

УДК 58(082)
ББК 28.5я43
С56

С56 **Современные** проблемы экспериментальной ботаники : материалы I Международной научной конференции молодых учёных, приуроченной Году науки в Республике Беларусь (г. Минск, 27–29 сентября 2017 года) / Национальная академия наук Беларуси ; ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси». – Минск : Колорград, 2017. – 221 с.
ISBN 978-985-7189-53-3.

В сборник включены материалы I Международной научной конференции молодых учёных «Современные проблемы экспериментальной ботаники». Представлено 6 пленарных докладов-лекций и 66 материалов докладов 122 авторов из Беларуси, России, Украины, Чехии, Сирии и Азербайджана, представляющих 40 организаций науки, охраны природы и образования.

В материалах представлены результаты изучения биологического разнообразия и систематики сосудистых растений, мохообразных, грибов, лишайников и водорослей, а также вопросы геоботанических и экологических исследований растительных сообществ, экспериментов и опытов в области физиологии и биохимии растений и грибов.

УДК 58(082)
ББК 28.5я43

Материалы опубликованы в авторской редакции. Ответственность за достоверность фактов, цитат, собственных имён и других сведений несут авторы.

ISBN 978-985-7189-53-3

© Государственное научное учреждение
«Институт экспериментальной ботаники
им. В.Ф.Купревича НАН Беларуси», 2017
© Оформление. ЧПТУП «Колорград», 2017

ПРОТЕОМНО-ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ *IN VITRO* КУЛЬТУР *SILYBUM MARIANUM* КРАСНО - И БЕЛОЦВЕТКОВЫХ РАС

О.В. Ковзунова, А.Н. Юхимук

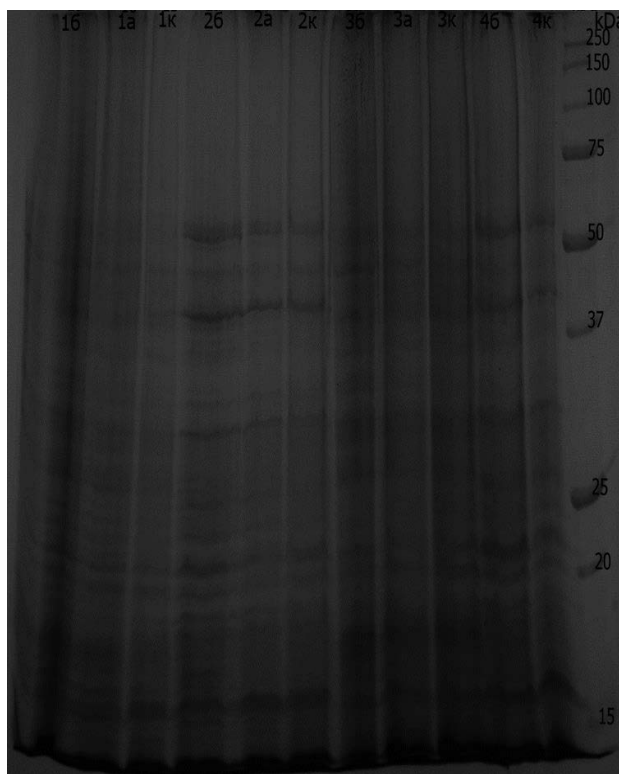
Государственное научное учреждение «Центральный ботанический сад Национальной академии наук
Беларуси»; Минск, Беларусь, e-mail: olga-kopa@mail.ru

Получены протеомные карты in vitro культур Silybum marianum двух рас при воздействии препарата «Нано-плант – Co, Mn, Si, Fe» и электромагнитного поля низкого уровня мощности. Выявлены белки-маркеры, которые, предположительно, отвечают за повышенный биосинтез биологически активных веществ. На основе RAPD- и ISSR-анализов разработана система идентификации и ДНК-паспортизации генотипов рода Silybum. Методом UPGMA построено дерево генетического родства, отражающее таксономические взаимоотношения исследуемых образцов.

Применение новейших современных подходов к исследованию генома и метаболома лекарственных растений позволяет углубить фундаментальные знания о биосинтетических

циклах и механизмах, ответственных за продукцию БАВ в растениях. При использовании комбинации этих подходов может быть дана детальная характеристика биохимического статуса целого организма или отдельной ткани. Целью работы было определение белков, ответственных за повышенный синтез биологически активных веществ в перспективных образцах *in vitro* культур *S. marianum* красно- и белоцветковой рас, а также проведение мультилокусного маркирования тотальной ДНК.

Протеомные карты были получены проведением вертикального электрофореза белков в денатурирующих условиях в щелочной системе [1, 2, 3] (1D-электрофорез), а молекулярно-генетический анализ проводился с использованием методик RAPD и ISSR [4, 6].



