

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов
III Международной научной конференции
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии
и биотехнологии растений*

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгеноза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад
НАН Беларуси, 2008

УДК 633/635:582.998:577.2

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ ПО ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМ СПЕКТРАМ 11S ГЛОБУЛИНА СЕМЯН

Гончарова Л.В., Зубарев А.В., Шугалей Н.А., Гетко Н.В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, 220012,
ул. Сурганова 2, e-mail: goncharova@cbg.basnet.by

Методом электрофореза в семенах двух сортовых популяций эхинацеи пурпурной, выделенных из коллекции ЦБС НАН Беларуси, идентифицирована группа запасных белков – 11S глобулин, состав которой характеризуется внутрисортowym полиморфизмом. Обсуждается возможность использования глобулина для идентификации и паспортизации генотипов.

Эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea* (L.) Moench), подсемейство *Asteroideae* семейства астровые, или сложноцветные – *Asteraceae* Dumort (Compositae Gisece) – уникальное лекарственное и декоративное растение. Основная и общеизвестная ценность растения заключается в его способности повышать естественные защитные силы организма, в первую очередь, благодаря веществам, обладающим иммуностимулирующей активностью и представленными производными оксикоричных кислот в листьях и полисахаридами в корневищах эхинацеи. Эхинацея является типичным перекрестноопылителем, что определяет особенности структуры сортовых популяций, каждая из которых представляет собой сложную смесь гетерозиготных биотипов. Это является предпосылкой эволюционных преобразований и дает материал для отбора хозяйственно-ценных фенотипов.

До недавнего времени классификацию и сертификацию (или паспортизацию) сортов, линий и гибридов эхинацеи проводили только по морфологическим признакам. Однако такой подход не всегда позволяет дифференцировать образцы, особенно близкие по происхождению, или когда учитываемые признаки подвержены влиянию окружающей среды. По морфологическим признакам невозможно выявить скрытую генетическую изменчивость в сортах-популяциях. Наиболее эффективными для этих целей оказались молекулярно-генетические методы и, в частности, электрофорез полиморфных белков, к которым относятся запасные белки семян [2]. С использованием запасных белков семян в качестве маркеров связаны реальные практические достижения в идентификации и регистрации сортов важнейших сельскохозяйственных культур, что закреплено в решениях международной организации ISTA. В литературе встречается информация по биохимическому составу корневищ, травы и цветков эхинацеи пурпурной [3-7]. Эти данные касаются в основном биологически

активных веществ, содержащихся в эхинацее, однако практически отсутствуют данные по белковому качественному составу семян и оценки его с целью использования для идентификации популяций сортов и линий эхинацеи пурпурной. Как известно, глобулины (в частности, 11S глобулин) являются запасными белками семян двудольных. Например, у одного из представителей того же семейства – подсолнечника – 11S глобулин имеет видоспецифическое название гелиантинин [1]. Он высоко полиморфен и составляет до 70% белка семени. 11S глобулин состоит из шести субъединиц, соединенных водородными связями. Каждая из субъединиц включает по два полипептида (кислый и основной), соединенные дисульфидными связями. Состав и соотношение полипептидов глобулина являются генотипичными и могут быть оценены электрофоретически. Идентификация сорта или сортовой популяции (в случае перекрестноопыляемых растений), а также определение степени внутрисортного полиморфизма включают анализ отдельных семян, взятых из случайной выборки. Сорта характеризуются показателями частоты встречаемости выявленных типов спектра, выраженными в процентах. При этом для оценки образца на сортовую принадлежность достаточно выборки 50–100 семян.

Объектом нашего исследования были две сортовые популяции эхинацеи пурпурной, выделенные в пределах интродукционной популяции в ЦБС НАН Беларуси и находящиеся на госсортоиспытании с 2003 года – Элегия и Мустанг. Полиморфизм эхинацеи пурпурной в пределах популяции, культивируемой в настоящее время в ЦБС НАН Беларуси, был инициирован первоначальной обработкой семян рядом химических и физических агентов. При этом число хромосом осталось таким же, как и у природной формы эхинацеи ($2n=22$). В дальнейшем гетерогенность популяции усиливалась спонтанной гибридизацией растений при переопылении [3].

