

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 6, Number 306 (2014), 82 – 87

**THE IMPACT OF THE PESTICIDES
ON ACTIVITY OF Ca^{2+} -ATPase AND LEVEL OF Ca^{2+} IONS
IN THE TUBE PLANTS OF POTATO SANTA**

A. M. Manadilova, A. Zh. Amirkulova

M. A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry MES RK RGI, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: Man_Alija@mail.ru

Key words: Ca^{2+} -ATPase, Ca^{2+} -ion, herbicide, fungicide, enzyme activity.

Abstract. A comparative analysis of the hydrolytic activity of Ca^{2+} -ATPase in the tube plants of potato (Santa cultivar) under normal conditions and after treatment with herbicides (Granstar, Glyphosat) and fungicides (Fundazol, Tilt) was carried out. The changes of the enzyme activity in potato plants after treatment with series of dilutions of pesticides were studied. The significant increase of enzymatic activity of the studied enzyme and accumulation of the cytoplasmic calcium after one hour of exposition with pesticides were established. Treatment of potato plants with pesticides leads to increased process proceeds via the Ca^{2+} plasmalemma to the apoplast, which leads to activation of the Ca^{2+} -ATPase and enhance defense mechanisms. It is assumed that one of the first links in the mechanism of herbicides impact on a plant cell is activation of the calcium-canals of plasmalemma which are remarkable selective about Ca^{2+} -ions.

УДК 581.19;581.4/632.952:633.1

**ВЛИЯНИЕ ПЕСТИЦИДОВ НА АКТИВНОСТЬ Ca^{2+} -АТФАЗЫ
И УРОВЕНЬ ИОНОВ Ca^{2+} В ПРОБИРОЧНЫХ РАСТЕНИЯХ
КАРТОФЕЛЯ САНТА**

А. М. Манадилова, А. Ж. Амиркулова

Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина ЦБИ КН МОН РК, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: Ca^{2+} -АТФаза, ионы Ca^{2+} , гербициды, фунгициды, активность фермента.

Аннотация. Проведен сравнительный анализ гидролитической активности Ca^{2+} -АТФазы (КФ 3.6.1.3) пробирочных растений картофеля Санта в норме и при опрыскивании гербицидами (Гранстар, Глифосат) и фунгицидами (Фундазол, Тилт). Изучено изменение активности фермента в растениях картофеля при серии разведения пестицидов (от 6 до 90%). Установлено значительное повышение активности Ca^{2+} -АТФазы, и накопление цитоплазматического кальция уже через час после обработки пестицидами. Обработка растений картофеля пестицидами приводит к усилению процесса поступления ионов Ca^{2+} через плазмалемму в апопласт, что приводит к активации фермента и усилению защитных механизмов. Предполагается, что одним из первичных звеньев в механизме действия пестицидов на растительную клетку является активация кальциевых каналов плазмалеммы, которые обладают высокой селективностью к ионам Ca^{2+} .

Ионы Ca^{2+} обладают уникальными свойствами и универсальной способностью в проведении самых различных сигналов, оказывающих на клетку первичное воздействие – гормонов, патогенов, света и стрессовых воздействий. Главными элементами в системе кальциевой сигнализации растительной клетки являются различные типы Ca^{2+} -каналов, Ca^{2+} -АТФазы, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обменники и Ca^{2+} -зависимые белки [1].

Известно, что ионы Ca^{2+} играют регуляторную роль в метаболизме растительных клеток как в норме, так и при воздействии различных стрессовых факторов. Концентрация свободного Ca^{2+} в цитоплазме составляет в состоянии покоя 0,1 мкМ и повышается при стрессе до 10 мкМ. Присутствие Ca^{2+} важно для нормального функционирования мембран. Дефицит кальция приводит к увеличению проницаемости мембран, нарушению их целостности, а соответственно, процессов мембранных транспорта. Стабилизация концентрации кальция в цитоплазме происходит благодаря Ca^{2+} -транспортирующим системам, которые участвуют в перемещении избытка ионов в клеточные органеллы и клеточные стенки. Ведущую роль в этом процессе играют Ca^{2+} -транспортирующие аденоинтрифосфатазы (Ca^{2+} -АТФазы), связанные с плазмалеммой, тонопластом и эндоплазматическим ретикулумом [2].

