

А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ

Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины,
ул. акад. Заболотного, 148, 252143, Киев-143

МУТАНТНЫЕ ГЕНЫ ТУБУЛИНОВ РАСТЕНИЙ КАК МАРКЕРНЫЕ СЕЛЕКТИВНЫЕ ГЕНЫ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ



*Изложены подходы к использованию новых маркерных генов для селекции трансформированных клеток растений, базирующиеся на использовании мутантных генов тубулина из природных биотипов растений, а, в перспективе, и из индуцированных мутантов растений. Обобщены результаты исследований устойчивости растений (биотипов, мутантов) к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия на молекулярном и клеточном уровнях. Дан анализ работ, связанных с изучением переноса и экспрессии генов мутантного β -тубулина, которые обеспечивают устойчивость к аминпрофосметилу (фосфоротиоамидный гербицид) и трифлюралину (динитроанилиновый гербицид), от соответствующих мутантов *N. plumbaginifolia* в близкородственные и отдаленные виды растений путем соматической гибридизации. Приведены результаты работ по трансформации однодольных и двудольных растений геном мутантного α -тубулина, обеспечивающего устойчивость к динитроанилину, для проверки возможности его использования в качестве маркерного гена с одновременным получением динитроанилин-устойчивых растений.*

© А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ, 2007

На сегодняшний день более 50 маркерных генов, используемых в трансгенных или транспластомных исследованиях, а также при создании сельскохозяйственных культур растений, всесторонне исследованы с точки зрения их эффективности, биобезопасности и возможностей коммерческого применения [1]. Селективные маркерные гены могут быть сгруппированы в несколько категорий в зависимости от того, обеспечивает ли их использование позитивную (выживание трансформированных клеток) или негативную (гибель трансформированных клеток) селекцию, и является ли селекция возможной в присутствии внешних субстратов. Среди них наиболее широкое распространение, базирующееся на использовании токсических агентов (антибиотики, гербициды и другие биологически активные вещества), а в последнее время — и нетоксических веществ, получили позитивные селективные маркерные гены. Более широкое применение находят также позитивные селективные маркерные гены, экспрессия которых не зависит от внеклеточных субстратов, но которые влияют на физиологические процессы, управляющие развитием растения.

В качестве селективных маркерных генов все чаще используются репортерные гены, которые позволяют отслеживать трансформированные клетки для того, чтобы потом их отбирать вручную. Предложены также пути селекции, предполагающие удаление маркерных генов путем использования индуцибельных промоторов, которые обеспечивают вырезание предусмотренных последовательностей [2].

Тем не менее, несмотря на такое большое количество предложенных маркерных генов, в генетической инженерии растений, в том числе и для практических целей, используются всего лишь несколько маркерных генов. Это ограничение определяется многими факторами, включая дороговизну и сложность проводимых разработок, необходимость избежания побочных эффектов, простоту их практического применения. Хотя до сих пор не показано никаких негативных эффектов от используемых маркерных генов с точки зрения биобезопасности, существующие общественные опасения определяют ограничения использования генов устойчивости к антибиотикам в практических целях. Уже в ближайшем будущем гены устойчивости к антибиотикам будут запреще-

ны не только для целей практического использования (запрет вступил в силу с 1 января 2005 г.), но и для использования в научных разработках (запрет вступит в силу с 1 января 2009 г.) (Директива ЕС 2001.18.ЕС). Следовательно, испытание и внедрение новых маркерных генов для трансформации растений, несущих генетическую информацию исключительно растительного происхождения, составляет потенциально значимый практический интерес.

Подобная задача может быть решена путем использования в качестве маркерного гена какого-либо из генов конститутивных белков клетки, способного подвергаться регуляции со стороны соответствующего селективного агента. Этим условиям соответствует тубулин, формирующий микротрубочки как неотъемлемый структурный компонент цитоскелета любой эукариотической клетки. Микротрубочки вовлечены в регуляцию таких важных процессов, как клеточное деление, организация цитоплазмы, транспорт везикул или органелл, морфогенез и подвижность клеток [3]. Это высококонсервативные филаментные структуры, состоящие из димеров α - и β -субъединиц тубулина, каждая из которых имеет молекулярную массу ~50—55 кДа [4]. Несмотря на высокий уровень консервативности аминокислотных последовательностей тубулинов, изолированных из различных организмов, тубулины грибов, животных и растений четко различимы по некоторым фармакологическим и иммунологическим свойствам [4, 5] и аминокислотным последовательностям [6]. Вследствие этого ряд веществ, специфически связывающихся с тубулином и, таким образом, нарушающих функции микротрубочек, характеризуются различным сродством к тубулинам грибов, животных и растений, что позволяет исследователям использовать их в качестве важнейшего инструмента для изучения структуры и функций как микротрубочек в целом, так и тубулина в частности [3, 7, 8].

Поскольку среди веществ, обладающих способностью как разрушать, так и стабилизировать микротрубочки, есть ряд соединений, эффективно используемых в настоящее время в качестве антипротозойных, антигельминтных, противоопухолевых средств, а также в качестве фунгицидов и гербицидов. Изуче-

ние генетических основ приобретенной устойчивости к таким соединениям имеет еще и чисто практический аспект. В частности, значительное развитие получили генетические исследования микротрубочек, включая изолирование мутантных генов белков для установления тех изменений в их последовательностях, которые могут определять устойчивость микротрубочек к этим соединениям [7, 9].

К настоящему времени выполнено огромное количество работ по получению мутантных линий грибов, водорослей, млекопитающих, и высших растений [7, 10], устойчивых к веществам с антимикротрубочковым механизмом действия. Исходя из результатов по выяснению роли мутантного тубулина в развитии устойчивости клеток гриба *Neurospora crassa* к беномилу (представитель бензимидазолов) в свое время было предложено использовать ген этого тубулина в качестве селективного маркерного признака при трансформации грибов [11]. В свою очередь обнаружение природных биотипов растений с мутантным тубулином, обладающих устойчивостью к антимикротрубочковым гербицидам, а также селекция аналогичных мутантов *in vitro* [7, 10] открыли возможности для использования аналогичного подхода в генетической инженерии растений.

Приблизительно четверть всех используемых на рынке гербицидов принадлежат к нарушителям митоза или разрушителям микротрубочек [12, 13]. К этой группе относятся широко используемые динитроанилины (в частности, трифлуралин, пендиметалин и оризалин), фосфоротиоамиды (такие как ампрофосметил, АПМ) и фенилкарбаматы (изопропил-*N*-фенилкарбамат, ИФК, этил-*N*-фенилкарбамат, ЭФК, и хлоризопропил-*N*-фенилкарбамат, ХИФК). В отличие от классического нарушителя митоза — алкалоида колхицина, весьма неэффективно разрушающего микротрубочки растений, упомянутые соединения действуют при значительно более низких, микромолярных, концентрациях. Данные многочисленных исследований указывают, что мишенью действия динитроанилиновых и фосфоротиоамидных гербицидов и, по крайней мере, значительной части *N*-фенилкарбаматов является тубулин [7, 14, 15]. Для фенилкарбаматов существуют противоречивые данные, которые

свидетельствуют в пользу того, что эти вещества могут разрушать непосредственно как сами микротрубочки, так и центры организации микротрубочек (ЦОМТы) (более детально этот вопрос обсуждается ниже). Таким образом, связывание гербицидов с тубулином снижает его полимеризационные способности, препятствуя формированию микротрубочек и, соответственно, митотического веретена. Следовательно, их действие на растительную клетку проявляется в полной потере микротрубочек не только на этапе митотического деления, но и в интерфазе, и может приводить к гибели клеток. Поэтому гены мутантного тубулина, определяющие устойчивость микротрубочек к таким гербицидам, могут быть использованы в качестве маркерных при позитивной селекции.

Параллельно нашим разработкам по использованию мутантных генов тубулина в качестве селективных маркеров в генетической инженерии растений аналогичные работы были начаты другой группой исследователей [16]. Эта разработка базировалась на получении микротрубочковых мутантов риса, устойчивых к ЭФК [17], и допущении того факта, что данная устойчивость определяется молекулой α -тубулина, лишённого С-концевой части [18]. Однако в силу недостаточных доказательств существования такого механизма устойчивости к ЭФК и, на наш взгляд, сопряженных с этим технологических сложностей в осуществлении практической разработки, этот проект пока не получил надлежащего развития. Учитывая собственный опыт получения мутантов растений с устойчивостью как к динитроанилинам и фосфоротиоамидам, так и фенолкарбаматам [14], а также тот факт, что высокая селективность динитроанилинов и фосфоротиоамидов сопряжена с их взаимодействием непосредственно с тубулином, в последние годы нами развивались подходы по созданию новых маркерных систем для трансформации растений, базирующихся исключительно на использовании мутантных генов тубулина из природных биотипов растений, а в перспективе — и из индуцированных мутантов растений.

