

КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ ім. ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

*На правах рукопису*

УДК 665.939.14:54-116+576.311.1

СОЛОДУШКО Віктор Григорович

**РОЛЬ  $\beta$ -ТУБУЛІНУ У СТІЙКОСТІ МУТАНТНИХ ЛІНІЙ  
*Nicotiana plumbaginifolia* ДО ДІЇ СПОЛУК З  
АНТИМІКРОТРУБОЧКОВОЮ АКТИВНІСТЮ**

03.00.04 — біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 1997

577.1

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00751886 (Z)

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі клітинної біології біологічного факультету Київського університету імені Тараса Шевченка

Науковий керівник — член-кореспондент НАН України,  
доктор біологічних наук  
**БЛЮМ Ярослав Борисович**

Офіційні опоненти — доктор біологічних наук, професор  
**КАЛІНІН Федір Леонтійович**  
кандидат біологічних наук, ст. наук. спів.  
**СОРОЧИНСЬКИЙ Борис Володимирович**

Провідна організація — Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, Київ

Захист відбудеться "29" травня 1997 р. о 14<sup>00</sup> год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.01.01.07 при Київському університеті ім. Тараса Шевченка за адресою: 252127, м. Київ, проспект Глушкова, 2, корпус 12 (біофак), ауд. 215.

Поштова адреса: 252033, Київ-33, вул. Володимирська, 64, спецрада Д.01.01.07, біологічний факультет.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Київського університету імені Тараса Шевченка

Автореферат розісланий " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 1997 р.

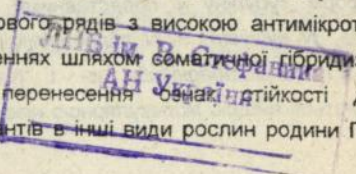
Вчений секретар спеціалізованої ради,  
кандидат біологічних наук, професор

О. В. Брайон

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Мікротрубочки є важливими структурними компонентами цитоскелету еукаріот, оскільки вони відіграють ключову роль в здійсненні таких фундаментальних процесів життєдіяльності клітин, як їх мітотичний і мейотичний поділ, внутрішньоклітинний транспорт речовин, рух джгутиків і війок, визначення і підтримка форми клітини, розміщення в клітині ряду органел (в першу чергу ядра), тощо [Fosket & Morejohn, 1992]. Крім цього, у рослинній клітині мікротрубочки виконують ряд додаткових функцій: формування клітинної стінки, утворення фрагмопласту під час поділу клітини, приймають участь у її розтягненні [Hussey, 1991; Hepler & Hush, 1996; Goddard et al., 1994]. Дослідження функцій мікротрубочок викликає значний інтерес, оскільки, змінюючи структурно-функціональні властивості мікротрубочок (наприклад, при допомозі речовин, що порушують або стабілізують мікротрубочки), можна впливати як на функції окремих клітин, так і всього організму. [Corgeia, 1991]. На сьогоднішній день ряд речовин з антимікротрубочковою активністю вже використовуються як гербіциди, протипухлинні, фунгіцидні, антигельмінтозні засоби [Страшнюк и Блюм, 1993; Morejohn & Fosket, 1991]. Встановлено, що у більшості випадків внутрішньоклітинною мішенню для цих речовин є тубулін – білок, який формує протофіламенти мікротрубочок [Corgeia, 1991]. Специфічне зв'язування антимікротрубочкових речовин з цим білком приводить до загибелі клітин, однак не виключено, що спонтанні чи індуковані мутації у молекулі тубуліну можуть забезпечувати їх стійкість до таких речовин [Страшнюк и Блюм, 1993; Oakley, 1985].

Особливий інтерес викликають рослинні організми з природною підвищеною стійкістю до антимікротрубочкових речовин, які використовуються як гербіциди: динітроаніліни, фосфороаміди і фенілкарбамати [Страшнюк и Блюм, 1993]. До недавнього часу серед вищих рослин були відомі лише мутанти *Eleusine indica*, які були стійкими до динітроанілінових гербіцидів; встановлено, що дана стійкість визначалась мутацією в одному із генів тубуліну [Vaughn & Vaughan, 1990; Vaughn et al., 1987; Waldin et al., 1992]. На початку 90-х років, використовуючи селекцію *in vitro*, були отримані мутанти *Nicotiana plumbaginifolia*, стійкі до аміпрофосметилу (АПМ) [Страшнюк и др., 1993; Blume et al., 1991, 1997] і трифлюраліну [Блюм и др., 1996; Blume et al., 1991] – гербіцидів фосфороамідного і динітроанілінового рядів з високою антимікротрубочковою активністю. У наступних дослідженнях шляхом соматичної гібридизації автори продемонстрували можливість перенесення ознак стійкості до АПМ і трифлюраліну від отриманих мутантів в інші види рослин родини Пасльонових



[Емец, 1996; Емец і др., 1996; Yemets et al., 1994]. На основі результатів цих досліджень було висунуто припущення, що стійкість отриманих мутантів *N. plumbaginifolia* до АПМ і трифлюраліну визначається мутацією(ями) в одному із генів тубуліну. Тому, пошук біохімічних доказів участі мутантного тубуліну у формуванні стійкості вищезгаданих рослин до антимікротрубочкових речовин є актуальним питанням. Вирішення цієї проблеми дозволить виділити і клонувати відповідні гени тубуліну та переносити їх у важливі сільськогосподарські рослини з метою підвищення їх стійкості до гербіцидів нового покоління.

**Мета і завдання дослідження.** Метою даної роботи є аналіз ролі  $\beta$ -тубуліну у формуванні стійкості мутантних рослин *Nicotiana plumbaginifolia* до дії речовин з антимікротрубочковою активністю – аміпрофосметилу і трифлюраліну – гербіцидів фосфоорамідного і динітроанілінового рядів. Згідно із поставленою метою, до конкретних завдань роботи входило:

- проведення порівняльного електрофоретичного аналізу ізоформ  $\alpha$ - і  $\beta$ -тубуліну у представників двох триб родини Пасльонових (*Atropa belladonna*; *Nicotiana sylvestris* і *N. plumbaginifolia*);
- порівняння спектру ізоформ тубуліну, виділеного із контрольних та стійких до АПМ і трифлюраліну рослин *N. plumbaginifolia*, з метою виявлення можливих змін в електрофоретичній рухливості даних білків;
- порівняння здатності тубуліну із контрольних та стійких рослин *N. plumbaginifolia* зв'язувати АПМ і трифлюралін;
- порівняння здатності тубуліну із контрольних та стійких рослин *N. plumbaginifolia* гідролізувати ГТФ в присутності АПМ і трифлюраліну;
- вивчити здатність тубуліну із стійких рослин *N. plumbaginifolia*, перехресно зв'язувати АПМ і трифлюралін, а також інші динітроанілінові гербіциди;
- провести електрофоретичний аналіз ізоформ тубуліну із гібридів стійких до АПМ (*N. plumbaginifolia* x *A. belladonna*) та трифлюраліну (*N. plumbaginifolia* x *N. sylvestris*) на наявність мутантних форм даного білку та порівняти здатність тубуліну із даних рослин зв'язувати АПМ і трифлюралін;
- вивчити здатність тубуліну із контрольних та стійких рослин *N. plumbaginifolia* зв'язувати АПМ і трифлюралін в присутності таксолу – сполуки, що стабілізує мікротрубочки.

