

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

*На правах рукопису*

**СТРАННЮК Надія Михайлівна**

**ОДЕРЖАННЯ ТА АНАЛІЗ МУТАНТІВ *NICOTIANA  
PLUMBAGINIFOLIA*, СТІЙКИХ ДО ДІЇ СПОЛУК З  
АНТИМІКРОТРУБОЧКОВОЮ АКТИВНІСТЮ**

*Спеціальність 03.00.15. - генетика*

**А в т о р е ф е р а т**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

**Київ - 1993**

Робота виконана на кафедрі клітинної біології та генетичної інженерії біологічного факультету Київського університету ім. Тараса Шевченка

Науковий керівник - доктор біологічних наук,  
ст. н. співр. Блюм Я. Б.

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук,  
професор Малуца С. С.

кандидат біологічних наук,  
ст. н. співр. Кучук М. В.

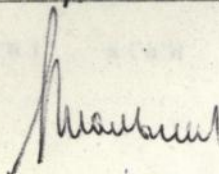
Провідна організація - Інститут фізіології рослин та генетики АН України

Захист дисертації відбудеться "12" жовтня 1993 р. о "14" год. на засіданні спеціалізованої ради Д.01.19.01. в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії АН України /252143, м. Київ, вул. акад. Заболотного, 148/.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії АН України

Автореферат розісланий "9" вересня 1993 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради,  
кандидат біологічних наук



Л. В. Малишева

ЛННБ України ім. В. Стефаника



00815377 (V)

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність проблеми.** За останнє десятиліття помітне зростання інтересу вчених до вивчення цитоскелету. Одним із найбільш важливих структурних компонентів цитоскелету є мікротрубочки, які забезпечують процеси клітинної рухливості, підтримання форми клітини, формування веретена поділу, транспорт везикул або мембранно-зв'язаних органел, беруть участь у міграції ядер тощо [Lloyd, 1982; Фултон, 1987].

Незважаючи на значні успіхи у вивченні структури і функцій мікротрубочок, до цього часу такі молекулярно-біологічні аспекти їх функціонування, як тонкі механізми збирання-розбирання мікротрубочок, їх взаємодія з іншими скелетними структурами клітини і органелами, взаємодія з хромосомами і їх розділення в мітозі, вивчені недостатньо. Вирішення всіх перелічених вище проблем може бути в значній мірі полегшене при використанні для вивчення структури і функцій мікротрубочок відповідних мутантних ліній клітин, що характеризуються наявністю мутантних форм білків мікротрубочок і, в першу чергу, тубуліну.

Найбільш поширеним прийомом отримання таких мутантів є селекція ліній клітин, стійких до дії сполук з антимікротрубочковою активністю. На сьогоднішній день такі мутанти отримані у тварин і нищих еукаріот [Oakley, 1985]. Однак, клітинна селекція до цього часу не використовувалась для одержання мутантів за тубуліном у представників вищих рослин.

**Мета і завдання дослідження.** В зв'язку з викладеним вище, метою даної роботи було отримання за допомогою методів клітинної селекції мутантних ліній рослин *Nicotiana plumbaginifolia*, стійких до дії сполук, що характеризуються антимітотичною активністю і при цьому або порушують процеси полімеризації тубуліну (аміпрофосметил і трифлюоралін), або ж стабілізують мікротрубочки (таксол).

Відповідно до поставленої мети в завдання експериментальної роботи входило:

1. Вивчити *in vitro* вплив аміпрофосметилу (АПМ), трифлюораліну (ТФЛ) і таксолу (ТАХ) на протопласти, калусну тканину і рослини *N. plumbaginifolia* з метою підбору оптимальних умов для селекції стійких до даних сполук ліній *N. plumbaginifolia*.

2. Отримати лінії рослин *N. plumbaginifolia*, стійкі до дії АПМ, ТФЛ и ТАХ.

3. Вивчити стійкість отриманих ліній *N. plumbaginifolia* до АПМ, ТФЛ і ТАХ порівняно з контролем.

4. Провести гібридологічний аналіз отриманих мутантів з метою

визначення генетичної природи їх стійкості до АПМ, ТФЛ і ТАХ.

5. Провести аналіз одержаних ліній на наявність у них перехресної стійкості до сполук з аналогічним механізмом дії на мікротрубочки.

6. Порівняти стійкість мікротрубочок в протопластах отриманих ліній та мікротрубочок в протопластах контрольних рослин до АПМ, ТФЛ і ТАХ за допомогою методу непрямої імуофлюоресцентної мікроскопії.

7. Провести біохімічний аналіз отриманих ліній для ідентифікації мутантних ізоформ тубуліну.

**Наукова новизна і практична цінність роботи.** Вперше у вищих рослин за допомогою методу прямої позитивної селекції *in vitro* отримані лінії *N. plumbaginifolia*, стійкі до дії сполук, які руйнують мікротрубочки - аміпрофосметилу, трифлюраліну. Вперше у вищих рослин отримані лінії *N. plumbaginifolia*, стійкі до дії сполуки, що стабілізує мікротрубочки - таксолу. Встановлено, що стійкість отриманих ліній до досліджуваних речовин забезпечується за рахунок мутацій в генах, що кодують ізоформи  $\beta$ -субодиниці тубуліну. Показано наявність в отриманих лініях перехресної стійкості до сполук з аналогічним механізмом дії на мікротрубочки.

Отримані нами мутанти *N. plumbaginifolia*, що характеризуються стійкістю до гербіцидів фосфоамідного і динітроанілінового рядів - АПМ і ТФЛ, можуть бути в майбутньому використані для ідентифікації гена  $\beta$ -тубуліну, який забезпечує стійкість до даних гербіцидів. Його клонування і перенесення у важливі сільськогосподарські культури для отримання їх стійких сортів.

Отримані нами стійкі до АПМ, ТФЛ і ТАХ рослини *N. plumbaginifolia*, що містять мутантний тубулін, використовуються як один із партнерів при соматичній гібридизації. Наявність молекулярного маркера у структурі мікротрубочок дозволить з'ясувати, яким чином відбувається реорганізація систем МТ батьківських клітин при соматичній гібридизації і за рахунок яких структурно-функціональних особливостей веретено поділу забезпечує правильність розходження в мітозі хромосом, успадкованих від різних батьків.

Результати дисертаційної роботи можуть використовуватися в педагогічному процесі при вивченні окремих тем курсів "Клітинна селекція", "Основи біотехнології рослин" та ін. В даний час результати застосовуються у навчальному процесі на кафедрі клітинної біології та генетичної інженерії Київського університету ім. Тараса Шевченка при вивченні окремих розділів курсу "Клітинна селекція", "Скелетні структури клітини", а також на кафедрі ботаніки Тернопільського педінституту при вивченні окремих розділів курсу "Основи біотехнології рослин".

**Основні положення, що виносяться на захист.** На основі проведених досліджень та узагальнення власних результатів і літературних даних на захист виносяться наступні положення:

1. Специфічна дія АПМ, ТФЛ і ТАХ на мікротрубочки клітин *N. plumbaginifolia* фенотипічно виражається у пригніченні росту тканин і клітин, зупинці росту клітинних колоній, уповільненні утворення коренів. В експериментах по селекції мутантів *N. plumbaginifolia*, стійких до дії АПМ, ТФЛ і ТАХ, слід використовувати наступні концентрації кожної із речовин: АПМ - 3-5 мкМ, ТФЛ - 5-12 мкМ і ТАХ - 1-2 мкМ.

2. Стійкість отриманих ліній *N. plumbaginifolia* до АПМ, ТФЛ і ТАХ є наслідком стабільних генетичних змін і пов'язана з домінантними ядерними мутаціями.

