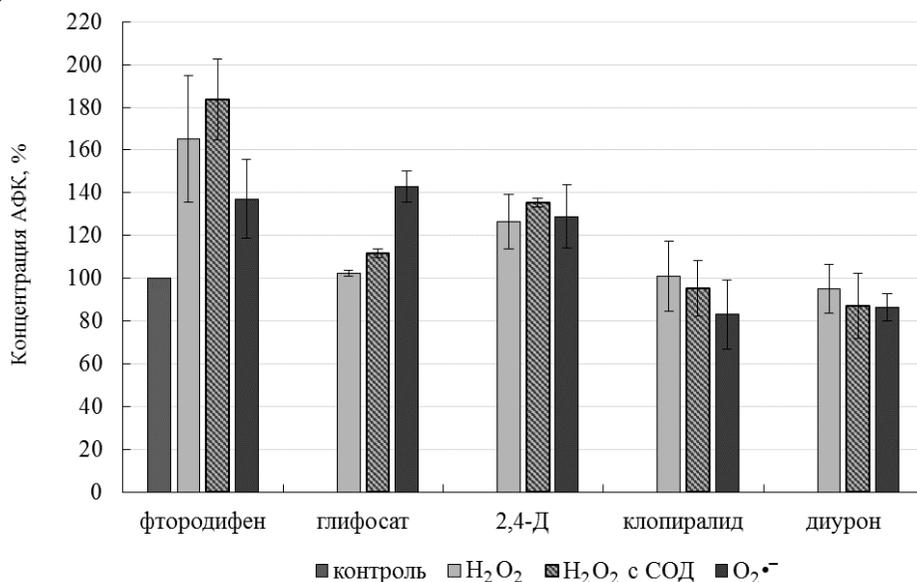


Рис. 6. Образование АФК пероксидазой хрена в присутствии гербицидов (фтородифен, глифосат, 2,4-Д, клопиралид, диурон) и СОД из сыворотки крови быка

Диурон стимулировал генерацию H₂O₂ и O₂•⁻ в вакуолярном экстракте, но оказался неэффективен в опыте с пероксидазой хрена. Как уже отмечалось, пероксидазы разного происхождения характеризуются разной субстратной специфичностью. Диурон и фтородифен имеют схожее токсическое действие – подавляя электронный транспорт, они ингибируют фотосинтез и дыхание. Однако по своей химической структуре они различаются: диурон является производным мочевины и относится к классу фениламидов и подклассу производных фенилмочевины, фтородифен же – производное нитродифенила и относится к классу гербицидов дифениловых эфиров [8]. На сегодняшний день диурон практически не используют в качестве гербицида в нашей стране, но активно применяется его аналог из группы производных сулфонилмочевины. К некоторым из них свёкла устойчива даже на стадии ранних всходов, что обусловлено наличием эффективных систем детоксикации, в числе которых разнообразные ферменты, относимые к классу оксидоредуктаз [2]. Фтородифен, в зависимости от дозы, может угнетать процессы жизнедеятельности у свёклы и ряда других культурных растений, но не приводит к их гибели, что также свидетельствует о функционировании защитных и адаптивных систем [11].

Заключение

Обобщая полученные результаты, следует отметить, что в вакуолярном содержимом могут образовываться АФК. Повышение концентрации H_2O_2 и $\text{O}_2^{\cdot-}$ в присутствии НАДН и салициловой кислоты указывало на наличие в вакуолях АФК-генерирующих систем. Кроме того, увеличение содержания H_2O_2 и $\text{O}_2^{\cdot-}$ в присутствии некоторых гербицидов (диурон и 2,4-Д) и уменьшение в присутствии ингибиторов (цианида калия, азид натрия) свидетельствовало о наличии в вакуолях ферментативных редокс-систем, способных взаимодействовать и с гербицидами.

На данном этапе исследования можно предположить, что фенольная пероксидаза вакуолей является генератором АФК, хотя для полного подтверждения этого факта требуются дополнительные исследования.