Природные биотипы растений, устойчивые к гербицидам, которые обладают антимикротрубочковой активностью

Известно, что многие растения обладают повышенной устойчивостью или чувствитель-

ностью к гербицидам с антимикротрубочковой активностью, однако генетическая природа вариабельности их чувствительности к этим веществам далеко не всегда изучена [13]. Наиболее известным примером природной устойчивости микротрубочек к гербицидам, специфически связывающимся с тубулином, является морковь. Известно, что проростки моркови резистентны к концентрациям динитроанилинов, в 100—1000 раз превышающим таковые, вызывающие разрушение микротрубочек у толерантных (хлопок, соя) и чувствительных видов растений (кукуруза, сорго) [19]. Оказалось, что организованные структуры микротрубочек корней моркови — кортикальная сеть, препрофазная лента, веретено и фрагмопласт — не разрушаются даже после 24 ч обработки различными динитроанилинами. Предполагается, что причина резистентности у моркови к динитроанилиновым гербицидам является результатом не природной селекции на устойчивость, а связана с «предсуществующей» устойчивостью вида.

Однако к настоящему времени устойчивость к гербицидам, обладающим антимикротрубочковым механизмом действия (как спонтанно приобретенный признак), найдена уже у целого ряда сорняков и трав, принадлежащих к однодольным и двудольным растениям. Характеристика большинства из них, включая природные биотипы *Eleusine indica*, *Setaria viridis*, *Alopecurus myosuroides*, *Sorghum halepense*, *Lolium rigidum*, *Poa annua*, *Amaranthus palmeri* и *Echinochloa crus-galli*, описана в большом количестве работ, так или иначе обобщенных в нескольких обзорах последних лет [10, 13, 14]. Нужно отметить, что у многих биотипов растений с приобретенной устойчивостью к гербицидам с антимикротрубочковой активностью также обнаружена либо перекрестная устойчивость к родственным соединениям, либо мультиустойчивость к гербицидам с иными механизмами действия на растительную клетку [14]. Последнее может свидетельствовать в пользу наличия или параллельных механизмов устойчивости, обеспечивающих функционирование микротрубочек, или механизмов, базирующихся вообще на модификации других структурных и функциональных

звеньев клетки, не имеющих отношения к микротрубочкам.

На протяжении целого ряда лет молекулярные и генетические механизмы устойчивости к гербицидам с антимикротрубочковой активностью наиболее детально изучались на примере динитроанилин-устойчивых биотипов *E. indica* и *S. viridis* [10, 13, 14]. В обоих случаях была обнаружена перекрестная устойчивость этих биотипов к некоторым другим структурно несходным гербицидам, нарушающим митоз. Оказалось, что резистентный биотип *E. indica* перекрестно устойчив не только ко всем динитроанилинам, но и к фосфоротиоамидному гербициду, амипрофосметилу (АПМ; *N*-изопропил *O*-(2-нитро-*p*-толил)фосфорамидотиоат) [20, 21]. Однако и резистентный, и чувствительный биотипы *E. indica* обладали одинаковой чувствительностью к таким антимикротрубочковым гербицидам, как пронамид (3,5-дихлоро(*N*-1,1-диметил-2-пропинил)бензамид), тербутол (карбаматный гербицид) и ДХФК (диметиловый эфир 2,3,5,6-тетрагидрофурфуровой кислоты) [21]. В то же время динитроанилин-устойчивый биотип *S. viridis* оказался в равной степени устойчивым и к АПМ, и к ДХФК, и к тербутолу [22]. Так же, как и устойчивый биотип *E. indica*, устойчивый биотип *S. viridis* демонстрировал перекрестную резистентность к антимикротрубочковому гербициду дитиопиру (*S,S*-диметил 2-(дифлуорометил)-4-(2-метилпропил)-6-(трифлуорометил)-3,5-пиридин-дикарботиоат) [22].

Поскольку известно, что динитроанилины препятствуют полимеризации тубулина в микротрубочки, была изучена способность оризалина к ингибированию полимеризации тубулин-обогащенной фракции белка, выделенной из устойчивого и чувствительного биотипов *Eleusine* [23]. Обогащенные тубулином экстракты обоих биотипов полимеризовались в микротрубочки при отсутствии оризалина, однако при его наличии микротрубочки формировались только из белковой фракции резистентного биотипа [23]. При биохимическом же анализе *E. indica* группой одних авторов было показано наличие в устойчивом биотипе дополнительного полипептида в районе локализации β -тубулина [23, 24]. Параллельно другими исследователями при анализе биотипов

E. indica с помощью двумерного электрофореза не было обнаружено никаких отличий в свойствах тубулина по сравнению с чувствительным биотипом [25]. Однако несколько позже при анализе еще одного резистентного биотипа *E. indica* с 40-кратной устойчивостью к трифлюралину ими было найдено отличие в электрофоретических свойствах одной из изоформ α -тубулина, позволившее предположить, что устойчивость к динитроанилинам у этого биотипа коррелирует с изменением сайта связывания тубулина [26].

Впоследствии группа этих же исследователей продемонстрировала, что устойчивость к динитроанилинам у *E. indica* является результатом единичной нуклеотидной замены (точечной мутации) в последовательности гена $\alpha 1$ -тубулина, приводящей к замене Тре-239 на Иле в аминокислотной последовательности $\alpha 1$ -тубулина [26–28]. Поскольку для многих эукариот и, в частности, для растений наличие Тре-239 в последовательности α -тубулина является высококонсервативным, авторы предположили, что замена этого остатка на Иле в последовательности α -тубулина, равно как и аналогичные замены Тре-237 в молекуле β -тубулина и Тре-240 в молекуле γ -тубулина, может приводить к появлению видоизмененного тубулина, определяющего повышенную устойчивость к динитроанилиновым гербицидам [26].

Несколько позже аналогичные результаты молекулярно-генетического анализа резистентных и чувствительных к динитроанилинам биотипов *E. indica* были получены независимо группой Баярда [29–32]. Ими также были обнаружены различия в подвижности изоформ α -тубулина: «новая» мутантная изоформа α -тубулина у резистентного биотипа была обнаружена в более основной позиции [29]. При изучении трех изоформ кДНК α -тубулина (*TUA1*, *TUA2* и *TUA3*), изолированных из высокоустойчивого (R), интермедиатного (I) и чувствительного (S) биотипов *E. indica*, нуклеотидные отличия между чувствительными и устойчивыми α -тубулинами были найдены у *TUA1* и *TUA2* [31]. Наиболее значительными различиями в R- и I-биотипах являлись обнаруженные в *TUA1* миссенс-мутации, приводящие к замене Тре-239 на Иле в R-биотипе, а в I-биотипе — к замене Мет-268 на Тре [31].

В случае с *S. viridis* при иммуноблоттинге тубулина после одномерного электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия [22, 33] и двумерного электрофореза [25] с использованием специфических антител против α - и β -тубулина [22, 25, 33] или белков, ассоциированных с микротрубочками [33], не было обнаружено никаких качественных и количественных отличий между динитроанилин-устойчивыми и чувствительными растениями. Однако совсем недавно при анализе последовательностей тубулинов из устойчивой и чувствительной к динитроанилину линий *S. viridis* были обнаружены две аминокислотные замены в гене $\alpha 2$ -тубулина, определяющие устойчивость к этим веществам: Лей-136 был замещен на фенилаланин, а Тре-239 — на изолейцин [34]. Обе мутации обеспечивали перекрестную устойчивость к различным представителям динитроанилинов без изменений чувствительности к бензимидазолам и гиперчувствительности к карбамамтам.

Еще одна мутация в гене β -тубулина, приводящая к замене Арг-241 на лизин, была идентифицирована в динитроанилин-устойчивых растениях *P. annua* [35]. Как итог, каждый из описанных мутантных генов тубулина может быть использован в работах по созданию новых маркерных систем генов, используемых при получении трансгенных растений.