3. Наявність в отриманих АПМ- і ТФЛ-стійких лініях перехресної стійкості до сполук з аналогічним механізмом дії на мікротрубочки є доказом того, що мутація пройшла в одному з генів, які кодують тубулін.

4. За допомогою методу непрямої імуофлюоресцентної мікроскопії встановлено, що кортикальна сітка мікротрубочок в ізольованих протопластах отриманих ліній характеризується підвищеною стійкістю до АПМ, ТФЛ і ТАХ, відповідно. Це може служити підтвердженням того, що стійкість є результатом мутацій у генах, що кодують тубулін - основний білок мікротрубочок.

5. Стійкість отриманих ліній до досліджуваних речовин пов'язана із змінами в ізоформах  $\beta$ -субодиниці тубуліну, що можна пояснити мутаціями в генах, що кодують дані ізоформи.

**Апробація роботи:** Результати дисертаційної роботи доповідались на: 1. 8th International protoplast symposium, June 16-20, 1991, Uppsala, Sweden; 2. Satellite of the 15th International congress of biochemistry "Frontiers of Biotechnology in Agriculture - 1990", August 1-4, 1991, Sea of Galilee, Israel; 3. I Всесоюзном симпозиуме "Новые методы биотехнологии растений", 20-22 ноября 1991, Пущино, СССР; 4. Всесоюзной конференции "Достижения биотехнологии - агропромышленному комплексу", 14-18 октября 1991, Черновцы, Украина; 5. IV Всесоюзной научной конференции "Экологическая генетика растений, животных, человека", 20-21 ноября 1991, Кишинев, Молдова; 6. Конференции молодых ученых "Актуальные проблемы физиологии растений и генетики", 26-28 мая 1992, Киев, Украина; 7. II Российском симпозиуме "Новые методы биотехнологии растений", 18-20 мая, 1993, Пущино, Россия; 8. II з'їзді товариства фізіологів України, 4-8 жовтня 1993, Київ, Україна.

**Публікації.** Основні результати дисертації викладені у 10 дру-

кованих роботах, список яких наведено у кінці автореферату.

**Структура та об'єм роботи.** Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, викладення результатів дослідження та їх обговорення, заключення, висновків і списку літератури, який включає 250 найменувань. Робота містить 23 малюнки і 10 таблиць.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.

В роботі використовували такий рослинний матеріал: диплоїдні і гаплоїдні рослини *Nicotiana plumbaginifolia*; калусну тканину *N. plumbaginifolia*; насіння рослин *N. plumbaginifolia*. Як селективні агенти використовували гербіциди: аміпрофосметил (Chemagro, Division, Baychem Corp., США), трифлуралін (DowElanco, США) і алкалоїд таксол (NCI, NIH, Bethesda, США).

Для індукції калусної тканини нарізали стерильне листя гаплоїдних рослин *N. plumbaginifolia* і поміщали на поживне середовище МС [Murashige & Skoog, 1962], до складу якого входили фітогормони 1 мг/л БАП (6-бензиламінопурин) і 1 мг/л НОК (І-нафтилоцтова кислота). Чашки з рослинним матеріалом культивували в термостаті при температурі +25°C. Протопласти виділяли і культивували за відпрацьованою раніше методикою [Сидоров и др., 1985а]. Для регенерації рослин використовували середовище РМОР [Sidorov et al., 1982]. Стебла вкорінювали на безгормональному середовищі МС, інколи з 0,1 мг/л НОК.

Для визначення концентрацій речовин, які інгібують ріст калусу, кусочки калусної тканини масою 0,35-0,46 г поміщали на середовище МСмод (1 мг/л БАП, 1 мг/л НОК), що містило різні концентрації досліджуваних речовин: АПМ -  $1 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-5}$  М; ТФЛ -  $1 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-4}$  М; ТАХ -  $1 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-5}$  М. Через 4 тижні калусну тканину зважували і визначали відносний приріст її маси.

Для оцінки впливу АПМ, ТФЛ і ТАХ на мезофільні протопласти *N. plumbaginifolia* ізольовані протопласти після виділення культивували в рідких поживних середовищах  $K_3$ -NM [Nagy & Maliga, 1976] або КМ8р [Kao & Michayluk, 1975], що містили різні концентрації досліджуваних речовин: АПМ -  $1 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-5}$  М; ТФЛ -  $1 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-4}$  М; ТАХ -  $1 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-5}$  М. Кількісну оцінку виживання проводили на основі репродуктивного потенціалу одиничних клітин (здатність клітин до утворення колоній).

Для вил'яння мутантів із стійкістю до дії АПМ, ТФЛ і ТАХ як вихідний матеріал використовували калусну тканину і мезофільні протопласти гаплоїдних рослин *N. plumbaginifolia*. Підбираючи селективні концентрації досліджуваних речовин, прімали до уваги той факт, що

вміст кожного із них у середовищі не повинен перевищувати ті концентрації, при яких повністю інгібується ріст тканини.

З метою індукції мутацій як мутаген використовували  $\gamma$ -опромінення в дозі 1.5 крад. Щоб запобігти утворенню в середовищі токсичних речовин під дією іонізуючого опромінення, протопласти відмивали від середовища, в якому проводили опромінення. Опромінені протопласти культивували у рідкому поживному середовищі  $K_3$ -NM у неселективних умовах. Селективний тиск здійснювали на стадії трьох-п'яти циклів клітинного поділу. Після 2-3 тижнів культивування колонії переносили для регенерації на агаризоване середовище RMOP, що містило селективні концентрації АПМ, ТФЛ і ТАХ, відповідно. Рослини, які регенерували на селективних середовищах, переносили на середовище RMOP без селективних агентів, а далі на середовище MS.

Для отримання АПМ-, ТФЛ- і ТАХ-стійких ліній через калус опромінений матеріал культивували на середовищі MSmod, яке містило селективні концентрації антимікротрубочкових агентів. Ділянки калусу, які не загинули внаслідок дії АПМ, ТФЛ і ТАХ, відповідно, для індукції органогенезу переносили на середовище RMOP, що також містило селективні концентрації даних речовин. Острівки тканини, яка позеленіла, переносили на середовище RMOP без селективних агентів для подальшої регенерації та органогенезу. Отримані рослини-регенеранти переносили на середовище MS.

Для первинної перевірки регенерантів на стійкість до АПМ, ТФЛ і ТАХ, відповідно, їх листові пластинки і листові пластинки контрольних рослин висаджували на середовища RMOP, що містили селективні концентрації досліджуваних речовин. За здатністю утворювати калус з наступною регенерацією визначали стійкість отриманих клонів до відповідних селективних агентів. Первинну перевірку здійснювали також на рівні рослин. Порівнювали здатність контрольних і одержаних рослин до росту і коренеутворення на безгормональних середовищах MS, що містили селективні концентрації АПМ, ТФЛ і ТАХ, відповідно. Порівнювали приріст калусу контрольних і отриманих рослин на селективних середовищах MSmod через 4 тижні після посадки калусних тканин. Під час роботи з протопластами виживання клітин, виділених із одержаних в результаті селекції клонів, порівнювали з таким в контролі, культивуючи обидва види протопластів в середовищі  $K_3$ -NM, що містило селективні концентрації досліджуваних речовин. Виживання клітин визначали як процентне відношення клонів, які вижили, до загальної кількості висіяних клітин.

Одержане від самозапилення і перехресного запилення насіння контрольних і стійких рослин стерилізували і висаджували на відповідні селективні середовища. Аналізуючи процент проростання насіння,

одержаного від самозапилення і перехресного запилення, робили висновок щодо генетичної природи стійкості отриманих ліній.