В целом полученные данные позволяют прийти к заключению, что вакуоли клеток корнеплодов столовой свёклы содержат ферментативные редокс-системы, способные взаимодействовать с некоторыми гербицидами и активировать генерацию АФК.

Список литературы

1. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений / Р. К. Саяев [и др.] // Физиология растений. – 1981. – Т. 28, № 6. – С. 1295–1305.
2. Груздев Г. С. Химическая защита растений / Г. С. Груздев. – М.: Агропромиздат, 1987. – 415 с.
3. Захаренко В. А. Гербициды / В. А. Захаренко. – М.: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
4. Захарычев В. В. Гербициды и регуляторы роста растений. Основы биохимии и применения / В. В. Захарычев. – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2007. – 204 с.
5. Полесская О. Г. Растительная клетка и активные формы кислорода / О. Г. Полесская. – М.: Кн. дом «Университет», 2007. – 140 с.
6. Праделова Е. В. Супероксиддисмутаза вакуолей клеток растений / Е. В. Праделова, О. Д. Ишеева, Р. К. Саяев // Биологические мембраны. – 2009. – Т. 26, № 1. – С. 5–14.
7. Рогожин В. В. Пероксидаза: структура и механизм действия / В. В. Рогожин, В. В. Верхотуров, Т. В. Рогожина. – Иркутск: Изд-во Иркут. гос. техн. ун-та, 2004. – 200 с.
8. A comparative study on the interference of two herbicides in wheat and italian ryegrass and on their antioxidant activities and detoxification rates / D. Del Buono [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2011. – Vol. 59. – P. 12109–12115.
9. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilising the principal of protein-dye binding / M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, N 1–2. – P. 248–254.
10. Cadmium-induced subcellular accumulation of $\text{O}_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 in pea leaves / M. C. Romero-Puertas [et al.] // Plant, Cell and Environment. – 2004. – Vol. 27. – P. 1122–1134.
11. Chemical and mechanical weed control in transplanted tomatoes / M. A. Maksoud [et al.] // Annals of Agricultural Science. – 1981. – Vol. 26. – P. 307–321.
12. Chen S. Hydroxyl-radical production in physiological reactions - a novel function of peroxidase / S. Chen, P. Schopfer // Eur. J. Biochem. – 1999. – Vol. 260. – P. 726–735.
13. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles / T. Karuppanapandian [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 2011. – Vol. 49. – P. 168–177.

14. Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H_2O_2 affair? / F. Ferreres [et al.] // *J. Exp. Botany*. – 2011. – Vol. 62. – P. 2841–2854.
15. Kawano T. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture / T. Kawano, S. Muto // *J. Exp. Botany*. – 2000. – Vol. 51. – P. 685–693.
16. Reactive oxygen species and signaling in cadmium toxicity / L. M. Sandalio [et al.]. – Berlin: Springer-Verlag. – 2009. – Vol. 57, N 8. – P. 175–189.
17. Recent Advances in Understanding the Origin of the Apoplastic Oxidative Burst in Plant Cells / G. P. Bolwell [et al.] // *Free Radical Res.* – 1999. – Vol. 31. – P. 137–145.
18. Redox regulation of cellular activity: concepts and mechanisms / S. N. Cherenkevich [et al.] // *Bull. NAS Belarus. Biol. Sci. Ser.* – 2013. – Vol. 1. – P. 92–108.
19. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three component system / G. P. Bolwell [et al.] // *J. Exp. Botany*. – 2001. – Vol. 53. – P. 1367–1376.

