

УДК 581.17

*Н. Г. АВЕРИНА, Р. А. ЩЕРБАКОВ, И. В. ВЕРШИЛОВСКАЯ, И. Н. ДОМАНСКАЯ*  
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ  
ДЛЯ ВОССТАНАВЛЕНИЯ ДЫХАНИЯ И ФОТОСИНТЕЗА  
У РАСТЕНИЙ ОЗИМОГО РАПСА (*BRASSICA NAPUS*), ВЫРАЩИВАЕМЫХ  
НА СУЛЬФОНИЛМОЧЕВИННОМ ГЕРБИЦИДЕ**

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: averina@ibp.org.by*

*(Поступила в редакцию 07.05.2015)*

**Введение.** Одним из основных мероприятий, способствующих увеличению производства сельскохозяйственной продукции, является борьба с сорняками. Гербициды на основе сульфонилмочевины (СМГ) относятся к препаратам четвертого поколения с широким спектром действия и интенсивно используются для прополки посевов практически всех основных культур во многих странах мира, в том числе и в Беларуси [1, 2]. Эти гербициды имеют ряд положительных свойств: низкие нормы расхода, широкий спектр действия, высокую гербицидную активность при низких температурах воздуха, значительный временной диапазон использования, совместимость с большинством пестицидов. Под воздействием СМГ прекращается деление клеток чувствительных к этим препаратам видов сорных растений, в результате чего они останавливаются в росте и теряют конкурентоспособность с культурными растениями.

Одной из проблем при использовании СМГ является отрицательное действие наиболее персистентных препаратов этого класса на чувствительные культуры севооборота – рапс, люпин, свеклу, гречиху и др. [3]. Недобор урожая указанных выше культур от последствий СМГ может составлять от 15 до 25 %. Высоким фитотоксичным действием обладает СМГ Магнум (метсульфурон-метил). Так, остатки гербицида в почве даже в дозе менее 0,2 г/га снижали массу сахарной свеклы на 32 % по сравнению с контролем, а остаточная доза СМГ 1 г/га оказывала существенное влияние на посевы льна. Знание механизмов действия СМГ на растения и использование приемов, позволяющих ослабить отрицательное действие СМГ на используемые в севообороте растения, является актуальной задачей. Вместе с тем механизмы действия СМГ изучены недостаточно. Имеются отдельные публикации о воздействии сульфонилмочевины на ацетолактатсинтетазу – ключевой фермент биосинтеза незаменимых аминокислот с разветвленной углеводородной цепью – валина, лейцина и изолейцина [4], что может приводить к нарушениям в протеоме растительной клетки в целом. Ранее нами было отмечено отрицательное действие СМГ Магнум на активность аскорбатпероксидазы, сопровождаемое повышением содержания пероксида водорода в растениях рапса, а также снижение содержания антоцианов, что в целом ослабляло защитную систему растений [5]. Отмеченное нами подавление функциональной активности систем синтеза хлорофиллов и гема – основных участников фотосинтеза и дыхания – в растениях, выращенных на растворе СМГ [6], может сказаться на активности этих двух важнейших энергетических процессов и снизить тем самым устойчивость выращиваемых в севообороте растений к действию СМГ. Поэтому анализ активности фотосинтеза и дыхания у растений, выращиваемых на СМГ Магнум, является весьма актуальной задачей.

Перспективным подходом к снижению нежелательного действия СМГ на культурные растения может стать использование регуляторов роста растений (РРР). 5-аминолевулиновая кислота (АЛК), предшественник хлорофилла и гема в биосинтезе, в низких концентрациях (0,1–40 мг/л) обладает свойствами РРР, а также антистрессора, и в настоящее время препараты на ее основе широко используются в сельском хозяйстве как высокоэффективные экологически чистые соединения [7]. Их действие приводит к ускорению роста и развития растений [8], содержанию в них хлорофиллов, общих и восстановленных сахаров [9], возрастанию фотосинтетической активности [10, 11], активности антиоксидантных ферментов [12] и повышению продуктивности растений [7]. Ранее нами было показано, что обработка экзогенной АЛК растений озимого рапса, выращиваемых на растворе СМГ Магнум, способствовала формированию устойчивости растений к гербициду через активацию аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы [5].

Цель данной работы – изучение влияния сульфонилмочевины Магнум на активность фотосинтеза и дыхания в проростках озимого рапса путем анализа поглощения и выделения кислорода листовыми дисками растений на содержание белков основных светособирающих комплексов фотосинтетических мембран, активность ключевого дыхательного фермента – цитохром *c*-оксидазы, а также использование экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты с целью ослабления отрицательного действия сульфонилмочевины на эти процессы.

