

РАЗЛИЧИЯ В МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ТЕБУКОНАЗОЛА И ТЕБУКОНАЗОЛ-СОДЕРЖАЩЕГО ПРОТРАВИТЕЛЯ НА АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

*А.В. Корсукова^{1,2}, О.А. Боровик¹, Т.П. Побежимова¹,
Н.С. Забанова^{1,2}, Н.В. Дорофеев¹, О.И. Грабельных^{1,2}*

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет,
Иркутск, e-mail: avkorsukova@gmail.com

Системные фунгициды – ингибиторы синтеза стероидов – получили наибольшее развитие и применяются в сельском хозяйстве против болезней растений, вызываемых базидиомицетами (ржавчинные и головнёвые грибы), аскомицетами (парша, мучнистая роса, склеротиния, септориоз) и некоторыми дейтеромицетами. Азолы, содержащие триазольную группу и относящиеся к ингибиторам C¹⁴-деметилирования, занимают лидирующую позицию в области синтетических фунгицидов и активно используются не только для борьбы с возбудителями болезней растений, но и в качестве ретардантов (Попов и др., 2003). Ретарданты – производные 1,2,4-триазола – способствуют замедлению роста растений посредством нарушения синтеза гиббереллина и увеличения содержания абсцизовой кислоты (Прусакова, Чижова, 1998; Чижова и др., 2005). Поиск химических соединений, способствующих повышению холодо- и морозоустойчивости растений, в настоящее время является одним из приоритетных направлений. Митохондрии, играющие ведущую роль в жизни растений, участвуют и в механизмах их адаптации к низким температурам (Грабельных и др., 2014). Переход растений в состояние покоя и формирование устойчивости к неблагоприятным температурам сопровождается ингибированием процессов дыхания (Трунова, 2007; Титов, Таланова, 2011). Известно, что фунгициды, в том числе триазольной природы, являются ингибиторами митохондриального дыхания, и их действие направлено на комплекс I дыхательной цепи митохондрий (Сафина-Осташевская, Гордон, 1984). В связи с этим можно предположить, что тебуконазол (1-(4-хлорфенил)-4,4-диметил-3-(1H-1,2,4-триазол-1-илметил)-3-пентанол) будет оказывать влияние на окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий. Изучение данного вопроса явилось целью настоящей работы в рамках исследования участия тебуконазола в механизмах низкотемпературной адаптации растений.

Объектом исследования выступали этиолированные (выращенные в темноте при 24 °С) проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт «Иркутская»).

Для обработки семян озимой пшеницы использовали тебуконазол-содержащий фунгицид (содержание тебуконазола 60 г/л) – протравитель (1,5 мкл препарата на г семян, мкл/г) «Бункер» (ЗАО Фирма «Август»), а для обработки 2-х суточных проростков – 1 мМ раствор тебуконазола (Tebuconazol PESTANAL, “Sigma-Aldrich”, Германия).

Доза ретарданта «Бункер» – 1,5 мкл/г семян – была подобрана в ходе лабораторных исследований по изменению ростовых параметров coleoptилей проростков озимой пшеницы (Korsukova et al., 2015). Степень ингибирования длины coleoptилей проростков злаков препаратом «Бункер» 1,5 мкл/г семян статистически значимо отличалась от величины ингибирования при 0,5 (рекомендуемой производителем для достижения фунгицидного эффекта), 1 и 3 мкл/г семян, в то же время между вариантами 3 и 4 мкл/г семян статистически значимых отличий не наблюдали (Корсукова, 2016).

Концентрация тебуконазола 1 мМ также подбиралась экспериментально. Так, тебуконазол в концентрации 1 мМ вызывал ингибирование длины coleoptилей, стати-

стически значимо не отличающееся от ингибирования, которое оказывал препарат «Бункер» в концентрации 1,5 мкл/г семян.

В течение 7-ми суток при 2 °С проводили холодное закаливание 3-х суточных проростков.

Выделение митохондрий из побегов этиолированных проростков проводили по методике (Побежимова и др., 2004).

Полярнографическим методом определяли окислительную и фосфорилирующую активность изолированных митохондрий. Для полярнографического анализа использовали платиновый электрод закрытого типа (электрод Кларка) и полярнограф Oxytherm system (“Hansatech Inst.”, Англия), используя объём ячейки 1,4 мл. В качестве субстратов окисления использовали 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата; 8 мМ сукцинат в присутствии 5 мМ глутамата и 3 мкМ ротенона; 1 мМ НАД·Н; 2 мМ аскорбат плюс 0,2 мМ тетраметил-п-фенилендиамин. Глутамат добавляли для устранения оксалоацетатного ингибирования. При окислении НАД·Н из состава среды инкубации исключали ЭДТА и для активации «внешней» ротенон-нечувствительной НАД·Н дегидрогеназы включали 0,06 мМ CaCl₂ (Møller et al., 1981). Для ингибирования цитохромного пути использовали 0,4 мМ KCN, для ингибирования альтернативного пути – 1 мМ бензгидроксамовую кислоту. Вклад цитохромного пути рассчитывали как дыхание, ингибируемое KCN, а вклад альтернативного пути, связанного с функционированием цианид-резистентной альтернативной оксидазы (АО), как дыхание, ингибируемое бензгидроксамовой кислотой в присутствии KCN (потенциальная активность АО).

