

MAŁGORZATA KORBIN<sup>1</sup>, KAZIMIERZ ADAMCZEWSKI<sup>2</sup>, TOMASZ TWARDOWSKI<sup>3</sup>

## Jak zbadać stres herbicydowy u roślin na poziomie molekularnym?

### Wprowadzenie: rolnictwo, rośliny genetycznie zmodyfikowane i herbicydy

Nowoczesne rolnictwo powoduje występowanie wielu stresów systemu biologicznego roślin. W konsekwencji stosowania rutynowych zabiegów agrotechnicznych (herbicydy, insektycydy i nawozy) dochodzi do dużego, lokalnego stężenia aktywnych komponentów, jak również wystąpienia śladowych ilości innych składników, np. metali ciężkich. Wszystkie te komponenty, jako czynniki egzogenne, mogą spowodować wystąpienie warunków stresu abiotycznego dla roślin (Devine i Shukla, 2000).

Kukurydza, będąca obecnie rośliną modelową w wielu badaniach, należy do roślin słabo konkurujących z chwastami. Technologia uprawy w szerokim rozstawie międzyrzędzi, przy dużej odległości między roślinami i początkowym wolnym wzroście, jest powiązana z koniecznością odchwaszczania chemicznego. Do zwalczania chwastów w kukurydzy zarejestrowanych jest obecnie wiele herbicydów, różniących się skutecznością zwalczania roślin niepożądanych gatunków oraz selektywnością w stosunku do rośliny uprawnej. Linie homozygotyczne, stanowiące materiał wyjściowy w hodowli kukurydzy, oraz wyhodowane odmiany heterozyjne różnie reagują na zalecane obecnie substancje aktywne herbicydów. Dla wielu linii kukurydzy, podobnie jak dla zwalczanych chwastów, substancje aktywne herbicydów stanowią bardzo silny czynnik stresogenny, powodujący zmiany fenotypowe i zaburzenia procesów fizjologicznych. Tak działa m.in. glufosynat, czyli fosfotrycyna  $[(HOCH_2)_3CNHCCH_2CO_2]_3P$ , składnik aktywny, występujący w wielu nieselektywnych preparatach chwastobójczych (Basta, Ignite, Challenge, LIBERTY). Glufosynat, hamujący aktywność syntazy glutaminowej i skutkiem tego ograniczający detoksyfikację amoniaku, może być wchłaniany przez części zielone kukurydzy. Herbicyd Roundup, którego składnikiem aktywnym jest glifosat, niszczy rośliny przez inhibicję enzymu EPSPS (*ang. 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase*). Składnikiem aktywnym herbicydu Titus, powszechnie stosowanego w uprawie kukurydzy, jest rimsulfuron. Mechanizm działania tego związku polega na zakłóceniu szlaku biosyntezy

---

<sup>1</sup> Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice, e-mail: malgorzata.korbin@gmail.com

<sup>2</sup> Instytut Ochrony Roślin, Poznań

<sup>3</sup> Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach (walina, leucyna, izoleucyna), poprzez hamowanie działania katalizującego syntetazy acetylohydroksykwasowej (AHAS). Brak w roślinie aminokwasów niezbędnych do syntezy białek (aminokwasy aromatyczne oraz izoleucyna i walina) prowadzi do zahamowania podziału komórek, a w konsekwencji do obumarcia rośliny (Newhouse i in., 1991; Funke i in., 2006; Yu i in., 2007).



Ryc. 1. Efekt działania herbicydu Roundup na roślinę kukurydzy linii S79757 po 8 dniach od zabiegu (po prawej). Po lewej roślina kontrolna, nietraktowana herbicydem