**Материалы и методы исследования.** *Растительный материал и условия выращивания растений.* В качестве объектов исследования использовали растения озимого рапса (*Brassica napus*, сорт Зорны). Растения выращивали в течение 7 дней в условиях 14-часового фотопериода на воде (контроль), растворах гербицида Магнум в концентрациях 200 и 500 мг/л, а также на растворах гербицида совместно с АЛК (0,1; 1,0 и 10 мг/л) при температуре  $23 \pm 2$  °С и освещенности 2200 люкс (люминесцентные лампы типа ЛБ-40).

*Определение активности фотосинтеза и дыхания.* Половинку семядольного листа озимого рапса помещали в камеру прибора Plant-Vital (Германия) на электрод – сенсор кислорода. Сначала в течение 10–15 мин в темноте измеряли дыхательную активность по потреблению кислорода, затем при освещении камеры – фотосинтез по выделению кислорода [13]. Для каждого варианта использовали 6 физиологических повторностей. Скорость дыхания и фотосинтеза оценивали в мкмоль/м<sup>2</sup>·с, учитывая при этом сырую массу исходной навески.

*Вестерн-блотт анализ содержания белковых компонентов пигмент-белковых комплексов фотосистем 1 и 2.* Экстракцию из растений озимого рапса белков и их электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг выполняли, как описано в работе [14]. Белки экстрагировали из растений рапса в раствор, содержащий 56 мМ дитиотрейтола, 56 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 12 % сахарозы, 2 мМ этилендиаминтетраацетата, 2 % SDS-Na. Гомогенат центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную фракцию собирали и хранили при –20 °С. После разделения белков с помощью денатурирующего гель-электрофореза осуществляли электроперенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану HybondP<sup>+</sup>. Иммунодетекцию белков на нитроцеллюлозной мембране проводили с помощью антител на белок D1 фотосистемы (ФС) 2, а также на белки светособирающих комплексов ССК1 (Lhca1, Lhca 3, Lhca 4) и ССК2 (Lhcb1, Lhcb2, Lhcb5 и Lhcb6).

*Определение активности цитохром *c*-оксидазы.* Определение активности цитохром *c*-оксидазы (ЦО) проводили согласно методу, описанному в работе [15]. Предварительно замороженную ткань (0,3 г) растирали и суспендировали в 1,9 мл буфера для экстракции. Экстракт центрифугировали при 13 000 g 5 мин и супернатант использовали для анализа. Активность фермента измеряли по изменению оптической плотности раствора при 550 нм в ходе окисления восстановленного цитохрома *c*.

Для статистической обработки экспериментальных данных и учета полученных результатов использовали стандартные пакеты программ Excel 2010, SigmaPlot 12.0. Статистическая обработка данных состояла в определении средней квадратичной ошибки их среднего. Приведены средние значения из трех независимых экспериментов и их стандартные ошибки.

**Результаты и их обсуждение.** Представленные на рис. 1, а данные показывают, что скорость дыхания в растениях, выращенных на растворах экзогенной АЛК (0,1; 1,0 и 10 мг/л), возрастает

по сравнению с таковой у контрольных растений, выращенных на воде. Для трех концентраций АЛК скорость дыхания составила соответственно 136, 143 и 113 % от контроля. Гербицид в концентрации 200 мг/л не оказывал какого-либо влияния на скорость дыхания (0,0302 в контроле и 0,0294 мкмоль  $O_2/m^2 \cdot c$  в варианте с Магнумом). Добавление к раствору гербицида 200 мг/л экзогенной АЛК (0,1; 1,0 и 10 мг/л) и в этом случае простимулировало дыхание – 121, 112 и 106 % по сравнению с растениями, выращенными на одном гербициде. Однако в этом случае эффект АЛК проявился в меньшей степени, чем при использовании в качестве контроля растений, выращенных на воде.

Магнум в концентрации 500 мг/л увеличил скорость дыхания проростков рапса на 128 %. В этом случае добавление экзогенной АЛК (0,1; 1,0 и 10 мг/л) не повлияло на активность дыхательного процесса по сравнению с действием одного гербицида либо незначительно снизило скорость дыхания (87, 99 и 104 % от контроля).

