

ПРОБЛЕМА РЕЗИСТЕНТНОСТІ РОСЛИН ДО ГЕРБІЦИДІВ: ГЕНЕТИЧНИЙ ТА МЕТАБОЛІЧНИЙ АСПЕКТИ

Однією з передумов реалізації генетичного потенціалу продуктивності сільськогосподарських культур є ефективний захист посівів від бур'янів. Найбільш ефективним та економічно рентабельним на сьогодні є хімічний метод контролювання бур'янів, який передбачає використання селективних гербіцидів.

З моменту відкриття явища вибіркової фітотоксичності вважалося, що стійкість чи чутливість рослин до того або іншого гербіциду є видовою ознакою. Однак у деяких регіонах на площах, де тривалий час застосовувались одні й ті ж гербіциди, в популяціях чутливих до даних препаратів видів бур'янів було виявлено високостійкі біотики. У зв'язку з цим виникла необхідність відрізняти різні види стійкості рослин до гербіцидів, для чого американським товариством гербологів було запропоновано вживати терміни «толерантність» та «резистентність» [1]. Толерантність — це природжена здатність видів рослин до виживання і відтворення після обробки гербіцидом. Це означає, що селекція або генетичні маніпуляції не використовувались для надання толерантності рослинам, вони є такими від природи. Толерантність є основою традиційних технологій застосування гербіцидів. Резистентність — успадкована здатність рослин виживати і відтворюватися після впливу гербіциду в дозі, зазвичай летальній для дикого типу. У рослин резистентність може бути природною або індукованою з використанням, наприклад, таких методів, як генна інженерія або селекція.

Останнім часом проблема резистентності до гербіцидів набуває глобального масштабу. На сьогодні серед 245 видів бур'янів виявлено 449 резистентних до гербіцидів біотипів [2]. Чинником природного виникнення резистентності є селекційний тиск гербіцидів на популяції бур'янів. Не знайшло підтвердження припущення, що виникнення резистентності зумовлено мутаціями, індукованими впливом гербіцидів. Навпаки, було встановлено, що у популяціях бур'янів, які не оброблялися гербіцидами, зустрічаються рослини з мутантними генами, які зумовлюють

стійкість до гербіцидів. Зокрема, геномний аналіз гербарних зразків китника мишохвостого, які збиралися у період між 1788 і 1975 рр., виявив один гетерозиготний мутантний зразок, датований 1888 роком, з мутацією лейцину у кодоні 1781 [3]. На сьогодні ця мутація зустрічається у біотипів бур'янів, резистентних до гербіцидів інгібіторів ацетил-КоА-карбоксилази. Зрозуміло, що на момент збирання такого зразка гербіциди не використовувались, отже ця мутація є спонтанною. Таким чином, наявність спонтанних мутацій при тривалому застосуванні гербіцидів призводить до відбору особин, стійких до їх дії. За умов перманентного застосування гербіцидів з одним механізмом фітотоксичності особини, що вижили, мають значну перевагу і можуть стати домінуючими в популяції та витіснити вихідний тип. При цьому чисельність резистентних рослин може зрости аж до рівня, коли їх уже неможливо контролювати даним гербіцидом [4].

Уперше появу біотипів рослин, резистентних до гербіцидів, було помічено у 70-і роки минулого століття в розплідниках хвойних, де упродовж багатьох років для знищення бур'янів використовували гербіцид із групи сим-триазинів симазин [5]. Дослідження показали, що резистентний біотип жовтозілля звичайного має стійкість не лише до симазину, але й до атразину та інших сим-триазинів. Було встановлено, що стійкість зумовлена мутацією хлоропластного гена, що кодує білок, з яким відбувається зв'язування сим-триазинів. Відтоді серед 72 видів бур'янів (як однодольних, так і дводольних) було виявлено біотики, резистентні до сим-триазинів, стійкість яких виникла в результаті аналогічної мутації того ж гена [2].

У рослин розрізняють резистентність до гербіцидів, що пов'язана або ж не пов'язана з сайтом дії. Якщо сайтом дії гербіциду є певний фермент, то пов'язана з сайтом дії резистентність може бути зумовлена мутацією гена, який кодує цей фермент. Внаслідок такої мутації може лімітуватися зв'язування гербіциду з ферментом, що зменшує інгібувальну дію гербіциду. Альтерна-

тивним механізмом резистентності може бути надпродукування цього ферменту (надекспресія чи ампліфікація гена). Резистентність, не пов'язана з сайтом дії, зумовлена активацією систем, які перешкоджають потраплянню гербіциду до цього сайту. Відбуватися це може завдяки зменшенню поглинання чи транслокації гербіциду, збільшенню його секвестрування (компартименталізації) або підвищенню рівня метаболічної детоксикації гербіциду [6].