Alternatywnym systemem, redukującym działanie stresu herbicydowego na roślinę uprawną, jest uprawa kukurydzy zmodyfikowanej genetycznie pod kątem odporności na herbicydy. Generalnie, transgeneza otwiera duże i kuszące badaczy perspektywy wprowadzania i wykorzystywania w roślinach genów kontrolujących występowanie cech pożądaných przez producentów, przemysł przetwórczy i konsumentów. Kukurydza to, obok soi, jeden z najważniejszych gatunków uprawnych, w którego produkcji i użytkowaniu (pasze i produkty spożywcze, także przetworzone) odmiany GM odgrywają znaczącą rolę w wielu krajach. Obecnie rośliny transformowane w celu uzyskania cechy odporności na herbicydy stanowią 80% upraw roślin GM, podczas gdy kolejne 12% areалу uprawy zajmują rośliny z wprowadzonym genem odporności na szkodniki (gen Bt z *Bacillus thuringiensis*), a 8% powierzchni zajmują odmiany GM zawierające jednocześnie geny odporności na herbicydy i geny Bt. W 2007 r. rośliny zmodyfikowane genetycznie uprawiane były w 23 krajach na areale 114 mln ha (12 – kraje rozwijające się, 11 – kraje rozwinięte). W 2007 r. do grona producentów roślin GM dołączyły Chile i Polska.

W 2008 r. uprawiano w Polsce ponad 3000 ha kukurydzy transgenicznej, odpornej na szkodnika omacnicę prosowiankę (wg komunikatu Polskiego Związku Hodowców Kukurydzy). Jedną z głównych zalet wymienionych odmian transgenicznych jest możliwość stosowania w ich uprawie nieselektywnych herbicydów typu Roundup i Basta, pozwalających na tańsze i bardziej skuteczne odchwaszczanie.

### **Stres wywołany przez herbicydy**

Pod pojęciem stresu rozumie się stan „napięcia” w organizmie, w którym – wskutek działania niesprzyjających czynników środowiska – następuje upośledzenie lub ograniczenie metabolizmu lub rozwoju. W roślinach funkcjonują różne mechanizmy obronne, zabezpieczające organizm przed działaniem czynników stresowych. Odporność na stres może mieć charakter konstytutywny, czyli polegający na trwałym wyposażeniu rośliny w cechy chroniące przed niekorzystnymi wpływami środowiska. Odporność może być także indukowana przez czynniki, które pojawiają się w roślinie dopiero w odpowiedzi na stres.

Dezaktywację podstawowych herbicydów nieselektywnych można spowodować, stosując system acetylacji fosfotrycyny katalizowanej przez acetylotransferazę (system enzymatyczny bakterii, kodowany m.in. przez gen PAT – dezaktywacja glifosynatu) lub nadprodukcję enzymu EPSPS (dezaktywacja glifosatu). Samoistna dezaktywacja glifosatu i glifosynatu zachodzi po 14 dniach poprzez rozkład do azotanów i tlenku węgla (Oxtoby i in., 1989; Tan i in., 2006; Jin i in., 2007).

Generalnie, obecność egzogenego preparatu herbicydowego jest silnym czynnikiem stresogennym dla rośliny. Znany jest fizjologiczny mechanizm działania herbicydów. Wiadomo także, iż poszczególne linie hodowlane kukurydzy reagują na stres herbicydowy odmiennie. Natomiast nie są w pełni rozpoznane molekularne podstawy odpowiedzi roślin na stres wywołany obecnością herbicydów, w tym wpływ czynników stresowych na transkrypcję i translację. Zrozumienie korelacji w strukturze i funkcji DNA, RNA i białek jest zasadnicze dla stworzenia pełnej interpretacji mechanizmu odpowiedzi rośliny na stres abiotyczny. Zdobyte tej wiedzy przekłada się bezpośrednio na praktykę przez przyspieszenie procesu selekcji w hodowli kukurydzy.

### **W jaki sposób analizujemy efekt stresu**

Rozpoznanie efektu stresu na poziomie molekularnym można rozpocząć od oceny zmienności (polimorfizmu) materiału genetycznego (DNA) w roślinach o skrajnie odmiennej reakcji fenotypowej na stres. Ocena może obejmować zarówno analizę porównawczą sekwencji genomowego DNA, jak i analizę porównawczą sekwencji genów, bezpośrednio i pośrednio związanych z reakcją rośliny na stres. Wykrycie polimorfizmu

badanego DNA umożliwia wygenerowanie markerów stanowiących znacznik cechy tolerancji lub wrażliwości na stres, co jest podstawą dla szybkiej selekcji roślin (z ang. *Marker Assisted Selection*, MAS), podczas gdy analiza polimorfizmu w obrębie alleli z analizowanej puli genowej stanowi podstawę do zlokalizowania badanych fragmentów DNA na nasyczonej w ten sposób mapie genomu kukurydzy (Mohan i in., 1997; Wenkai, 2007).

