

оп $V$ , поскольку именно этот этап является критическим в процессе инициации репликации любого внехромосомного генетического элемента [1].

Для картирования области промотора *par*-оперона, связанной с функцией несовместимости, были созданы праймеры, позволяющие обеспечить амплификацию определенных участков данной последовательности (см.табл. 2). Продукты амплификации в дальнейшем были встроены в вектор pGEM-T и использованы в тестах на несовместимость с плазмидой pMT2R. В результате этих экспериментов установлено, что последовательность размером 154 п. н., расположенная на расстоянии 76 п. н. от стартового кодона *ragA*-гена, связана с функцией несовместимости плазмиды pMT2 (см. рисунок).

Таким образом, несовместимость плазмиды pMT2 группы несовместимости P-9 обеспечивается двумя функциональными единицами - гер-геном и промоторным участком *par*-оперона. Поскольку генетические детерминанты несовместимости, как правило, связаны с функцией копияности плазмидного репликагона [12], полученные результаты представляют не только теоретический, но и практический интерес, в частности, позволяют в дальнейшем направленно вносить изменения в плазмидный геном и отбирать многокопийные варианты плазмиды pMT2 с целью создания векторных систем широкого круга хозяев для молекулярного клонирования.

1. Espinosa M., Cohen S., Couturier M. et al.//The Horizontal Gene Pool/C.M. Thomas (ed.). Amsterdam, 2000. P. 1.
2. Surtees J. A., Funnell B. E.//Curr. topics in development biology. 2003. Vol. 56. P. 145.
3. Datta N. // Plasmid of medical, environmental and commercial importance / K.N. Timmis, A. Puhler (eds.). Amsterdam, 1979. P. 3.
4. Титок М.А., Олехнович И.Н., Евтушенков А. Н.//Молекул, генетика, микробиология и вирусология. 1991. №3. С. 18.
5. Greated A., Titok M.A., Krasowiak R. et al.// Microbiol. 2000. Vol. 146. P. 2249.
6. Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J. et al.//Nucl. Acids Res. 1989. Vol. 17. P. 3469.
7. Titok M.A., Sevastyanovich Y.R., Krasowiak R. et al. // Plasmid biology, 14-21 septembre. Greece. 2004. P. 153.
8. Yanisch-Perron C., Vierira J. & Messing J.//Gene. 1985. Vol. 33. P. 103.
9. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, 1989.
10. Antoine R., Loch C.//Mol. Microbiol. 1992. Vol. 6. P. 1785.
11. Gerdes A., Ayora S., Canosa I. et al.//The Horizontal Gene Pool /C.M. Thomas (ed.). Amsterdam, 2000. P. 49.
12. Dennis J. J., Zylstra G. J. //J. Mol. Biol. 2004. Vol. 341. № 3. P. 753.
13. Del Solar G., Giraldo R., Ruiz-Echevarria M.J. et al.//Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. Vol. 62. №2. P. 434.

Поступила в редакцию 10.12.2004.

*Марина Алексеевна Титок*- кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики.

УДК 581.1

*А.И. СОКОЛИК, Н.Ш. МАНГАЛАДЗЕ, Д.А. ОНИАНИ, В.М. ЮРИН, Т.И. ОНИАНИ*

## МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПОВЫШЕННЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ НЕКОТОРЫХ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ $H^+$ -АТФазной ПОМПЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

It was shown, that elevated microelements concentrations ( $2 \cdot 10^{-3}$  M)  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  inhibit of plant cell plasma membrane  $H^+$ -ATPase activity by action on the inside of membrane.

Микроэлементы представляют собой группу незаменимых питательных веществ растений: многие из них входят в состав активного центра ферментов, обеспечивающих рост и развитие растительных организмов [1], в то же время высокое их содержание в среде произрастания оказывает неблагоприятное воздействие на рост и развитие растений.

Протондвижущая сила, возникающая в результате функционирования  $H^+$ -АТФазной помпы, характеризует энергетическое состояние растительной

клетки и играет первостепенную роль в обеспечении ее питательными веществами [2]. Следует также отметить, что влияние микроэлементов на транспортно-барьерные свойства плазматической мембраны растительной клетки в условиях *in vivo*, за исключением проведенного нами довольно подробного исследования по действию одного из микроэлементов (меди) на отдельные транспортные системы [3], практически не изучалось.