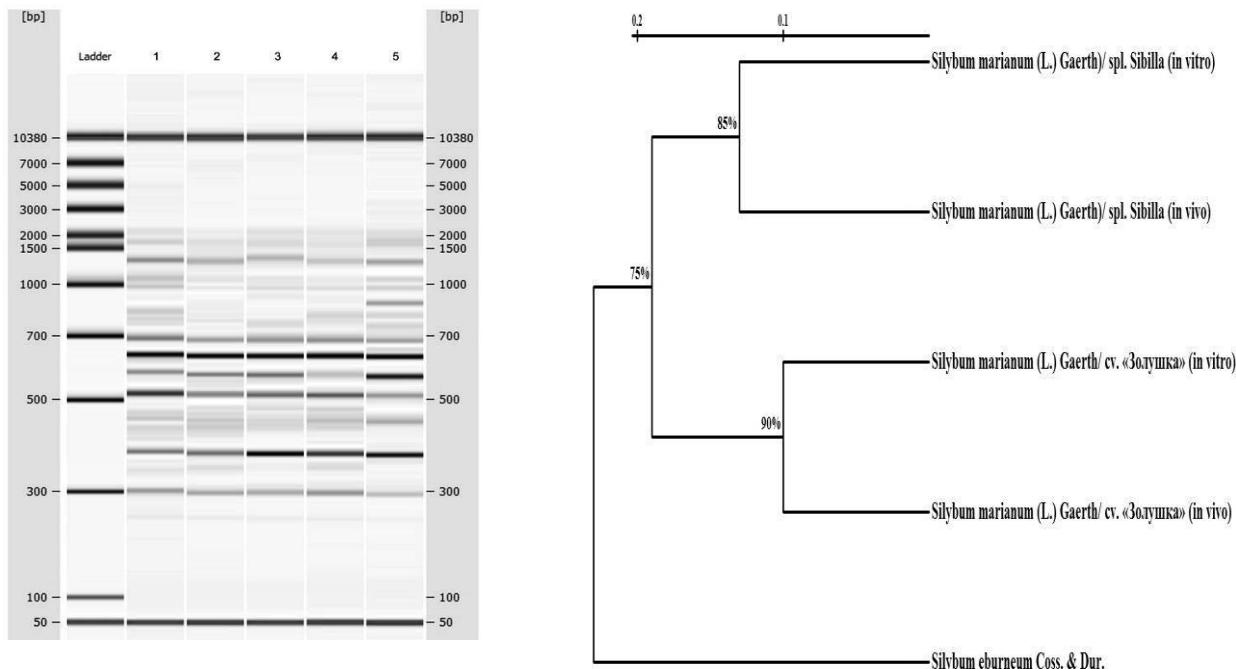
1 – корневой каллус сорта Золушка; 2 – стеблевой каллус сорта Золушка; 3 – корневой каллус сортообразца Sibilla венгерской селекции; 4 – стеблевой каллус сортообразца Sibilla венгерской селекции; а – «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» в концентрации 0,01 мг/л; б – воздействие ЭМП СВЧ; к – контроль.

Рисунок 1 – 1-D-электрофореграмма общего пула клеточных белков стеблевого и корневого каллуса *S. marianum* красно- и белоцветковой рас, при воздействии модификаторов метаболизма

Были получены протеомные карты расторопши пятнистой красно- и белоцветковой рас при воздействии модификаторов метаболизма химической и физической природы. Обнаружены зоны (рисунок 1), в которых присутствуют дифференциально экспрессируемые белки, претендующие на роль белков-маркеров, не характерных для контрольных образцов, культивируемых без добавления препарата наночастиц металлов «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» (химический модификатор) и не подвергнутых обработке электромагнитным облучением низкого уровня мощности (физический модификатор). Были выявлены белки с молекулярной массой от 283,1 до 10,2 KDa наблюдаемые у всех образцов. Экспрессия белков с одинаковой молекулярной массой у разных образцов отличалась. Белки с молекулярной массой 221,4; 37,7; 29,0; 22,0; 21,7; 20,5; 17,0 и 16,6 KDa экспрессируемые в ответ на воздействие использованных модификаторов метаболизма претендуют на роль маркерных белков в корневом каллуса сорта Золушка, и 13 белков с Mr 262,6; 195,7; 50,7; 43,7; 37,7; 29,0; 23,4; 20,2; 18,1; 17,4; 17,0; 15,8 и 15,0 KDa в корневом каллусе венгерского сортообразца Sibilla. 12 белков с молекулярными массами 283,1; 55,6; 50,7; 46,2; 39,9; 36,7; 35,6; 30,0; 18,1; 15,8; 11,7 и 10,3 KDa экспрессировались в каллусе стеблевого происхождения сорта Золушка. 24 белка

экспрессировались у стеблевого каллуса венгерского сортообразца Sibilla в «ответ» на воздействие модификаторов: 221,4; 195,7; 147,0; 99,6; 80,6; 76,2; 69,8; 67,8; 52,6; 51,9; 46,2; 38,9; 35,8; 33,1; 30,0; 29,7; 29,3; 29,0; 25,7; 23,1; 21,0; 19,7; 19,0 и 10,2 KDa, которые можно рассматривать как маркерные.