Efekt stresu herbicydowego rozpoznaje się także na poziomie funkcjonalnym genomu. Oznacza to, że poziom ekspresji genów kodujących te same białka, ale pochodzących z roślin odmiennie reagujących na stres herbicydowy, jest różny. Zmiany w ekspresji (obserwowane na poziomie transkrypcji i translacji) dotyczą zarówno genów strukturalnych, jak i regulatorowych, oraz bywają związane ze stopniem metylacji, prowadzącym do „wyciszenia” genów, a ostatecznie – zaniku odpowiednich białek, będących naturalnym efektem ich ekspresji (Finnegan i in., 2000).

### ***Techniki badawcze***

Reakcja fenotypowa na stres może być określona w badaniach szklarniowych, podczas gdy identyfikacja zmian w strukturze i funkcjonowaniu RNA, DNA i białek, które zaszły w wyniku zastosowania czynnika stresującego, wymaga zastosowania wielu nowoczesnych metod analitycznych, takich jak :

- elektroforeza 2D-PAGE na obecność (lub brak) specyficznych „prążków”, odpowiadających unikatowym, zmodyfikowanym lub zhydrolizowanym białkom;
- spektroskopia mas w przypadku białek i kwasów nukleinowych;
- sekwencjonowanie w odniesieniu do kwasów nukleinowych;
- analiza *in silico* (algorytmy bioinformatyczne, program Mascot);
- reakcja PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR).

Ocena polimorfizmu genetycznego, związanego z odmienną reakcją roślin na czynnik stresogenny, jest przeprowadzana na podstawie wyników analiz opartych na molekularnej amplifikacji fragmentów DNA (łańcuchowa reakcja polimerazy, PCR). Polimorfizm genomowego DNA ocenia się po rozdziale produktów reakcji amplifikacji na żelach agarozowych i poliakryloamidowych. Zastosowanie uzupełniających się technik, różniących się specyfiką w stosunku do poszczególnych regionów DNA i obserwowanym stopniem polimorfizmu, takich jak analizy polimorfizmu powtórzeń mikrosatelitarnych ISSR (ang. *Inter Simple Sequence Repeats*) i SSR (ang. *Simple Sequence Repeats*) czy technika AFLP (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*), oceniająca polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych – wymaga zastosowania zaawansowanych technik bioinformatycznych dla sumarycznej oceny zmian w strukturze DNA (Weising i in. 2005).

Identyfikacja fragmentów genomu, ewentualnie związanych z reakcją badanej rośliny na stres herbicydowy, wymaga wykorzystania zasady syntenii i wiedzy o genomie roś-

lin innych gatunków, dla których dostępne są informacje o obronnych systemach antyoksydacyjnych czy systemach regulatorowych. Do zgromadzenia bazy danych o genach przypuszczalnie związanych z reakcją na stres (ang. *candidate genes*) służy także technika mikromacierzy. Zróżnicowanie hybrydyzacji cDNA i mRNA, wyekstrahowanego z roślin traktowanych herbicydem w kilku terminach po traktowaniu oraz odpowiednio z roślin nietraktowanych, umożliwi wyodrębnienie dużej populacji zarówno genów strukturalnych, jak i modulujących różne procesy metaboliczne organizmu.

Potwierdzenie roli genów-kandydatów w odpowiedzi na stres uzyskuje się po zbadaniu poziomu ekspresji badanego genu przed potraktowaniem rośliny herbicydem oraz w trakcie działania herbicydu na roślinę. W takich badaniach stosuje się technikę PCR w czasie rzeczywistym (ang. *Real-time PCR*), a także techniki półilościowego i ilościowego (wspomagane bioanalizatorem) RT-PCR (Valasek i Repa, 2005; Xiao i in., 2005).