Селекция *in vitro* мутантных линий растений, устойчивых к динитроанилинам и фосфоротиоамидам

Устойчивые к гербицидам растения могут быть эффективно отселектированы как клеточные мутанты, поскольку методы клеточной селекции в условиях *in vitro* позволяют обнаружить и отобрать резистентные генотипы с последующей их регенерацией. Именно этот подход был впервые использован нами для селекции мутантных линий высших растений, устойчивых к динитроанилинам и фосфоротиоамидам. В результате проведенных экспериментов путем прямой клеточной селекции с предварительным использованием гамма-облучения в качестве индуктора мутагенеза были получены мутантные линии *Nicotiana plumbaginifolia*, устойчивые к АПМ [36—38] и трифлюралину [39—41].

Уровень резистентности к АПМ у АПМ-устойчивой линии в 10 раз превышал аналогичный показатель у исходной линии, а уровень резистентности к трифлюралину у трифлюралин-устойчивой линии — в 7 раз. Было установлено, что признаки устойчивости к АПМ и трифлюралину наследуются в поколениях F_1 и F_2 мутантов. Как показали результаты генетического анализа, у АПМ-устойчивой линии резистентность наследовалась как доминантный гомозиготный ядерный признак [37, 38], а у трифлюралин-устойчивой линии — как семидоминантный гетерозиготный признак [14, 39]. Полученные АПМ-резистентные мутанты обладали также перекрестной устойчивостью к трифлюралину, а трифлюралин-резистентные мутанты, соответственно, обладали перекрестной устойчивостью к амипрофосметилу. При этом отмечалась стабильная экспрессия полученных признаков устойчивости к этим гербицидам.

Поскольку ранее предполагалось, что оба гербицида имеют подобные сайты связывания на молекуле тубулина [21, 42—44], был проведен двумерный электрофорез тубулина из обеих линий мутантов с последующим иммуноблоттингом. Оказалось, что как и в АПМ-, так и в трифлюралин-устойчивых растениях присутствует измененная изоформа β -тубулина. Было установлено также, что тубулин, изолированный из АПМ-устойчивых растений, имеет резко сниженное сродство к АПМ [45]. Это позволило предположить, что у полученных линий растений *N. plumbaginifolia* наличие измененных изоформ β -тубулина может быть следствием мутаций в гене(ах), кодирующем(их) β -тубулин, и связано с приобретением растениями устойчивости к гербицидам с антимикротрубочковой активностью [37—39].

Поэтому полученные мутанты *N. plumbaginifolia*, устойчивые к АПМ, были использованы для изолирования и секвенирования гена β -тубулина, который обеспечивает устойчивость к этому гербициду. Оказалось, что искомая мутация является результатом замещения остатка серина на остаток пролина в положении 248 в одном из генов β -тубулина, изолированных из мутантной линии *N. plumbaginifolia* [46]. Таким образом, наряду с мутантными генами α -тубулина, несущими устойчивость к динит-

роанилинам/фосфоротиоамидам, этот ген тоже может быть использован как маркерный признак для селекции трансгенных растений, а также и для получения растений, устойчивых к данным типам гербицидов.

Селекция *in vitro* мутантных линий растений, устойчивых к фенилкарбаматам

Фенилкарбаматные гербициды, среди которых выделяются наиболее распространенные соединения ИФК и ХИФК, представляют собой антимиотические соединения, воздействующие как на ЦОМТы, так и/или только на микротрубочки. Механизмы действия указанных гербицидов по-прежнему остаются предметом обсуждения, поскольку существуют доказательства того, ХИФК нарушает функционирование только ЦОМТов, а не микротрубочек, приводя к фрагментации полюсов и формированию трех- либо многополюсных веретен деления с последующим образованием ненормальных (разветвленных) фрагментов, как это было показано в случае клеток кончиков корней лука [47—49] и клеток суспензионной культуры моркови [50]. Другие данные, полученные на клетках овса, указывают на то, что ХИФК может повреждать как ЦОМТы, так и микротрубочки в зависимости от используемой концентрации [51]. Некоторые данные демонстрируют, что мишенью действия ХИФК являются исключительно микротрубочки, под действием которого они разрушаются, как, например, в клетках корня пшеницы [52], и что ХИФК ингибирует полимеризацию растительных микротрубочек *in vitro* [5]. Более того, на клетках суспензионной культуры табака было установлено, что ХИФК наиболее вероятно связывается с β -тубулином в сайте связывания бензамидов [53]. Необходимо отметить, что ранее были сделаны попытки выяснения механизма действия на растительную клетку другого, менее распространенного вещества фенилкарбаматного ряда, ЭФК, у мутантов риса, устойчивых к данному соединению [17]. Было предположено, что за связывание с указанным соединением отвечает С-концевой остаток α -тубулина [18].

Что касается механизма действия ИФК, то на сегодняшний день существуют только данные о том, что упомянутое вещество не оказы-

вает влияния ни на полимеризацию тубулина из мозга *in vitro* [54, 55], ни на сборку растительных микротрубочек *in vivo* [54]. Наиболее типичными симптомами, которые он вызывает, является образование трех- и мультиполярных полюсов, наблюдаемое у таких филогенетически отдаленных организмов, как зеленая водоросль *Oedogonium cardiacum* [56], высшее растение *Haemanthus katerinae* Baker [57] и ЗТЗ фибробласты [58].

Для более глубокого выяснения механизма действия ИФК на растительные клетки нами были отобраны *in vitro* мутантные линии *N. plumbaginifolia* [59] и *N. sylvestris* [60, 61], устойчивые к действию 30 мкМ ИФК. Полученные мутанты обладали перекрестной устойчивостью к ЭФК, однако демонстрировали чувствительность к ХИФК [59], что может свидетельствовать о не совсем сходных механизмах действия ИФК и ХИФК, как описано выше. ИФК-устойчивые растения *N. sylvestris* также демонстрировали более низкий уровень чувствительности к нокодазолу (вещество из класса бензимидазолов, деполимеризующее микротрубки), тогда как в клетках контрольной линии после обработки нокодазолом наблюдался в два-три раза более высокий процент нарушений метафаз, анафаз и телофаз. В клетках контрольной линии нокодазол в концентрациях 100—500 мкМ индуцировал тотальную фрагментацию ДНК на всех стадиях клеточного цикла, включая интерфазу, тогда как у мутанта при любых концентрациях, использованных в эксперименте, фрагментацию ДНК не наблюдали вообще [62].

Имунофлюоресцентный анализ с использованием специфических моноклональных антител к α - и β -тубулину показал, что и микротрубочки, и ЦОМТы в клетках ИФК-резистентных линий не разрушаются после обработки ИФК, тогда как в клетках контрольной линии наблюдалось сохранение интактной структуры кортикальных микротрубочек при одновременном формировании многополюсных веретен деления и разветвленных фрагментов [61]. ЦОМТы после обработки мутантов гербицидом не разрушались, а располагались характерно для растительных клеток в примембранной области и на периферии ядра, тогда как в клетках контрольной линии локализа-

ция ЦОМТов была нарушенной [61]. Полученные данные еще раз подтверждают вывод о том, что мишенью действия ИФК являются сайты нуклеации микротрубочек, а не непосредственно сами микротрубочки.

Хотя признак устойчивости к ИФК стабильно экспрессировался *in vitro* в разных типах клеток полученных линий *Nicotiana*, из-за отсутствия фертильности у большинства ИФК-устойчивых мутантов не удалось провести генетический анализ и установить тип мутации [59]. Так, у одной из мутантных линий *N. plumbaginifolia* наблюдалось полное отсутствие апикального доминирования и замедленный рост, из-за чего растение не было способно зацвести в период вегетативного роста. Инфертильность других линий была следствием аномального развития цветков либо продукции недоразвитых семян [59]. Мутантные растения *N. sylvestris* также характеризовались определенной депрессией развития, выраженной в уменьшении габитуса и размеров вегетативных и генеративных органов, полустерильностью пыльцы, которая была обусловлена нарушениями микроспорогенеза и синтеза цитоплазмы в микроспорах [63, 64]. Как было установлено, низкая семенная продуктивность обуславливалась высокой стерильностью пыльцы ($84,51 \pm 0,71$ %) и пониженной жизнеспособностью семязачек [63, 64].