За застосування ефективних доз гербіцидів, які забезпечують високий рівень контролювання бур'янів, більш вірогідним є виникнення резистентності, що пов'язана з сайтом дії. При внесенні гербіцидів у низьких дозах чи за дії інших чинників (несвоєчасного внесення гербіцидів, несприятливих погодних умов тощо) їх ефективність стає меншою, рослини виживають головним чином через їх здатність метаболізувати гербіцид (розкласти гербіцид або знешкодувати його дію). З часом кількість особин рослин із генами, що кодують ферменти, які забезпечують метаболізацію гербіциду, може збільшитись, особливо завдяки перехресному запиленню. Внаслідок цього рівень резистентності популяції до гербіциду може підвищитися в рамках навіть невеликої кількості наступних поколінь.

Метаболічна резистентність може бути притаманна рослинам через збільшену активність ендогенних цитохром Р450-монооксигеназ, глікозилтрансфераз, глутатіон-S-трансфераз та/або інших ферментних систем, таких як ациламідаза [7].

Більшість досліджень метаболічної резистентності було проведено на злакових рослинах [6], однак останнім часом з'являються дані про деякі види дводольних бур'янів, зокрема щиріці (*Amaranthus tuberculatus* (Moq.) Sauer), резистентні до мезотріону й атразину [8]. Це свідчить про здатність до прискореної трансформації гербіцидів не лише в однодольних, як вважали раніше, але й у дводольних видів бур'янів і можливість розвитку у них метаболічної резистентності до гербіцидів.

На сьогодні в аграрному секторі багатьох країн широко застосовуються гербіциди — інгібітори ферменту ацетолактатсинтази (АЛС), який бере участь у синтезі амінокислот з розгалуженим ланцюгом: валіну, лейцину, ізолейцину. Гербіциди інгібітори АЛС є найбільш ефективними з відомих на сьогодні груп гербіцидів. При

нормах внесення від одиниць до десятків грамів діючої речовини на гектар гербіциди цієї групи контролюють широкий спектр видів бур'янів та є селективними до значної кількості культур. Однак уже через 4 роки після початку застосування гербіцидів цієї групи було виявлено біотиби латука компасного і кохії віничної, резистентні до цих гербіцидів. На сьогодні відомо 153 види бур'янів, що мають резистентні до інгібіторів АЛС біотиби, ареал розповсюдження яких постійно зростає [2]. В основі резистентності головним чином знаходиться мутація гена, що кодує АЛС, яка призводить до заміни проліну-197 на гістидин чи триптофан [9]. Пізніше було показано 22 пов'язані з резистентністю заміни амінокислот у 8 сайтах АЛС [10, 11], однак заміна проліну-197 на інші амінокислоти (на сьогодні показано, що їх може бути 11) зустрічається найчастіше. В той же час заміщення проліну-197 на серин потребує лише однієї нуклеотидної мутації, тоді як для заміни його на інші амінокислоти (зокрема, ізолейцин, метіонін, лізин, триптофан) необхідні дві нуклеотидні зміни, що загалом відбувається більш повільно [12]. Оскільки заміщення амінокислот може відбуватися в багатьох сайтах ферменту, це призводить до збільшення резистентності до різних класів речовин усередині групи інгібіторів АЛС. Молекулярно-структурні дослідження показали, що сайти зв'язування з гербіцидами і каталітичний просторово розділені і деякі мутації чинять незначний ефект на функціонування ферменту. Саме тому, мабуть, може спостерігатися так багато мутацій генів, які зумовлюють резистентність до цих гербіцидів. Крім того, поширення стійких до гербіцидів інгібіторів АЛС біотипів бур'янів не обмежується лише мутаціями гена, що кодує цей фермент, а може бути зумовлене і резистентністю, що не пов'язана з сайтом дії, яка ґрунтується на прискореній метаболічній детоксикації ксенобіотиків.