Пестициды – химические вещества для защиты сельскохозяйственной продукции. В основе токсического действия веществ лежит повреждение клеток, сопровождающиеся их функциональными, либо структурно-функциональными изменениями. Разнообразие формирующихся при этом эффектов со стороны объекта, обусловлено сложностью организации клеток. К числу важнейших можно отнести нарушение гомеостаза внутриклеточного кальция и изменение активности Ca^{2+} -АТФазы.

Целью работы является изучение влияния гербицидов (Глифосат, Гранстар) и фунгицидов (Тилт, Фундазол) на активность Ca^{2+} -АТФазы, и концентрацию ионов кальция в пробирочных растениях картофеля (*Solanum tuberosum L.*) сорта Санта.

Материалы и методы

Объектами исследования служили 20-и дневные пробирочные растения картофеля сорта Санта. Растения выращивали при комнатной температуре на среде Мурасиге - Скуга, высота побегов 8-10 см, длина корней 1 – 2 см.

Условия проведения опыта: растения картофеля обрабатывали пестицидами путем опрыскивания разными концентрациями, время инкубации - 30 мин., 1 час, 3,5 часа. В качестве контроля использовали растения картофеля, обработанные водой.

Концентрация гербицида Гранстар: Контроль - вода; 1 – 0,03 мг (норма); 2 - 0,09 мг (в 3 раза выше нормы); 3 - 0,15 мг (в 5 раз выше нормы);

Концентрация гербицида Глифосат: Контроль, вода; 1 - 4 мл/м² (норма); 2 - 20 мл/м² (в 3 раза выше нормы); 3 – 40 мл/м² (в 5 раз выше нормы);

Концентрация фунгицида Фундазол: Контроль, вода; 1 – 2г/кг (норма); 2 - 6г/кг (в 3 раза выше нормы); 3 - 10г/кг (в 5 раз выше нормы);

Концентрация фунгицида Тилт: Контроль, вода; 1 - 0,03 мг (норма); 2 - 0,09 мг (в 3 раза выше нормы); 3 – 0,15 мг (в 5 раз выше нормы);

Глифосат (*N*-(фосфонометил) - глицин, $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$) – неселективный системный гербицид, использующийся для борьбы с сорняками, особенно многолетними. Глифосат является N-фосфонометильным производным аминокислоты глицина. Токсическое действие глифосата обусловлено тем, что этот гербицид ингибирует фермент растений 5-еноилпиривил-шикимат-3-фосфат-синтазу. Глифосат оккупирует в активном центре фермента место фосфоенолпирувата и блокирует его активность. Поэтому при попадании глифосата на растение он проникает в клетки, блокирует синтез ряда необходимых соединений, и растение погибает [3].

Гранстар – системный гербицид, сульфонилмочевинный, избирательного действия, послевсходовый. Препарат применяется в малых дозах и высоко эффективен при борьбе с широколиственными сорняками в посевах зерновых культур. Воздействует на ферменты, характерные только для растений (подавляет деление клеток), первые симптомы, в том числе хлороз, некроз, появляются через несколько дней после обработки, а через 1–2 недели сорняки погибают [4].

Тилт применяется на зерновых колосовых в борьбе с самыми вредоносными заболеваниями листьев, стебля и колоса. Тилт имеет наиболее широкий спектр фунгицидной активности, обеспечивает длительный защитный эффект при профилактическом опрыскивании на протяжении 3-4 недель. Действующее вещество - пропиконазол относится к группе триазолов, проявляет системную активность. Препарат поступает в растения через листья и стебли и перемещается

акропетально. Он обладает продолжительным защитным, лечащим и истребительным действием на возбудителей болезни, прекращает их дальнейшее развитие и подавляет у них спорообразование [5].

Фундазол – многофункциональный системный фунгицид, обладает системными свойствами, эффективно подавляет многие грибные заболевания. Действующий компонент беномил, проникая в растение, частично преобразуется в карбендазим. Взаимодействие беномила и карбендазима останавливает процесс деления клеток патогенов. Поглощение препарата происходит через листья и корни культуры, с перемещением вверх [6].