В настоящей работе предпринята попытка выявить влияние на функциональную активность  $H^+$ -АТФазной помпы плазмалеммы *in vivo* таких микроэлементов, как  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и  $Ni^{2+}$ .

### Материал и методика

В экспериментах использовались гигантские интернодальные клетки пресноводной харовой водоросли *Niteila flexilis*, которые выращивались, препарировались и подготавливались к эксперименту общепринятыми методами. В качестве базового раствора служила искусственная прудовая вода (ИПВ) следующего состава:  $10^{-4}M$   $KCl$ ,  $10^{-3}M$   $NaCl$  и  $10^{-4}M$   $CaCl_2$  [4].

Использовались адаптированные и неадаптированные к темноте клетки. В первом случае микроэлементы вводились в среду в момент максимальной светоактивации помпы, а во втором - после установления мембранного потенциала на стационарном уровне. Электрические характеристики плазмалеммы исследовались с помощью стандартной микроэлектродной техники в режиме фиксации потенциала на плазмалемме [6].

Фотоиндуцируемая протонная помпа активировалась светом от искусственного источника (лампа накаливания), обеспечивающего на поверхности клетки  $12 \text{ Вт/м}^2$ . В эксперименте использовались клетки при освещении 12 ч, а также содержавшиеся 2-3 сут в темноте.

Действие микроэлементов ( $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и  $Ni^{2+}$ ) на светостимулируемую протонную помпу плазмалеммы изучалось на фоне повышенного содержания  $Ca^{2+}$  ( $2,5 \cdot 10^{-3} M$ ) и  $Ca^{2+}$  ( $5 \cdot 10^{-3} M$ ) при pH 6,0, что было необходимо для минимизации влияния калиевых каналов и устранения вклада поверхностного заряда мембраны в изучаемые явления [5]. Концентрация ионов калия и натрия поддерживалась на уровне ИПВ.

Данные, полученные для транспортных систем используемого нами объекта, хорошо экстраполируются на аналогичные системы клеток высших растений [6], и с достаточной степенью уверенности установленные закономерности могут быть перенесены на культурные растения.

Для обработки результатов использовались методы вариационной статистики [7].

### Результаты и их обсуждение

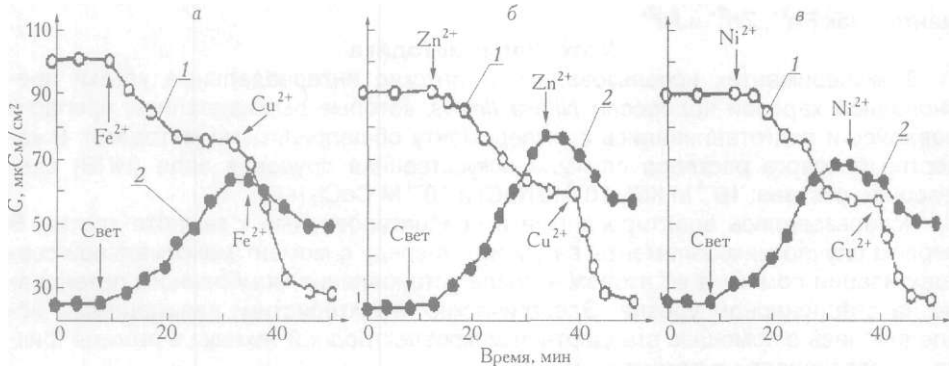
Изучение влияния  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и  $Ni^{2+}$  на активную светом  $H^+$ -АТФазу показало, что данные микроэлементы не вызывают достоверных изменений регистрируемых параметров до концентрации  $10^{-3}M$ .

При добавлении исследуемых микроэлементов в концентрации  $2 \cdot 10^{-3} M$  в момент максимальной светоактивации помпы в течение 20-30 мин наблюдалось уменьшение проводимости плазмалеммы на 30-60 %. Необходимо отметить, что последующее введение ингибитора  $H^+$ -АТФазы - ионов  $Cu^{2+}$  приводило к быстрому (4-6 мин) снижению данного показателя до уровня, соответствующего моменту начала светостимуляции (рисунок).