### ***Niekodujące RNA***

Czy obserwowane zaburzenia biosyntezy białek są związane ze zmienioną sekwencją kodującego DNA, czy też z zablokowaniem funkcji DNA przez stres? Odpowiedź na to pytanie ma zasadnicze znaczenie. Do niedawna uważano, że DNA (nośnik informacji genetycznej) i białka (produkty końcowe procesu ekspresji genów) pełnią główną rolę w procesach komórkowych zachodzących w żywych organizmach. Sądono, że procesy regulacji ekspresji genów odbywają się wyłącznie za pomocą białek regulatorowych, działających jako represory lub aktywatory genów. Na początku lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku Cech i Altman odkryli katalityczne właściwości RNA.

W ostatnich latach szczególnie duże zainteresowanie wzbudzają krótkie, około 20-30 nukleotydowe ncRNA, pełniące zasadniczą rolę w procesie zwanym interferencją RNA lub wyciszaniem RNA. Powstają one na drodze specyficznej degradacji dwuniciowego lub częściowo dwuniciowego RNA. W zależności od pochodzenia dwuniciowego/częściowo dwuniciowego RNA powstałe w wyniku jego cięcia cząsteczki zwane są siRNA (ang. *small interfering RNA*) lub microRNA (ang. *micro RNA*). siRNA i microRNA mogą uczestniczyć w regulacji każdego etapu ekspresji informacji genetycznej.

Antysensowe oligomery (aDNA) są to krótkie oligodeoksynukleotydy, tworzące kompleks z DNA lub RNA, na których przebiega proces biosyntezy białka. aDNA są komplementarne do sekwencji sensowej, właśnie dlatego przyjęto nazywać je „antysensowymi oligonukleotydami”. Hybrydyzacja aDNA do właściwego fragmentu DNA lub mRNA powoduje zahamowanie procesu replikacji, transkrypcji lub translacji. Strategie antysensu otwierają możliwości zwłaszcza w zakresie obniżenia wydajności procesów metabolicznych, np. przez częściowe zablokowanie fragmentu genu lub mRNA. Strategia antysensowych oligonukleotydów jest także skutecznym narzędziem w celu określenia lokalizacji dostępności i funkcji rRNA w strukturze rybosomów.

W metodzie SELEX (ang. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) krótkie cząsteczki RNA (aptamery) izoluje się z kombinatorycznych bibliotek RNA (zbiór wszystkich możliwych do zsyntetyzowania oligorybonukleotydów o określonej długości  $n$ ). Strukturalna różnorodność cząsteczek tworzących biblioteki kombinatoryczne stwarza możliwość zidentyfikowania oligorybonukleotydów, które wiążą określone molekuly z wysokim powinowactwem i specyficznością.

Analiza bioinformatyczna polega na ustaleniu, czy cząsteczki RNA (wpływające na aktywność poszczególnych białek) są kodowane lub występują w genomie roślinnym, a także czy można stwierdzić ich obecność w genomach innych królestw. Standardowe programy umożliwiają przeszukiwanie genomu roślinnego *in silico* w bazach danych.

Te przykładowe techniki eksperymentalne winny doprowadzić do identyfikacji ncRNA zaangażowanych w odpowiedź na stres. Identyfikacja nowych regulatorowych RNA, wpływających na białka oddziałujące z rybosomem roślinnym w warunkach stresowych, będzie z pewnością prowadzić do kolejnego pytania, bezpośrednio połączonego z następnym etapem biosyntezy: Czy istnieją takie RNA, które regulują funkcjonowanie białek rybosomalnych lub oddziałujących z rybosomem roślinnym podczas narażenia na warunki stresowe? Identyfikacja zmian strukturalnych rybosomu roślinnego w warunkach stresowych może być realizowana przez zbadanie poziomu ekspresji poszczególnych białek rybosomalnych oraz kwasów rybonukleinowych w warunkach stresu z zastosowaniem PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*) oraz mikromacierze (ang. *microarrays*). PCR w czasie rzeczywistym umożliwia ilościowe oznaczenia DNA kodującego rybosomalne białka lub kwasy nukleinowe. Dzięki tej technice można monitorować zmiany w stężeniu produktu przez pomiar fluorescencji proporcjonalnej do ilości produktu amplifikowanego podczas reakcji PCR.

