

ISSN 2221-9927

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ
«НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР НАЦИОНАЛЬНОЙ
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ ПО БИОРЕСУРСАМ»
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОТАНИКИ
ИМЕНИ В. Ф. КУПРЕВИЧА НАН БЕЛАРУСИ»
ОБЩЕСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ
«БЕЛОРУССКОЕ БОТАНИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО»
БЕЛОРУССКОЕ ОБЩЕСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ ФИЗИОЛОГОВ РАСТЕНИЙ

БОТАНИКА

(ИССЛЕДОВАНИЯ)

Выпуск 46

Минск
«Колорград»
2017

Ботаника (исследования) : Сборник научных трудов. Выпуск 46 / Ин-т эксперимент. бот. НАН Беларуси. – Минск : 2017. – 360 с.
ISSN 2221-9927.

В сборнике представлены оригинальные научные статьи белорусских ученых из ведущих научно-исследовательских учреждений Национальной академии наук и ВУЗов Беларуси, содержащие результаты экспериментальных исследований, теоретических и практических разработок в широком спектре направлений ботанической науки, физиологии и экологии растений.

Публикуемые в сборнике научные статьи рецензируются ведущими специалистами в области ботаники, экологии, физиологии и биохимии растений.

Редакционная коллегия :

акад. НАН Беларуси, проф. Н. А. Ламан
акад. НАН Беларуси, проф. В. И. Парфенов
д. б. н., проф. Н. Г. Аверина
к. б. н. Д. Г. Груммо
д. б. н., проф. В. В. Карпук
к. б. н. Н. А. Копылова
д. б. н. В. Н. Прохоров
к. б. н. А. В. Пугачевский
д. б. н. Г. Ф. Рыковский
д. б. н. В. В. Сарнацкий

Научные редакторы :

акад. НАН Беларуси, проф. Н. А. Ламан
акад. НАН Беларуси, проф. В. И. Парфенов

Ответственный секретарь

к. б. н. Т. А. Будкевич

ISSN 2221-9927

© ГНУ «Институт экспериментальной ботаники
им. В. Ф. Купревича», 2017
© Оформление. ЧПТУП «Колорград», 2017

220072, г. Минск, ул. Академическая, 27,

Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси.

Факс +375 (17) 284–18–53, e-mail: nan-botany@yandex.by

О. В. ЧИЖИК, О. В. КОВЗУНОВА, И. П. КОНДРАЦКАЯ
**ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕОМА *VACCINIUM CORYMBOSUM* L.
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* И *IN VIVO***

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск

Введение. Состояние и прохождение жизненного цикла клетки определяется составом ее белков (протеомом), гетерогенность и специфичность которых обуславливают ход метаболизма на каждом из этапов онтогенетического развития организма и, в свою очередь, зависят от условий внешней среды (стрессы разной природы, обеспеченность элементами питания, водный режим, регуляторные воздействия и т. п.).

В последние годы активно изучаются особенности как генома, так и протеома в интактных растениях и биологических системах. Возможность количественного и качественного анализа мРНК и популяций белков [1] увеличивает перспективу расшифровки функциональной и регуляторной сети, которая является «мостом» между генотипом и фенотипом, составления глобальных схем транскриптома для широкого разнообразия видов растений и изучения огромного количества информации, генерируемой кДНК.

Как известно, экспрессия генов регулируется на уровне образования РНК, когда хроматин находится в деконденсированной форме, что впоследствии выражается в биосинтезе белков [2].

В связи с этим исследование даже относительно простых генетических сетей требует знаний о белках, т. к. реальная оценка транскриптома может быть полностью осуществлена только совместно с изучением протеома и регуляции транскрипции при участии специализированных белков (Marmorstein, 2001), [3]. Необходимо также учитывать посттрансляционные модификации белков [4–6], приводящие к увеличению сложности белка без сопутствующего усиления в экспрессии гена. Дополнительные аргументы к использованию протеомики в качестве экспериментальной платформы основываются на том, что протеом отражает экспрессию молекул, связанную с функциональным состоянием клетки.