Основными компонентами электрон-транспортной дыхательной цепи, генерирующей АТФ, являются гем-содержащие цитохромы, из которых наиболее значимым является терминальная ЦО, которая переносит электрон от цитохрома *c* на кислород, восстанавливая последний до воды. Результаты анализа активности ЦО представлены на рис. 1, б. Гербицид Магнум в концентрации 200 мг/л не оказал сколько-нибудь заметного влияния на активность ЦО (96 % от контроля). Добавление экзогенной АЛК (0,1; 1,0 и 10 мг/л) простимулировало активность фермента – 113, 112 и 120 % по сравнению с действием одного гербицида. Выращивание растений на 500 мг/л Магнума увеличило активность ЦО в среднем на 48 %. В индивидуальных опытах величина стимуляции составила 73, 37, 20, 53 и 56 %. В этом случае добавление экзогенной АЛК (0,1; 1,0 и 10 мг/л) снизило эффект стимуляции активности фермента гербицидом на 13, 15 и 9 % соответственно (рис. 1, б). В целом показатели активности ЦО в растениях, выращенных на сочетанном действии Магнума и АЛК, оказались достаточно близки – 0,1503; 0,1484 и 0,1598 нмоль/г сырой массы (в среднем 0,1528) в случае использования 200 мг/л Магнума и 0,1692; 0,1652 и 0,177 нмоль/г сырой массы (в среднем 0,1705) при использовании 500 мг/л гербицида. Разница между средними величинами составила 10 %. Активность фермента при использовании растворов одних гербицидов составила 0,1329 и 0,1939 для Магнума 200 и 500 мг/л соответственно. По-видимому, действие экзогенной АЛК направлено на поддержание наиболее оптимального гомеостаза активности ЦО путем повышения активности фермента в случае его ингибирования и снижения – в случае его стимуляции.

На рис. 2, а представлены результаты влияния гербицида Магнум и экзогенной АЛК на скорость фотосинтеза в растениях озимого рапса. Как и в случае дыхания, фотосинтетическая активность при действии экзогенной АЛК в концентрациях 0,1; 1,0 и 10 мг/л была простимулирована соответственно на 26, 49 и 7 % по сравнению с контрольными растениями. Магнум (200 мг/л) незначительно (на 9 %) снизил скорость фотосинтеза. Фотосинтетическая активность проростков озимого рапса при добавлении к гербициду экзогенной АЛК составила 93, 103 и 130 % соответственно по сравнению с контролем.

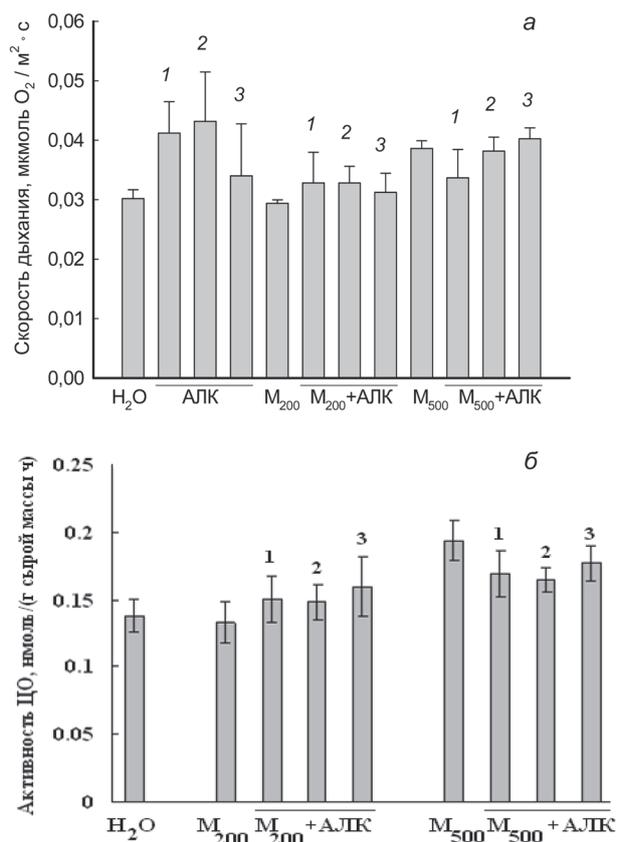


Рис. 1. Скорость дыхания (а) и активность цитохром *c*-оксидазы (б) в растениях озимого рапса, выращенных на растворах гербицида Магнум (200 и 500 мг/л), а также на растворах гербицида с добавлением АЛК (1 – 0,1; 2 – 1,0; 3 – 10 мг/л)