Поряд з гербіцидами інгібіторами АЛС широкого розповсюдження набули препарати, фітотоксична дія яких пов'язана з інгібуванням активності ацетил-КоА-карбоксилази (АКК), ключового ферменту біосинтезу жирних кислот. Гербіциди інгібітори АКК діють виключно на бур'яни із родини злакових, тому їх об'єднують у групу під назвою грамініциди. Вибірність дії грамініцидів на злаки детермінована не відмінностями у швидкості детоксикації цих гербіцидів злаковими та іншими родинами рослин,

а особливостями сайту дії [13]. Злакові рослини містять у пластидах еукаріотичну форму АКК, яка є чутливою до грамініцидів, у той час як у інших видів рослин у пластидах знаходиться стійка прокаріотична форма цього ферменту. Завдяки виключно високій селективності грамініциди широко застосовуються у посівах дводольних культур для контролювання одно- і багаторічних злакових бур'янів. Деякі препарати цієї групи мають достатній рівень селективності, зумовлений швидкою детоксикацією діючих речовин цих гербіцидів, також і щодо пшениці та ячменю і можуть застосовуватись у посівах цих культур. На сьогодні резистентність до грамініцидів було виявлено у 46 видів бур'янів [2], ареал поширення яких є досить значним у різних частинах світу. У більшості видів відсутність чутливості до грамініцидів зумовлена мутаціями гена, який кодує АКК. Виявлено 8 таких мутацій, серед яких найчастіше зустрічається заміна лейцину на ізолейцин у кодоні 1781 карбоксилтрансферазного домену пластидної АКК [12]. Різні мутації гена АКК призводять до різних проявів резистентності. При цьому рівень резистентності до грамініцидів визначається як типом мутації, так і гербіцидом та його дозою, використаною для оцінки чутливості [13, 14]. Наприклад, вищезгадана заміна лейцину на ізолейцин у залишку 1781 сприяє високому рівню резистентності до багатьох грамініцидів похідних арилоксифеноксипропіонової кислоти, але в той же час спостерігається дуже низький ступінь резистентності до гербіциду клетодиму, який є похідним циклогександіону.

Слід зазначити, що поряд із пов'язаною з АКК резистентністю може спостерігатись і резистентність, що не пов'язана з сайтом дії. Так, у більшості резистентних рослин популяцій китника мишохвостого (*Alopecurus myosuroides* Huds.) у Франції не спостерігалася жодна з відомих мутацій АКК [15]. Понад 75% рослин цього виду, резистентних до гербіцидів інгібіторів АКК, можуть набути цю властивість через збільшений рівень метаболізації гербіцидів. Аналогічний тип резистентності до інгібіторів АКК було виявлено у пажитниці жорсткої (*Lolium rigidum* Gaud.) та вівсюга (*Avena* spp.), що зростають в Австралії [16, 17].

Культурні рослини з пов'язаною з сайтом дії резистентністю до гербіцидів можуть бути отримані шляхом клітинної селекції, мутагенезу, відбору і розмноження рослин з природною стійкістю, а також з використанням методів гене-

тичної інженерії [18, 19]. Так, наприклад, соняшник, резистентний до гербіцидів похідних імідазолінону, які є інгібіторами АЛС, було отримано шляхом селекції з використанням резистентного дикорослого соняшнику [19]. Резистентність до тріазинів у ріпаку розвилася завдяки схрещуванню з його диким родичем суріпкою, яка є стійкою до цих гербіцидів [20].

Трансгенні культури з резистентністю до неселективних гербіцидів гліфосату і глюфосинату були створені генно-інженерними методами шляхом перенесення одного або декількох генів з інших організмів, що дозволило культурним рослинам набути стійкість до цих гербіцидів. Більшість резистентних до гліфосату культур були отримані шляхом інсерції бактеріального гена, що кодує 5-енолпірувілшикимат-3-фосфатсинтазу, нечутливу до гліфосату внаслідок конформаційних змін, зумовлених порушеннями амінокислотної послідовності в ділянці зв'язування з гербіцидом [21, 22]. Нині спостерігається широкомасштабне вирощування трансгенних культур, стійких до гліфосату і глюфосинату, площі під цими культурами у світі оцінюються приблизно в 70 млн га [23]. В той же час, паралельно зі стрімким ростом площ під трансгенними культурами, до яких головним чином належать кукурудза, соя, бавовник і ріпак, спостерігається така ж стрімка поява нових резистентних біотипів бур'янів. На сьогодні такі біотики знайдено у 32 видів бур'янів, значна частина яких має крос-резистентність. Фітотоксична дія гліфосату зумовлена інгібуванням активності ферменту 5-енолпірувілшикимат-3-фосфатсинтази, який бере участь у синтезі ароматичних кислот, зокрема триптофану. Відомо два механізми резистентності: перший пов'язаний з мутацією гена, що кодує сайт дії гліфосату; другий детермінований появою у рослин здатності блокувати переміщення гербіциду з листків у меристематичні тканини. Вважають, що зумовлена обмеженою транслокацією резистентність до гліфосату є навіть більш поширеною, ніж цільова, що пов'язана з мутацією гена, який кодує 5-енолпірувілшикимат-3-фосфатсинтазу [12]. При цьому у деяких популяцій пажитниці (*Lolium*) резистентність до гліфосату забезпечується відразу двома вищезгаданими механізмами [24, 25]. Механізм, який дозволяє обмежити переміщення гліфосату всередині рослини, поки що невідомий. Є припущення та перші докази того, що у ньому може