Моделирование трехмерной структуры тубулина с последующим докинггом гербицидов в сайты взаимодействия

В дальнейшем нами была продемонстрирована связь между особенностями изменений в последовательностях мутантных тубулинов растительного происхождения (продуктов как мутантных генов α -тубулина из динитроанилин-устойчивых линий *Eleusine indica*, так и секвенированного нами гена β -тубулина из АПМ-устойчивой линии *N. plumbaginifolia*) и характером пространственного взаимодействия их молекул с антимиотрубочковыми гербицидами. Эти результаты были получены с помощью моделирования пространственной структуры тубулинов высших растений и благодаря установлению потенциальных сайтов взаимодействия α - и β -тубулина с динитроанилинами и фосфоротиоамидами. Поскольку

известно, что остаток Тре-239 очень консервативен для всех известных α -тубулинов грибов, растений и животных, анализ последовательностей, фланкирующих сайт мутации, показал, что они тоже достаточно консервативны, хотя и не идентичны у всех изученных последовательностей α -тубулина растений.

Для анализа специфичности взаимодействия динитроанилинов и фосфоротиоамидов с тубулином из R- и S-биотипов *E. indica* были реконструированы трехмерные структуры обоих типов молекул α -тубулина, включая распределение электростатического потенциала на их поверхности с одновременной локализацией сайта связывания динитроанилинов [20, 65]. Сравнение пространственных моделей α -тубулинов из R- и S-биотипов *E. indica* с учетом фиксации местоположения Тре-239 позволяет очень легко идентифицировать сайт связывания динитроанилинов на поверхности молекулы α -тубулина, который локализуется в зоне интердимерного контакта [65]. Замена треонина на изолейцин в положении 239 выражается в существенных изменениях распределения электростатического заряда на поверхности молекулы. Это перераспределение поверхностной энергии вследствие точечной мутации является, очевидно, следствием пространственной переориентации боковых цепей соседствующих на поверхности молекулы и вблизи нее аминокислотных остатков. Одновременно происходят значительные конформационные изменения в обнаруженном сайте связывания динитроанилинов и фосфоротиоамидов с молекулой α -тубулина. Нами показано, что замена Тре-239, находящегося в районе седьмой спирали, может существенно изменять трехмерную структуру молекулы α -тубулина [65].

В то же время анализ пространственной структуры молекул трифлурала и АПМ позволил обнаружить не только сходную пространственную геометрию обоих типов молекул, но и сходное распределение поверхностных потенциалов [65]. Все известные представители этих классов веществ, обладающие гербицидной активностью, характеризуются наличием общих структурных элементов — нитрогрупп, связанных с бензольным кольцом. Такое основополагающее сходство

предполагает, что полярная (электронегативная) часть их молекул должна, вероятно, играть определяющую роль во взаимодействии с тубулином. С учетом этих закономерностей и был осуществлен пространственный докинг динитроанилинов и фосфоротиоамидов в сайты связывания на поверхности молекул α -тубулина из чувствительных и устойчивых линий *E. indica*.

Было обнаружено, что углеводородные хвосты скелета изучаемых гербицидов ориентированы вдоль аминокислотных остатков Глн-133, Асн-253 и Глн-256, которые расположены на поверхности молекулы α -тубулина и участвуют во взаимодействии с аминокислотными остатками молекулы β -тубулина следующего гетеродимера. Именно в этой области поверхности молекулы α -тубулина образуется отчетливо различаемая и ясно очерченная полость с высоким положительным электростатическим зарядом [65]. Хотя остаток Тре-239 и не экспонирован на поверхности молекулы α -тубулина, он расположен непосредственно под этой полостью. Взаимодействие негативно заряженных NO_2 -групп, являющихся общей структурной чертой как динитроанилинов, так и фосфоротиоамидов, с описанным сайтом молекулы α -тубулина должно иметь существенные последствия, приводящие к предотвращению дальнейшей полимеризации микротрубочек. Более того, положение связанного лиганда (т.е. того или иного гербицида) будет стабилизироваться за счет дополнительного взаимодействия негативно заряженных групп, таких как $-\text{CF}_3$, $-\text{SO}_2$ с NH_2 -группой Арг-2 [65]. Вследствие описанных черт взаимодействия гербицидов и α -тубулина их комплексы приобретают достаточный уровень стабильности для того, чтобы не диссоциировать под воздействием внутренних молекулярных осцилляций.

Моделирование ситуации с заменой Тре-239 на изолейцин, происходящей вследствие описанной мутации в молекуле α -тубулина из R-биотипа [28, 31], демонстрирует очень существенное уменьшение позитивного поверхностного заряда в районе сайта взаимодействия с гербицидами [20, 65]. Это перераспределение заряда, сопровождаемое частичным закрытием (сужением) полости взаимодействия, вызывает резкое снижение аффинности сайта к динитроанилино-

вым, а также фосфоротиоамидным гербицидам [20, 65].

Полученные нами результаты по анализу особенностей пространственных моделей молекул α -тубулинов из R- и S-биотипов *E. indica* были подтверждены позже при реконструкции сайта взаимодействия с динитроанилинами молекулы α -тубулина из *S. viridis*, где была обнаружена аналогичная мутация по остатку Тре-239 [34]. Авторами этой работы было также показано, что сайт связывания динитроанилинов расположен практически в зоне контакта между димерами тубулина, тогда как модель молекулы α -тубулина простейшего *Toxoplasma gondii* предполагает, что связывание динитроанилиновых гербицидов нарушает латеральные контакты между протофиламентами микротрубочек [66]. В то же время сайты взаимодействия, предсказанные для α -тубулина высших растений и простейших, частично перекрываются. Поэтому можно сделать вывод, что связывание динитроанилинов с тубулинами этих двух групп эукариот имеет некоторые отличительные черты вследствие эволюционной отдаленности.

В то же самое время результаты по реконструкции трехмерной структуры молекул β - и γ -тубулинов свидетельствуют о том, что наличие остатков треонина в положениях 237 или 240, соответственно, не является фактором, определяющим формирование полости взаимодействия с изучаемыми гербицидами (иными словами, эта полость отсутствует в обоих случаях) [67]. Замена же остатка треонина в этих положениях на остаток изолейцина не приводит к заметной реорганизации поверхности молекул как β -, так и γ -тубулинов, т.е. не влечет за собой никаких функциональных последствий. Следовательно, развитие устойчивости молекулы тубулина к динитроанилинам и фосфоротиоамидам определяется не только положением и природой заменяемого аминокислотного остатка, но и его пространственным микроокружением, формируемым соседствующими аминокислотными остатками. Таким образом, ранее сформулированный постулат о том, что замены Тре-237 в молекуле β -тубулина и Тре-240 в молекуле γ -тубулина должны приводить к появлению видоизмененного тубулина, определяющего повышенную устойчивость к динитроанилиновым

гербицидам [26], опровергается результатами пространственного моделирования.

Сравнительный анализ реконструированных пространственных структур молекул β -тубулина из устойчивых и чувствительных к АПМ линий *N. plumbaginifolia* позволил идентифицировать остаток Сер-248, подвергшийся мутации, в зоне интрадимерного контакта [46]. Этот аминокислотный остаток так же, как и остатки Лиз-252 и Лиз-350, принимает участие в формировании полости, которая может быть идентифицирована как сайт взаимодействия с фосфоротиоамидами и динитроанилинами, а также в создании соответствующего микроокружения. Замена Сер-248 на остаток пролин практически блокирует полость, предназначенную для взаимодействия с гербицидами. Эти результаты совпадают с нашими же результатами по реконструкции пространственной структуры устойчивых и чувствительных изоформ β -тубулина из *Chlamydomonas reinhardtii*, где была продемонстрирована критическая роль миссенс-мутации по остатку Лиз-350 в развитии устойчивости к фосфоротиоамидам и динитроанилинам [68].