Анализ глобулинов семян для идентификации эхинацеи пурпурной проводили на случайной выборке из 50 семян каждой исследуемой сортовой популяции методом, включающим следующие этапы: 1) извлечение 11S глобулина из единичных семян; 2) диссоциация белка до полипептидов обработкой детергентом ДСН (додецилсульфатом натрия) и β -меркаптоэтанолом, восстанавливающим дисульфидные связи; 3) электрофоретическое фракционирование полипептидов. Экстракцию глобулина проводили из обезжиренной муки каждого семени раствором 1М NaCl на 0.05М трис-HCl буфере, pH 8.0 при +4⁰C. Добавление к полученному экстракту пяти объемов охлажденной до +4⁰C дистиллированной воды приводит к снижению ионной силы раствора и образованию осадка – глобулина, который хорошо растворим в 0.025М трис-глициновом буфере, pH 8.3. Для диссоциации белковых молекул до полипептидов и подготовке полученных препаратов к электрофорезу добавляли равный объем

0.0625M трис-HCl буфера, рН 6.8, содержащего 2% ДСН и 5% β-меркаптоэтанол. Электрофоретическое разделение белков проводили в 12% ПААГ с ДСН с использованием маркерных белков фирмы Fermentas.

На рисунках 1 и 2 представлены электрофореграммы глобулина семян эхинацеи пурпурной.

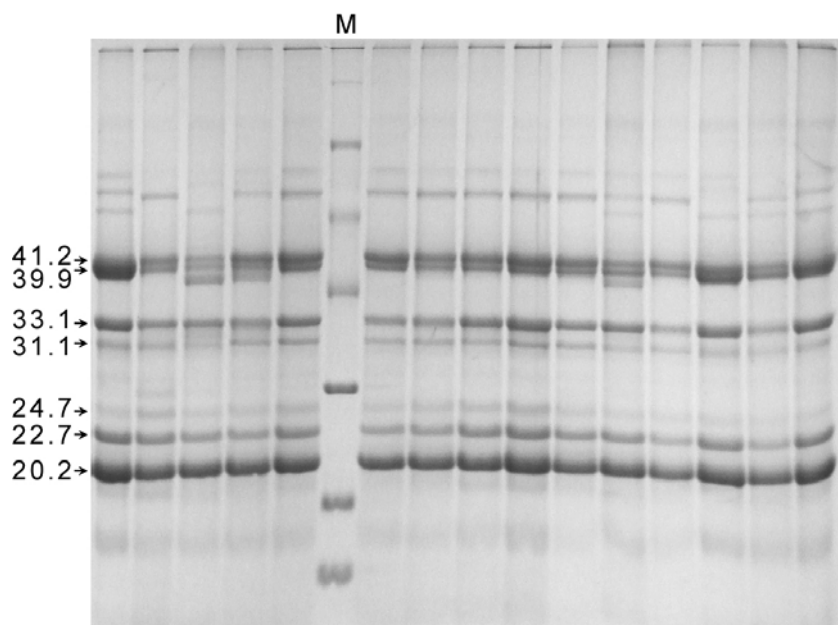


Рис. 1. Электрофореграмма посеменного исследования глобулина семян эхинацеи пурпурной сорта Элегия: М – маркерные белки фирмы Fermentas (по направлению снизу вверх: 14.4, 18.4, 25.0, 35.0, 45.0, 66.2, 116.0 кДа)

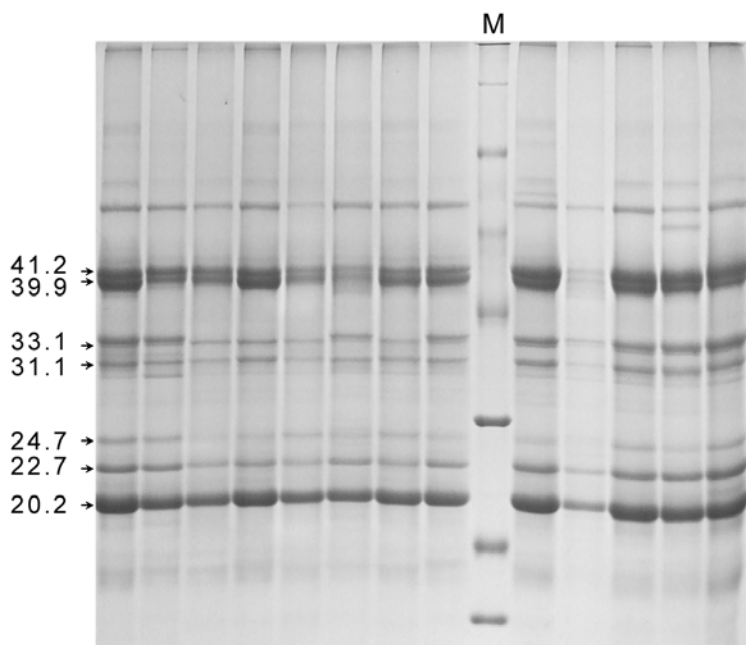


Рис. 2. Электрофореграмма посеменного исследования глобулина семян эхинацеи пурпурной сорта Мустанг: М – маркерные белки фирмы Fermentas (по направлению снизу вверх: 14.4, 18.4, 25.0, 35.0, 45.0, 66.2, 116.0 кДа)