**Наукова новизна.** Вперше проведений порівняльний електрофоретичний аналіз ізоформ тубуліну у представників двох триб родини Пасльонових: *A. belladonna*, *N. sylvestris* і *N. plumbaginifolia*. Виявлено, що на відміну від *N. sylvestris* і *N. plumbaginifolia*  $\alpha$ - і  $\beta$ -тубулін з рослин *A. belladonna* характеризуються вищою молекулярною масою і більш кислими значеннями рІ.

Встановлено, що стійкі до АПМ і трифлюораліну рослини *N. plumbaginifolia*, характеризуються наявністю мутантної ізоформи  $\beta$ -тубуліну, зі зміненим значенням  $pI$ , що може бути наслідком одиначної амінокислотної заміни в його поліпептидній послідовності. Показано, що наявність такої мутантної форми тубуліну приводить до зниження його здатності зв'язувати АПМ і трифлюоралін.

Встановлено, що в присутності антимікротрубочкових сполук, тубулін із стійких рослин активніше, порівняно з контролем, гідролізує ГТФ. Даний факт може бути ще одним доказом участі тубуліну у формуванні стійкості мікротрубочок мутантних рослин до АПМ і трифлюораліну. Показано, що стійкість соматичних гібридів *N. plumbaginifolia*  $\times$  *A. belladonna* та *N. plumbaginifolia*  $\times$  *N. sylvestris* до АПМ і трифлюораліну, визначається наявністю мутантної форми тубуліну, отриманої від однієї із батьківських форм – стійких до даних сполук рослин *N. plumbaginifolia*.

Таким чином, отримані результати свідчать на користь того, що зміни в структурі  $\beta$ -субодиниці тубуліну відіграють визначальну роль у формуванні стійкості рослин до речовин з антимікротрубочковою активністю.

**Практична цінність.** Запропоновано спектрофотометричний метод вивчення зв'язування тубуліну з антимікротрубочковими речовинами, який ґрунтується на порівнянні показників поглинання світла вільним білком і його комплексами з досліджуваними речовинами. Розроблений кількісний метод опосередкованої оцінки ефективності взаємодії мономерів  $\alpha$ - і  $\beta$ -тубуліну шляхом вимірювання змін у вмісті іонів водню (значенні рН середовища) при гідролізі ГТФ тубуліном. Використання даних методичних підходів відкриває ширші можливості для дослідження ефективності впливу різних речовин на мікротрубочки (наприклад для виявлення нових речовин з антимікротрубочковою активністю).

З'ясування ролі мутантного  $\beta$ -тубуліну в стійкості до фосфороамідів та динітроанілінів відкриває можливість виявлення і клонування гену, що кодує даний білок, з метою переносу його в інші рослинні організми.

Результати роботи використовуються при викладанні спецкурсу «Скелетні структури клітини і їх функції», а розроблені методичні прийоми використовуються під час проведення практичних занять з розділу «Методи виділення цитоскелетних структур» на кафедрі клітинної біології і генетичної інженерії Київського університету ім. Тараса Шевченка.

**Основні положення, які виносяться на захист.** На основі проведених досліджень і узагальнення літературних даних на захист виносяться наступні положення:

1. Рослини двох різних триб *N. plumbaginifolia*; *N. sylvestris* і *A. belladonna* характеризуються наявністю тубуліну з різною рухливістю ізоформ на двомірному електрофорезі. *A. belladonna* містить більш кислий як  $\alpha$ -, так і  $\beta$ -тубулін з більшою молекулярною масою, порівняно з аналогічними білками представників роду *Nicotiana*.

2. Тубулін, виділений з АПМ і трифлюралін-стійких рослин *N. plumbaginifolia*, має змінену, порівняно з тубуліном чутливих рослин, композицію ізоформ його  $\beta$ -субодиниці, про що свідчать зміни у рухливості цих ізоформ при двомірному електрофорезі в більш кислу область.

3. Наявність в складі тубуліну з АПМ- і трифлюралін-стійких рослин зміненої ізоформи його  $\beta$ -субодиниці приводить до того, що специфічне зв'язування цих речовин тубуліном із досліджуваних мутантів *N. plumbaginifolia* знижується більше ніж в два рази порівняно з аналогічним показником для контрольних рослин.

4. Антимікротрубочкові сполуки пригнічують гідроліз ГТФ тубуліном, необхідний для полімеризації мікротрубочок. Тубулін із рослин, стійких до даних сполук, в більшій мірі зберігає здатність до гідролізу ГТФ в присутності АПМ і трифлюраліну, порівняно з тубуліном із контрольних рослин.

5. Наявність тубуліну із АПМ- і трифлюралін-стійких рослин *N. plumbaginifolia* перехресної стійкості до даних сполук, а також стійкості до інших динітроанілінових гербіцидів з різною будовою, є доказом існування в цьому білку одного або декількох споріднених сайтів для зв'язування даних гербіцидів.

6. Алкалоїд, що стабілізує мікротрубочки – таксол – не впливає на швидкість гідролізу ГТФ тубуліном, що дозволяє припускати існування на молекулі даного білку різних сайтів зв'язування таксолу і досліджуваних гербіцидів.

7. Наявність мутантної форми тубуліну в соматичних гібридах, отриманих при використанні в якості одного з батьків мутантів, стійких до АПМ і трифлюраліну, забезпечує стійкість мікротрубочок цих гібридів до досліджуваних гербіцидів.

**Апробація роботи.** Результати дисертаційної роботи доповідались на II-му з'їзді Українського товариства фізіологів рослин (Київ, 1993), VIII-му (Ассізі, Італія, 1993) і X-му (Стокгольм, Швеція, 1995) Європейських цитоскелетних форумах, IV-му Європейському конгресі по клітинній біології (Прага, Чеська Республіка, 1994); Міжнародному симпозиумі «Біотехнологія і генетична інженерія рослин» (Київ, 1994), Міжнародному симпозиумі «Молекулярна біологія рослин і біотехнологія» (Нью-Делі, 1994), Міжнародному симпозиумі по бур'янах і

культурних рослинах, стійких до гербіцидів (Кордова, Іспанія, 1995), X-му Міжнародному конгресі по клітинній біології (Сан-Франціско, США, 1996).

**Публікації.** Основні положення дисертації викладені в 15 публікаціях.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів та їх обговорення, заключення, висновків та списку літератури, який містить 279 бібліографічних посилань. Робота викладена на 156 сторінках машинопису, і містить 1 таблицю та 17 рисунків.

### Матеріали і методи.

Як об'єкти дослідження в роботі були використані рослини *N. plumbaginifolia*, *N. sylvestris*, *A. belladonna*, мутантні лінії *N. plumbaginifolia*, стійкі до дії 5 мкМ АПМ [Blume et al., 1991; Strashnyuk et al., 1993] та *N. plumbaginifolia*, стійкі до дії 12 мкМ трифлюраліну [Blume et al., 1991b], а також гібридні лінії (NrAb-107,  $\gamma$ NN-9), отримані при використанні в якості батьківських форм АПМ і трифлюралін-стійкі рослини *N. plumbaginifolia* та нестійкі до цих речовин рослини *N. sylvestris* и *A. belladonna* [Емец, 1996].