Сайты взаимодействия фенолкарбаматов с растительным тубулином на сегодняшний день точно не установлены, однако известно, что некоторые фенолкарбаматы, в частности ХИФК, конкурируют за сайт связывания с бензимидазолами на молекуле β -тубулина [53]. Также установлено, что устойчивость к бензимидазолам у грибов может быть обусловлена точечными мутациями в последовательности β -тубулина грибов вследствие замены остатка Глю-198 на остаток Ала, Вал или Гли, либо Фен-200 на остаток Тир [69]. Замена аминокислотного остатка в положении 198 последовательности β -тубулина из *Neurospora crassa* ведет к негативной кросс-устойчивости к фенолкарбаматам [70], однако замены остатков Лей-250 на остаток Фен, Ала-265 на Вал и Тре-237 на Ала обеспечивают перекрестную устойчивость к фенолкарбаматам [71]. Результаты реконструкции пространственной структуры растительного β -тубулина свидетельствуют о том, что все эти мутации локализованы в одной и той же области около зоны интрадимерного контакта, но только остатки Лей-250 и Ала-165 экспонируются на поверх-

ности молекулы [72]. Таким образом, нельзя исключить, что по крайней мере некоторые фенолкарбаматы, имеющие близкое структурное сходство с бензимидазолами, могут иметь один и тот же сайт связывания на поверхности молекулы β -тубулина, но при наличии некоторых особенностей докинга.

Наиболее важным заключением, проистекающим из анализа молекулярно-генетических и структурно-биологических закономерностей устойчивости тубулина растений к различным классам гербицидов с антимикротрубочковой активностью, является вывод о том, что мутантные гены тубулина, определяющие устойчивость к этим соединениям, могут использоваться в качестве маркерных генов при создании генетически модифицированных растений. Более того, учитывая тот факт, что растительный тубулин является специфической мишенью как для ряда широко используемых антимикротрубочковых агентов [73], так и недавно обнаруженных (например, пиримидиновой природы [74] и цианоакрилатов [75]), спектр мутантных генов тубулина с устойчивостью к антимикротрубочковым агентам для использования в качестве маркерных генов может быть в ближайшее время существенно расширен.

Перенос устойчивости к антимикротрубочковым гербицидам путем соматической гибридизации

Поскольку создание векторных конструкций с мутантным геном тубулина для генетической трансформации сопряжено с решением ряда предварительных задач, включающих идентификацию мутантного гена и места точечной мутации, экспериментальную проверку эффективности работы такого гена, его клонирование и т. п., и требует достаточно больших временных затрат, то на первоначальных этапах разработки технологии применения генов тубулина в качестве селективного (маркерного) признака было предложено использовать соматическую гибридизацию [14]. На сегодняшний день соматическая гибридизация продолжает оставаться одним из альтернативных способов переноса генов интереса из одних видов растений в другие. Именно поэтому первые попытки переноса мутантных

генов β -тубулина, обеспечивающих устойчивость к веществам с антимикротрубочковой активностью, от ранее полученных линий *N. plumbaginifolia* в близкородственные и отдаленные виды были сопряжены с использованием методов симметричной и асимметричной соматической гибридизации [76–80].

С этой целью признак устойчивости к АПМ или трифлюралину переносили в реципиентные растения *N. sylvestris* и *Atropa belladonna*. Для частичного направленного переноса ядерного материала (асимметричная гибридизация) осуществляли инактивацию клеток мутантных линий *N. plumbaginifolia* летальными дозами радиации. В результате слияния и селекции в присутствии АПМ или трифлюралина нами были получены серии межвидовых и межтрибных гибридов *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* и *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* с повышенной устойчивостью к АПМ или трифлюралину соответственно. Данные цитогенетического анализа и результаты наследования признака устойчивости в первом поколении полученных фертильных соматических гибридов свидетельствовали о том, что их устойчивость к АПМ и трифлюралину является прямым следствием переноса генетического материала от соответствующих мутантов *N. plumbaginifolia* [76–80].

Как и в случае иммунофлюоресцентного анализа микротрубочек исходных мутантов *N. plumbaginifolia* [37–39], было обнаружено, что кортикальные и митотические микротрубочки протопластов гибридных растений *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* и *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* не разрушаются при обработке АПМ [76, 77, 79, 80] или трифлюралином [78] в селективных концентрациях, в то время как микротрубочки в протопластах родительских линий *N. sylvestris* и *A. belladonna* полностью деполимеризировались под действием указанных веществ. Следовательно, устойчивость микротрубочек гибридов может быть объяснена наличием в их составе мутантной изоформы β -субъединицы тубулина (как и в случае мутантов), экспрессирующейся в результате переноса мутантного гена β -тубулина от АПМ- или трифлюралин-устойчивых растений *N. plumbaginifolia*. Результаты двумерного электрофореза тубулина гибридных и роди-

тельских растений с последующим иммуноблоттингом подтвердили экспрессию в гибридах *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* и *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* наряду с изоформами α - и β -тубулинов реципиента дополнительной изоформы β -тубулина, характерной для мутантов *N. plumbaginifolia* [76, 78–80].

С учетом того, что селекция соматических гибридов осуществлялась на средах, содержащих АПМ или трифлюралин, нами впервые была продемонстрирована принципиальная возможность эффективного использования признака устойчивости к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом, что сопряжено с наличием мутантного тубулина в качестве маркерного признака.

Создание конструкций с использованием мутантного гена тубулина в качестве нового маркерного гена

Принимая во внимание высокий селективный потенциал динитроанилинов и фосфоротиоамидов, а также успешные результаты по использованию признака устойчивости к этим гербицидам в качестве маркерного при получении соматических гибридов растений, эффективная селекция которых велась исключительно на гербицидах динитроанилинового либо фосфоротиоамидного классов с последующей стабильной экспрессией и интеграцией экзогенных мутантных тубулинов в клетках реципиентных видов, дальнейшее развитие технологических подходов базировалось на создании векторных конструкций для трансформации растений, в которых присутствовал бы мутантный ген тубулина в качестве маркерного гена.

В принципе, использование генов тубулина в генетической инженерии растений может решить ряд проблем, связанных с приобретением устойчивости к различным классам антимикротрубочковых гербицидов [14, 81–83], с устойчивостью к холоду [83, 84], элонгацией клеток [85] и даже с регуляцией клеточной архитектуры в целом, включая гравитропическую реакцию, ветвление, укоренение, высоту растения и урожайность [83]. Различные аспекты трансформации растений генами тубулина, включая химерные гены GFP-тубулина, описаны нами ранее в нескольких обзорах [14,

86]. Практические шаги по получению трансгенных растений с устойчивостью к динитроанилинам и фосфоротиоамидам были приняты группой Хасси [28, 81, 82], однако им удалось осуществить регенерацию только модельного растения — табака.

Для разработки подходов по использованию мутантного тубулина в качестве маркерного гена при селекции трансгенных растений нами также был использован клонированный и хорошо охарактеризованный мутантный ген $\alpha 1$ -тубулина из R-биотипа *E. indica* [31], обеспечивающий устойчивость к широкому спектру динитроанилиновых и фосфоротиоамидных гербицидов. В работе также дополнительно использовали полноразмерный ген $\beta 1$ -тубулина из ячменя, который встраивали в конструкции, уже несущие мутантный ген α -тубулина, или создавали с ним отдельные векторы, поскольку наличие привнесенных генов именно обеих субъединиц тубулина позволяет достичь их эквимольной ко-экспрессии для дальнейшего нормального функционирования мутантного тубулина в нативных структурах микротрубочек трансгенных растений [82]. Были созданы соответствующие конструкции для трансформации однодольных и двудольных растений, а перенос селективного маркерного гена осуществляли путем биолистической трансформации либо с помощью трансформации *Agrobacterium tumefaciens* [87]. Для биолистической трансформации однодольных гены тубулинов в отдельно созданных векторах помещали под конститутивный убихитиновый промотор кукурузы, а для двудольных — под конститутивный 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты. Для агробактериальной трансформации была создана конструкция, в которой оба гена тубулина были расположены под 35S-промотором.

Эффективность систем трансформации с мутантным геном тубулина *TuA1m* проверяли, используя несколько видов однодольных и двудольных, включая ячмень (*Hordeum vulgare*), пальчатое просо (*Eleusine coracana*), сою (*Glycine max*), лен (*Linum usitatissimum*) и табаки (*Nicotiana glauca* и *N. glauca*). Для каждого из указанных видов разрабатывали отдельный протокол трансформации и селекции трансгенных линий. В качестве селективного агента

использовали наиболее эффективный гербицид из класса динитроанилинов — трифлуралин. Эффективные селективные концентрации трифлуралина для каждой линии растений устанавливали согласно разработанному нами протоколу [80, 88], на основании которого определен диапазон селективных концентраций для данного селективного агента (5–10 мкМ).

В результате селекции были получены трансгенные линии пальчатого проса, ячменя, сои, табака и льна с устойчивостью к динитроанилинам и фосфоротиоамидам. Трансгенная природа отселектированных растений была подтверждена с помощью Саузерн-, Нозерн-блотинга и ПЦР-анализа с использованием специфических зондов, включая зонды к гену α -тубулина и/или гену β -тубулина.