З метою з'ясування стійкості мікротрубочок до дії використовуваних речовин в протопластах досліджуваних ліній готували препарати за стандартним протоколом Мейджер і Сіммондс [(Meijer & Simmonds, 1988)]. Як первинні антитіла використовували мишині моноклональні антитіла Tu-01 проти  $\alpha$ -тубуліну і Tu-13 проти  $\beta$ -тубуліну, надані д-ром В. Віклицьким (Інститут молекулярної генетики, Прага, Чеська Республіка).

Виділення і очистку тубуліну із мезофілу *N. plumbaginifolia* проводили за методом Morejohn та ін. [Morejohn & Fosket, 1986] з внесеними нами змінами. Двомірний електрофорез проводили за методом O'Farrell [O'Farrell, 1975]. Імуноблотінг субодиниць тубуліну проводили за методом Towbin та ін. [Towbin et al., 1979].

Під час статистичної обробки експериментальних даних використовували стандартні методи обробки результатів [Деркач, 1963; Урбах, 1964].

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ІХ ОБГОВОРЕННЯ

### I. Одержання мутантів рослин *N. plumbaginifolia*, стійких до дії аміпрофосметилу, трифлураліну і таксолу.

Вивчення впливу аміпрофосметилу, трифлураліну і таксолу на рослини *N. plumbaginifolia*, калус та протопласти. Відомо, що АПМ і ТФЛ є одними з найбільш ефективних антимікротрубочкових сполук, які руйнують сітку мікротрубочок рослинних клітин [Morejohn & Fosket, 1984; Vaughn & Vaughan, 1988]. Використання ТАХ як одного із селективних агентів під час отримання мутантів стійкості зумовлене тим, що ТАХ є поки що єдиним продуктом природнього походження, який інгібує процеси деполімеризації мікротрубочок [Shiff et al., 1980]. Однак, чутливість до цих речовин може варіювати в залежності від об'єктів, на які вони впливають. Тому на першому етапі дослідження вивчали вплив даних гербіцидів і алкалоїда на рослини *N. plumbaginifolia*, калусну культуру і протопласти, визначити концентрації досліджуваних речовин, які гальмують ріст рослин, і концентрації, що повністю подавляють його. Було виявлено, що вже при концентрації  $1 \times 10^{-7}$  М АПМ, ТФЛ і ТАХ гальмують ріст стебла і перешкоджають росту коренів. При підвищенні концентрації гербіцидів і алкалоїда у поживному середовищі до  $10^{-6}$  М ріст стебла значно сповільнювався, а утворення коренів пригнічувалось повністю. Найбільш сильнодіючим на процес росту стебла і утворення коренів серед досліджуваних речовин є ТАХ: вже при концентрації  $8 \times 10^{-7}$  М він повністю пригнічує утворення коренів. Специфічна дія АПМ, ТФЛ і ТАХ на калусну тканину фенотипово

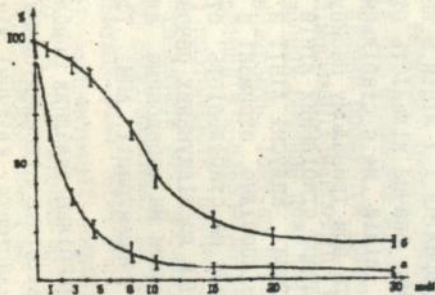
проявляється в пригніченні її росту - калус починає темніти і гинути. Результати дослідження впливу АПМ, ТФЛ і ТАХ на калусну тканину *N. plumbaginifolia* показані на мал. 1а, 2а, 3а, відповідно. Виходячи з отриманих результатів, нами були визначені селективні концентрації досліджуваних речовин для калусу *N. plumbaginifolia*: АПМ, які лежать в межах 3-5 мкМ, ТФЛ - 5-12 мкМ, ТАХ - 1-2 мкМ.

В результаті вивчення впливу АПМ, ТФЛ і ТАХ на протопласти *N. plumbaginifolia* було встановлено, що, незважаючи на незначну різницю чутливості протопластів і калусу до дії зазначених вище речовин, в експериментах із селекції через протопласти слід використовувати такі ж концентрації, як і у випадку селекції через калус, а саме: АПМ - 3-5 мкМ, ТФЛ - 5-12 мкМ, ТАХ - 1-2 мкМ.

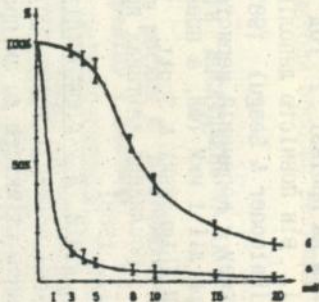
Отримані нами результати визначення діапазонів селективних концентрацій АПМ, ТФЛ і ТАХ для *N. plumbaginifolia* узгоджуються з даними, відомими з літературних джерел. Так, показано, що при обробці АПМ в концентраціях 1-3 мкМ на протязі 1 год клітин рослин, які культивуються в суспензії, він повністю деполімеризує кортикальні і мітотичні мікротрубочки [Falconer & Seagull 1987]. Встановлено, що порушення проходження мітозу у кореневій меристемі пшениці (*Triticum aestivum*) відбувається при дії 1 мкМ ТФЛ, а повне порушення мітозу - при концентрації 4 мкМ [Lignovski & Scott, 1972]. ТАХ ефективно стабілізує мікротрубочки у рослинних клітинах при концентраціях 1-10 мкМ [Weerdenburg & Seagull, 1988].

Селекція in vitro ліній *N. plumbaginifolia*, стійких до дії АПМ, ТФЛ і ТАХ. В результаті селекції через протопласти нами отримано 14 ліній з передбачуваною стійкістю до аміпрофосметилу, 23 лінії з передбачуваною стійкістю до трифлураліну і 7 ліній з передбачуваною стійкістю до таксолу. Як відомо, значна кількість отриманих на селективних середовищах клітинних ліній не є стабільними і певна частина з них втрачає свою стійкість при тривалому пасивуванні [Сидоров, 1990; Левенко, 1991]. Для відбору стабільних ліній необхідно підвищувати рівень селективного фактора. Калусні лінії з передбачуваною стійкістю до АПМ, ТФЛ і ТАХ, відповідно, отримані в результаті селекції через протопласти, перевіряли на стабільність стійкості і стійкість до підвищених концентрацій досліджуваних речовин. Після цього відібрані калусні лінії переносили на середовище для регенерації, яке містило селективні концентрації АПМ, ТФЛ і ТАХ, відповідно.

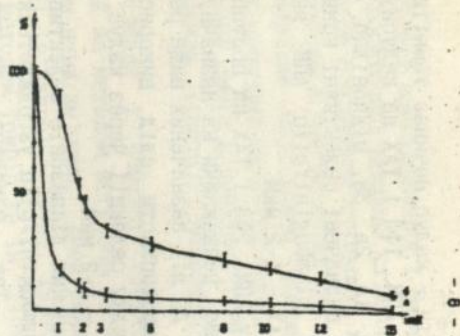
Слід відзначити, що однією із найбільш складних проблем під час одержання мутантів стійкості є здатність відселектованих калусних ліній до регенерації. Первинні резистентні клітинні лінії під час перевірки на стабільність експресії ознаки стійкості на протязі ряду



Мал. 2. Криві приросту (%) калусу *Nicotiana plumbaginifolia* в присутності різних концентрацій трифлураліну (ТФЛ):  
 а - контроль;  
 б - лінія, стійка до 12 мкМ ТФЛ.