Do zbadania poziomu ekspresji białek i rybosomalnych RNA używane są również mikromacierze DNA, przydatne do studiowania poziomu ekspresji dużej liczby genów jednocześnie. Schemat badań z użyciem mikromacierzy jest następujący:

- 1) Izolacja RNA z roślin poddawanych poszczególnym warunkom stresowym oraz z roślin kontrolnych.
- 2) Przeprowadzenie odwrotnej transkrypcji w celu przepisania wyizolowanego RNA na komplementarny jednoniciowy DNA. W czasie odwrotnej transkrypcji do powstających cząsteczek DNA włączone zostaną znakowane nukleotydy posiadające dołączony barwnik fluorescencyjny.
- 3) Hybrydyzacja przygotowanego materiału do mikromacierzy.
- 4) Zebranie i analiza wyników: porównanie intensywności fluorescencji w obrębie każdej pary sond oraz zestawienie wyników uzyskanych dla wszystkich sond reprezentujących dany gen.

## Konkluzje

Identyfikacja zmian w strukturze i funkcjonowaniu DNA, wykrycie nowych krótkich, funkcjonalnych RNA, produktów hydrolizy rRNA czy białek regulujących działanie rybosomu roślinnego w warunkach stresowych może stanowić prawdziwy przełom w interpretacji mechanizmu działania herbicydów na roślinę. Testowane czynniki stresowe to powszechnie stosowane herbicydy niespecyficzne, stymulujące rozliczne dyskusje i zróżnicowane oceny skutków nowoczesnej agrobiotechnologii. Zrozumienie podstawowych efektów molekularnych ma zasadnicze znaczenie dla oceny ich wartości. Metody analizy zmian w transkryptomie i proteomie (pokrótce opisane w niniejszym tekście) mogą znaleźć zastosowanie w ocenie postępu biologicznego, a tym samym otworzą drogę dla nowych kierunków w pracach hodowlanych. Finalnie, koncepcje te mogą doprowadzić do polepszenia jakości produkcji rolnej.

Praca w ramach grantu PBZ-MNiSW-2/3/2006.

## Piśmiennictwo

- Devine M. D., Shukla A. (2000). *Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance*. Crop Protection, 19, 881-889.
- Finnegan E. J., Peacock R. J., Dennis D. S., (2000). *DNA methylation a key regulator of plant development and other processes*. Current Opinion in Genetics and Development 10: 217-223.
- Funke T., Han H., Healy-Fried M. L. et al. (2006). *Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops*. PNAS 103, 35: 13010-13015.
- Jin D., Lu W., Ping S. et al. (2007). *Identification of a new gene encoding EPSPS with high glyphosate resistance from the metagenomic library*. Curr. Microbiol. 55: 350-355.
- Mohan M., Nair S., Bhagwat A. et al. (1997). *Genome mapping, molecular markers and marker assisted selection in crop plants*. Molec. Breed. 3: 87-103.
- Newhouse K., Singh B., Shaner D., Stidham M. (1991). *Mutations in corn (Zea mays L.) conferring resistance to imidazolinone herbicides*. Theoretical and Applied Genetics. 83, Nr 1.
- Oxtoby E., Hughes A. (1989). *Breeding for herbicide resistance using molecular and cellular techniques*. Euphytica 40: 173-180.
- Tan S., Evans R., Singh B. (2006). *Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops*. Amino Acids 30: 195-204.
- Valasek M.A., Repa J. R. (2005). *The power of real-time PCR*. Advan. Physiol. Educ. 29: 151-159.
- Weising K., Nybom H., Wolff K., (2005). *DNA Fingerprinting in Plants. The principles, Methods and Applications*. Science. CRC Press. Taylor, p. 444
- Wenkai Xiao, Jing Zhao, Shengci Fan et al. (2007). *Mapping of genome-wide resistance gene analogs (RGAs) in maize (Zea mays L.)* Theor. Appl. Genet. 115(4): 501-50.
- Xiao N.Z., Ba L., Holm P. B. et al. (2005). *Quantitative Transcript Analysis in Plants: Improved First-strand cDNA Synthesis*. Acta Biochimica and Biophysica 37: 429-434.
- Yu Q., Cairns A., Powles S. (2007). *Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance involved in a Lolium rigidum biotype*. Planta 225: 499-513.

**How to search herbicide stress in plant system at molecular level?**

Application of herbicides is connected with stress in plant system. Molecular signals of stress are of significant value. How to find them?

**Key words:** herbicide, corn, plant reaction, molecular analysis