бути задіяний мембранний переносник, який по-мпеє гліфосат до вакуолі [12, 26]. Більша порівняно з іншими гербіцидами швидкість прояву резистентності до гліфосату зумовлена тим, що при вирощуванні трансгенних культур застосовуються нульові технології (no-till), тобто практично виключаються агротехнічні прийоми контролювання бур'янів, у зв'язку з чим різко зростає жорсткість і направленість відбору.

Подальше розповсюдження резистентних до гербіцидів біотипів бур'янів може призвести до значного зменшення ефективності захисту посівів. Особливо небезпечним є поширення біотипів, стійких до різних гербіцидів. При цьому така стійкість може бути зумовлена одним (кросрезистентність) або кількома механізмами резистентності (мультирезистентність). Єдиним на сьогодні засобом попередження та подолання явища резистентності є ротація у сівозміні гербіцидів з різними механізмами фітотоксичності, а також застосування гербіцидних комплексів та сумішей для захисту окремих культур. Реальні можливості ротації та комплексування лімітовані

обмеженістю існуючого асортименту гербіцидних препаратів. Оновлення цього асортименту останнім часом практично припинилося внаслідок високої витратності традиційного методу пошуку нових гербіцидів шляхом емпіричного скринінгу. У зв'язку з цим актуальним є впровадження новітніх молекулярно-біологічних методів пошуку гербіцидів, реалізація яких вимагає поглиблення уявлень щодо механізмів індукованого гербіцидами патогенезу.

Висновки

Проблема резистентності рослин до гербіцидів є відображенням їх адаптації до хімічних препаратів і процесів, спричинених селекційним тиском від застосування гербіцидів. Зміни відбуваються на фізіологічному і молекулярному рівнях та імітують біологічні процеси рослин, толерантних до даних гербіцидів. Необхідне подальше дослідження процесів, які відбуваються на молекулярно-генетичному та метаболічному рівнях і беруть участь у формуванні резистентності рослин до гербіцидів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Vencill W.K., Nichols R.L., Webster T.M., Soteris J.K., Mallory-Smith C., Burgos N.R., Johnson W.G., McClelland M.R. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops // *Weed Science*. — 2012. — 60 (sp. 1). — P. 2–30.
2. Heap I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.weedscience.com>. Accessed: March 25, 2015.
3. Délye C., Deulvot C., Chauvel B. DNA analysis of herbarium specimens of the grass weed *Alopecurus myosuroides* reveals herbicide resistance pre-dated herbicides // *PLoS ONE*. — 2013. — 8 (10): e75117. Doi:10.1371/journal.pone.0075117 Resource Number (2013).
4. О резистентности сорняков: [Если появились признаки резистентности сорняков к гербицидам] // *Агро XXI*. — 1997. — № 3. — С. 6–7.
5. Timmons F.L. A history of weed control in the United States and Canada // *Weed Sci*. — 1970. — 18. — P. 294–307.
6. Yu Q., Powles S. Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production // *Plant Physiol*. — 2014. — 166, N 3. — P. 1106–1118.
7. Carey V.F., Hoagland R.E., Talbert R.E. Resistance mechanism of propanil-resistant barnyardgrass: II. *In-vivo* metabolism of the propanil molecule // *Pestic. Sci*. — 1997. — 49. — P. 333–338.
8. Ma R., Kaundun S.S., Tranel P.J., Riggins C.W., McGinness D.L., Hager A.G., Hawkes T., McIndoe E., Riechers D.E. Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp // *Plant Physiol*. — 2013. — 163. — P. 363–377.
9. Guttieri M.J., Eberlein C.V., Mallory-Smith C.A., Thill D.C., Hoffman D.L. DNA sequence variation in Domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and -susceptible weed biotypes // *Weed Sci*. — 1992. — 40. — P. 670–676.
10. Tranel P.J., Wright T.R., Heap I.M. ALS mutations from herbicide-resistant weeds. — 2009. [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.weedscience.org>.
11. Tranel P.J., Wright T.R. Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? // *Weed Sci*. — 2002. — 50. — P. 700–712.
12. Powles S.B., Yu Q. Evolution in action: plant resistant to herbicides // *Annu. Rev. Plant Biol*. — 2010. — 61. — P. 317–347.