Суммарный электрофоретический спектр полипептидов 11S глобулина исследуемых сортов эхинацеи содержит 17 главных и минорных компонентов со средними значениями молекулярных масс от 20.2 до 55.7 кДа. Следует отметить, что 7 полипептидов с молекулярными массами 41.2, 39.9, 33.1, 31.1, 24.7, 22.7 и 20.2 кДа являются реперными компонентами, их наличие отмечено для всех исследуемых семян. В то же время для определенных зон характерна высокая вариабельность. Более консервативными по компонентному составу в обоих исследованных образцах являются участки электрофоретических спектров с М.м. 55.7-38.2 и 24.7-20.2 кДа, а наибольшей вариабельностью, что особенно характерно для сорта Мустанг, отличается участок с М.м. от 33.1 до 26.0 кДа. Некоторые зоны представлены в отдельных семенах сорта Мустанг двойными компонентами, очень незначительно различающимися по подвижности – это зоны около 51.5, 33.1 и 29.6 кДа. Для всех семян этого же сорта характерна зона 51.5 кДа, отсутствующая у некоторых семян сорта Элегия, и полипептиды с М.м. 29.6 и 20.6 кДа, характерные только для сорта Мустанг.

Для того, чтобы получить целостное представление о возможности использования электрофоретических спектров 11S глобулина в оценке сортоспецифичности и идентификации исследуемых форм, были выделены определенные типы спектров и показана частота их встречаемости внутри каждой исследованной сортовой популяции эхинацеи пурпурной. На электрофореграммах сорта Элегия выявлено 11 типов спектра, три из которых являются преобладающими, или лидирующими, и на их долю приходится 64.4% выборки (28.6%, 17.9% и 17.9%, соответственно). Частота встречаемости остальных 8 спектров колеблется от 3.6% до 7.1%. Сортовая популяция Мустанг характеризуется значительно большим полиморфизмом. У этого образца отмечено 19 типов спектра, причем невозможно судить о преобладании какого-либо из них, т.к. максимальная частота встречаемости – 10.7-14.3% – характерна только для двух типов спектра, для всех остальных этот показатель не превышает 7.1% выборки.

Таким образом, сравнительный анализ 2 сортовых популяций эхинацеи пурпурной из коллекции ЦБС НАН Беларуси по спектрам запасных белков семян (11S глобулина) позволил разделить их на средне- и высокополиморфные. К высокополиморфному отнесен сорт Мустанг, отличающийся большим числом типов спектра, среди которых отсутствуют лидирующие типы. Сорт Элегия является среднеполиморфным, т.к. доля лидирующих трех типов спектра в сумме составляет более 50% выборки, остальные типы спектра распределены равномерно по частоте встречаемости, которая не превышает 7.1%. Электрофорез глобулина семян является перспективным для анализа генотипической структуры эхинацеи

пурпурной, поскольку сравнительно простой и доступный метод может значительно облегчить и ускорить процесс селекции и сортоиспытания.

Литература

1. Анисимова, И.Н. Идентификация генетического и селекционного материала подсолнечника по белкам семян/ И.Н. Анисимова// Аграрная Россия. – 2002. – № 3. – С.52-59.
2. Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства/ А.В.Конарев [и др.] // Цитология и генетика. – 2000. – т. 34, № 2. – С. 91–104.
3. Гетко, Н.В. Культура эхинацеи пурпурной *Echinacea purpurea* (L.) Moench в условиях Беларуси/ Н.В. Гетко, И.Н. Бобко// Международный аграр. журн. – 1998. – № 1. – С. 33–37.
4. Самородов, В.Н. Эхинацея на рубеже XXI века: проблемы, тенденции, перспективы/ В.Н. Самородов, С.В. Поспелов// Вісник Полтавського державного сіль/гос інституту. – 2000. – № 3. – С. 90–97.
5. Bauer, R. Echinacea species as potential immunostimulatory drugs/ R. Bauer, H. Wagner// Econ. Med. Plant Res. – 1991. – № 5. – P. 253-321.
6. Bawer, R. Echinacea - Drogen. Who is who?/ R. Bawer, H. Wayner// Ztschr. Phytotherapie. – 1988. – № 6. – P.191–192.
7. Gallo, M. Pregnancy outcome following gestational exposure to Echinacea/ Gallo, M. [et al.]// Arch. Intern. Med. – 2000. – № 160. – P. 3141-3143.

Summary

The reserve polypeptide group – 11S globulin – has been identified in seeds of two variety populations of *Echinacea purpurea* from collection Central Botanical Gardens of NAS of Belarus with the use of electrophoresis method. The group composition is characterized by an intravarietal polymorphism. The possibility of globulin use for genotype identification and passportization is discussed.