Effect of Herbicides on the Formation of Superoxide Anion Radicals and Hydrogen Peroxide in the Vacuolar Sap

O. D. Nimaeva¹, E. V. Pradedova¹, A. B. Karpova², R. K. Salyaev¹

¹ *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk*

² *Irkutsk State University, Irkutsk*

Abstract. The formation of reactive oxygen species (ROS) in vacuoles of red beet root cells (*Beta vulgaris* L.) in the presence of various herbicides was studied. Unconditional activators of oxidative processes can be considered herbicides, such as 2.4-D (2.4-dichlorophenoxyacetic acid) and diuron. In their presence, the content of both the superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) was increased. In the presence of other herbicides, either H_2O_2 was formed, as in the case of fluorodifene and clopyralide, or $O_2^{\cdot-}$, as in the case of glyphosate. The formation of ROS caused by herbicides inhibited the recognized oxidoreductase inhibitors NaN_3 and KCN. That could indicate the involvement of these enzymes to ROS generation. Model experiments with horseradish peroxidase subjected this assumption. The formation of H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ in the presence of horseradish peroxidase was observed with herbicides such as fluorodifene and 2.4-D. The results showed that $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 formed in vacuolar sap, indicating in the vacuoles the presence of redox systems capable of generating ROS and, in addition, the availability of systems capable of interacting with herbicides.

Keywords: vacuole, reactive oxygen species, hydrogen peroxide, superoxide radical anion, herbicides.

References

1. Salyaev R.K., Kuzevanov V.Ya., Khaptagaev V.Ya., Kopytchuk V.N. *Vydelenie i ochistka vakuolei i vakuolyarnykh membran iz kletok rastenii* [Isolation and Purification of Vacuoles and Vacuolar Membranes from Plant Cells]. *Fiziologiya rastenii* [Russian Journal of Plant Physiology], 1981, vol. 28, pp. 1295-1305. (in Russian).
2. Gruzdev G.S. *Khimicheskaya zashchita rastenii* [Chemical Protection of Plants]. Moscow, Agropromizdat Publ., 1987, 415 p. (in Russian).
3. Zakharenko V.A. *Gerbitsidy* [Herbicides]. Moscow, Agropromizdat Publ., 1990, 240 p. (in Russian).
4. Zakharychev V.V. *Gerbitsidy i regulatory rosta rastenii. Osnovy biokhimii i primeneniya* [Herbicides and Plant Growth Regulators. Basics of Biochemistry and Applications]. Moscow, RKhtU im. D. I. Mendeleeva Publ., 2007, 204 p. (in Russian).