Таким образом, результаты представленных в обзоре работ свидетельствуют о том, что знания о закономерностях функционирования генов тубулина растений и механизмов устойчивости этого белка к веществам с антимикротрубочковой активностью в совокупности с использованием методов функциональной геномики и структурной биоинформатики позволяют разработать эффективные генно-инженерные технологии, решающие несколько проблем создания генетически модифицированных растений. В первую очередь, это создание векторных конструкций для трансформации, содержащих новые маркерные гены, которыми являются гены тубулина, определяющие устойчивость к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия. Очевидно, что это направление обладает значительным потенциалом для дальнейшей разработки в силу того, что тубулин является важной мишенью для целого ряда веществ различной химической природы. Параллельно использование уже обнаруженных мутантных генов тубулина с устойчивостью к динитроанилинам и фосфоротиоамидам может решить проблему создания новых сортов культурных растений, устойчивых к этим классам гербицидов, с помощью генетической инженерии.

SUMMARY. The approaches for new marker genes usage in selection of transformed plant cells, which are based on using mutant tubulin genes from natural plant biotypes and, in perspective, from induced plant mutants

have been considered. The results of investigations of plant (biotypes, mutants) resistance to herbicides with antimicrotubular mode of action on molecular and cellular levels have been summarized. The reports dealing with study the transferring and the expression of mutant tubulin genes conferring resistance to amiprofosmethyl (phosphorothioamidate herbicide) and to trifluralin (dinitroaniline herbicide) from corresponding *N. plumbaginifolia* mutants into related and remote plant species by somatic hybridisation methods have been analyzed. The results of experiments on monocotyledonous and dicotyledonous plant transformation by mutant α -tubulin gene conferring resistance to dinitroanilines are described to test the possibility of its using as a marker gene with obtaining, at the same time, a dinitroaniline-resistant plants.

РЕЗЮМЕ. В огляді викладено підходи щодо використання нових маркерних генів для селекції трансформованих клітин рослин. Ці підходи базуються на використанні мутантних генів тубуліну з природних біотипів рослин, а у перспективі — також і з індукованих мутантів рослин. Узагальнено результати досліджень стійкості рослин (біотипів, мутантів) до гербіцидів з антимікротрубочковим механізмом дії на молекулярному та клітинному рівнях. Подано аналіз робіт, що пов'язані з вивченням переносу та експресії генів мутантного β -тубуліну, які забезпечують стійкість до аміпрофосметилу (фосфоротіамідний гербіцид) і трифлураліну (динітроаніліновий гербіцид), від відповідних мутантів *N. plumbaginifolia* у споріднені та віддалені види рослин шляхом соматичної гібридизації. Наведено результати робіт з трансформації однодольних та дводольних рослин геном мутантного α -тубуліну, що забезпечує стійкість до динітроанілінів, для перевірки можливості його використання як маркерного гена з одночасним отриманням динітроанілін-стійких рослин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miki B., McHugh S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety // *J. Biotechnol.* — 2004. — **107**. — P. 193—232.
2. Zuo J., Niu Q.W., Moller S.G., Chua N.H. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants // *Nature Biotechnol.* — 2001. — **19**. — P. 157—161.
3. Блюм Я.Б. Организация цитоскелета протопластов и соматические гибриды растений: интеграция функций клетки // *Биотехнология* / Под ред. Ю.Ю. Глебы. — М.: ВИНТИ АН СССР, 1988. — С. 166—277 (Итоги науки и техники, т. 9).
4. Fosket D.E., Morejohn L.C. Structural and functional organization of tubulin // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1992. — **43**. — P. 201—240.
5. Morejohn L.C., Fosket D.E. Tubulins from plants, fungi and protists: a review // *Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton* / Ed. J.W. Shay. — New York : Plenum Press, 1986. — P. 257—329.
6. Демчук О.Н., Блюм Я.Б. Построение филогенетического древа растительных тубулинов на основании гомологии их белковых последовательностей // *Цитология и генетика.* — 2005. — **39**, № 2. — С. 3—9.
7. Страшнюк Н.М., Блюм Я.Б. Получение мутантов по генам белков микротрубочек // *Цитология и генетика.* — 1993. — **27**. — С. 79—96.
8. Correia J.J. Effects of antimitotic agents on tubulin-nucleotide interactions // *Pharm. Ther.* — 1991. — **52**. — P. 127—147.
9. Oakley B.R. Microtubule mutants // *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* — 1985. — **63**. — P. 479—488.
10. Baird W.V., Blume Ya.B., Wick S. Microtubular and cytoskeletal mutants // *Plant microtubules: potential for biotechnology* / Ed. P. Nick. — Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2000. — P. 159—191.
11. Orbach M. J., Porro E. B., Yanofsky C. Cloning and characterization of the gene for β -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker // *Mol. Cell. Biol.* — 1986. — **6**, № 7. — P. 2452—2461.
12. Molin W.T., Khan R.A. Mitotic disrupter herbicides: recent advances and opportunities // *Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology* / Ed. R.M. Roe. — Burke (VA, USA): IOS Press, 1997. — P. 143—158.
13. Vaughn K.C. Anticytoskeletal herbicides // *Plant microtubules: potential for biotechnology* / Ed. P. Nick. — Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2000. — P. 193—205.
14. Емец А.И., Блюм Я.Б. Устойчивость растений к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия: от природных мутантов до переноса генов // *Физиология растений.* — 1999. — **46**, № 6. — С. 899—907.
15. Morejohn L.C., Fosket D.E. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells // *Pharm. Ther.* — 1991. — **51**. — P. 217—230.
16. Nick P., Christou P., Breviaro D. Generating transgenic plants by minimal addition of exogenous DNA — a novel selection marker based on plant tubulins // *AgBiotechNet.* — 2003. — **5**. — ABN 105.
17. Nick P., Yatou O., Furuya M., Lambert A.-M. Auxin-dependent microtubule responses and seedling development are affected in a rice mutant resistant to EPC // *Plant J.* — 1994. — **6**. — P. 651—663.
18. Wiesler B., Wang Q.-Y., Nick P. The stability of cortical microtubules depends on their orientation // *Plant J.* — 2002. — **32**. — P. 1023—1032.
19. Vaughan M.A., Vaughn K.C. Carrot microtubules are dinitroaniline resistant. I. Cytological and cross-resis-