Гидролитическую активность Ca^{2+} -АТФазы картофеля анализировали через 30 мин, час и 3,5 часа инкубации при 37°C в инкубационной среде следующего состава (50мм трис-НСl буфера (рН 7,5), 0,5 мМ АТФ и 2,25 мМ CaCl_2). Реакцию останавливали добавлением 0,5мл 30% ТХУ [7].

Активность фермента оценивали спектрофотометрически при 720 нм по количеству неорганического фосфата ($\text{P}_{\text{и}}$), накапливающегося в ходе гидролиза АТФ, и выражали в мкмоль $\text{P}_{\text{и}}$ /(мг белка в час).

Содержание общего белка определяли микробиуретовым методом [8]. Измерение концентрации Ca^{2+} в растительном материале проводили по методу [9].

В работе представлены средние арифметические значения и ошибки среднего, полученные в результате экспериментов, проведенных в 3-5 биологических повторностей.

Результаты и их обсуждение

По своему действию на активность Ca^{2+} -АТФазы картофеля гербициды и фунгициды отличаются уровнем активности фермента – уровень активности гербицидов значительно выше пестицидов (рисунок 1). После обработки растений гербицидом гранстар, через 30 минут происходит незначительное повышение активности фермента даже при концентрации в пять раз выше нормы; через час – активность фермента увеличивается при 2 и 3-ем разведении. Через 3,5 часа инкубации (при концентрации в 3 и 5 раз выше нормы) наблюдается значительное повышение активности Ca^{2+} -АТФазы - в 2 раза по сравнению с контролем.

После обработки растений глифосатом, через 30 минут наблюдается незначительное повышение активности; через час и 3,5 часа происходит резкое увеличение активности (в 2 раза) при 2 и 3 разведениях. По своему влиянию на активность фермента, гранстар и глифосат почти идентичны.

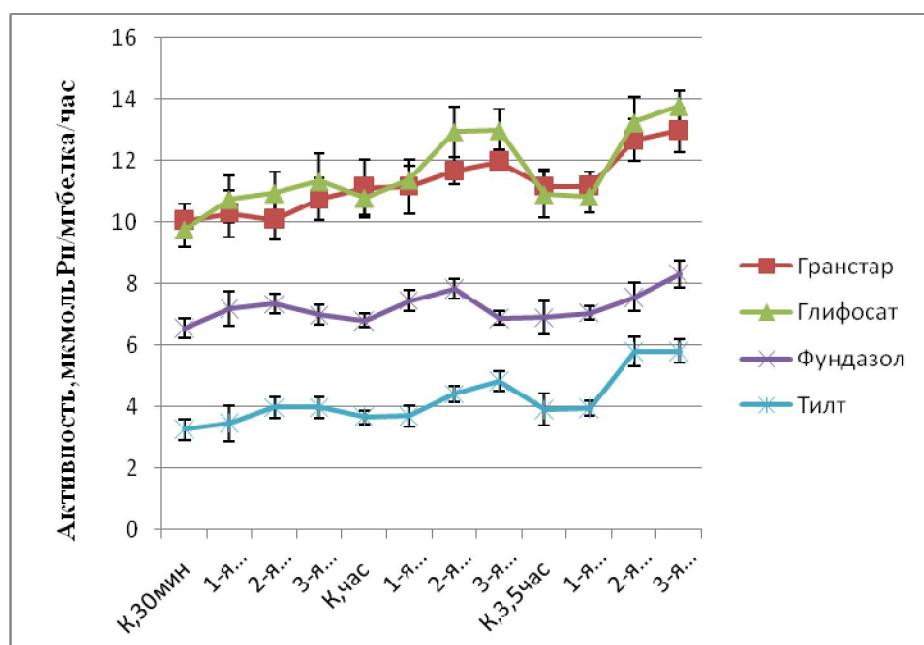


Рисунок 1 – Влияние пестицидов на активность Ca^{2+} -АТФазы пробирочных растений картофеля Санта

Под действием фундазола появляется небольшой подъем активности через 30 минут после обработки; через час - активность фермента увеличивается при 2-м разведении, и через 3,5 часа отмечается подъем активности, достигающий максимума при 3-й концентрации гербицида.