Мал. 1. Криві приросту (%) калусу *Nicotiana plumbaginifolia* в присутності різних концентрацій аміпрофосметилу (АПМ):  
 а - контроль;  
 б - лінія, стійка до 5 мкМ АПМ.



Мал. 3. Криві приросту (%) калусу *Nicotiana plumbaginifolia* в присутності різних концентрацій таксолу (ТАХ):  
 а - контроль;  
 б - лінія, стійка до 2 мкМ ТАХ.

пасажів втрачають здатність до регенерації рослин. Так, після первинної перевірки ліній, отриманих у результаті селекції через протопласти, на стабільність стійкості до антимікротрубочкових сполук, нами було відібрано 8 із 14 АПМ-стійких ліній, із яких у 4 зберігалась здатність до регенерації; 12 із 23 ТФЛ-стійких ліній, де здатність регенерувати мали 7 ліній; 5 із 7 ТАХ-стійких ліній, здатність до регенерації у даному випадку зберігалась у 2 ліній.

У результаті через калус нами було отримано 22 лінії з передбачуваною стійкістю до АПМ, 29 ліній з передбачуваною стійкістю до ТФЛ, 12 ліній з передбачуваною стійкістю до ТАХ. Після первинної перевірки на стабільність стійкості було відібрано 8 АПМ-стійких ліній, у 5 із яких зберігалась здатність до регенерації; 14 ТФЛ-стійких ліній, де здатність до регенерації мали 10 ліній; 9 ТАХ-стійких ліній, здатність до регенерації у даному випадку зберігалась у 3 ліній.

Аналіз результатів селекції мутантів, стійких до АПМ, ТФЛ, і ТАХ через протопласти і через калус показав, що кількість ліній з передбачуваною стійкістю до даних речовин при селекції через калус більша у порівнянні з такою ж, але одержаною за допомогою селекції через протопласти. Під час проведення первинного тестування було встановлено, що значна кількість ліній, отриманих через калус, не є стабільною. Це можна пояснити тим, що калусна культура характеризується значною цитологічною гетерогенністю. Виділення в процесі селекції окремих мутантних клітин може маскуватися немутантними, поряд із стійкими можливе виживання чутливих клітин, виділення химерних ліній [Сидоров, 1990; Левенко, 1991]. Поряд з цим, ізольовані протопласти є кращим матеріалом для селекції, їх використання дозволяє клонувати повністю сепаровані клітини рослинної тканини і регенерувати із них рослини.

## II. Характеристика одержаних ліній *Nicotiana plumbaginifolia*.

### Вивчення стійкості отриманих ліній до досліджуваних речовин.

В результаті проведеної первинної перевірки на рівні рослин-регенерантів, під час якої листові пластинки контрольних і одержаних рослин культивували на поживних середовищах RMOP, які містили селективні концентрації досліджуваних речовин (АПМ - 5 мкМ, ТФЛ - 12 мкМ, ТАХ - 2 мкМ), було встановлено, що на листових пластинках отриманих регенерантів утворювався на селективних середовищах калус з наступною регенерацією на відміну від контрольних рослин. Ці результати дозволили нам зробити попередній висновок про стійкість отриманих рослин-регенерантів до АПМ, ТФЛ і ТАХ, відповідно.

Під час перевірки на рівні рослин стійкості отриманих регене-

рантів відповідно до АПМ, ТФЛ і ТАХ, було виявлено, що у всіх випадках в отриманих регенерантах, за виключенням ліній арм<sup>Г</sup> 3(к) (лінія, стійка до дії 3 мкМ АПМ, отримана через калус), тfl<sup>Г</sup> 3(к), тfl<sup>Г</sup> 8(к), тах<sup>Г</sup> 1,8(к), на середовищах, які містили селективні концентрації АПМ, ТФЛ і ТАХ, відповідно, ріст стебла і утворення коренів проходило так, як і у випадку з контрольними рослинами, висадженими на середовища без селективних агентів. В той час як у випадку контрольних рослин, висаджених на середовища, що містили селективні концентрації використовуваних речовин, значно сповільнювалися ріст стебла і утворення коренів. Наявність стійкості отриманих ліній до АПМ, ТФЛ і ТАХ було підтверджено і під час тестування мезофільних протопластів, виділених із ліній з передбачуваною стійкістю до цих речовин.

Калусні тканини, індуковані із ліній з передбачуваною стійкістю до АПМ, ТФЛ і ТАХ, мали здатність до росту на селективних середовищах. При цьому утворений калус був білого кольору і пухкої консистенції, тоді як під час тестування контрольного калусу спостерігали його потемніння і гальмування росту. Порівнюючи відносні прирости сирі маси калусів контрольних та отриманих рослин через 4 тижні після посадки калусних тканин, робили висновок про збільшення стійкості одержаних ліній до досліджуваних речовин порівняно з контролем. Таким чином, було встановлено, що одержана АПМ-стійка лінія характеризується стійкістю до АПМ в 10 раз вищою порівняно з контролем (Мал. 1); отримана ТФЛ-стійка лінія *N. plumbaginifolia* характеризується стійкістю до ТФЛ в 8 раз вищою в порівнянні з контролем (Мал. 2); ТАХ-стійка лінія в 5 стійкіша до ТАХ, ніж контрольна (Мал. 3).

Генетичний аналіз отриманих ліній. Результати проведеного генетичного аналізу дають можливість припустити, що отримані рослини лінії арм<sup>Г</sup> 5 є гомозиготними за одиначною домінантною ядерною мутацією, яка несе стійкість до АПМ. При тестуванні насінневого потомства R<sub>1</sub> (номенклатура, запропонована Р. Чалеффом [Chaleff, 1981]), отриманого від самозапилення рослин лінії арм<sup>Г</sup> 5, визначили, що його процент проростання на середовищі МС, що містило 5 мкМ АПМ, складав 97,0% (Таб. 1). В той час як аналогічний показник для контрольних рослин складав 4,9%. Процент проростання насіння, отриманого від реципрокних схрещувань арм<sup>Г</sup> 5 х k і k х арм<sup>Г</sup> 5, на середовищі, що містило 5 мкМ АПМ, складав 95,6% і 95,5%. Але в даному випадку насіння на середовищі, яке містило АПМ, проростало із затримкою і темп його росту був нищий у порівнянні з насінням, отриманим від самозапилення арм<sup>Г</sup> 5 (Таб. 1). Можливо, це пояснюється тим, що ознака стійкості у даному випадку знаходиться у гетерозиготному стані.

Генетичний аналіз тfl<sup>Г</sup> 12 лінії показав, що отримані рослини є,

Таб. 1. Генетичний аналіз отриманих мутантів *N. plumbaginifolia*, стійких до випрофосметилу (АІМ)

♀ ♂	Рослини, стійкі до 5 мкг АІМ					Контрольні рослини				
	№ п/п	кількість висадженого насіння на середовище, що містить АІМ	кількість пророслого насіння		χ проростання	№ п/п	кількість висадженого насіння на середовище, що містить АІМ	кількість пророслого насіння		χ проростання
			ф*	г*				ф*	г*	
Рослини, стійкі до 5 мкг АІМ	1.	47	46	47	97,9	1.	48	48	48	100
	2.	56	54	56	96,4	2.	56	52	56	92,9
	3.	63	60	63	95,2	3.	67	62	67	92,5
	4.	72	70	72	97,2	4.	72	69	72	95,8
	5.	68	67	68	98,5	5.	77	74	77	96,1
ср	-	-	-	97,0	ср	-	-	-	95,5	
Контрольні рослини	1.	55	53	55	96,4	1.	58	2	0	3,4
	2.	67	64	67	95,5	2.	69	3	0	4,3
	3.	81	78	81	96,3	3.	73	4	0	5,5
	4.	74	70	74	94,8	4.	84	6	0	7,1
	5.	61	58	61	95,1	5.	72	3	0	4,2
ср	-	-	-	95,6	ср	-	-	-	4,9	