Введение в среду той же концентрации ионов  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и  $Ni^{2+}$  способствовало падению проводимости мембраны на 20-40 % у неадаптированных к темноте клеток. При последующем введении в среду  $5 \cdot 10^{-5}M$   $Cu^{2+}$  проводимость быстро снижалась до уровня, наблюдаемого у адаптированных клеток, т. е. до значения, характерного для неактивного состояния фотоиндуцируемой электрогенной  $H^+$ -АТФазной помпы. Для полного ингибирования  $H^+$ -АТФазы требовалось 10-20-минутное выдерживание клеток в растворах с более высокой концентрацией ( $\sim 10^{-2}M$ ). Значения константы ингибирования помпы ионами  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и  $Ni^{2+}$  составляли  $(7-8) \cdot 10^{-3}$  и  $(3-4) \cdot 10^{-3} M$  соответственно.

Установленные константы ингибирования на 1-2 порядка выше, чем полученные для  $H^+$ -помпы плазматических мембран, выделенных из корней кукуру-

зы [8], моркови [9], подсолнечника и пшеницы [10]. Авторы работы [11] объясняют это различие следующим образом: во-первых, в живой клетке активны системы детоксикации, способные перевести проникающие в цитоплазму тяжелые металлы в нерастворимую форму или вывести их обратно в окружающий раствор; во-вторых, свойства H<sup>+</sup>-АТФазы, ее строение и чувствительность к действию указанных катионов могут существенно изменяться в условиях *in vitro* по сравнению с *in vivo*.



Влияние  $2 \cdot 10^{-2} \text{M Fe}^{2+}$  (а),  $\text{Zn}^{2+}$  (б) и  $\text{Ni}^{2+}$  (в) на проводимость плазмалеммы.

1 и 2 - адаптированные и неадаптированные к темноте клетки соответственно. Моменты введения исследуемых металлов, начало светоактивации помпы для клеток, адаптированных к темноте, и добавления  $5 \cdot 10^{-5} \text{M Cu}^{2+}$  указаны стрелками

Время и характер подавления активности помпы ионами  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$  отличаются от отмеченных нами эффектов при действии ионов меди [3] - происходят медленнее и не являются полными. Объяснить данный факт можно, предположив, что ионы оказывают влияние с внутренней стороны плазмалеммы, т. е. для связывания с центром ингибирования им необходимо проникнуть в цитоплазму. Согласно ряду работ [12-14] при концентрации  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$  в наружном растворе выше  $10^{-3} \text{M}$  данные катионы в течение 5-15 мин накапливаются в цитоплазме в концентрации выше  $10^{-6} \text{M}$ , которой достаточно для ингибирования АТФаз растений [10]. Это положение подтверждается полученными в наших экспериментах временными характеристиками изменения проводимости плазматической мембраны (см. рисунок).

Анализ данных литературы показывает, что наиболее вероятным механизмом воздействия  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$  на электрогенную H<sup>+</sup>-АТФазную помпу плазмалеммы является связывание катиона этих металлов с SH-группами активного центра данного фермента; такое связывание препятствует присоединению к АТФазе комплекса Mg - АТФ, что и нарушает функционирование помпы [10].

Обнаруженное в ходе исследования подавление активности H<sup>+</sup>-помпы указанными микроэлементами при их высоких концентрациях развивалось достаточно быстро. Отсюда можно предположить, что для клеток корневой системы высших растений происходящие физиологические расстройства могут быть одной из причин токсичности данных катионов. Известно, что, находясь в растворах, содержащих миллимолярные концентрации  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$ , растительные клетки погибают в течение суток [12]. Следовательно, ингибирование H<sup>+</sup>-АТФазной помпы может выступать в качестве одной из первичных токсических реакций растительной клетки на избыток  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$ .

1. Медведев С.С. Физиология растений. СПб., 2004.

2. Воробьев Л. Н. // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. М., 1988. Т. 5.

3. Demidchik V.V., Sokolik A.I., Yurin V. M // Plant Physiology. 1997. Vol. 114. № 8. P. 1313.

4. Юрин В.М., Гончарик М.Н., Галактионов С.Г. Перенос ионов через мембраны растительных клеток. Мн., 1977.