При опрыскивании растений тилтом, обнаружено небольшое повышение активности Ca^{2+} -АТФазы через полчаса и час (при всех разведениях); и существенное усиление активности - через 3,5 часа при разведении в 3-5 раз выше нормы.

На основании полученных данных видно значительное повышение активности исследуемого фермента уже через час после обработки гербицидами, и через 3,5 часа после опрыскивания фунгицидами. При высоких концентрациях (в 5 раз выше нормы) используемых пестицидов наблюдается значительное повышение активности фермента. В связи с этим, был поставлен опыт по влиянию увеличивающихся концентраций пестицидов на изменение активности Ca^{2+} -АТФазы проростков картофеля.

Пробирочные растения картофеля обрабатывали пестицидами, путем опрыскивания растений разными концентрациями 6% (норма), 12%, 24%, 40%, 50%, 60%, 90%. Растения анализировали через 3,5 часа после опрыскивания (рисунок 2).

В результате обработки растений картофеля серией пестицидов наблюдается постепенное повышение активности фермента, достигающая максимума для глифосата при 60%, для гранстара – 50%, для фундазола – 60%, для тилта – 90% (Рис.2). Максимальная концентрация гербицидов, при

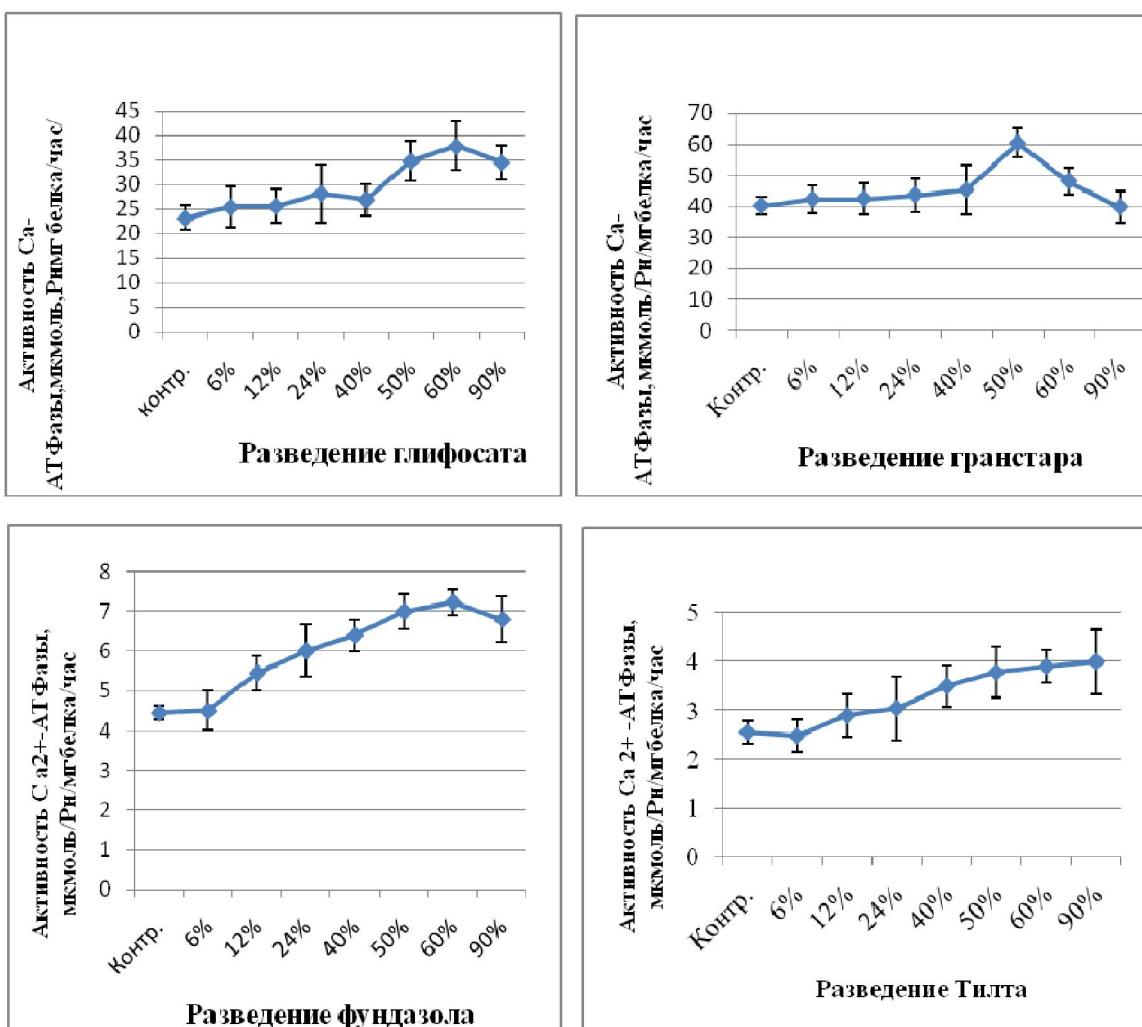


Рисунок 2 – Влияние серии концентраций пестицидов на активность Ca^{2+} -АТФазы пробирочных растений картофеля Санта