Виділення і очистку тубуліну з мезофілу *N. plumbaginifolia* здійснювали за методом Мореджона і Фоскета [Morejohn & Fosket, 1986], із внесеними нами модифікаціями. Листя рослин розтирали в рідкому азоті і гомогенізували в буфері А (0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ ЕГТА, 1 мМ ДТТ, 2 мМ ГТФ, 50 мМ HEPES, 10 мкМ лейлептин, 10 мкМ пепстатин А, рН 6,8) для солюбілізації тубуліну. Гомогенат фільтрували і центрифугували при 13000 g на протязі 25 хв. при температурі 4 °С. Після цього розчин білку змішували в колбі з ДЕАЕ-сефадексом А-50, попередньо зрівноваженого буфером А. Суміш перемішували при 0—+4 °С на протязі 30 хв., деаерували і наносили на колонку (1,5x12 см) з ДЕАЕ-сефадексом А-50. Білок, який не зв'язався із смолою, змивали буфером А, який додатково містив 0,35 М KCl.

Елюцію зв'язаних білків проводили буфером А, який додатково містив 0,8 М KCl. Фракція, яка вимивалась останньою, містила приблизно 70% тубуліну. Тубулін із розчину осаджували 50%-ним насиченням (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub> на протязі 1,5 год і відділяли центрифугуванням. Після цього тубулін обезсолювали, пропускаючи через колонку, наповнену сефадексом G-25 (0,5x4 см) з необхідним (залежно від експерименту) буфером. Кількість білку в пробах визначали за методом Бредфорда [Bradford, 1976].

Двомірний гель-електрофорез проводили за методом О'Фаррелла [O'Farrell, 1975]. Для ізофокусування використовували амфоліни з діапазоном рН 4-6. Перенос білків з гелю на нітроцелюлозу здійснювали або шляхом

електропереносу [Towbin et al., 1979], або за допомогою методу пасивного переносу [Albaugh et al., 1987]. Якість перенесення білків контролювали забарвленням нітроцелюлозної мембрани амідочорним [Wojtkowiak et al., 1983]. Імуноблоттинг тубуліну проводили за методом Тоубіна та ін. [Towbin et al., 1979], використовуючи мишині антитіла TU-01 проти  $\alpha$ -тубуліну і TU-06 проти  $\beta$ -тубуліну, а також вторинні козячі антитіла (проти мишиних Ig G) з ковалентно зв'язаною лужною фосфатазою. Фарбування білків колоїдним сріблом проводили за методом Драбера і ін. [Draber et al., 1991].

Для вивчення зв'язування тубуліну із сполуками з антимікротрубочковою активністю отримували комплекси даних речовин із тубуліном на ДЕАЕ-сефарозі [Borisy, 1972; Hugdahl & Morejohn, 1993; Morejohn et al., 1987]. В розчинному білковому екстракті визначали загальний вміст білку і вміст тубуліну. Буфер виділення А додатково містив 2%-ний розчин ДМСО [Hugdahl & Morejohn, 1993; Murthy et al., 1994]. Зразки розділяли на дві рівні частини. В одну з них, для утворення комплексу між тубуліном і антимікротрубочковим агентом, додавали 20 мМ розчин АПМ або трифлораліну в ДМСО і витримували протягом 20 хв. В другу контрольну частину вносили однакову кількість розчинника (ДМСО). Отримані комплекси, а також контрольні зразки наносили на колонку з ДЕАЕ-сефарозою для виділення тубуліну. Вивчення рівня зв'язування відповідного ліганду з тубуліном вимірювали спектроскопічно.

Для вивчення ГТФ-азної активності тубуліну розчин даного білку діалізували проти буферу D (5 мМ PIPES, pH 6,8, 0,5 мМ  $MgCl_2$ , 0,1 мМ EGTA, 0,2 мМ ДТТ, 5 мМ ГТФ, 2% ДМСО) [Hugdahl & Morejohn, 1993; Murthy et al., 1994]. Загальний вміст білку доводили до концентрації 0,1 мг/мл. Після цього відбирали аліквоти розчинів тубуліну і поміщали в кювети для вимірювання значення pH. В розчини добавляли різні концентрації АПМ і трифлораліну, або відповідну кількість ДМСО для контролю. Для перерахунку  $\Delta pH$  в показник накопичення нерганічного фосфату використовували калібровочну криву. Всі експерименти проводили в інтервалі pH 6,7-6,9.

Статистичну обробку отриманих результатів та регресійний аналіз проводили на комп'ютері, використовуючи стандартний пакет програм SigmaPlot.

## РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Електрофоретичний аналіз тубуліну у представників родини Пасльонових, АПМ- і трифлюралін-стійких ліній *N. plumbaginifolia* та їх гібридів

Аналіз тубуліну із дикого типу *N. plumbaginifolia* (рис. 1а) показав, що його  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниці характеризуються подібною рухливістю при електрофоретичному розділенні, що є наслідком близьких значень їх молекулярних мас і незначних відмінностей в ізоелектричних точках. Порівняно з  $\alpha$ -субодиницею  $\beta$ -субодиниця тубуліну цих рослин має дещо більшу молекулярну масу і більш кислу ізоелектричну точку, що є характерним для більшості рослин [Fosket, 1992].

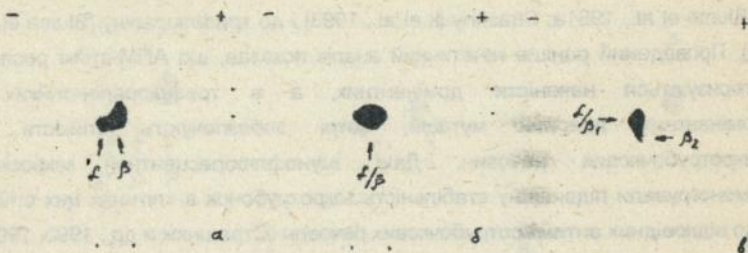


Рис. 1. Результати електрофоретичного аналізу тубуліну, виділеного із *N. plumbaginifolia* (а), *N. sylvestris* (б) і *A. belladonna* (в):  $\alpha$  – ізоформи  $\alpha$ -субодиниці тубуліну;  $\beta$  - ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ) – ізоформи  $\beta$ -субодиниці тубуліну.

Із представленої на рис. 1б електрофореграми видно, що тубулін *N. sylvestris*, на відміну від тубуліну *N. plumbaginifolia*, характеризується практично однаковою рухливістю обох тубулінів і ізоформ, що їх утворюють. Це свідчить про деякі відмінності між тубулінами цих двох видів тютюну. Тубулін, виділений з представника іншої триби родини Пасльонових – *A. belladonna* (рис. 1в); характеризується ще більшими відмінностями в рухливості обох субодиниць, порівняно з описаними вище рослинами роду *Nicotiana*. Так,  $\alpha$ -тубулін белладонни звичайної має приблизно на 2 кД більшу молекулярну масу і більш кислу ізоелектричну точку, ніж  $\alpha$ -тубулін *Nicotiana*.  $\beta$ -Тубулін белладонни звичайної на електрофореграмі (рис. 1в) представлений двома білковими

плямами з однаковими ізоелектричними точками, але з різними молекулярними масами. Одна пляма ( $\beta_1$ ) значно домінує і перекривається з місцезнаходженням  $\alpha$ -тубуліну. Друга пляма ( $\beta_2$ ) представлена відносно невеликою кількістю білка і містить тубулін, молекулярна маса якого приблизно на 2 кД менша, ніж у  $\beta_1$ -ізоформи, і дорівнює молекулярній масі ізоформ  $\beta$ -тубуліну із *N. plumbaginifolia* і *N. sylvestris* (рис. 1а,б). В той же час  $\beta$ -тубуліни обох досліджуваних видів потюнів характеризуються більш лужними ізоелектричними точками.