Выявление и идентификация белков поможет решить многие фундаментальные и прикладные проблемы.

Материалы (объекты) и методы исследований. Объектом исследования служили растения голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) сортов Нортланд и Эрлиблю из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси, перспективные для промышленного выращивания на территории Беларуси (устойчивость к низким температурам, болезням и вредителям, урожайность, продукционные характеристики). Образцы для анализов отбирали из вегетативной части маточных растений *in vivo* и стабилизированных *in vitro* культур.

Общую фракцию клеточных белков из *in vitro* и *ex vitro* культур голубики высокорослой сортов Нортланд и Эрлиблю выделяли методом ТХУ/ацетоновой преципитации по Amme et al. [7] с нашими модификациями.

Определение содержания белка в образцах голубики проводили по [8].

В качестве реагентов использовали готовые киты – RC DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, США) [8,9].

Вертикальный электрофорез белков образцов голубики высокорослой проводили в денатурирующих условиях в щелочной системе по методу Лэммли [10].

После электрофореза белки фиксировали в 40% спирте с 10% уксусной кислотой и окрашивали раствором коллоидного Кумасси (QC Colloidal Coomassie Stain, Bio-Rad, США). Окрашенные гели фотографировали с помощью цифровой фотокамеры. Анализ протеомных карт проводили с помощью специализированного программного обеспечения Quantity One Basic (Bio-Rad, США).

Все анализы проводили, как минимум, в трехкратной повторности, полученные результаты обрабатывали с использованием компьютерной программы StatSoft STATISTICA 7.0, отличия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В ходе работы были получены карты общего пула белков *in vitro* и *in vivo* культур голубики сортов Нортланд и Эрлиблю и проведен их сравнительный анализ (рисунок).

В результате скрининга протеомов были обнаружены бэнды, представляющие собой дифференциально экспрессирующиеся белки, которые могут претендовать на роль белков-маркеров функционального состояния голубики высокорослой на разных стадиях онтогенеза.

На электрофореграммах при окрашивании проявились фракции в диапазоне молекулярных масс (Мм) от 224,7 до 17,0 kDa (рисунок).

Сравнение электрофореграмм белков голубики высокорослой *in vivo* и *in vitro* культур сортов Нортланд и Эрлиблю позволил выявить индивидуальные белки, претендующие на роль сортоспецифичных белков, а также маркеров функционального состояния растений. В частности, у сорта Нортланд было выявлено 13 полипептидов, не характерных для сорта Эрлиблю, однако имеющие 14 своих тест-белков с Мм 224,7; 79,6; 74,8; 71,8; 65,2; 60,0; 57,9; 37,5; 37,1; 34,7; 27,4; 24,3; 24,5 и 17,0 кДа (таблица). У сорта Нортланд указанные 13 фракций имели Мм 97,5; 62,7; 61,7; 54,6; 52,2; 47,1; 44,0; 43,4; 32,8; 24,6; 23,1; 20,9 и 17,2, отсутствующие в белковых профилях голубики сорта Эрлиблю.

В ходе протеомных исследований также были выявлены группы белков, которые детектировались только в *in vitro* или *in vivo* культурах каждого сорта – потенциальные маркеры функционального состояния растения.