13. Delye C., Matejcek A., Michel S. Cross-resistance pattern to ACCase-inhibiting herbicide conferred by mutant ACCase isoforms in *Alopecurus myosuroides* Huds. (black-grass) re-examined at the recommended herbicide field rate // *Pest Manag. Sci.* — 2008. — 64. — P. 1179–1186.
14. Neve P., Powles S.B. Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum* // *Theor. Appl. Genet.* — 2005. — 110. — P. 1154–1166.
15. Delye C., Menchari Y., Guillemin J.P., Matějček A., Michel S., Camilleri C., Chauvel B. Status of black grass (*Alopecurus myosuroides*) resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in France // *Weed Res.* — 2007. — 47. — P. 95–10.
16. Owen M., Walsh M., Llewellyn R., Powles S.B. Widespread occurrence of multiple herbicide resistance in Western Australian annual ryegrass (*Lolium rigidum*) populations // *Aust. J. Agric. Res.* — 2007. — 58. — P. 711–718.
17. Owen M.J., Powles S.B. Distribution and frequency of herbicide-resistant wild oat (*Avena* spp.) across the Western Australian grain belt // *Crop Pasture Sci.* — 2009. — 60. — P. 25–31.
18. Duke S.O. Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction // *Pest Manag. Sci.* — 2005. — 61. — P. 211–218.
19. Tan S., Bowe S.J. Developing herbicide-tolerant crops from mutations [Електронний ресурс] // *Induced plant mutations in the genomics era* (Q.Y. Shu, ed.). — Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009. — Режим доступу: <http://www.fao.org/docrep/012/i0956e/i0956e10.pdf>.
20. Hall J.C., Vanderloo M.J., Hume D.J. Triazine-resistant crops: the agronomic impact and physiological consequences of chloroplast mutation // *Herbicide-resistant crops: agricultural, environmental, economic, regulator and technical aspects* (S.O. Duke, ed.). — Boca Raton, FL, CRC, 1996. — P. 107–126.
21. Duke S.O., Powles S.B. Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future // *Agbioforum.* — 2009. — 12. — P. 346–357.
22. Powles S.B., Preston C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance // *Weed Technol.* — 2006. — 20. — P. 282–289.
23. Price A.J., Balkcom K.S., Culpepper S.A., Kelton J.A., Nichols R.L., Schomberg H. Glyphosate-resistant Palmer amaranth: a threat to conservation tillage // *J. Soil Water Conserv.* — 2011. — 66. — P. 265–275.
24. Preston C., Wakelin A.M., Dolman F.C., Botamam Y., Boutsalis P. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness and agronomic management // *Weed Sci.* — 2009. — 57. — P. 435–441.
25. Yu Q., Cairns A., Powles S.B. // Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance in a *Lolium rigidum* biotype // *Planta.* — 2007. — 225. — P. 499–513.
26. Ge X., Ackerman J.J.H., Sammons R.D. *In vivo* ³¹P-nuclear magnetic resonance studies of glyphosate uptake, vacuolar sequestration, and tonoplast pump activity in glyphosate-resistant horseweed // *Plant Physiol.* — 2014. — 166, N 3. — P. 1255–1268.

GURALCHUK ZH.Z., MORDERER YE.YU.

Institute of Plant Physiology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: azhanna@ukr.net

PROBLEM OF PLANT RESISTANCE TO HERBICIDES: GENETIC AND METABOLIC ASPECTS

Aims. The plant resistance to herbicides is a big problem of modern agriculture. Thus, knowledge of the mechanisms of resistance to herbicides is very important due to the emergence of a large number of herbicide-resistant weeds. **Results.** Analysis of the literature data shows a significant contribution of gene mutations to the evolution of resistance. Metabolic processes are important too, due to enhanced metabolic capacity to detoxify herbicides. **Conclusions.** Some progress in understanding the mechanisms of plant resistance to herbicides achieved, but further studies of phytopathogenesis of herbicides and processes that occur at the molecular genetic and metabolic levels and are involved in the formation of plant resistance to herbicides are needed.

Keywords: herbicide, resistance, target-site resistance, non-target-site resistance.