которой не наблюдается видимых изменений в активности фермента по сравнению с контролем – 40% раствор. Для фунгицидов уже при 12%-й концентрации раствора, отмечается увеличение активности фермента. Таким образом, повышение концентрации глифосата, гранстара и фундазола до 60% приводит к активированию фермента; и только 90% концентрация снижает активность Ca^{2+} -АТФазы и происходит нарушение метаболических процессов в клетке.

Из литературных данных известно [10], что под действием стресса увеличивается концентрация Ca^{2+} в клетке, что ведет к увеличению активности Ca^{2+} -АТФазы. В основе токсического действия веществ лежит повреждение клеток, сопровождающиеся их функциональными, либо структурно-функциональными изменениями. Разнообразие формирующихся при этом эффектов со стороны объекта, обусловлено сложностью организации клеток. К числу важнейших можно отнести нарушение гомеостаза внутриклеточного Ca^{2+} и изменение активности Ca^{2+} -АТФазы.

На рисунке 3 показаны изменения в содержании ионов Ca^{2+} после обработки растений картофеля пестицидами.

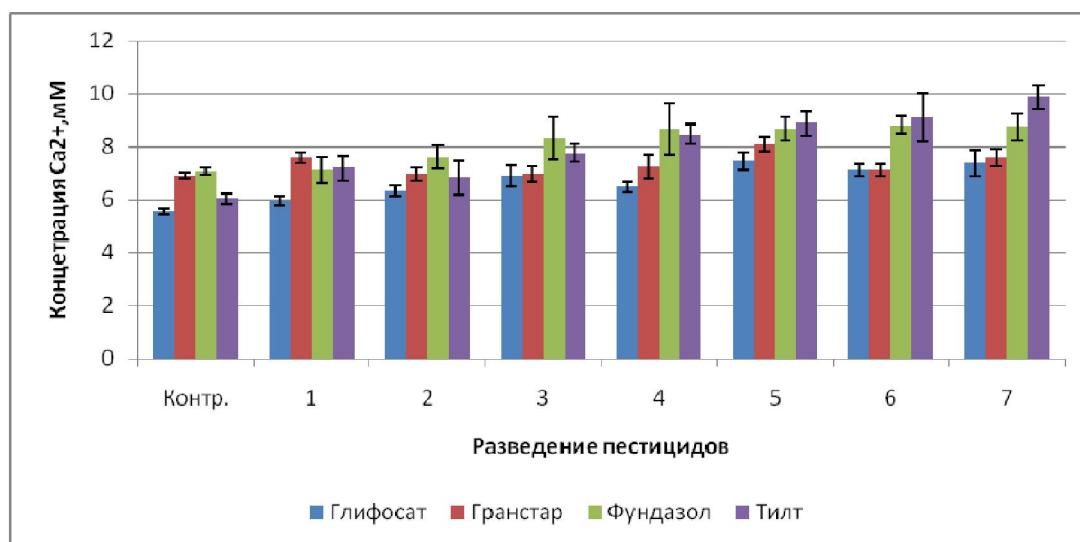


Рисунок 3 – Влияние пестицидов на концентрацию Ca^{2+} в пробирочных растениях картофеля Санта.
Контроль, 1 - 6%, 2 - 12%, 3 - 24%, 4 - 40%, 5 - 50%, 6 - 60%, 7 - 90%-й раствор пестицидов