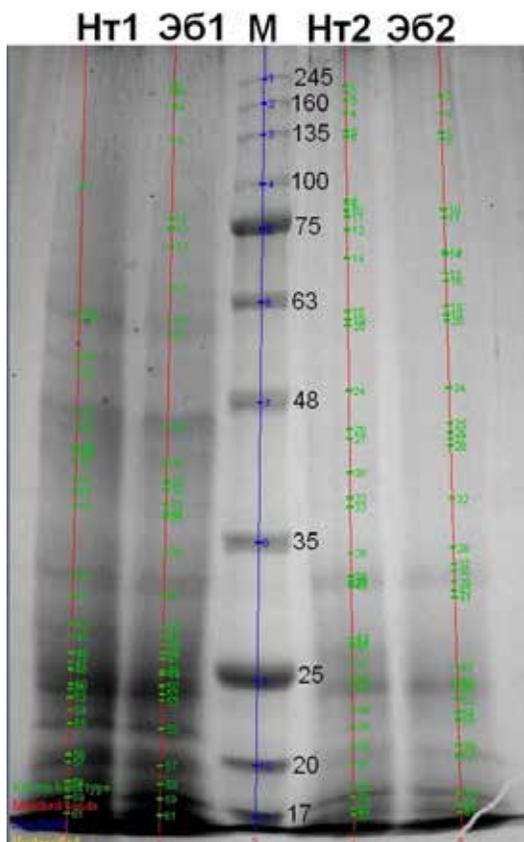


Рисунок. 1-D-электрофореграмма протеома *in vivo* (1) и *in vitro* (2) культур голубики высокорослой сортов Нортланд (Ht) и Эрлибу (Эб),
M – маркер молекулярной массы (кДа).

Таблица. Общий пул белков *in vitro* и *in vivo* культур голубики высокорослой сортов Нортланд и Эрлибло *

№	Молекулярная масса, кДа	Сорт Нортланд <i>ex vitro</i>	Сорт Нортланд <i>in vitro</i>	Сорт Эрлибло <i>ex vitro</i>	Сорт Эрлибло <i>in vitro</i>
1.	224,7		+	+	
2.	202,9	+	+	+	+
3.	<u>184,6</u>		±		
4.	173,2	+	+	+	+
5.	144,3		+		+
6.	129,1	+	+	+	+
7.	<u>97,5</u>	±			
8.	<u>89,2</u>		±		
9.	<u>87,7</u>		±		
10.	84,4		+		+
11.	79,6		+	+	+
12.	74,8		+	+	
13.	71,8			+	+
14.	71,2		+		+
15.	<u>67,9</u>				±
16.	<u>66,7</u>				±
17.	<u>65,2</u>			±	
18.	62,7	+	+		+
19.	61,7	+	+		+
20.	60,0		+	+	+
21.	<u>57,9</u>			±	
22.	<u>54,6</u>	±			
23.	<u>52,2</u>	±			
24.	50,1		+		+
25.	47,1	+			+
26.	45,5	+	+	+	+
27.	44,9		+		+

Продолжение таблицы

№	Молекулярная масса, кДа	Сорт Нортланд <i>ex vitro</i>	Сорт Нортланд <i>in vitro</i>	Сорт Эрлиблю <i>ex vitro</i>	Сорт Эрлиблю <i>in vitro</i>
28.	44,0	+			+
29.	<u>43,4</u>	±			
30.	41,9	+	+	+	
31.	40,2	+		+	
32.	39,5	+	+	+	+
33.	38,2	+	+	+	
34.	<u>37,5</u>			±	
35.	<u>37,1</u>			±	
36.	34,7		+	+	+
37.	<u>33,3</u>				±
38.	32,8	+	+		+
39.	31,9		+		+
40.	31,2		+		+
41.	30,8	+		+	+
42.	28,7	+		+	
43.	27,9	+	+	+	
44.	<u>27,6</u>		±		
45.	27,4		+	+	
46.	26,9	+		+	
47.	26,5	+	+	+	
48.	25,8	+		+	+
49.	25,5		+	+	+
50.	24,8	+	+	+	+
51.	24,6	+			
52.	<u>24,3</u>			±	
53.	23,8	+		+	+
54.	23,1	+	+		+
55.	22,1	+	+	+	+

№	Молекулярная масса, кДа	Сорт Нортланд <i>ex vitro</i>	Сорт Нортланд <i>in vitro</i>	Сорт Эрлиблю <i>ex vitro</i>	Сорт Эрлиблю <i>in vitro</i>
56.	20,9	+	+		+
57.	20,1	+	+	+	+
58.	18,9	+	+	+	
59.	18,1	+	+	+	+
60.	17,2	+	+		+
61.	17,0		+	+	+

*Примечание: + и – обозначают наличие или отсутствие полосы полипептида на электрофореграмме.