Таким чином показано, що, не дивлячись на еволюційну близькість видів *N. plumbaginifolia*, *N. sylvestris* і *A. belladonna*, субодиниці тубулінів, виділених із цих рослин, характеризуються різною рухливістю на двомірному електрофорезі, що свідчить про відмінності в їх будові, і, відповідно, фізико-хімічних характеристиках.

Наступним етапом даної роботи було вивчення можливих змін в електрофоретичній рухливості тубуліну з рослин *N. plumbaginifolia*, стійких до АПМ [Blume et al., 1991a; Strashnyuk et al., 1993] і до трифлюораліну [Blume et al., 1991b]. Проведений раніше генетичний аналіз показав, що АПМ-стійкі рослини характеризуються наявністю домінантних, а в трифлюоралін-стійких – семідомінантних ядерних мутацій, котрі забезпечують стійкість до антимікротрубочкових речовин. Дані імунофлюоресцентної мікроскопії продемонстрували підвищену стабільність мікротрубочок в клітинах цих стійких ліній до відповідних антимікротрубочкових речовин [Страшнюк и др., 1993, 1996].

Результати аналізу тубуліну із АПМ-стійких рослин *N. plumbaginifolia* продемонстрували наявність змін в рухливості частини  $\beta$ -тубуліну (рис. 2г ( $\beta_2$ )), які характеризуються зміщенням її ізоелектричної точки в більш кислу область (крапками вказані орієнтири). Рухливість однієї мінорної ізоформи  $\beta$ -тубуліну ( $\beta_1$ ) залишалась без змін і була такою ж, як і у контрольних рослин. Ці дані свідчать про те, що в  $\beta_2$ -ізоформах тубуліну із АПМ-стійких рослин відбулись зміни, можливо лише на рівні однієї або декількох амінокислот.

На рис 2ж представлені результати аналізу тубуліну, виділеного з трифлюоралін-стійких рослин *N. plumbaginifolia*.  $\alpha$ -Субодиниця тубуліну представлена однією ізоформою (ідентичної до такої ж ізоформи із контрольних рослин), в той час як  $\beta$ -субодиниця представлена двома ізоформами.  $\beta_1$ -ізоформа тубуліну із трифлюоралін-стійких рослин характеризується такою ж рухливістю, як і всі ізоформи  $\beta$ -тубуліну із контрольної лінії *N. plumbaginifolia*, в той час як  $\beta_2$ -ізоформа характеризується більш кислим значенням рІ і володіє рухливістю, подібною до рухливості  $\beta_2$ -тубуліну із АПМ-стійких мутантів.

Наявність мутантного  $\beta$ -тубуліну було досліджено і в інших, стійких до різних антимікротрубочкових речовин, видів [Страшнюк и Блюм, 1993]. Таким

чином, отримані результати підтверджують раніше висунуте припущення, що можливо основною причиною підвищення стійкості ліній *N. plumbaginifolia* до АПМ і трифлюораліну є зміни в структурі їх  $\beta$ -тубуліну.

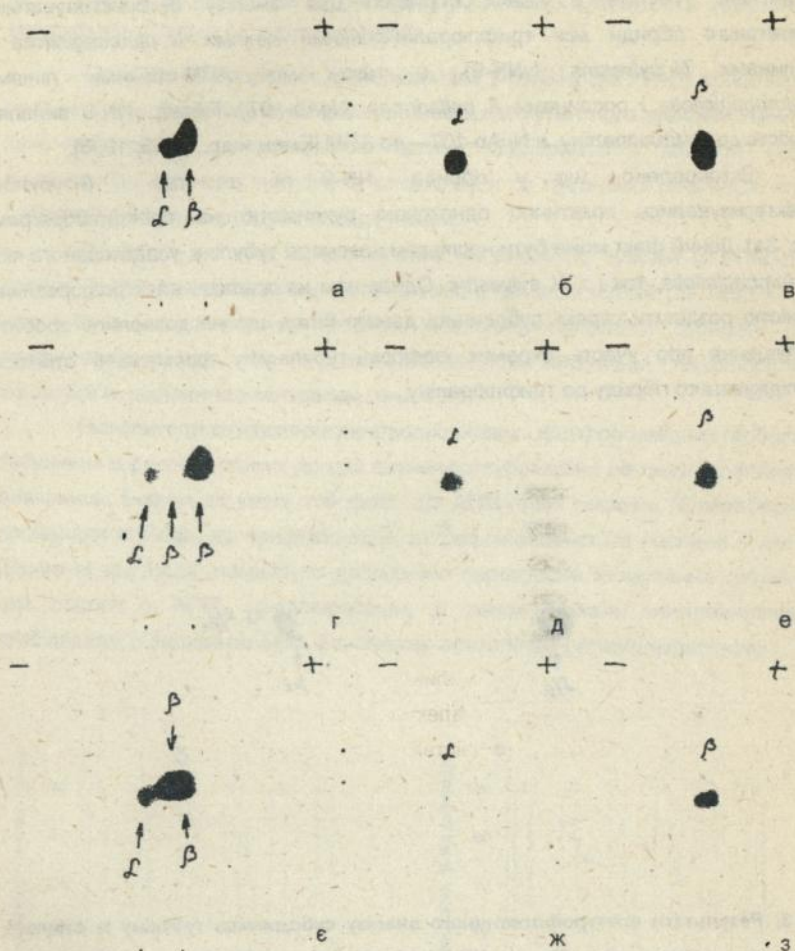


Рис. 2. Результати електрофоретичного аналізу та імуноблотинг субодиниць тубуліну із контрольних рослин *N. plumbaginifolia* (а, б, в) та рослин, стійких до АПМ (г, д, е) і трифлюораліну (є, ж, з): а, г, є – електрофореграми субодиниць тубуліну; в, д, ж – імуноблотинг  $\alpha$ -субодиниць тубуліну; в, е, з – імуноблотинг  $\beta$ -субодиниць тубуліну;  $\alpha$  –  $\alpha$ -субодиниці тубуліну;  $\beta$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  –  $\beta$ -субодиниці тубуліну;

Оскільки досліджувані мутантні лінії *N. plumbaginifolia* були використані для одержання соматичних гібридів із нестійкими рослинами *N. sylvestris* і *A. belladonna*, наступним етапом досліджень було визначення наявності мутантного тубуліну в даних гібридах. Для аналізу використовувались асиметричні гібриди між трифлюоралін-стійкими лініями *N. plumbaginifolia* і рослинами *N. sylvestris* ( $\gamma$ NN-9), а також між АПМ-стійкими лініями *N. plumbaginifolia* і рослинами *A. belladonna* (№Ab-107). Гібрид  $\gamma$ NN-9 виявляє стійкість до трифлюораліну, а №Ab-107 – до АПМ [Емец і др., 1995, 1996].