В ходе исследования были выявлены различия в действии тебуконазол-содержащего протравителя «Бункер» и тебуконазола на окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий озимой пшеницы и вклад в дыхание цитохромного и альтернативного путей переноса электронов как при обычной температуре выращивания, так и при закаливании растений.

Так, в контрольных условиях тебуконазол значительно снижал скорость окисления митохондриями малата, действуя на комплекс I дыхательной цепи, и не приводил к статистически значимому снижению скоростей дыхания митохондрий при окислении сукцината и НАД·Н, в отличие от препарата «Бункер», подавляющего в целом перенос электронов по дыхательной цепи. При этом тебуконазол ингибировал цитохромный путь дыхания, в то время как тебуконазол-содержащий протравитель подавлял транспорт электронов и по цитохромному, и по альтернативному путям. Учитывая, что препарат «Бункер» и тебуконазол оказывают ростингибирующее действие на проростки злаков (Korsukova et al., 2015; Корсукова, 2016), и при этом митохондрии, изолированные из таких проростков, обладают сниженным дыханием, можно предполагать, что такое изменение носит адаптивный характер и направлено на снижение потребления субстратов дыхания, в первую очередь сахаров, и повышение устойчивости незакалённых растений (Корсукова, 2016).

На холодозакалённых проростках озимой пшеницы тебуконазол приводил к незначительной стимуляции дыхания митохондрий независимо от использованного субстрата окисления. У закалённых проростков озимой пшеницы из семян, обработанных препаратом «Бункер», тенденцию к увеличению скоростей дыхания митохондрий наблюдали при окислении малата, а при окислении сукцината и НАД·Н происходило снижение скоростей дыхания митохондрий. Таким образом, в митохондриях из холодозакалённых растений действие тебуконазола и препарата «Бункер» было связано с некоторым усилением их окислительной активности, главным образом при использовании в качестве субстрата малата. При этом наблюдали увеличение вклада альтернативного пути дыхания. Вероятно, при холодовом закаливании реализуется защитный механизм, направленный на поддержание скоростей дыхания митохондрий и активацию альтернативного пути, связанного с функционированием АО, необходимой для адаптации растений к низким температурам (Грабельных и др., 2014).

Выявленные различия в действии тебуконазол-содержащего протравителя «Бункер» и тебуконазола свидетельствуют о том, что влияние промышленного препарата «Бункер» на параметры дыхания митохондрий опосредовано не только входящим в его состав тебуконазолом, но и вспомогательными соединениями.

Литература

Грабельных О.И., Боровик О.А., Таусон Е.Л. (и др.). Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 6. – С. 645–660.

Корсукова А.В. Изменение холодо- и морозоустойчивости проростков злаков под действием тебуконазол-содержащего протравителя семян: Дис. ... канд. биол. наук: 03.01.05. – Иркутск, 2016. – 181 с.

Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез; Отв. ред. чл.-корр. РАН Р.К. Саяев. – М.: ООО «НПК ПРОМЭКОБЕЗОПАСНОСТЬ», 2004. – 98 с.

Попов С.Я., Дорожкина Л.А., Калинин В.А. Основы химической защиты растений: Учебное пособие. – М.: Арт-Лион, 2003. – 208 с.

Прусакова Л.Д., Чижова С.И. Применение производных триазола в растениеводстве // Агрехимия. – 1998. – № 10. – С. 37–44.

Сафина-Осташевская Г.Ф., Гордон Л.Х. Действие фунгицидов на дыхательный газообмен корней пшеницы // Физиология растений. – 1984. – Т. 31, № 5. – С. 896–901.

Титов А.Ф., Таланова В.В. Локальное действие высоких и низких температур на растения. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. – 166 с.

Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. – М.: Наука, 2007. – 54 с.

Чижова С.И., Павлова В.В., Прусакова Л.Д. Содержание абсцизовой кислоты и рост растений ярового ячменя под действием триазолов // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 1. – С. 108–114.

Korsukova A.V., Borovik O.A., Grabelnych O.I. (et al.). The tebuconazole-based protectant of seeds “Bunker” induces the synthesis of dehydrins during cold hardening and increases the frost resistance of wheat seedlings // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2015. – V. 11, N 4. – P. 118–127.

Møller I.M., Johnston S.P., Palmer J.M. A specific role for Ca²⁺ in the oxidation of exogenous NADH by Jerusalem-artichoke (*Helianthus tuberosus*) mitochondria // J. Biochem. – 1981. – V. 194, N 2. – P. 487–495.