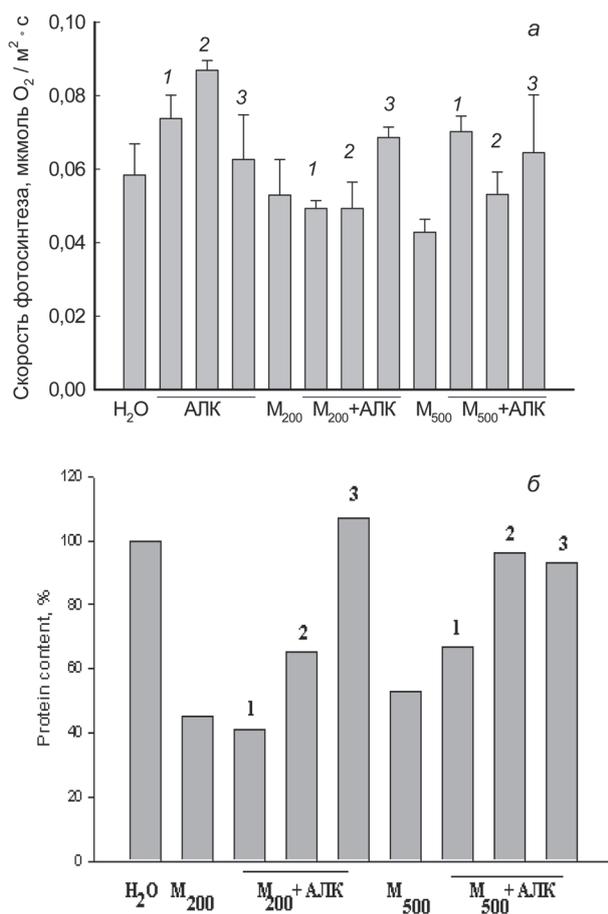


Рис. 2. Скорость фотосинтеза (а) и относительное содержание белка ССК ФС1 (б – Lhca1, результаты единичного опыта) в растениях озимого рапса, выращенных на растворах гербицида Магнум (200 и 500 мг/л), а также на растворах гербицида с добавлением АЛК (1 – 0,1; 2 – 1,0; 3 – 10 мг/л). За 100 % принято относительное содержание белка Lhca1 в контрольных растениях

и Lhca4. Пигмент-белковые комплексы антенны собирают энергию солнечного света в виде фотонов и передают ее на РЦ, где эта энергия используется для отрыва электронов от молекул хлорофилла и их передачи в электрон-транспортную цепь для синтеза соединений, участвующих в последующем усвоении атмосферного CO<sub>2</sub>.

Вестерн-блот анализ показал, что наиболее чувствительным к гербициду Магнум в концентрациях 200 и 500 мг/л оказался один из минорных белков ССК2 – Lhcb6, содержание которого составило 42 и 23 % от контроля соответственно, а также белок Lhca1 ФС 1, концентрация которого составила 45 и 53 % по сравнению с таковой в контрольных растениях. Содержание белка D1 реакционного центра ФС2 в вариантах с гербицидом Магнум в концентрациях 200 и 500 мг/л составило 87 и 33 %, белка Lhcb1 – 90 и 64 %, в то время как содержание белка Lhca 3 практически не отличалось от водного контроля – 87 и 93 %. Экзогенная АЛК увеличила содержание белка ССК1 – Lhca1 в растениях, обработанных двумя концентрациями Магнума (рис. 2, б). АЛК также была эффективна в случае использования 200 мг/л гербицида. Так, при сочетанном действии СМГ и АЛК (10 мг/л) содержание белков Lhca3, Lhcb1 и Lhcb2 практически восстанавливалось до их уровня в растениях водного контроля – 99, 112 и 108 % соответственно.

**Заключение.** Таким образом, при нормальных условиях развития растений озимого рапса отмечена способность экзогенной АЛК стимулировать как дыхание, так и фотосинтез. Действие СМГ Магнум практически не снижало дыхательную активность растений либо стимулировало скорость этого процесса, что сопровождалось аналогичным влиянием гербицида на активность

Растения в варианте Магнум 500 показали очень низкую фотосинтетическую активность – 73 % по сравнению с контролем. Отчетливое стимулирование скорости фотосинтеза проявилось при добавлении к этой концентрации гербицида экзогенной АЛК (0,1; 1,0 и 10 мг/л) – 164, 124 и 151 % соответственно по сравнению с действием одного гербицида. Практически во всех случаях обработки растений гербицидом стимулирующее влияние экзогенной АЛК на фотосинтез было выше по сравнению с ее влиянием на скорость дыхания.