Встановлено, що у гібрида  $\gamma$ NN-9 як  $\alpha$ -, так і  $\beta$ -тубуліни характеризувались практично однаковою рухливістю на електрофореграмі (рис. 3а). Даний факт може бути наслідком наявності тубуліну, успадкованого як з *N. plumbaginifolia*, так і з *N. sylvestris*. Однак нам не вдалось електрофоретично повністю розділити окремі субодиниці даного білку, що не дозволило зробити припущення про участь окремих ізоформ тубуліну у формуванні стійкості досліджуваного гібриду до трифлюораліну.

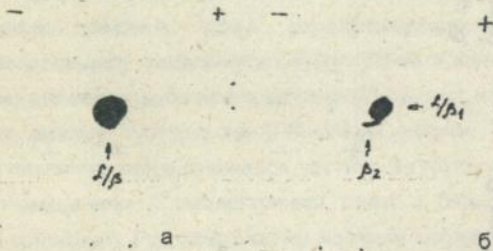


Рис. 3. Результати електрофоретичного аналізу субодиниць тубуліну із стійкого до трифлюораліну гібрида  $\gamma$ NN-9 (а) і стійкого до АПМ гібрида №Ab-107 (б):  $\alpha$  – ізоформи  $\alpha$ -субодиниці тубуліну;  $\beta$ , ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ) – ізоформи  $\beta$ -субодиниці тубуліну

Аналіз ізоформ тубуліну із гібрида №Ab-107 показав, що поряд з усіма ізоформами, притаманними белладонні звичайній, у даного гібрида присутня додаткова ізоформа ( $\beta_2$ ) тубуліну із такою ж молекулярною масою та ізоелектричною точкою, як і у мутантної форми  $\beta$ -тубуліну із АПМ-стійкої лінії

*N. plumbaginifolia* (рис. 36). На нашу думку, це є доказом експресії в геномі гібридної рослини гену  $\beta$ -тубуліну із *N. plumbaginifolia*.

## 2. Оцінка зв'язування антимікротрубочкових речовин з тубуліном із мутантних рослин *N. plumbaginifolia*

Оскільки в попередніх експериментах у стійких до АПМ і трифлюраліну рослин *N. plumbaginifolia* були виявлені ізоформи мутантного тубуліну, нами було здійснено спробу за допомогою прямих експериментів виявити можливі відмінності в здатності тубуліну із контрольних та мутантних рослин зв'язувати досліджувані антимікротрубочкові речовини.

Як видно з даних, представлених на рис. 4.1а, тубулін із АПМ-стійких рослин *N. plumbaginifolia* зв'язував приблизно в три рази менше ( $37,1 \pm 9,8\%$ ) АПМ, ніж тубулін із контрольних рослин. Аналогічні показники отримані і для трифлюралін-стійкої лінії *N. plumbaginifolia* при зв'язуванні трифлюраліну -  $45,3 \pm 10,9\%$ , порівняно з контролем (рис. 4.2б).

Особливості зв'язування динітроанілінових і фосфороамідних гербіцидів з тубуліном із рослин, стійких до цих антимікротрубочкових речовин, практично не вивчались. Беручи до уваги той факт, що АПМ-стійкі рослини *N. plumbaginifolia* проявляли стійкість до трифлюраліну, а трифлюралін-стійкі рослини – до АПМ [Blume et al., 1993], нами було досліджено перехресне зв'язування тубулінів із цих рослин з АПМ, трифлюраліном, а також іншими динітроаніліновими гербіцидами (пендиметаліном, бенефіном, оризаліном і еталфлюраліном).

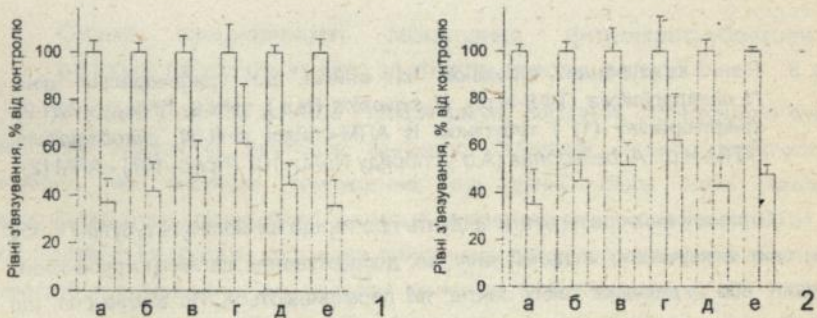


Рис. 4 Рівні зв'язування тубуліном із контрольної (ліві колонки), а також АПМ- (1, праві колонки) і трифлюралін-стійких (2, праві колонки) ліній *N. plumbaginifolia* ліній аміпрофосметилу (а), трифлюраліну (б), пендиметаліну (в), бенефіну (г), оризаліну (д), і еталфлюраліну (е)

Як видно з даних, представлених на рис. 4.1, тубулін, виділений із АПМ-стійкої лінії *N. plumbaginifolia*, характеризувався зниженою здатністю зв'язувати усі досліджувані динітроанілінові гербіциди. Рівень зв'язування тубуліну із АПМ-стійких рослин з трифлюраліном складав лише  $42 \pm 12\%$ , пендиметаліном –  $48,2 \pm 14,6\%$ , бенефіном –  $59,6 \pm 27,7\%$ , оризаліном –  $44,8 \pm 9,3\%$ , а еталтрифлюраліном –  $36,4 \pm 10,7\%$  від аналогічного показника для тубуліну із контрольних рослин *N. plumbaginifolia*. Аналогічні дані були отримані і для тубуліну, виділеного із трифлюралін-стійких рослин *N. plumbaginifolia* (рис. 4.2). Рівень зв'язування тубуліну із даних рослин, складав для АПМ –  $35 \pm 15\%$ , пендиметаліну –  $48 \pm 9\%$ , бенефіну –  $60 \pm 20\%$ , оризаліном –  $45 \pm 12\%$ , еталтрифлюраліном –  $36 \pm 4\%$  від аналогічного показника для тубуліну із контрольних рослин.

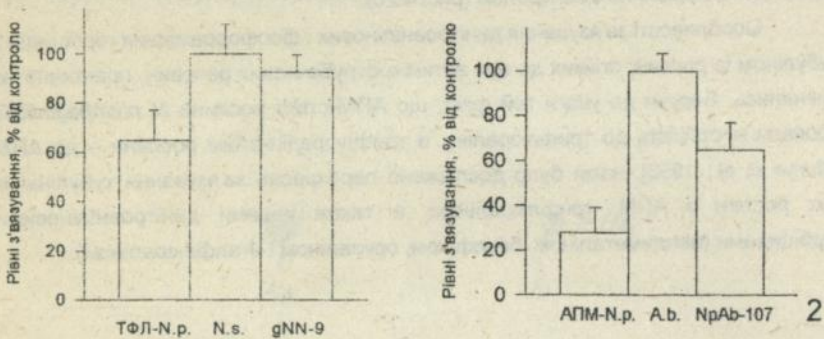


Рис. 5. Рівні зв'язування тубуліном із стійкої до трифлюраліну лінії *N. plumbaginifolia* (ТФЛ-N.p.), *N. sylvestris* (N.s.),  $\gamma$ NN-9, гібриду ( $\gamma$ NN-9) трифлюраліну (1) і тубуліном із АПМ-стійкої лінії *N. plumbaginifolia* (АПМ-N.p.), *A. belladonna* (A.b.) і гібриду NpAb-107 (NpAb-107) - АПМ (2)

Отримані нами результати свідчать про те, що на молекулі тубуліну є або один сайт зв'язування, спільний для усіх досліджуваних антимікротрубочкових речовин, або ж декілька таких сайтів, які перекриваються. Не виключено, що мутації в молекулах тубуліну в стійких рослинах зачепили сайти зв'язування цих речовин. Цим можна пояснити той факт, що стійкість рослин до одного гербіциду з високою долею ймовірності проявляється і по відношенню до інших досліджуваних гербіцидів.