Таб. 2. Генетичний аналіз отриманих мутантів *N. plumbaginifolia*, стійких до трифлораліку (ТФЛ)

♀ ♂	Рослини, стійкі до 12 мкг ТФЛ					Контрольні рослини				
	№ п/п	кількість висадженого насіння на середовище, що містить ТФЛ	кількість пророслого насіння		χ проростання	№ п/п	кількість висадженого насіння на середовище, що містить ТФЛ	кількість пророслого насіння		χ проростання
			ф*	г*				ф*	г*	
Рослини, стійкі до 12 мкг ТФЛ	1.	43	31	32,25	72,1	1.	41	21	20,5	51,2
	2.	51	38	39,25	74,5	2.	40	22	24,5	44,9
	3.	48	35	36	72,9	3.	63	31	31,5	49,2
	4.	57	41	42,75	71,9	4.	58	30	29	51,7
	5.	63	45	47,25	71,4	5.	45	21	22,5	46,7
ср	-	-	-	72,5	ср	-	-	-	48,7	
Контрольні рослини	1.	52	28	26	53,8	1.	55	3	0	5,5
	2.	81	38	40,5	46,9	2.	38	0	0	0
	3.	48	22	24	45,8	3.	46	1	0	2,2
	4.	63	31	31,5	49,2	4.	72	6	0	8,3
	5.	54	25	27	46,2	5.	64	4	0	6,3
ср	-	-	-	48,4	ср	-	-	-	4,5	

\* - Кількість пророслого насіння;  
 г - теоретично очікувана;  
 ф - фактична.  
 Примітка: у всіх випадках  $p > 0,05$

Таб. 3. Генетичний аналіз отриманих мутантів *N. plumbaginifolia*, стійких до таксолу (ТАХ)

♀ ♂	Рослини, стійкі до 2 мкг ТАХ					Контрольні рослини				
	№ п/п	кількість висадженого насіння на середовище, що містить ТАХ	кількість пророслого насіння		Х проростання	№ п/п	кількість висадженого насіння на середовище, що містить ТАХ	кількість пророслого насіння		Х проростання
			♀*	♂*				♀*	♂*	
Рослини, стійкі до 2 мкг ТАХ	1.	39	29	29,25	71,8	1.	80	38	40	47,5
	2.	43	30	32,25	69,7	2.	63	30	31,5	47,6
	3.	54	40	40,5	74,1	3.	79	37	39,5	46,8
	4.	37	26	27,75	70,3	4.	58	31	29	52,4
	5.	52	38	39	73,1	5.	46	24	23	52,2
ср	-	-	-	71,8	ср	-	-	-	-	49,5
Контрольні рослини	1.	38	18	19	47,4	1.	48	0	0	0
	2.	47	25	23,5	53,2	2.	72	3	0	4,2
	3.	52	24	26	46,2	3.	63	2	0	3,2
	4.	43	21	21,5	48,8	4.	81	1	0	1,2
	5.	65	33	32,5	50,8	5.	56	2	0	3,6
ср	-	-	-	49,3	ср	-	-	-	-	2,4

\* - Кількість пророслого насіння:  
 т - теоретично очікувана;  
 ф - фактична.

Примітка: у всіх випадках  $p > 0,05$

очевидно, гетерозиготними за однією ядерною мутацією. Під час аналізу насінневого потомства  $R_1$ , отриманого від самозапилення  $t_1^{f12}$  виявлено, що в даному випадку характер розщеплення на стійке і чутливе насіння узгоджується з очікуваними менделєвським 3 : 1 (Таб. 2). На основі тестування насінневого потомства  $F_1$ , отриманого від аналізуючих схрещувань, було встановлено, що розщеплення на чутливе і стійке насіння складає 1 : 1 (Таб. 2). Отриманий результат є підтвердженням того, що однією ядерною мутацією, яка забезпечує стійкість отриманих рослин до ТФЛ, є гетерозиготна.

На основі генетичного аналізу рослин-регенерантів лінії  $tax^2$  можна припустити, що вони є гетерозиготами за домінуючою ядерною мутацією, що забезпечує стійкість до ТАХ (Таб. 3).

Виходячи із результатів генетичного аналізу рослин-регенерантів  $art^5$ , а також, враховуючи те, що джерелом матеріалу для селекції служили гаплоїдні рослини *N. plumbaginifolia*, можна припустити, що мутація, яка забезпечує стійкість до АПМ, пройшла в гаплоїдних клітинах, які послідовно диплоїдизувались. Аналогічні результати були отримані Р. Чаллеффом [Chaloff, 1984] під час генетичного аналізу мутантів *Nicotiana tabacum*, стійких до хлорсульфурону і сульфометуронметилу. Мутації, що забезпечують стійкість до ТФЛ і ТАХ, відповідно, очевидно, пройшли після диплоїдизації гаплоїдних клітин.

Диплоїдизація могла пройти під впливом умов культивування. Так, встановлено [Глеба и др., 1978], що на протязі 5-7 циклів більша частина популяції диплоїдних та гаплоїдних клітин переходять на рівень плідності в 2 рази більший порівняно з вихідним. Довготривале пасивування клітин *in vitro* сприяє підвищенню генетичної різноманітності як серед клітин, що культивуються, так і отриманих із них рослин [Кунах, 1978, 1980; Сидоров, Сидорова, 1987].

На основі аналізу одержаних даних можна зробити висновок, що в кожному із випадків стійкість до АПМ, ТФЛ і ТАХ пов'язана з доміантною ядерною мутацією.

Аналіз мутантів на перехресну стійкість до речовин з антимікротрубочковою активністю. При проведенні тестування на наявність перехресної стійкості отриманих ліній до сполук, які характеризуються подібним механізмом дії на мікротрубочки, спостерігали утворення калусу з наступною регенерацією на листкових пластинках АПМ-стійких рослин на середовищі, що містило ТФЛ в концентрації 12 мкМ і вище. Приріст калусу, одержаного із АПМ-стійких рослин на середовищі МСмод, яке містило 12 мкМ ТФЛ, складав 39,5% по відношенню до контролю, тоді як приріст контрольного калусу на аналогічному середовищі складав всього 5,4%. Приріст калусу ТФЛ-стійкої лінії на середовищі, яке містило 5 мкМ АПМ, складав 83,5% по відношенню до приросту контрольного калусу, тимчасом як приріст контрольного калусу на середовищі, яке містило 5 мкМ АПМ складав тільки 11,4%. Як видно з результатів тестування, у даному випадку отримані лінії характеризуються перехресною стійкістю.

Немає нічого дивного в тому, що мутанти проявляють перехресну стійкість до споріднених антимікротрубочкових сполук, які характеризуються однаковими сайтами зв'язування на молекулах білків-мішеней. Відомо, що дуже часто мутанти, стійкі до дії однієї антимікротрубочкової сполуки, характеризуються стійкістю до інших антимікротрубочкових агентів. Так, показано, що мутація за ліз-350 в  $\beta$ -субодиниці тубуліну забезпечує стійкість мутантів *Chlamydomonas reinhardtii* Col<sup>4</sup> і Col<sup>15</sup> як до АПМ, так і до ТФЛ [Lee & Huang, 1990]. Динітроанілін-стійкий біотип *Eleusine indica* характеризується стійкістю до АПМ [Vaughn et al., 1987]. Такою ж властивістю характеризуються динітроанілін-стійкі клітини кореневої меристеми моркви [Vaughan & Vaughn, 1988]. Оскільки обидва гербіциди: АПМ і ТФЛ мають подібні сайти зв'язування на молекулі тубуліну [Bolduc et al., 1988; Vaughn et al., 1987; Vaughan & Vaughn, 1988], це є, на наш погляд, одним із доказів наявності мутації за одним із генів, що кодують тубулін.