Так, в образцах *in vitro* культуры сорта Эрлиблю отмечены белки с Мм 67,9; 66,7 и 33,3; *in vitro* культуры сорта Нортланд – с Мм 184,6; 89,2; 87,7 и 27,6 кДа, отсутствующие у сорта Эрлиблю.

Для каждого исследуемого сорта голубики было выявлено по 5 полипептидов, синтезирующихся только в *in vivo* образцах.

У сорта Нортланд – это белки с Мм 97,5; 54,6; 52,2; 43,4 и 24,6 кДа, которые претендовали на роль белков-маркеров *in vivo* культуры данного сорта. Полипептиды с молекулярными массами 65,2; 57,9; 37,5; 37,1 и 24,3 кДа характерны только для *in vivo* образцов голубики сорта Эрлиблю.

Заключение. Проведенные электрофоретические исследования выявили сортоспецифичность протеома голубики высокорослой и фракций белков, претендующих на роль маркеров *in vivo* и *in vitro* культур. В протеоме сорта Нортланд и сорта Эрлиблю определено по 5 белков-маркеров в культуре *in vivo*, в образцах *in vitro* сорта Эрлиблю найдено 3, а у сорта Нортланд – 4 маркера.

Литература

1. Ponnala L. [et al.] // Plant J. 2014. Vol.78 (3). P. 424–40.
2. Шемарова И.В. // Цитология. 2008. Т. 50, № 8. С. 663–670.
3. Floris M. [et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2009. Vol.10. P. 3168–3185.
4. Ghaemmghami S [et al.] // Nature. 2003. Vol.425 (6959). P. 737–41.
5. Friso G., van Wijk K.J. // Plant Physiol. 2015 Vol. 169(3). P. 1469–87.
6. Kwon Sun Jae // Journal of Experimental Botany. 2006. Vol. 57, No. 7. P. 1547–1551.
7. S. Amme [et al.] // Proteomics. 2005. Vol. 5. P. 2508–2518.
8. Lowry O.H. [et al.]. // Journal of Biological Chemistry. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
9. Peterson Gary. L. // Analytical Biochemistry. 1979. Vol. 100, Issue 2. P. 201–220.
10. Laemmli U.K. // Nature. 1970. Vol. 227. T4. P.680–685.

О. В. ЧИЖИК, О. В. КОВЗУНОВА, И. П. КОНДРАЦКАЯ
**ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕОМА *VACCINIUM CORYMBOSUM* L.
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* И *IN VIVO***

Резюме

Для 2-х сортов голубики высокорослой (Нортланд и Эрлиблю) проведен скрининг протеома исходных растений (*in vivo*) и стабилизированных *in vitro* культур. Оценены функциональные особенности продуктов экспрессированного генома у культивируемых *in vitro* и *in vivo* растений. Выявлены белки, претендующие на роль белков-маркеров физиологического состояния голубики высокорослой, культивируемой *in vivo* и *in vitro*.

O. V. CHIZHIK, O. V. KOVZUNOVA, I. P. KONDRATSKAYA
**CHARACTERISTIC OF *VACCINIUM CORYMBOSUM* L. PROTEOM
IN CULTURE *IN VITRO* AND *IN VIVO***

Summary

The proteome screening for two high-bush blueberry cultivars (Northland and Earliblue) of the original plants (*in vivo*) and *in vitro* stabilized cultures were carried out. The functional features of the expressed genome products in plants cultivated *in vitro* and *in vivo* were evaluated. Proteins that claim to be protein markers of the physiological state of *in vivo* and *in vitro* high-bush blueberry have been identified.

Поступила в редакцию 10.11.2017 г.