Из полученных данных видно, что увеличение концентрации гербицидов индуцирует волнобразное изменение концентрации ионов кальция: уровень Ca^{2+} повышается при 24%, 50% и 90% растворе глифосата, и при 6%, 50% и 90% растворе гранстара.

Обработка растений фунгицидами индуцирует линейное увеличение концентрации кальция, достигая максимума при 90% - й концентрации.

Таким образом, в ходе выполнения работы установлено, что обработка проростков картофеля гербицидами и пестицидами индуцирует накопление цитоплазматического кальция в клетке и повышению активности транспортной Ca^{2+} -АТФазы.

Ионы кальция являются важнейшим и наиболее универсальным вторичным посредником в растительной клетке. Повышение уровня цитоплазматической активности Ca^{2+} (кальциевый сигнал) участвует в распознавании стрессовых воздействий (пестицидов). Процесс проведения кальциевого сигнала в клетке состоит из двух этапов. На первом этапе наблюдается временное, как правило, локальное повышение концентрации кальция в цитоплазме за счет поступления его по Ca^{2+} -каналам. Второй этап связан с "тушением сигнала" путем активного выкачивания избытка кальция из цитоплазмы во внеклеточное пространство или в органеллы (вакуоль, эндоплазматический ретикулум, митохондрии) Ca^{2+} -АТФазами [11].

Анализ полученных нами и литературных данных позволяет предполагать, что обработка растений картофеля пестицидами приводит к усилинию процесса поступления ионов Ca^{2+} через плазмалемму в апопласт или перемещении кальция из цитозоля во внутриклеточное депо, что приводит к активации Ca^{2+} -АТФазы и усилию защитных механизмов.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система растений // Физиология растений. – 2005. – № 2(52). – С. 282-305.
- [2] Hetherington, A.M. The generation of Ca^{2+} signals in plants / A.M. Hetherington, C. Brownlee // Annu. Rev. Plant viol. – 2004. – Vol. 55. – P. 401-427.
- [3] Rueppel M.L., Brightwell B.B., Schaefer J. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1977. – Vol. 25. – P. 517 -528.
- [4] Гарькова А.Н., Русяева М.М., Нуштаева О.В., Аросланкина Ю.Н., Лукаткин А.С. Обработка гербицидом Гранстар вызывает окислительный стресс в листьях злаков // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, № 6. – С. 935-943.
- [5] Спиридонов Ю.Я., Жемчужин С.Г. Современные проблемы изучения гербицидов (2006–2008 гг.) // Агрехимия. – 2010. – Vol. 27. – P. 429-438.
- [6] Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 465-474.
- [7] Лукаткин А.С., Еремкина Т.Н. Активность Ca^{2+} - АТФазы в листьях растений кукурузы под влиянием охлаждения и в последействии // Сельскохозяйственная биология. – 2002. – № 3. – С. 73-76.
- [8] Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М., 1971. – 309 с.
- [9] Ладыженская Э.П., Кораблева Н.П. Действие жасмоновой кислоты на транспорт Ca^{2+} через мембрану везикул плазмалеммы из клеток клубней картофеля // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44, № 6. – С. 708-713.
- [10] Kiaune L., Singhaseemanon Nan., Pesticidal Copper (I) Oxide: Environmental Fate and Aquatic Toxicity // Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 1Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 213, Springer Science+Business Media, LLC, 2011. – P. 22.
- [11] Tiemann Ute., Kuchenmeister U. Influence of organochloride pesticides on ATPase activities of microsomal fractions of bovine oviductal and endometrial Cells, Toxicology Letters. – 1999. – Vol. 104, Issues 1-2. – P. 75-81.