### III. Докази природи мутацій.

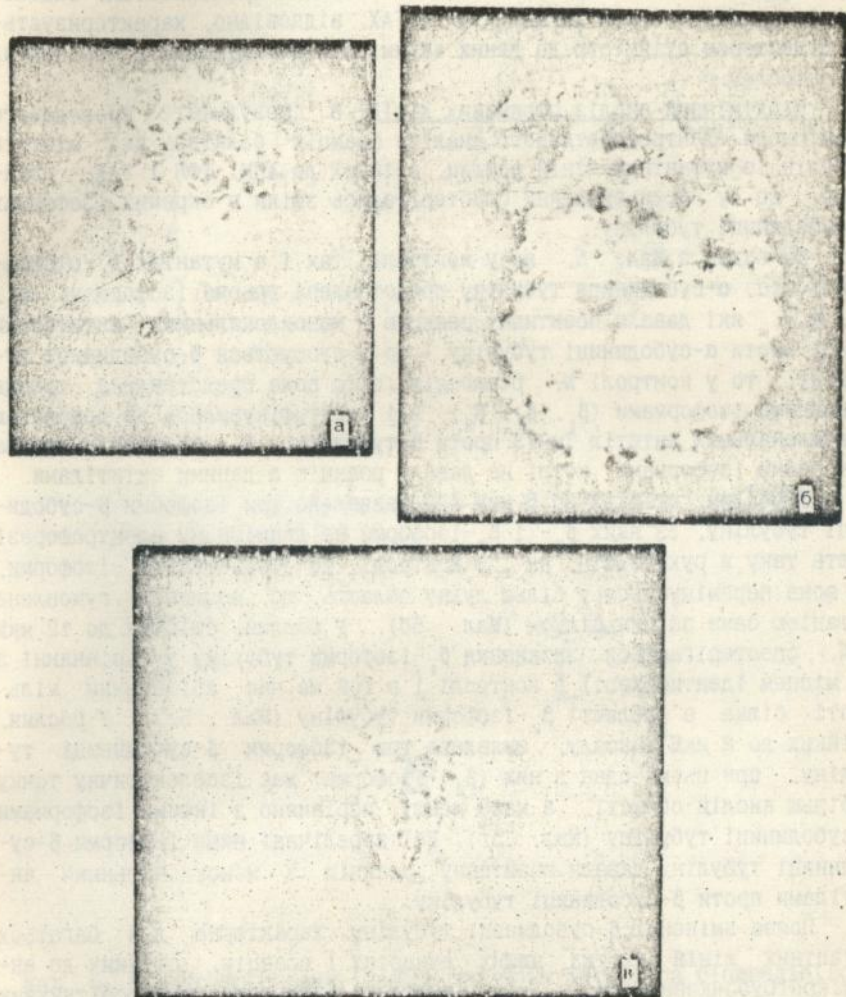
Аналіз одержаних ліній за допомогою непрямої імунофлуоресцентної мікроскопії. При вивченні стійкості мікротрубочок до дії АПМ в одержаних лініях *N. plumbaginifolia* порівняно з контрольними за допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії було встановлено, що при концентрації АПМ вищій ніж 3 мкМ всі мікротрубочки і в мутантних, і в контрольних клітинах руйнувались. Слід зазначити, що у всіх випадках концентрація ДМСО не перевищувала 0,1%. Саме таку концентрацію багато авторів вважають граничною в таких експериментах [Serlin & Ferrell, 1989; Seagull, 1990; Schwuchow et al., 1990; Wacker et al., 1987]. У цитоплазмі можна було спостерігати тільки уламки мікротрубочок або накопичення тубуліну. При використанні АПМ у концентрації 3 мкМ, в більшості протопластів, виділених із АПМ-стійких рослин, сітка мікротрубочок зберігалась, тимчасом як в протопластах контрольної лінії при аналогічних умовах спостерігали руйнування мікротрубочок в усіх клітинах.

Під час аналізу контрольної та стійкої до 12 мкМ ТФЛ ліній було встановлено, що при концентрації ТФЛ 12 мкМ у стійкій лінії мікротрубочки зберігались (Мал. 4в), тоді як в контрольній лінії при цій же концентрації всі мікротрубочки руйнувались (Мал. 4б).

За допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії було також показано, що в протопластах, виділених із рослин, стійких до 2 мкМ ТАХ, після обробки протягом 3-х годин ТАХ такої ж концентрації зберігалась нативна кортикальна сітка мікротрубочок, тимчасом як в контрольних клітинах нормальна організація кортикальної сітки мікротрубочок порушувалась. Внаслідок стабілізації мікротрубочок таксолом, в цитоплазмі контрольних клітин вони представлені у вигляді товстих паралельних пучків.

Дія сполук з антимиотичною активністю на мікротрубочки рослинних клітин уже достатньо добре вивчена. Вакер із співавторами [Wacker et al., 1988] виявили, що орізалін в концентрації 0,5 мкМ сильно руйнував мікротрубочки в клітинах протонемі моху *Funaria hygrometrica*. 0,1 мкМ орізалін через 3 години, а 1 мкМ АПМ уже через 10-15 хвилин повністю руйнували цитоскелет в протонемі іншого моху *Ceratodon purpureus* [Schwuchow et al., 1990]. Під час обробки волокон бавовника *Gossypium hirsutum* ТФЛ в концентрації 1 мкМ на протязі 4 днів кортикальна сітка мікротрубочок повністю руйнувалась [Seagull, 1990]. Обробка 10 мкМ ТАХ приводить до збільшення кількості мікротрубочок у волокнах бавовника, що розвиваються [Seagull, 1990].

На основі результатів аналізу одержаних мутантів за допомогою непрямої імунофлуоресцентної мікроскопії можна зробити висновок, що



Мал. 4. Результати імунофлуоресцентного аналізу стійкості кортикальних мікротрубочок протопластів *Nicotiana plumbaginifolia* до трифлураліну (ТФЛ):  
а) протопласт із контрольного калусу;  
б) протопласт із контрольного калусу після обробки ТФЛ (12 мкМ) на протязі 2 годин.  
в) протопласт з ТФЛ-стійкого калусу після обробки ТФЛ (12 мкМ) на протязі 2 годин.

кортикальна сітка мікротрубочок в ізольованих протопластах, виділеніх із ліній, стійких до АПМ, ТФЛ і ТАХ, відповідно, характеризується підвищеною стійкістю до даних антимітотичних речовин у порівнянні з контролем.