5. Юрин В.М., Соколик А.И., Кудряшов А. П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. Мн., 1991.

6. Grabov A., Blatt M. R. // Planta. 1997. Vol. 201. № 4. P. 84.

7. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Мн., 1973.

8. Kennedy C.D., Gonsalves F. A.N. // Plant and Soil. 1989. Vol. 117. № 2. P. 167.

9. Kennedy C.D., Gonsalves F. A. N. // J. Exp. Bot. 1987. Vol. 38. P. 800.
10. Serano R. // The Plant Plasma Membrane. Berlin, 1990. P. 127.
11. Ros R., Morales A., Segura J., Picazo I. // Plant Sci. 1992. Vol. 83. P. 1.
12. Chaney R.L. // Zinc in soil and plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publ. 1993. P. 135.
13. Mishra D., Kar M. // Bot. Rev. 1974. Vol. 1. P. 395.
14. Улит и с В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей. Рига, 1983.

Поступила в редакцию 10.12.2004.

**Анатолий Иосифович Соколик** - кандидат биологических наук, заведующий НИЛ физиологии растительной клетки.

**Нина Шотаевна Мангаладзе** - кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии растений Кутаисского государственного университета им. А. Церетели.

**Джаба Ардеванович Ониани** - доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гидробиологии и токсикологии Тбилисского государственного университета им. И. Джавахишвили.

**Владимир Михайлович Юрин** - доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений.

**Тамара Ираклиевна Ониани** - научный сотрудник лаборатории экологической биофизики Тбилисского государственного университета им. И. Джавахишвили.

УДК 576.31

Ю.И. КОЖУРО

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ ХРОМАТИНА ЯЧМЕНЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГЕРБИЦИДА ТРЕФЛАНА

The investigation of the herbicide treflan action on root cells of *Hordeum vulgare* L. was performed. The treflan presence at seeds germination results to DNA degradation. The features revealed allow interpreting the phenomenon described as a programmed cell death induced in root cells.

Повышенный интерес к изучению механизмов действия используемых в сельскохозяйственной практике пестицидов связан с их негативным влиянием на физиологические и генетические процессы у растений. Известно, что гербицид трефлан (действующее вещество - 2,6-динитро-4-(трифторметил)-М,М-дипропиланилин) блокирует деление клеток из-за деполимеризации сети микротрубочек [1, 2]. Вследствие высокой персистентности остатки этого гербицида могут повреждать последующие культуры севооборота - овес, ячмень и пшеницу [3]. В настоящей работе изучено действие трефлана на генетический аппарат клеток корневой меристемы проростков ячменя.

### Материал и методика

Объектом исследования служили проростки многорядного ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Визит. Семена проращивали в водных растворах трефлана при 25 °С. В контрольных экспериментах использовали дистиллированную воду. Для цитогенетического анализа корешки фиксировали в смеси уксусной кислоты и этилового спирта (1:3) и окрашивали ацетоорсеином. Давленные временные препараты готовили по стандартной методике [4]. Учитывали долю клеток с абберациями хромосом в ана- и телофазных клетках. Анализ спектра аббераций проводили по известной методике [5] с выделением хроматидных (одиночных) и хромосомных (двойных) мостов и фрагментов, а также отставаний хромосом (геномные мутации). Цитотоксическую активность гербицида оценивали по его влиянию на процесс деления клеток в корневой меристеме проростков. Митотические и фазовые индексы определяли по общепринятым методикам [6]. Результаты статистически обрабатывали с использованием критерия Стьюдента.

ДНК из корней проростков выделяли обычным методом [7]. Электрофорез проводили в 1,5 % агарозном геле с 40 ммоль/л триацетатным буфером, содержащим 0,5 мг/мл бромистого этидия [8]. После электрофоретического разделения ДНК гели сканировали с помощью системы ImageMaster VDS-CL («Amersham», США).

### Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены данные цитогенетического анализа действия трефлана в различных концентрациях на клетки корневой меристемы проростков ячменя. Возраст проростков составлял 46 ч от начала замачивания. Как видно