Гібридні лінії  $\gamma$ NN-9 і NrAb-107 також були використані для вивчення ролі присутнього в них мутантного  $\beta$ -тубуліну у формуванні стійкості до даних антимікротрубочкових речовин. Показано, що рівень зв'язування трифлюораліну з тубуліном із рослин *N. plumbaginifolia*, стійких до даного гербіциду, становить  $64,6 \pm 10,9\%$  від аналогічного показника для дикого типу *N. sylvestris*. В асиметричному гібриді між двома цими видами рослин ( $\gamma$ NN-9) із переважаючим каріотипом *N. sylvestris* [Емец, 1996] присутній тубулін, рівень зв'язування якого із трифлюораліном становить  $87,8 \pm 7,4\%$  від аналогічного показника для *N. sylvestris* (рис. 5.1).

Рівень зв'язування АПМ з тубуліном, виділеним з АПМ-стійкої лінії *N. plumbaginifolia*, становив  $28,0 \pm 9,6\%$  від аналогічного показника для тубуліну, виділеного із дикого типу *A. belladonna* (рис. 5.2). В гібриді між даними видами рослин (NrAb-107) приблизно половина від усього тубуліну відповідає  $\beta$ -тубуліну з АПМ-стійкої лінії *N. plumbaginifolia*, а решту – тубуліну із *A. belladonna* (рис. 3б). Рівень зв'язування АПМ з тубуліном із гібриду NrAb-107 становив  $64,6 \pm 11,1\%$  від аналогічного показника для тубуліну, виділеного із дикого типу *A. belladonna*.

Таким чином нами показано, що в формуванні стійкості досліджуваних рослин до фосфороамідних і динітроанілінових гербіцидів приймає участь  $\beta$ -субодиниця тубуліну. Дана субодиниця містить принаймі один спільний сайт (або декілька сайтів, що перекриваються) зв'язування із даними гербіцидами. Принаймі деякі мутації (мутація) в даному сайті можуть приводити до зниження у зв'язуванні тубуліном антимікротрубочкових речовин, що, однак, не позначається на його здатності виконувати основні функції.

### 3. Оцінка специфічності зв'язування антимікротрубочкових речовин тубуліном за його здатністю гідролізувати ГТФ

Оскільки у стійких до АПМ і трифлюораліну рослин *N. plumbaginifolia* був виявлений тубулін із зниженою здатністю зв'язувати антимікротрубочкові речовини, ми висунули припущення, що даний білок може також характеризуватись і підвищеною здатністю до полімеризації в присутності АПМ і трифлюораліну. Взаємодія субодиниць тубуліну між собою в процесі полімеризації мікротрубочок приводить до гідролізу молекули ГТФ [Fontalda et al., 1993]. Енергія, що при цьому виділяється йде на підтримку даної реакції, а неорганічний фосфат, який при цьому накопичується, закислює середовище. Антимікротрубочкові речовини пригнічують полімеризацію мікротрубочок, що приводить до зменшення кількості елементарних актів взаємодії мономерів тубуліну між собою і знижує ГТФ-азну активність даного білку [David-Pfeuty et al.,

1979; Hamel, 1985]. Не виключено, що рослини, які містять тубулін із зниженою спорідненістю до антимікротрубочкових речовин, можуть містити мікротрубочками з підвищеною здатністю до полімеризації в присутності цих речовин, а значить і підвищеною ГТФ-азною активністю.

Нами запропонована методика кількотної оцінки елементарних актів взаємодії між молекулами тубуліну, які відбуваються в процесі полімеризації мікротрубочок, за ступенем заокиснення середовища (внаслідок накопичення неорганічного фосфату [Fontalida et al., 1993]). Для перевірки запропонованої методики ми дослідили вплив вінбластину, алкалоїду з антимікротрубочковою активністю, на на ГТФ-азну активність тубуліну з усіх досліджуваних ліній *N. plumbaginifolia*. Нами не було виявлено достовірної різниці між ГТФ-азними активностями тубулінів із контрольних та стійких до АПМ і трифлюораліну рослин *N. plumbaginifolia* в присутності вінбластину. Внесення вінбластину в концентрації 500 мкМ знижує швидкість гідролізу ГТФ тубуліном з усіх досліджуваних ліній *N. plumbaginifolia* майже в два рази і становить приблизно 55% від аналогічного показника у відсутності вінбластину.

На рис. 6а представлені показники рівнів гідролізу ГТФ тубулінами із контрольних та стійких до АПМ рослин *N. plumbaginifolia* в залежності від концентрації АПМ через 2 год. інкубації. Як видно з представлених результатів, існує чітка залежність рівня гідролізу ГТФ тубуліном від концентрації гербіциду. ГТФ-азна активність тубуліну із АПМ-стійких рослин (рис. 6а, 2) в значно меншій мірі піддається інгубуючому впливу АПМ, ніж ГТФ-азна активність тубуліну із контрольних рослин (рис. 6а, 1). Можна зробити висновок, що АПМ істотно пригнічує полімеризацію тубуліну, однак полімеризація тубуліну із стійких до АПМ рослин в меншій мірі піддається такому впливу.

Подібні результати були отримані і при дослідженні ГТФ-азної активності тубуліну із трифлюоралін-стійких рослин *N. plumbaginifolia* в присутності трифлюораліну (рис. 6б). Тобто трифлюоралін, як і АПМ, здатний інгібувати гідроліз ГТФ. Оскільки характеристики пригнічення гідролізу ГТФ тубулінами були подібними і для трифлюораліну, і для АПМ, можна допустити, що ці гербіциди, не дивлячись на різницю в будові їх молекул, характеризуються приблизно однаковим впливом на полімеризацію тубуліну.

Як показано на рис. 6в, в присутності АПМ тубулін із трифлюоралін-стійких рослин *N. plumbaginifolia* гідролізував ГТФ з такою ж швидкістю, як і в присутності трифлюораліну. Відповідно в присутності трифлюораліну швидкість гідролізу ГТФ тубуліном із АПМ-стійких рослин була такою ж, як і в присутності АПМ (рис. 6г).

Заключним етапом даної роботи було вивчення впливу таксолу на інгібування АПМ і трифлюораліном ГТФ-азної активності тубуліну із контрольних і

стійких до даних гербіцидів рослин *N. plumbaginifolia*. Таксол є алкалоїдом, який стабілізує мікротрубочки, тобто його дія на мікротрубочки є протилежною дії АПМ і трифлюраліну [Falconer & Seagull, 1986]. Таксол потенційно міг би мати близький з деякими антимікротрубочковими сполуками сайт зв'язування, однак даний факт не доказаний. Існують лише непрямі докази існування такого сайту лише для колхіцину [Perez-Ramirez & Timasheff, 1994].