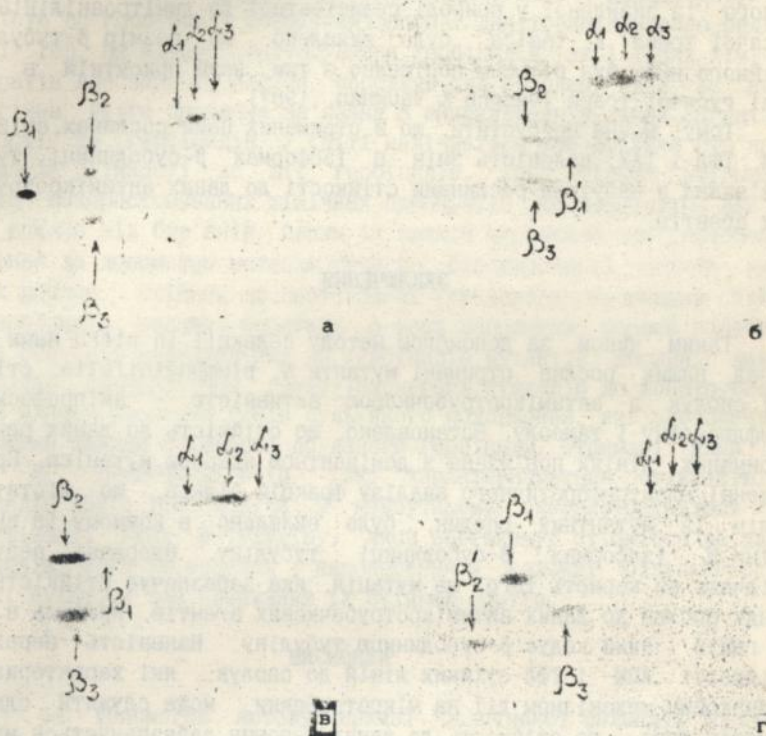
Біохімічний аналіз отриманих ліній. В результаті проведеного двомірного електрофоретичного аналізу фракцій білків, які містять тубулін із мутантних ліній рослин, стійких до АПМ, ТФЛ і ТАХ, показано, що у всіх випадках спостерігались зміни в окремих ізоформах  $\beta$ -субодиниці тубуліну.

Як видно з Мал. 5, як у контролі, так і в мутантах *N. plumbaginifolia*,  $\alpha$ -субодиниця тубуліну представлена трьома ізоформами ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ), які давали позитивну реакцію з моноклональними антитілами Tu-01 проти  $\alpha$ -субодиниці тубуліну. Що ж стосується  $\beta$ -субодиниці тубуліну, то у контролі *N. plumbaginifolia* вона представлена трьома основними ізоформами ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ), які ідентифікувались за допомогою моноклональних антитіл Tu-13 проти  $\beta$ -тубуліну, і, можливо, трьома мінорними ізоформами, котрі не давали реакцію з даними антитілами.

У рослин, стійких до 5 мкМ АПМ, виявлено три ізоформи  $\beta$ -субодиниці тубуліну, із яких  $\beta_2$  - і  $\beta_3$ -ізоформи на двомірному електрофорезі мають таку ж рухливість, як і в контролі, що стосується  $\beta_1$ -ізоформи, то вона переміщується у більш лужну область, що, можливо, зумовлене мутацією саме за цим білком (Мал. 5б). У рослин, стійких до 12 мкМ ТФЛ, спостерігається зникнення  $\beta_1$ -ізоформи тубуліну у порівнянні з її місцем ідентифікації в контролі і в той же час збільшення кількості білка в області  $\beta_2$ -ізоформи тубуліну (Мал. 5в). У рослин, стійких до 2 мкМ таксолу, виявлено три ізоформи  $\beta$ -субодиниці тубуліну, при цьому одна з них ( $\beta_2'$ -ізоформа) має ізоелектричну точку в більш кислій області, а масу меншу, порівняно з іншими ізоформами  $\beta$ -субодиниці тубуліну (Мал. 5г). Всі перелічені вище ізоформи  $\beta$ -субодиниці тубуліну давали позитивну реакцію з моноклональними антитілами проти  $\beta$ -субодиниці тубуліну.

Поява зміненої  $\beta$ -субодиниці тубуліну характерна для багатьох мутантних ліній клітин нижчих еукаріот і ссавців, стійких до антимікротрубочкових сполук. Так, виділені Кабралом і співробітниками мутантні лінії клітин СНО, стійкі до колхіцину, колцеміду і грізеофульвіну, характеризувалися наявністю  $\beta$ -тубуліну із зміненою електрофоретичною рухливістю [Cabral et al., 1980].

При аналізі за допомогою двомірного електрофорезу мутантів *S. reinhardtii* Col<sup>r</sup> 4 і Col<sup>r</sup> 15, які є стійкими до підвищених концентрацій колхіцину і при цьому зберігають джгутики, та нормальних клітин було встановлено, що мутація пройшла в одному із генів, що кодує  $\beta_2$ -тубулін [Bolduc et al., 1988]. Поряд з  $\beta$ -тубуліном, ха-



Мал. 5. Електрофореграми ізоформ тубуліну *Nicotiana plumbaginifolia*, виділених із:

- а) контрольних рослин;
- б) рослин, стійких до 5 мкМ аміпрофосметилу;
- в) рослин, стійких до 12 мкМ трифлураліну;
- г) рослин, стійких до 2 мкМ таксолу.

$\alpha$  -  $\alpha$ -тубулін;  
 $\beta$  -  $\beta$ -тубулін;

рактерним для дикого типу, джгутики мутантних клітин містять додатковий кислий ізоваріант  $\beta$ -тубуліну.

При електрофоретичному аналізі  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць тубуліну, виділеного із знайденої у природі резистентної до динітроанілінів лінії гусячої трави *E. indica*, було виявлено, що розмір  $\beta$ -тубуліну із стійкого виду був більшим порівняно з тим, який присутній в дикому типі гусячої трави [Vaughn & Vaughan, 1987].

Тому, можна припустити, що в отриманих нами рослинах, стійких до АПМ, ТФЛ і ТАХ, наявність змін в ізоформах  $\beta$ -субодиниці тубуліну пов'язана з набуттям рослинами стійкості до даних антимікротрубочкових агентів.

### ЗАКЛЮЧЕННЯ

Таким чином, за допомогою методу селекції *in vitro* нами вперше серед вищих рослин отримані мутанти *N. plumbaginifolia*, стійкі до дії сполук з антимікротрубочковою активністю - аміпрофосметилу, трифлураліну і таксолу. Встановлено, що стійкість до даних речовин в отриманих лініях пов'язана з домінантною ядерною мутацією. При проведенні електрофоретичного аналізу фракцій білків, що містять тубулін із мутантних рослин, було виявлено в кожному із випадків зміни в ізоформах  $\beta$ -субодиниці тубуліну. Одержані результати свідчать на користь того, що мутація, яка забезпечує стійкість отриманих рослин до даних антимікротрубочкових агентів, пройшла в одному із генів, який кодує  $\beta$ -субодиницю тубуліну. Наявність перехресної стійкості АПМ- і ТФЛ-стійких ліній до сполук, які характеризуються однаковим механізмом дії на мікротрубочки, може служити одним із доказів того, що стійкість до даних речовин забезпечується мутацією в одному із генів, що кодує тубулін.

Наявність мутантного тубуліну в клітинах отриманих рослин *N. plumbaginifolia* відкриває широкі перспективи їх використання з метою вивчення структури і молекулярно-біологічних аспектів функціонування мікротрубочок у клітині (механізми збирання-розбирання мікротрубочок, їх взаємодія з іншими скелетними структурами клітини і органами, взаємодія з хромосомами та їх розподілення в мітозі та ін.). Одержані нами мутанти використовуються як один із партнерів для отримання соматичних гібридів, які містили б ген мутантного тубуліну. Отримання міжвидових, міжродових і міжродинних гібридів дозволить вивчити функціонування мутантного тубуліну і його генів у різних гібридних системах, а також допоможе відповісти на актуальні питання про те, чи формуються гібридні мікротрубочки в таких гібридах; наскільки специфічні взаємодії ниток веретена і хромосом від різних

батьків; чи має значення специфіка формування сітки мікротрубочок при гібридизації для сегрегації певних хромосом.

