

ИЗМЕНЕНИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КАК ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ РАСТЕНИЙ НА СТРЕСС, ВЫЗВАННЫЙ НАРУШЕНИЕМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КОМПОНЕНТОВ ЦИТОСКЕЛЕТА

Ю.И. Кожуро, Е.С. Пышко, А.Д. Мороз
Минск, БГУ

В качестве препаратов для борьбы с сорной растительностью в сельском хозяйстве широко используются химические соединения, которые нарушают функционирование компонентов цитоскелета растений (производные динитроанилина, пиридазина, бензойной кислоты и др.). Динитроанилиновый гербицид трефлан, вследствие дестабилизации микротрубочек цитоскелета, вызывает нарушение хода митоза и повышает количество клеток с морфологическими признаками программируемой гибели у растений [1, 2]. Одним из ключевых событий программируемой клеточной гибели (ПКГ) является фрагментация ядерной ДНК вследствие активации эндонуклеолитических ферментов. В связи с этим представлялось интересным установить общие возрастные закономерности изменения нуклеазной активности при развитии ПКГ, индуцированной гербицидом трефланом. Это позволит получить важную информацию об адаптивных реакциях растительных клеток, а установление конкретных характеристик нуклеазной системы даст возможность ближе подойти к расшифровке механизма программируемой клеточной гибели.

Материал и методы. Объектом исследования служили проростки ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сортов «Гонар», «Дзивосны» и «Сталы». Семена проращивались в растворах трефлана при концентрации действующего вещества 1 мг/л при 25 °С. В контроле использовалась дистиллированная вода.

Для получения белковых экстрактов 150 мг корешков растирали в фарфоровой ступке со 150 мл буфера, содержащего 150 мМ Трис-НСI, рН 6,8; 0,5 мМ PMSF; 0,1 М дитиотрейтола. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 10 000 g и супернатант использовали для определения нуклеазной активности. Концентрацию белка в супернатанте определяли по методу Брэдфорда [3].

Измерение активности «щелочных» нуклеаз проводили в 1 мл 5 мМ Трис-НСI-буфера, рН 7,5, содержащего 5 мМ Ca^{2+} , 5 мМ Mg^{2+} и 0,1 мг денатурированной тимусной ДНК. Активность «кислых» нуклеаз определяли в 1 мл 40 мМ Na-ацетатного буфера, рН 5,5, содержащего 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ Zn^{2+} и 0,1 мг денатурированной тимусной ДНК. В пробы вносили 34 мкл белкового экстракта и смесь инкубировали при 37°С в течение часа. Реакцию останавливали добавлением 87 мкл 30 % трихлоруксусной кислоты для «щелочных» нуклеаз и 100 мкл 0,3 М хлорной кислоты для «кислых» нуклеаз. Смесь выдерживали 30 мин во льду, центрифугировали 15 мин при 10 000 g, после чего определяли поглощение в супернатанте при 260 нм с помощью прибора Cary 50 Scan.

Результаты и их обсуждение. Анализ динамики изменения эндонуклеазной активности в клетках растений ячменя обработанных трефланом

свидетельствуют о появлении $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимых нуклеаз, оптимум действия, которых лежит в области pH 7,5 («щелочные» эндонуклеазы). Так, у проростков ячменя изученных сортов на вторые сутки роста на среде с гербицидом увеличение данного типа эндонуклеазной активности по отношению к контролю составило 1,2–1,4 раза ($p < 0,05$), а на третье и четвертые сутки – 1,3–1,7 и 1,8–2,2 раза соответственно ($p < 0,05$).

При действии гербицида трефлана на растения ячменя наблюдается также индукция активности Zn^{2+} -зависимых нуклеаз оптимум действия, которых лежит в области pH 5,5 («кислые» эндонуклеазы). Так, у проростков ячменя изученных сортов на вторые сутки роста на среде с гербицидом увеличение активности «кислых» эндонуклеаз по отношению к контролю составило 1,1–1,3 раза ($p > 0,05$), а на третье и четвертые сутки – 1,3–1,6 и 1,6–2,0 раза соответственно ($p < 0,05$).

Установлено, что уровень активности Zn^{2+} -зависимых нуклеаз в клетках корней ячменя сорта «Сталы» существенно отличался от уровня сортов «Гонар» и «Дзивосны». Так, у двухсуточных проростков ячменя сорта «Сталы» активность ферментов эндонуклеазного комплекса составила $4,0 \pm 0,1$ ед. акт./мг белка, что более чем в 2 раза ниже ($p < 0,05$), чем у проростков ячменя сортов «Гонар» и «Дзивосны». У трех- и четырехсуточных проростков ячменя сорта «Сталы» эндонуклеазная активность увеличивалась, однако, и в этих случаях она была в 2 раза ниже, чем у проростков сортов «Гонар» и «Дзивосны» того же возраста. Существенных отличий по уровню активности $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимых нуклеаз в клетках корней ячменя сорта «Сталы» и сортов «Гонар» и «Дзивосны» не зарегистрировано.

Заключение. Таким образом, при действии гербицида трефлана на растения ячменя наблюдается индукция активности как $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимых нуклеаз оптимум действия, которых лежит в области pH 7,5 («щелочные» эндонуклеазы), так и Zn^{2+} -зависимых нуклеаз оптимум действия, которых лежит как в области pH 5,5 («кислые» эндонуклеазы). Обнаруженное явление может быть объяснено запуском программируемой гибели клеток вследствие нарушения функционирования микротрубочек цитоскелета.

У проростков ячменя сортов «Гонар» и «Дзивосны» обнаружен более высокий, чем у проростков сорта «Сталы» уровень активности Zn^{2+} -зависимых нуклеаз, что может служить показателем различной чувствительности/устойчивости изучаемых форм растений к антимикротрубочковому гербициду трефлану.

Список литературы

1. Кожуро Ю.И. Структурно-функциональные перестройки хроматина ячменя при действии гербицида трефлана / Ю.И. Кожуро // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Серия 2, Химия. Биология. География. – 2005. – № 1. – С. 39–42.
2. Trifluralin-induced disorganization of microtubular cytoskeleton alters the development of roots in *Hordeum vulgare* L. / E.V. Sheval, Yu.I. Kazhura, N.A. Poleshuk, E.M. Lazareva, E.A. Smirnova, N.P. Maximova, V.Yu. Polyakov // Acta Biologica Hungarica. – 2008. – Vol. 59 (4), № 2285. – P. 465–478.
3. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.