В высших растениях и водорослях фотосинтез осуществляется набором пигмент-белковых комплексов, образующих реакционные центры (РЦ) ФС1 и ФС2, светособирающую внутреннюю хлорофилл *a* содержащую антенну и внешнюю (периферическую) хлорофилл *a/b* светособирающую антенну двух фотосистем (ССК1 и ССК2). В состав РЦ ФС2 входят в виде димера закодированные в геноме хлоропласта белки D1 и D2 (32 и 34 кДа соответственно), связанные с четырьмя молекулами хлорофилла *a* (P680) и двумя молекулами феофитина *a* – первичного акцептора электронов. Периферическая антенна ССК2 в качестве основных пигмент-белковых комплексов содержит белковые триплеты, состоящие из белков Lhcb1, Lhcb2 и Lhcb3, а также белки минорных мономерных пигмент-белковых комплексов – Lhcb4, Lhcb5 и Lhcb6. Светособирающая антенна ССК1 представлена четырьмя пигмент-белковыми комплексами – Lhca1, Lhca2, Lhca3

ЦО. СМГ Магнум существенно подавлял фотосинтетическую активность растений, изменял структуру пигмент-белковых комплексов РЦ ФС2, ССК1 и ССК2 путем снижения содержания их белковых компонентов. В присутствии гербицида способность экзогенной АЛК стимулировать фотосинтез и дыхание отчетливо проявлялось и в случаях ингибирующего действия гербицида. В тех же случаях, когда гербицид оказывал стимулирующее воздействие (в частности, на фотосинтез) экзогенная АЛК снижала скорость процесса. Таким образом, в присутствии гербицида действие экзогенной АЛК направлено на поддержание наиболее оптимального гомеостаза дыхательной и фотосинтетической активности, а также активности ЦО.

### Литература

1. Крейди М., Александров О. Т. // Агриматко. 2001. № 2. С. 13–15.
2. Сорока С. В., Сорока Л. И. // Ахова раслін. 2001. № 2. С. 21–23.
3. Булавин Л. А. и др. // Земледелие и селекция в Беларуси: сб. науч. тр. 2009. № 45. С. 63–73.
4. Chaleff R. S., Mauvais C. J. // Science. 1984. Vol. 224. P. 1443–1445.
5. Аверина Н. Г., Недведь Е. Л., Щербакон Р. А. и др. // Физиол. раст. 2014. Т. 61, № 5. С. 721–729.
6. Аверина Н. Г., Яронская Е. Б., Недведь Е. Л., Тумилович А. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2012. № 4. С. 34–37.
7. Sasaki K. // Biohydrogen / Ed. by Oskar R. Zaborsky. New York, 1998. P. 133–142.
8. United States Patent 5298482 / Tanaka T., Takahashi K., Hotta Y. et al. 1994.
9. Khalas A. A., Al-Khateeb et al. // J. Biol. Sci. 2006. Vol. 6. P. 1118–1121.
10. Yoshida R. et al. // Proceed. 33<sup>th</sup> PGRSA Ann. Meeting. Toyama. Japan. 2006. P. 139–143.
11. Youssef T., Awad M. A. // J. Plant Growth Regul. 2008. Vol. 27. P. 1–9.
12. Xu F. et al. // African J. Biotechnol. 2009. Vol. 8. P. 3769–3776.
13. Vidykina S., Averina N., Rassadina V. et al. // Ecol. Proceed. 2008. N 1 (4). P. 5–12 (In Russ).
14. Kruse E., Mock H.-P., Grimm B. // Planta. 1995. Vol. 196. P. 796–803.
15. Millenaar F. F., Gonzalez-Meler M. A., Siedow J. N. et al. // J. Exp. Bot. 2002. Vol. 371. P. 1081–1088.

N. G. AVERINA, R. A. SHERBAKOV, I. V. VERSHILOVSKAYA, I. N. DOMANSKAYA

#### THE USE OF EXOGENOUS 5-AMINOLEVULINIC ACID FOR RESTORATION OF RESPIRATION AND PHOTOSYNTHESIS IN PLANTS OF WINTER RAPE (*BRASSICA NAPUS*) GROWN ON SULFONYLUREA HERBICIDE

### Summary

Exogenous 5-aminolevulinic acid (ALA) stimulated the respiration and photosynthesis in cotyledons of winter rape plants. Sulfonylurea herbicide Magnum did not reduce activity of respiration or even stimulated the process that was accompanied with similar effects on the activity of cytochrome *c*-oxidase. Herbicide significantly inhibited photosynthetic activity, changed the structure of pigment-protein complexes of the reaction centers of Photosystem (PS) 2, light-harvesting complexes of PS1 and PS2 through decreasing content of their protein components. ALA in the presence of Magnum stimulated photosynthesis and respiration if herbicide inhibited these processes but decreased rate of them in case of their stimulation by herbicide. It was concluded that in the presence of herbicide ALA supported optimal homeostasis of respiration and photosynthetic as well as activity of cytochrome *c*-oxidase.