Отримані нами мутанти *N. plumbaginifolia* характеризуються стійкістю до гербіцидів фосфоамідного і динітроанілінового рядів - АПМ і ТФЛ. Як відомо, застосування гербіцидів, як і інших хімічних препаратів для захисту рослин, породжує ряд проблем. Одна із них - екологічна. Друга проблема зв'язана з виникненням у живих організмів стійкості до гербіцидів. У світі налічується уже десятки бур'янів, які набули стійкості до дії гербіцидів. Тому тільки збільшення об'ємів використовуваних хімічних препаратів уже недостатнє для захисту рослин від бур'янів. Одним із шляхів вирішення цих проблем є створення за допомогою методів сучасної біотехнології сортів культурних рослин, стійких до промислових гербіцидів. Отримання стійких до гербіцидів рослин ведеться в двох напрямках: перший полягає у прямій селекції резистентних до гербіцидів мутантів рослин; другий передбачає використання генно-інженерних підходів до конструювання рослин шляхом введення генів будь-якого походження, які забезпечують проявлення ознаки стійкості до даного гербіциду. Отримані нами мутанти *N. plumbaginifolia*, які характеризуються стійкістю до гербіцидів АПМ і ТФЛ, можуть у майбутньому використовуватися для ідентифікації гену  $\beta$ -тубуліну, який забезпечує стійкість до даних гербіцидів, його клонування і перенесення у важливі сільськогосподарські культури для одержання їх стійких сортів.

### ВИСНОВКИ

1. За допомогою методу прямої позитивної селекції *in vitro* отримані лінії рослин *Nicotiana plumbaginifolia*, стійкі до дії сполук з антимітотичною активністю, що порушують процеси полімеризації тубуліну в мікротрубочки; - гербіцидів фосфоамідного і динітроанілінового рядів (аміпрофосметилу і трифлураліну). Одержані аміпрофосметил-стійкі лінії характеризуються стійкістю до аміпрофосметилу в 10 раз вищою порівняно з контролем, а трифлуралін-стійкі лінії характеризуються стійкістю до трифлураліну в 8 раз вищою у порівнянні з контролем.

2. Вперше за допомогою селекції *in vitro* одержані лінії рослин *N. plumbaginifolia* із стійкістю до таксолу, алкалоїду із рослин роду *Taxus*, який інгібує процеси деполімеризації тубуліну. Отримані таксол-резистентні лінії в 5 раз стійкіші до таксолу порівняно з контролем.

3. За допомогою гібридологічного аналізу доведено, що стійкість отриманих ліній *N. plumbaginifolia* до аміпрофосметилу, трифлураліну

і таксолу. Відповідно, є наслідком стабільних генетичних змін і пов'язана з домінантними ядерними мутаціями.

4. Встановлено, що для отриманих аміпрофосметил- і трифлуралін-стійких ліній характерна перехресна стійкість до сполук, які мають однакові сайти зв'язування на молекулі тубуліну. Це може розцінюватись як один із доказів того, що мутація пройшла в одному із генів, який кодує тубулін.

5. Показано, що кортикальна сітка мікротрубочок в ізольованих протопластах, виділених із ліній, стійких до антимікротрубочкових речовин, характеризується підвищеною стійкістю до аміпрофосметилу, трифлураліну та таксолу у кожному випадку. Це також може служити підтвердженням того, що отримана стійкість є результатом мутаційних змін у молекулі тубуліну - основного білка, що формує мікротрубочки.

6. За допомогою електрофоретичного аналізу встановлено, що набуття стійкості отриманими лініями до АПМ, ТФЛ і ТАХ пов'язане із змінами в ізоформах  $\beta$ -субодиниці тубуліну, що можна пояснити мутаціями в генах, що кодують дані ізоформи.

#### За матеріалами дисертації опубліковані наступні роботи:

1. Blume Ya. B., Strashnyuk N. M., Sidorov V. A., Gleba Yu. Yu. Producing and analysis of amiprofosmethyl-resistant mutants with altered tubulin from mesophyll protoplasts of *Nicotiana plumbaginifolia* // Abstr. of the 8th Internat. Protoplast Symposium. *Physiol. Plant.* - 1991. - v. 82, N 1. - P. A35

2. Blume Ya. B., Strashnyuk N. M., Gleba Yu. Yu. Selection and analysis of trifluralin-resistant mutants of *Nicotiana plumbaginifolia* // *Frontiers of Biotechnology in Agriculture - 1991. Satellite of the 15th Internat. Congress of Biochemistry. Sea of Galilee, Israel, August 1-4, 1991.* - P. 41.

3. Страшнюк Н. М., Блюм Я. Б., Сидоров В. А., Глеба Ю. Ю. Селекція і аналіз мутантів *Nicotiana plumbaginifolia*, устойчивих к гербицидам с антимікротрубочковым действием // Достижения биотехнологии - агропромышленному комплексу: Тез. докл. Всесоюз. конф. (Черновцы, 14-18 октября 1991 г.). - Черновцы, Украина, 1991. - с. 60.

4. Страшнюк Н. М., Блюм Я. Б., Сидоров В. А., Глеба Ю. Ю. Выделение и характеристика клеточных линий и растений-регенерантов *Nicotiana plumbaginifolia*, устойчивых к действию амипрофосметила // Экологическая генетика растений, животных, человека: Тез. докл. IV Всесоюз. науч. конф. (Кишинев, 20-21 ноября 1991 г.). - Кишинев: Штиинца, 1991. - Т. 2. - с. 432-433.

5. Блюм Я. Б., Страшнюк Н. М., Сидоров В. А., Глеба Ю. Ю. Получение и анализ линий *Nicotiana plumbaginifolia*, устойчивых к соединениям с антимікротрубочковой активностью // Новые методы биотехнологии растений: Тез. докл. I Всесоюз. симп. (Пушино, 20-22 ноября 1991 г.). - Пушино, СРСР, 1991. - с. 55-56.

6. Страшнюк Н. М., Блюм Я. Б. Получение и анализ мутантов растений *Nicotiana plumbaginifolia* с устойчивостью к таксолу // Актуальные проблемы физиологии растений и генетики: Тез. докл. конф. молодых ученых (Киев, 26-28 мая 1992 г.). - Киев, Украина, 1992. -

с. 142.

7. Микицей Е. В., Страшнюк Н. М., Блюм Я. Б. Реакция антител МРМ-13, которые узнают центры организации микротрубочек в протопластах растений // Актуальные проблемы физиологии растений и генетики: Тез. докл. конф. молодых ученых (Киев, 26-28 мая 1992 г.). - Киев, Украина, 1992. - с. 148.

8. Емец А. И., Страшнюк Н. М., Блюм Я. Б. Получение соматических гибридов высших растений с использованием мутантов по тубулину // Новые методы биотехнологии растений: Тез. докл. II Рос. симп. (Пушино, 18-20 мая 1993 г.). - Пушкино, Россия, 1993. - с. 138.

9. Страшнюк Н. М., Блюм Я. Б., Смертенко А. П., Сидоров В. А., Глеба Ю. Ю. Получение ампрофосметил-устойчивых линий *Nicotiana glauca*, содержащих мутантный тубулин // Доклады Российской АН. - 1993. - т. 332, N 2. - принято до друку.

10. Блюм Я. Б., Страшнюк Н. М. Получение мутантов по генам белков микротрубочек // Цитология и генетика. - 1993. - т. 27, N 6. - принято до друку.

*О. Шиняк*

Вид. до друку. 22.02.93. Формат 60 x 84 1/4 Папірофе

Друк. офс. Умови друк. арк. 1,16 Обл.-вид. арк. 0,53 тир. 100.

Зам. 3-3571.

---

Київська книжкова друкарня наукової книги. Київ, Репіна, 4.

Ab 27.987

**AB 27.987**