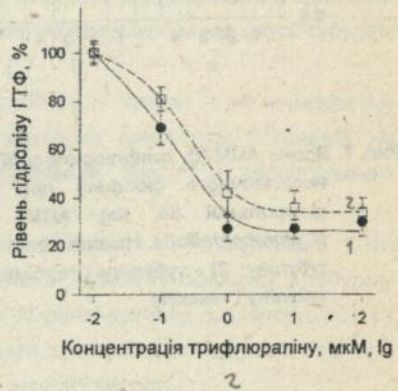
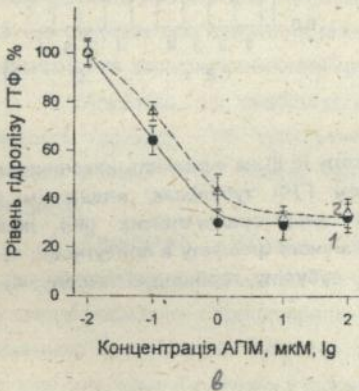
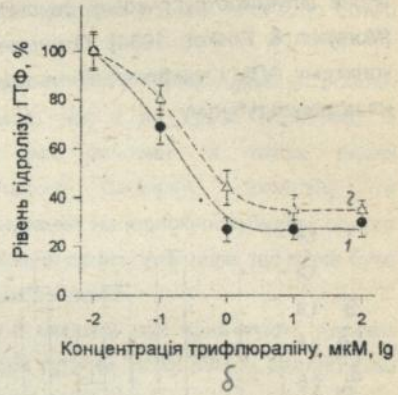
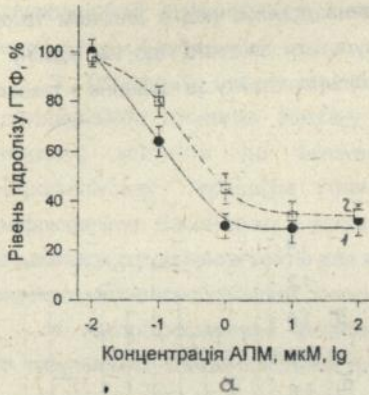


Рис. 6 Залежність рівнів гідролізу ГТФ тубуліном із контрольних (1), і стійких до АПМ (а2, г2) і трифлюраліну (б2, в2) рослин *N. plumbaginifolia* в залежності від концентрації АПМ (а, в) і трифлюраліну (б, г).

Як представлено на рис. 7, в присутності 10 мкМ таксолу швидкість гідролізу ГТФ тубуліном із контрольних і стійких рослин не змінюється. Також не

спостерігалось змін у швидкості гідролізу ГТФ тубуліном із усіх досліджуваних ліній в присутності одночасно 10 мкМ таксолу та 1 мкМ АПМ (I) або 1 мкМ трифлюраліну (II). Тобто можна зробити висновок, що таксол не впливає на ГТФ-азну активність тубуліну із жодної досліджуваної лінії.

На сьогоднішній день немає єдиної думки щодо існування конкурентного зв'язування з окремими молекулами тубуліну (чи з цілісними мікротрубочками) таксолу і антими́кротрубочкових сполук. Відомо, лише, що *in vitro* фізіологічний вплив антими́кротрубочкових речовин значно домінує над з впливом таксолу [Morejohn & Fosket, 1984]. Отримані результати свідчать, що на відміну від колхіцину, АПМ і трифлюралін не мають спільного сайту зв'язування з таксомом на молекулі тубуліну.

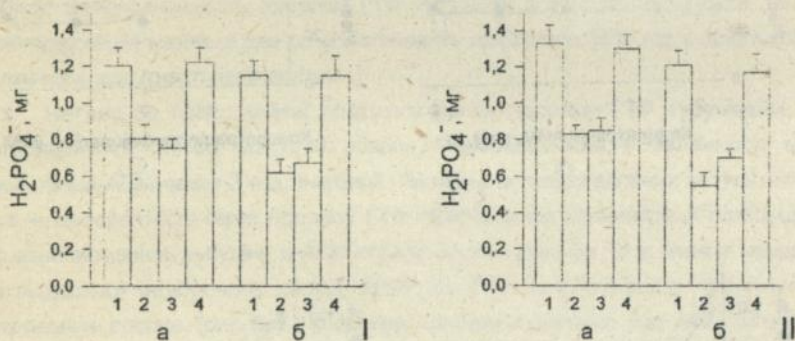


Рис. 7. Вплив АПМ (I), трифлюраліну (II) і таксолу (I, II) на швидкість накопичення неорганічного фосфату при гідролізі ГТФ тубуліном, виділеним із контрольної (Ia, IIa), АПМ- (Iб) і трифлюралін-стійких (IIб) ліній *N. plumbaginifolia*. Накопичення неорганічного фосфату в присутності: 1) - тубуліну; 2) - тубуліну і гербіциду; 3) - тубуліну, гербіциду і таксолу; 4) - тубуліну і таксолу.

## ВИСНОВКИ

1. Тубуліни представників двох різних триб родини Пасльонових *Nicotiana plumbaginifolia*; *N. sylvestris* та *Atropa belladonna* характеризуються різною рухливістю при двомірному електрофорезі, що свідчить про наявність відмінностей у будові цих білків.

2. Тубуліни, виділені із аміпрофосметил- і трифлюралін-стійких рослин *N. plumbaginifolia*, відрізняються від тубулінів чутливих рослин наявністю більш кислих ізоформ  $\beta$ -субодиниці.

3. Тубулін із стійких до аміпрофосметилу і трифлюраліну рослин *N. plumbaginifolia* проявляє знижену (більше, ніж в два рази порівняно із контролем) здатність до зв'язування цих речовин, а також інших динітроанілінових гербіцидів (пендіменаліну, бенефіну, оризаліну та еталфлюраліну). Даний факт є доказом існування на молекулі тубуліну одного або декількох споріднених сайтів для зв'язування даних гербіцидів, що може бути причиною перехресної стійкості рослин до цих речовин.

4. Аміпрофосметил і трифлюралін в меншій мірі пригнічують гідроліз ГТФ тубуліном із стійких до даних гербіцидів рослин, порівняно із аналогічним показником для тубуліну із дикого типу *N. plumbaginifolia*.

5. Вінбластин пригнічує ГТФазну активність тубуліну із контрольних та стійких до аміпрофосметилу і трифлюраліну рослин *N. plumbaginifolia* в однаковій мірі, що свідчить про існування різних сайтів зв'язування на молекулі тубуліну вінбластину та досліджуваних гербіцидів.

6. Алкалоїд, що стабілізує мікротрубочки – таксол – не впливає на швидкість гідролізу ГТФ тубуліном, що дозволяє припустити існування на молекулі даного білку різних сайтів зв'язування таксолу і досліджуваних гербіцидів.

7. Соматичні гібриди (*N. plumbaginifolia* x *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia* x *A. belladonna*), які успадкували мутантну ізоформу  $\beta$ -тубуліну від аміпрофосметил- і трифлюралін-стійких *N. plumbaginifolia*, характеризуються зниженою здатністю їх тубулінів зв'язувати ці гербіциди, що свідчить про ключову роль саме  $\beta$ -тубуліну у формуванні данної стійкості.

## СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Блюм Я.Б., Страшнюк Н.М., Смертенко А.П., Солодушко В.Г., академик НАН України Глеба Ю.Ю. Изменения  $\beta$ -тубулина обеспечивают устойчивость к трифлуралину мутантов *Nicotiana plumbaginifolia*, полученных *in vitro* // Доп. НАН України, - 1996, - №7, сс.132-137.