5. Poleskaya O.G. *Rastitel'naya kletka i aktivnye formy kisloroda* [Plant cell and reactive oxygen species]. Moscow, Knizhnyi Dom Universitet Publ., 2007, 140 p. (in Russian).
6. Pradedova E.V., Isheeva O.D., Salyaev R.K. *Superoksiddismutaza vakuolei kletok rastenii* [Superoxide dismutase of plant cell vacuoles]. *Biologicheskie membrany* [Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology], 2009, vol. 26, pp. 5-14. (in Russian). DOI: 10.1134/S1990747809010048.
7. Rogozhin V.V., Verkhoturov V.V., Rogozhina T.V. *Peroksidaza: struktura i mekhanizm deistviya* [Peroxidase: structure and mechanism of action]. Irkutsk, Irkutsk State technical University Publ., 2004, 200 p. (in Russian)
8. Buono D.D., Ioli G., Nasini L., Proietti P. A comparative study on the interference of two herbicides in wheat and italian ryegrass and on their antioxidant activities and detoxification rates. *J. Agric. Food Chem*, 2011, vol. 59, pp. 12109-12115. DOI: 10.1021/jf2026555.
9. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilising the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, no. 1-2, pp. 248-254.
10. Romero-Puertas M.C., Rodríguez-Serrano M., Corpas F.J., Gómez M., del Río LA, Sandalio L.M. Cadmium-induced subcellular accumulation of O²⁻ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant, Cell and Environment*, 2004, vol. 27, pp. 1122-134. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2004.01217.x.
11. Maksoud M.A. Rizk T.Y. El Oksh I. Fayed T., Ibrahim H. Chemical and mechanical weed control in transplanted tomatoes. *Annals of Agricultural Science*, 1981, vol. 26, pp. 307-321.
12. Chen S. Hydroxyl-radical production in physiological reactions - a novel function of peroxidase. *Eur. J. Biochem*, 1999, vol. 260, pp. 726-735.
13. Karuppanapandian T., Wang H.W., Prabakaran N., Jeyalakshmi K., Kwon M., Manoharan K., Kim W. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles. *Plant Physiol. Biochem.*, 2011, vol. 49, pp. 168-177. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.11.007.
14. Ferreres F., Figueiredo R., Bettencourt S., Carqueijeiro I., Oliveira J., Gil-Izquierdo A., Pereira D.M., Valentão P., Andrade P. B., Duarte P., Barceló A.R., Sottomayor M. Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H₂O₂ affair? *J. Exp. Botany*, 2011, vol. 62, pp. 2841-2854. DOI: 10.1093/jxb/erq458.
15. Kawano T., Muto S. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. *J. Exp. Botany*, 2000, vol. 51, pp. 685-693. DOI: 10.1093/jexbot/51.345.685.
16. Sandalio L.M., Rodríguez-Serrano M., del Río L.A., Romero-Puertas M.C. Reactive oxygen species and signaling in cadmium toxicity. Berlin: Springer-Verlag, 2009, vol. 57, no. 8, pp. 175-189. DOI: 10.1104/pp.108.131524.
17. Bolwell G.P., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C., Minibayeva F., Rowntree E.G., Wojtaszek P. Recent Advances in Understanding the Origin of the Apoplastic Oxidative Burst in Plant Cells. *Free Radical Res.*, 1999, vol. 31, pp. 137-145. DOI: 10.1093/jexbot/53.372.1367.
18. Cherenkevich S.N., Martinovich G.G., Martinovich I.V., Gorudko I.V., Shamova E.V. Redox regulation of cellular activity: concepts and mechanisms. *Bull. NAS Belarus. Biol. Sci. Ser.*, 2013, vol. 1, pp. 92-108.
19. Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C., Minibayeva F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three component system. *J. Exp. Botany*, 2001, vol. 53, pp. 1367-1376.

Нимаева Оксана Дамбинимаевна
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
Сибирский институт физиологии

Nimaeva Oksana Dambinimaevna
Candidate of Science (Biology), Research
Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology and

*и биохимии растений СО РАН
Россия, 664013, г. Иркутск,
ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–46–59
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: sandra_ok@mail.ru*

*Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
Russian Federation
tel.: (3952) 42–46–59
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: sandra_ok@mail.ru*

*Прадедова Елена Владимировна
кандидат биологических наук, старший
научный сотрудник
Сибирский институт физиологии и био-
химии растений СО РАН
Россия, 664013, г. Иркутск,
ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–46–59
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: praded@sifibr.irk.ru*

*Pradedova Elena Vladimirovna
Candidate of Science (Biology),
Senior Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
Russian Federation
tel.: (3952) 42–46–59
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: praded@sifibr.irk.ru*

*Карпова Александра Борисовна
магистрант
Иркутский государственный университет
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24–18–70
факс: (3952) 24–18–55
e-mail: KarpovaAB@yandex.ru*

*Karpova Aleksandra Borisovna
Undergraduate
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,
Russian Federation
tel.: (3952) 24–18–70
fax: (3952) 24–18–55
e-mail: KarpovaAB@yandex.ru*

*Салыев Рюрик Константинович
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН, советник РАН
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
Россия, 664013, г. Иркутск,
ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–46–59
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: salyaev@sifibr.irk.ru*

*Salyaev RYurik Konstantinovich
Doctor of Science (Biology), Corresponding
Member for RAS, Advisor for RAS
Siberian Institute of Plant Physiology and
Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
Russian Federation
tel.: (3952) 42–46–59
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: salyaev@sifibr.irk.ru*