REFERENCES

- [1] Medvedev S.S. Kal'cievaja signal'naja sistema rastenij. Fiziologija rastenij. 2005. N 2(52). S. 282-305.
- [2] Hetherington, A.M. The generation of Ca^{2+} signals in plants. A.M. Hetherington,C. Brownlee. Annu. Rev. Plant viol. 2004. Vol. 55. P. 401-427.
- [3] Rueppel M.L., Brightwell B.B., Schaefer J. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1977. Vol. 25. P. 517 -528.
- [4] Gar'kova A.N., Rusjaeva M.M., Nushtaeva O.V., Aroslankina Ju.N., Lukatkin A.S. Obrabotka gerbicidom Granstar vyzyvaet okislitel'nyj stress v list'jah zlakov. Fiziologija rastenij. 2011. T. 58, N 6. S. 935-943.
- [5] Spiridonov Ju.Ja., Zhemchuzhin S.G. Sovremennye problemy izuchenija herbicidov (2006–2008 gg.). Agrohimija. 2010. Vol. 27. P. 429-438.
- [6] Baranenko V. V. Superoksiddismutaza v kletkah rastenij. Citologija. 2006. T. 48, N 6. S. 465-474.
- [7] Lukatkin A.S., Eremkina T.N. Aktivnost' Sa^{2+} - ATFazy v list'jah rastenij kukuruzy pod vlijaniem ohlazhdelenija i v posledejstvii. Sel'skohozjajstvennaja biologija. 2002. N 3. S. 73-76.
- [8] Kochetov G.A. Prakticheskoe rukovodstvo po jenzimologii. M., 1971. 309 s.
- [9] Ladyzhenskaja Je.P., Korableva N.P. Dejstvie zhasmonovoj kisloty na transport Sa^{2+} cherez membranu vezikul plazmalemmy iz kletok klubnej kartofelia. Prikladnaja biohimija i mikrobiologija. 2008. T. 44, N 6. –S. 708-713.
- [10] Kiaune L., Singhaseemanon Nan., Pesticidal Copper (I) Oxide: Environmental Fate and Aquatic Toxicity. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 1Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 213, Springer Science+Business Media, LLC, 2011. –P. 22.
- [11] Tiemann Ute., Kuchenmeister U. Influence of organochloride pesticides on ATPase activities of microsomal fractions of bovine oviductal and endometrial Cells, Toxicology Letters. 1999. Vol. 104, Issues 1-2. P. 75-81.

ПЕСТИЦИДТЕРДІҢ САНТА КАРТОП ПРОБИРКАЛЫҚ ӨСІМДІКТЕРІНДЕГІ Ca^{2+} - АТФАЗА БЕЛСЕНДІЛІГІНЕ ЖӘНЕ Ca^{2+} ИОНДАРЫНЫҢ ДЕНГЕЙІНЕ ӘСЕРІ

А. М. Манадилова, А. Ж. Амиркулова

КРБжFM «М. А. Айтхожин атындағы молекулярлы биология және биохимия институты»,
Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: Ca^{2+} - АТФаза, Ca^{2+} иондары, гербицидтер, фунгицидтер, фермент белсенділігі.

Аннотация. Санта картоп пробиркалық өсімдіктерінде Ca^{2+} - АТФаза (КФ 3.6.1.3) гидролитикалық белсенділігіне калыпты және гербицидтерді (Гранстар, Глифосат) және фунгицидтерді (Фундазол, Тилт) шашу кезіне салыстырмалы анализ жүргізілді. Картоп өсімдігіндегі пестицидтермен (әр түрлі үлкен концентрацияларды алғанда) ферменттердің белсенділігінің өзгерісі зерттелген. Гербицидтермен өндегенмен кейін, бір сағат өткендеге, цитоплазмалық кальцийдің жинақталуы және зерттеліп жатқан ферменттің белсенділігінің айтарлықтай жоғарылауы байқалған. Пестицидтердің өсімдік жасушасына әсер ету механизмінде біріншілік белімі ретінде плазмалемманың кальцийлі каналының жылдамдауы болып табылады. Олар Ca^{2+} иондарына жоғары таңдамалық қасиетіне ие.

Поступила 10.11.2014 г.