- tance studies // *Weed Res.* — 1988. — **28**. — P. 73—83.
20. Ныпорко А.Ю., Емец А.И., Климкина Л.А., Блюм Я.Б. Взаимосвязь чувствительности каллуса *Eleusine indica* к трифлорулину и амипрофосметилу с особенностями взаимодействия этих соединений с тубулином // *Физиология растений.* — 2002. — **49**, № 3. — С. 459—466.
 21. Vaughn K.C., Marks M.D., Weeks D.P. A dinitroaniline-resistant mutant of *Eleusine indica* exhibits cross-resistance and supersensitivity to antimicrotubule herbicides and drugs // *Plant Physiol.* — 1987. — **83**. — P. 956—964.
 22. Smeda R.J., Vaughn K.C., Morrison I.N. Trifluralin-resistant green foxtail (*Setaria viridis* (L.) Beauv.). Exhibits cross-resistance to mitotic disrupter herbicides // *Plant Physiol.* — 1992. — **96**. — P. 114.
 23. Vaughn K.C., Vaughan M.A. Structural and biochemical characterization of dinitroaniline-resistant *Eleusine* // *Managing Resistance to Agrochemicals*. V. 421 / Eds M.B. Green, H.M. LeBaron, W.K. — Moberg Washington: Amer. Chem. Soc., 1990. — P. 364—375.
 24. Smeda R.J., Vaughn K.C. Resistance to dinitroaniline herbicides // *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biotechnology* / Eds S.B. Powles and J.A.M. Holtum. — Boca Raton et al.: Lewis Publ., 1994. — P. 215—228.
 25. Waldin T.R., Ellis J.R., Hussey P.J. Tubulin-isotype analysis of two grass species-resistant to dinitroaniline herbicides // *Planta.* — 1992. — **188**. — P. 258—264.
 26. Cronin K.E., Hussey P.J., Ray J.A., Waldin T.R. Herbicide resistant plants // *World Intellectual Property Org. Int. Publ.*, 1993. No. WO 93/24637.
 27. Anthony R.G., Hussey P.J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton // *Trends Plant Sci.* — 1999. — **4**. — P. 112—116.
 28. Antony R.G., Waldin T.R., Ray J.A., Bright S.W.J., Hussey P.J. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin // *Nature.* — 1998. — **393**. — P. 260—263.
 29. Baird W.M.V., Morejohn L., Zeng L., Mysore K., Kim H.-H. Genetic, molecular and biochemical characterization of dinitroaniline herbicide resistance in goosegrass (*Eleusine indica*) // *Proc. Second Int. Weed Control Congr.* — Copenhagen, 1996. — **2**. — P. 551—557.
 30. Baird W.M.V., Zeng L., Koka K., Yamamoto E. Genetic and molecular analysis of dinitroaniline resistance in three biotypes of goosegrass (*Eleusine indica*) // *Proc. Xth Symp. Biology of Weeds* (Dijon, France, 11—13 September, 1996). — Dijon, 1996. — P. 181—188.
 31. Yamamoto E., Zeng L., Baird W.V. α -Tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica* // *Plant Cell.* — 1998. — **10**. — P. 297—308.
 32. Mysore K., Baird V. Molecular characterization of the tubulin-related gene families in herbicide resistant and susceptible goosegrass (*Eleusine indica*) // *Weed Sci.* — 1995. — P. 28—33.
 33. Smeda R.J., Vaughn K.C., Morrison I.N. A novel pattern of herbicide cross-resistance in a trifluralin-resistant biotype of green foxtail (*Setaria viridis* (L.) Beauv.) // *Pestic. Biochem. Physiol.* — 1992. — **42**. — P. 227—241.
 34. Delye C., Menchari Y., Michel S., Darmency H. Molecular basis for sensitivity to tubulin-binding herbicides in green foxtail // *Plant. Physiol.* — 2004. — **136**. — P. 3920—3932.
 35. Lowe D.B., Swire-Clark G.A., McCarty L.B., Whitwell T., Baird W.V. Biology and molecular analysis of dinitroaniline-resistant *Poa annua* L. // *Int. Turfgrass Soc. Res. J.* — 2001. — **9**. — P. 1019—1025.
 36. 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* // *Physiol. Plant.* — 1991. — **82**. — P. 35.
 37. Страшнюк Н.М., Блюм Я.Б., Смертенко А.П., Сидоров В.А., Глеба Ю.Ю. Получение амипрофосметил-устойчивых линий *Nicotiana plumbaginifolia*, содержащих мутантный тубулин // *Докл. РАН.* — 1993. — **332**. — С. 240—243.
 38. Blume Ya.B., Strashnyuk N.M., Smertenko A.P., Solodushko V.G., Sidorov V.A., Gleba Yu.Yu. Alteration of β -tubulin in *Nicotiana plumbaginifolia* confers resistance to amiprofosmethyl // *Theor. Appl. Genet.* — 1998. — **97**. — P. 464—472.
 39. Блюм Я.Б., Страшнюк Н.М., Смертенко А.П., Солодушко В.Г., Глеба Ю.Ю. Изменения β -тубулина обеспечивают устойчивость к трифлорулину мутантов *Nicotiana plumbaginifolia*, полученных *in vitro* // *Доп. НАН України.* — 1996. — № 7. — С. 132—137.
 40. Blume Ya.B., Strashnyuk N.M., Gleba Yu.Yu. Selection and analysis of trifluralin-resistant mutants of *Nicotiana plumbaginifolia* // *Abstr. Satellite Symp. of the 15th Int. Cong. of Biochem.* (Sea of Galilee, Israel, August 1—4, 1991). — Israel, 1991. — P. 41.
 41. Yemets A.I., Strashnyuk N.M., Blume Ya.B. Plant mutants and somatic hybrids with resistance to dinitroanilines // *Cell Biol. Int.* — 1997. — **21**, № 12. — P. 912—914.
 42. Bolduc C., Lee V.D., Huang B. β -Tubulin mutants of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1988. — **85**. — P. 131—135.
 43. Vaughn K.C., Vaughan M.A. Mitotic disrupter from higher plants. Effect on plant cell // *Biological Active Natural Products: Potential Use in Agriculture* / Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. No. 380., 1988. — P. 273—293.

44. Ellis J.R., Taylor R., Hussey P. Molecular modeling indicates that two chemically distinct classes of anti-mitotic herbicide bind to the same receptor site(s) // *Plant. Physiol.* — 1994. — **105**. — P. 15–18.
45. Solodushko V.G., Kovalenko N.V., Yemets A.I., Blume Ya.B. Expression of mutant tubulin with decreased affinity to amiprofosmethyl in heterological plant cell // *Mol. Biol. Cell.* — 1996. — 7(Suppl.). — P. 46a.
46. Yemets A.I., Nyporko A.Yu., Swire-Clark G., Baird W.V., Blume Ya.B. Mechanisms of plant resistance to dinitroanilines and phosphoroamidates based on β -tubulin mutations // *Abstr. XVII Int. Bot. Congress.* — Vienna, 2005. — P. 292.
47. Clayton L., Lloyd C.W. The relationship between the division plane and spindle geometry in *Allium* cells treated with CIPC and griseofulvin: an anti-tubulin study // *Eur. J. Cell Biol.* — 1984. — **34**. — P. 248–253.
48. Gunning B.E., Wick S.M. Preprophase bands, phragmoplasts, and spatial control of cytokinesis // *J. Cell Sci. Suppl.* — 1985. — **2**. — P. 157–179.
49. Lehnen L.P., Vaughan M.A., Vaughn K.C. Terbutol affects spindle microtubule organizing centres // *J. Exp. Bot.* — 1990. — **41**, № 5. — P. 537–546.
50. Lloyd C.W., Traas J.A. The role of F-actin in determining the division plane of carrot suspension cells. Drug studies // *Development.* — 1988. — **102**. — P. 211–221.
51. Hoffman J.C., Vaughn K.C. Mitotic disrupter herbicides act by a single mechanism but vary in efficacy // *Protoplasma.* — 1994. — **179**. — P. 16–25.
52. Eleftheriou E.P., Bekiari E. Ultrastructural effects of the herbicide chlorpropham (CIPC) in root tip cells of wheat // *Plant Soil.* — 2000. — **226**. — P. 11–19.
53. Young D.H., Lewandowski V.T. Covalent binding of the benzamide RH-4032 to tubulin in suspension-cultured tobacco cells and its application in a cell-based competitive-binding assay // *Plant Physiol.* — 2000. — **124**. — P. 115–124.
54. Bartels P.G., Hilton J.L. Comparison of trifluralin, oryzalin, pronamide, propham and colchicine treatments on microtubules // *Pest. Biochem. Physiol.* — 1973. — **3**. — P. 462–472.
55. Coss R.A., Bloodgood R.A., Brower D.L., Pickett-Heaps J.D., McIntosh J.R. Studies on the mechanism of action of isopropyl N-phenyl carbamate // *Exp. Cell Res.* — 1975. — **92**. — P. 394–398.
56. Coss R.A., Pickett-Heaps J.D. The effects of isopropyl N-phenyl carbamate on the green alga *Oedogonium cardiacum*. I. Cell division. // *J. Cell. Biol.* — 1974. — **63**. — P. 84–98.
57. Hepler P.K., Jackson W.T. Isopropyl N-phenylcarbamate affects spindle microtubule orientation in diving endosperm cells of *Haemanthus katerina* Baker // *J. Cell Sci.* — 1969. — **5**. — P. 727–743.
58. Oliver J.M., Krawiec J.A., Berlin R.D. A carbamate herbicide causes microtubule and microfilament disruption and nuclear fragmentation in fibroblasts // *Exp. Cell Res.* — 1978. — **116**. — P. 229–237.
59. Емец А.И., Милейко А.А., Блюм Я.Б. Получение мутантов *Nicotiana plumbaginifolia* L., устойчивых к гербициду изопропил-N-фенилкарбамату // *Доп. НАН України.* — 2000. — № 10. — С. 182–187.
60. Yemets A., Stelmakh O.A., Kundelchuk O.P., Blume Ya.B. Obtaining and analysis of isopropyl-N-phenyl carbamate resistant lines of *Nicotiana* species // *Cell Biol. Int.* — 2003. — **27**, № 3. — P. 307–310.
61. Стельмах О.О., Емец А.И., Блюм Я.Б. Мутанти *Nicotiana sylvestris* L. зі стійкістю до гербициду ізопропіл-N-фенілкарбамату // *Доп. НАН України,* 2007, прийнята до друку.
62. Yemets A.I., Stelmakh O.A., Blume Ya.B. Nocodazole provokes an apoptosis in isopropyl-N-phenyl carbamate resistant and sensitive *Nicotiana* lines but in two different ways // *BMC Plant Biology.* — 2005. — **5** (Suppl. 1): S37 doi:10.1186/1471-2229-5-S1-S37.
63. Стельмах О.А., Кравець Е.А., Емец А.И., Блюм Я.Б. Особенности репродуктивного развития мутантов *Nicotiana sylvestris*, устойчивых к изопропил-N-фенилкарбамату // *Цитология и генетика.* — 2005. — **39**, № 6. — С. 15–23.
64. Yemets A.I., Stelmakh, O.A., Kravets E. A., Blume Ya.B. Early PCD events in male gametophyte development of isopropyl-N-phenyl carbamate resistant *Nicotiana sylvestris* mutant lines // *BMC Plant Biology.* — 2005. — **5** (Suppl. 1): S38 doi:10.1186/1471-2229-5-S1-S38.
65. Blume Ya.B., Nyporko A.Yu., Yemets A.I., Baird W.V. Structural modelling of the interaction of plant α -tubulin with dinitroaniline and phosphoroamidate herbicides // *Cell Biol. Int.* — 2003. — **27**. — P. 171–174.
66. Morissette N.S., Mitra A., Sept D., Sibley L.D. Dinitroanilines bind α -tubulin to disrupt microtubules // *Mol. Biol. Cell* — 2004. — **15**. — P. 1960–1968.
67. Blume Ya.B., Nyporko A.Yu., Yemets A.I., Baird W.V. Are earlier predicted sites of different plant tubulins involved in interaction with dinitroanilines? // *Mol. Biol. Cell.* — 2002. — 13(Suppl.). — P. 463a.
68. Schibler M. J., Huang B. The colR4 and colR15 β -tubulin mutations in *Chlamydomonas reinhardtii* confer altered sensitivities to microtubule inhibitors and herbicides by enhancing microtubule stability // *J. Cell Biol.* — 1991. — **113**. — P. 605–614.
69. Hollomon D.W., Butters J.A., Barker H. Tubulins: a target for anti-fungal agents // *Anti-infectives: recent advances in chemistry and structure activity relationships* / Eds P.H. Bentley, P.J. O'Hanlon. — London : Chemistry, 1997. — P. 152–156.
70. Fujimura M., Kamakura T., Inoue S., Yamaguchi I. Sensitivity of *Neurospora crassa* to benzimidazoles and N-phenylcarbamates: effect of amino acid substitu-