2. Емец А.И., Солодушко В.Г., Кундельчук О.П., Блюм Я.Б., Глеба Ю.Ю. Соматические гибриды высших растений с использованием амипрофосметил-устойчивого мутанта *Nicotiana plumbaginifolia* // Генетика. - 1996. - Т.32, № 8. - сс.1104-1111.

3. Yemets A.I., Smertenko A.P., Solodushko V.G., Kundel'chuk O.P., Blume Ya.B. Asymmetric somatic hybrids with mutant  $\beta$ -tubulin resistant to amiprofosmethyl // Proc. of Int. Symp. "Plant Mol. Biol. & Biotech." Narosa Publishing House, New Delhi, India, - 1997, - p. 220-234.

4. Blume Ya.B., Kundel'chuk O.P., Solodushko V.G., Sulimenko V.V., Yemets A.I. Asymmetric somatic hybrids of higher plants resistant to trifluralin. // Proc. of Int. Symp. on Weed & Crop Resistance to Herbicides, Cordoba, Spain, -1995, - p.182-185.

5. Емец А.И., Смертенко А.П. Солодушко В.Г., Кундельчук О.П., Рудас В.А., Блюм Я.Б. Получение  $\gamma$ -гибридов высших растений с мутантным  $\beta$ -тубулином // Докл. Академии наук. Россия, 1997, в печати.

6. Солодушко В. Г., Блюм Я. Б. Сниженное сродство тубулина к амипрофосметилу и трифлуралину у мутантов *N. plumbaginifolia* с устойчивостью к этим соединениям // Доп. НАН України, - 1997, в печати.

7. Blume Ya. B., Solodushko V. G., Linhartova I., Viklicky V. *Nicotiana plumbaginifolia* mutants resistant to amiprofosmethyl or trifluralin have an altered subunit of  $\beta$ -tubulin // Abstr. of Eight Annual Meeting of the European Cytoskeletal Forum (September 12-16, 1993, Assisi, Italy), p. 47.

8. Страшнюк Н.М., Емец А.И., Солодушко В.Г., Смертенко А.П., Блюм Я.Б. Отримання соматичних гібридів з використанням мутантів по тубуліну для вивчення особливостей функціонування цитоскелету в гібридних клітинах. II-й з'їзд Укр. товариства фізіологів рослин // Тези доповідей. т. II. Київ, 1993, с. 90-91.

9. Yemets A.I., Solodushko V.G. Kundelchuk O.P., A.P. Smertenko, Blume Ya.B. Somatic hybrids with mutant tubulin // Abstr. of Int. Symp. "Plant Biotech. & Genet. Engineering" (Kiev, Ukraine, October 3-6, 1994), p.71.

10. Blume Ya.B., Yemets A.I., Kundelchuk O.P., Solodushko V.G. Asymmetric somatic hybrids of higher plants with mutant tubulin. // Abstr. of Int. Symp. "Plant Mol. Biol. & Biotech." (New Delhi, December 14-17, 1994), p. 58.

11. Yemets A.I., Rudas V.A., Smertenko A.P., Solodushko V.G., Blume Ya.B., Producing of plant somatic hybrids with resistance to amiprophosméthyl. // Abstr. of Int. Symp. on Weed & Crop Resistance to Herbicides (3-6 April 1995, Cordoba, Spain), p.159.

12. Kundelchuk O.P., Solodushko V.G., Yemets A.I., Blume Ya.B. Asymmetric somatic hybrids of higher plant resistant to trifluralin // Abstr. of Int. Symp. on Weed & Crop Resistance to Herbicides (3-6 April 1995, Cordoba, Spain), p.177.

13. Solodushko V.G., Blume Ya.B. Peculiarities of tubulin property to hydrolyze GTP in the presence of antimicrotubule substance // Abstr. of 10th European Cytoskeletal Forum (Stockholm, Sweden, 27-31 May, 1995), p.63.

14. Yemets A.I., Solodushko V.G., Smertenko A.P., Kundelchuk O.P., Blume Ya.B. Antimicrotubular drug-resistant plants & their somatic hybrids with mutant  $\beta$ -tubulin // Abstr. of 10th European Cytoskeletal Forum (Stockholm, Sweden, 27-31 May, 1995), p.71.

15. Solodushko V.G., Kovalenko N.V., Yemets A.I., Blume Ya.B. Expression of mutant tubulin with decreased affinity to amiprophos-methyl in heterological plant cell // Abstr. of the 6th Int. Congress on Cell Biology and 36th American Society for Cell Biology Annual Meeting (San Francisco, California, December 7-11, 1996), p. 46a

Solodushko V.G. Role of  $\beta$ -tubulin in *Nicotiana plumbaginifolia* mutant plants resistance to the influence of some antimicrotubule agents.

Scientific Degree Candidate of Biological Sciences Thesis; speciality 03.00.04 - Biochemistry. Institute of Cell Biology & Genetic Engineering, National Academy of Sciences of the Ukraine, Kyiv, 1997.

The results of 15 scientific publications are defended.

It was shown the APM- & trifluralin-resistant mutant lines of *Nicotiana plumbaginifolia* had  $\beta$ -tubulin with more acid pI as compared to  $\beta$ -tubulin of susceptible plants. Using spectroscopic methods we have discovered that the APM-, trifluralin-resistant plants had tubulin with about 3 times decreased affinity to APM, trifluralin, pendimethaline, benepherine, orizaline & ethalfluraline. Hybrid plants, that expressed  $\beta$ -tubulin of resistant plants & possessed resistance to these compounds, had tubulin with average affinity as compared to tubulin of the parents. We showed that tubulin from different resistant plants saved increased ability to hydrolyse GTP in the presence of these compounds as compared to this protein from control line. The

results obtained indicate that  $\beta$ -tubulin is involved in acquirement of resistance of higher plants to investigated antimicrotubule agents

Солодушко В.Г. Роль  $\beta$ -тубулина в устойчивости мутантных линий растений *Nicotiana plumbaginifolia* к действию соединений с антимикротрубочковой активностью.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия, Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 1996.

Защищается 15 научных работ по теме диссертации, в которых было показано, что устойчивые к амипрофосметилу (АПМ) и трифлюралу растения *N. plumbaginifolia* имели  $\beta$ -субъединицу тубулина с более кислой изоэлектрической точкой по сравнению с  $\beta$ -тубулином чувствительных растений. Используя спектроскопические методы исследований было установлено, что АПМ- и трифлюралин-устойчивые растения имели тубулин с пониженным сродством к АПМ, трифлюралу, пендиметалину, бенефину, оризалину и эталфлюралу. Гибридные растения, экспрессирующие  $\beta$ -тубулин устойчивых родителей и проявляющие устойчивость к данным соединениям, имели также пониженное сродство тубулина к ним. Экспериментально продемонстрировано, что тубулин, выделенный из всех исследуемых устойчивых растений в отличие от тубулина чувствительной линии, сохранял повышенную способность к гидролизу ГТФ в присутствии антимикротрубочковых веществ. Результаты работы свидетельствуют о причастности  $\beta$ -тубулина в формировании устойчивости высших растений к исследуемым антимикротрубочковым агентам.

Ключові слова: рослини, мікротрубочки, тубулін, мутації, ізоформи, антимікротрубочкові сполуки, стійкість, гідроліз ГТФ.

Солу

AB 37E SA

435530