При проведении генетического анализа использовали *in vitro* и *in vivo* образцы красно- и белоцветковой рас расторопши.



1 – *Silybum marianum* (L.) Gaertn. cv. Золушка (коллекция *in vitro* 6 пассаж), 2 – *Silybum marianum* (L.) Gaertn. cv. Золушка (коллекция *in vivo*), 3 – *Silybum marianum* (L.) Gaertn. сортообразец Sibilla белоцветковая (коллекция *in vitro* 6 пассаж), 4 – *Silybum marianum* (L.) Gaertn. сортообразец Sibilla белоцветковая (коллекция *in vivo*), 5 – *Silybum eburneum* Coss. & Dur.

А

Б

Рисунок 2 – Разделение ампликонов (А), синтезированных в результате амплификации геномной ДНК таксонов рода Расторопша с праймером OPP-19 на Bioanalyzer 2100 и консенсусная дендрограмма (Б) таксонов рода *Silybum* L. сгенерированная с использованием UPGMA алгоритма на основе 72 ДНК маркеров. Горизонтальная шкала отражает генетическую дистанцию между соматклонами. Числа около узлов отражают величины поддержки (в %), основанные на 2000 репликах анализа Bootstrap.

Всего было сгенерировано 44 RAPD- (в среднем 12 маркеров на праймер) и 28 ISSR-маркеров (в среднем 12 маркеров на праймер). Было выявлено 72 дискретных ДНК-локусов, из них 38 оказались полиморфными (рисунок 2). Средний уровень полиморфизма составил 53%. Выявленные ДНК-маркеры, позволили провести генетическую идентификацию таксонов рода расторопша и создать для каждого из них молекулярно-генетические паспорта. Методом UPGMA было построено дерево генетического родства между исследованными видами рода *Silybum* (рисунок 2), где очевидно, что для исследованных таксонов рода *Silybum* L. характерна отчетливая кластеризация, отражающая их таксономические взаимоотношения. Сорта, относящиеся к виду *Silybum marianum* (L.) Gaertn. отчетливо кластеризуются в большой кластер. В границах данного кластера отчетливо выделяются два субкластера, в один из которых сгруппированы *in vitro* и *in vivo* образцы сорта Золушка, а во второй — представители сортообразца Sibilla. Генетические дистанции между *in vitro* и *in vivo* образцами внутри каждого из этих субкластеров различны, и указывают на более высокий уровень генетической дифференциации, возникающий при *in vitro* культивировании у сортообразца Sibilla по сравнению с сортом Золушка. Это может быть объяснено тем, что сортообразец является менее устойчивой генетической системой по сравнению с сортом. Величины бутстреп анализа,

расположенные около узлов дендрограммы, превышают 50%, что указывает на статистически достоверную топологию ветвей.

На основании полученных данных впервые выявлено, что белки с молекулярным весом 86,0; 37,7; 33,1; 29,0; 22,0; 17,0 и 15,0 КДа, экспрессируемые в ответ на воздействие использованных модификаторов метаболизма претендуют на роль маркерных и, возможно, отвечают за повышенный биосинтез вторичных метаболитов в корневой и стеблевой культуре бело- и красноцветковой рас расторопши пятнистой. На основе RAPD- и ISSR-анализов разработана система идентификации и ДНК-паспортизации генотипов рода *Silybum*. Для растений красно- и белоцветковой рас *Silybum* подобран комплекс из нескольких RAPD (OPA-03, OPC-02, OPC-10, OPP-19) и двух ISSR(UBC-827, UBC-856) маркеров, позволяющих при постановке ПЦР охватить различные области генома, достаточные для идентификации сортов. Полученные данные включены в информационно-поисковую базу ЦБС [5].

Список литературы

1. Amme S. et al. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes/ Amme S. // Proteomics. – 2005. – № 5. – P. 2508–2518.
2. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. — 227. – P. 680-685.
3. Lowry O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol Reagent/ O.H. Lowry // Journal of Biological Chemistry. – 1951. – № 193. – P. 265-275.
4. Software for NMR [Электронный ресурс] / Software for NMR. – Режим доступа : acdlabs.com. – Дата доступа: 15.01.2012.
5. Информационно-поисковая система Центрального ботанического сада Национальной Академии наук Беларуси Hortus Botanicus Centralis Info //[Электронный ресурс] / Информационно-поисковая система Центрального ботанического сада Национальной Академии наук Беларуси Hortus Botanicus Centralis Info. – Минск, 2000. – Режим доступа: <http://hbc.bas-net.by>. – Дата доступа: 25.01.20062.
6. Падутов В.Е. и др. Методы молекулярно-генетического анализа/ В.Е. Падутов. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.