- tions at position 198 in β -tubulin // *Pest. Biochem. Physiol.* — 1992. — **44**. — P. 165–167.
71. Fujimura M., Kamakura T., Inoue H., Yamaguchi I. Amino-acid alterations in the beta-tubulin gene of *Neurospora crassa* that confer resistance to carbendazim and diethofencarb // *Curr. Genet.* — 1994. — **25**. — P. 418–422.
 72. Yemets A., Stelmakh O., Kravets Ye., Nyporko A., Blume Ya.B. Blume IPC-resistant *Nicotiana* lines as a tool for investigation of phenylcarbamate and benzimidazole interaction with plant tubulin // *Plant Biology* 2003. — Abstr. of Annual Meeting of ASPB (25–30 July 2003, Honolulu, Hawaii, USA). — P. 235.
 73. Ныпорко А.Ю., Живолуп А.Н., Блюм Я.Б. Сравнительный анализ первичной структуры мутантных тубулинов, устойчивых к антимицротрубочковым соединениям, для предсказания позиций новых мутаций с аналогичными свойствами // *Цитология и генетика.* — 2003. — **37**, № 2. — P. 69–78.
 74. Takahashi A., Yamada S., Yamada H., Kawana T. Mitotic disruption by a novel pyrimidine herbicide, NS-245852, in oat (*Avena sativa* L.) roots // *Weed Biol. Management.* — 2001. — **1**, № 3. — P. 182–188.
 75. Tresch S., Plath P., Grossmann K. Herbicidal cyanoacrylates with antimicrotubule mechanism of action // *Pest. Manag. Sci.* — 2005. — **61**, № 11. — P. 1052–1059.
 76. Емец А.И., Кундельчук О.П., Смертенко А.П., Солодущко В.Г., Блюм Я.Б., Глеба Ю.Ю. Соматические гибриды высших растений с использованием мутанта *Nicotiana plumbaginifolia*, устойчивого к ампрофосметилу // *Генетика.* — 1996. — **32**, № 8. — С. 1104–1111.
 77. Емец А.И., Блюм Я.Б., Смертенко А.П., Кундельчук О.П., Рудас В.А., Глеба Ю.Ю. Получение γ -гибридов высших растений с мутантным β -тубулином // *Докл. РАН.* — 1997. — **353**, № 4. — С. 557–561.
 78. Blume Ya.B., Kundelchuk O.P., Solodushko V.G., Sulimenko V.V., Yemets A.I. Asymmetric somatic hybrids of higher plants resistant to trifluralin // *Proc. Int. Symp. on Weed & Crop Resist. to Herbicides* (Cordoba, Spain, 1995) / Eds R. De et al. — Univ. Cordoba, 1996. — P. 182–185.
 79. Yemets A.I., Smertenko A.P., Solodushko V.G., Kundelchuk O.P., Blume Ya.B. Asymmetric somatic hybrids with mutant β -tubulin resistant to amiprofosmethyl // *Plant Molecular Biology and Biotechnology* / Eds K.K. Tewari, G.S. Singhal et al. — New Delhi : Narosa Publ. House, 1997. — P. 220–234.
 80. Yemets A.I., Kundel'chuk O.P., Smertenko A.P., Solodushko V.G., Rudas V.A., Gleba Yu.Yu., Blume Ya.B. Transfer of amiprofosmethyl-resistance from *Nicotiana plumbaginifolia* mutant by somatic hybridization // *Theor. Appl. Genet.* — 2000. — **100**. — P. 847–857.
 81. Anthony R.G., Hussey P.J. Double mutation in *Eleusine indica* α -tubulin increases the resistance of transgenic maize calli to dinitroaniline and phosphoroamidate herbicides // *Plant J.* — 1999. — **18**. — P. 669–674.
 82. Anthony R.G., Reichelt S., Hussey P. Dinitroaniline herbicide-resistant transgenic tobacco plants generated by co-overexpression of a mutant α -tubulin and a β -tubulin // *Nature Biotech.* — 1999. — **17**. — P. 712–716.
 83. Breviario D., Nick P. Plant tubulins: a melting pot for basic questions and promising applications // *Transgenic Res.* — 2000. — **9**. — P. 383–393.
 84. Nyporko A.Yu., Demchuk O.N., Blume Ya.B. Cold adaptation of plant microtubules: structural interpretation of primary sequence changes in a highly conserved region of α -tubulin // *Cell Biol. Int.* — 2003. — **27**, № 3. — P. 241–243.
 85. Ji S., Lu Y., Li J., Wei G., Liang X., Zhu Y. A beta-tubulin-like cDNA expressed specifically in elongating cotton fibers induces longitudinal growth of fission yeast // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2002. — **296**. — P. 1245–1250.
 86. Kordyum E.L., Shevchenko G.V., Yemets A.I., Nyporko A.Yu., Blume Ya.B. Application of GFP technique for cytoskeleton visualization onboard the International Space Station // *Acta Astronaut.* — 2005. — **56**. — P. 613–621.
 87. Yemets A.I., Bayer G., Radchuk V.V., Bayer O., Blume Ya.B., Atanassov A., Baird W.V. The development of transformation vectors based upon modified plant tubulin genes as the selectable marker. — *Botany 2005* (Austin, Texas, 13–17 August, 2005): <http://www.2005.botanyconference.org/engine/search/index.php?func=detail&aid=458>.
 88. Yemets A.I., Klimkina L.A., Tarassenko L.V., Blume Ya.B. Efficient callus formation and plant regeneration from goosegrass *Eleusine indica* (L.) // *Plant Cell Rep.* — 2003. — **21**, № 6. — P. 503–510.

Поступила 31.01.07