

**Национальная академия наук Беларуси
Центральный ботанический сад**

**Интродукция, сохранение и использование
биологического разнообразия мировой флоры**

Материалы Международной конференции,
посвященной 80-летию Центрального ботанического сада
Национальной академии наук Беларуси
(19–22 июня 2012 г., Минск, Беларусь)

**В двух частях
Часть 2**

**Assessment, Conservation and Sustainable Use
of Plant Biological Diversity**

Proceedings of the International Conference
dedicated to 80th anniversary of the Central Botanical Garden
of the National Academy of Sciences of Belarus
(June 19–22, 2012, Minsk, Belarus)

**In two parts
Part 2**

Минск
2012

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

И73

Редакционная коллегия:

*Д-р биол. наук В.В. Титок (ответственный редактор);
д-р биол. наук, академик НАН Беларуси В.Н. Решетников;
д-р биол. наук, ч.-кор. НАН Беларуси Ж.А. Рупасова;
д-р биол. наук, чл.-кор. НАН Беларуси Е.А. Сидорович;
канд. биол. наук Ю.Б. Аношенко; канд. биол. наук А.В. Башилов;
канд. биол. наук А.А. Веевник; канд. биол. наук И.К. Володько;
канд. биол. наук И.М. Гаранович; канд. биол. наук Л.В. Гончарова;
канд. биол. наук А.А. Кузовкова; канд. биол. наук Л.В. Кухарева;
канд. биол. наук Н.М. Лунина; канд. биол. наук Е.В. Спиридович;
канд. биол. наук В.И. Торчик; канд. биол. наук О.В. Чижик;
канд. биол. наук А.Г. Шутова; канд. биол. наук А.П. Яковлев.*

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций

И 73 Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры; Материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. (19–22 июня 2012, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. Наук Беларуси, Централ. ботан. сад; редкол.: В.В. Титок /и др./, Минск, 2012. – 492 с.

В сборнике представлены материалы Международной конференции «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры», посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси.

В 1-й части публикуются тезисы докладов секций «Теоретические основы и практические результаты интродукции растений» и «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства»

Во 2-й части представлены тезисы докладов секций «Экологическая физиология и биохимия интродуцированных растений», «Генетические и молекулярно-биологические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений» и «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира».

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

Список литературы:

1. Mitchell A., Jobling J. Decorative trees for country, town and garden, HMSO, 1984, p. 146.
2. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологических систем получения и сохранения декоративных и плодовых культур. Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений. Сборник научных трудов, 2009, Том 131, с. 9–22.
3. Deverno L.L., Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J. An evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis. Somatic Embryogenesis in Woody Plants, 1995, Vol. 1, p. 361–377.
1. Chalupa V. *In vitro* propagation of birch (*Betula verrucosa* Ehrh.). Biologia Plantarum, Vol. 23, № 6, p. 472–474.
4. Шиша Е., Белокурова В., Сикура И., Кучук Н. Сохранение *in vitro* биоразнообразия видов семейств Asclepiadaceae, Berberidaceae и Betulaceae. Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія, 2009, Випуск 26, с. 192–196.
5. Третьякова И.Н., Барсукова А.В., Савельев С.С., Сиренко А.С. Сочетание классической селекции и применения современных методов биотехнологии для сохранения генофонда хвойных видов Сибири. Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений. Сборник научных трудов, 2009, Том 131, с. 5–9.
6. Инюткина А.Г. Получение каллусной ткани *Artemisia dracunculus* L. Актуальні проблеми ботаніки та екології. Матеріали міжнародної конференції молодих учених (13–16 серпня 2008 р., м. Кам'янець-Подільський), 2008, с. 221–222.
7. Картель Н.А., Кильчевский А.В. Биотехнология в растениеводстве: учебник. Тэхналогія, 2005, с. 310.
8. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 1962, Vol. 15(3), p. 473–497.

Протеомный статус клеток лекарственных растений как показатель их физиологического состояния и накопления вторичных метаболитов

Кузовкова А.А., Мазур Т.В., Чижик О.В., Спиридович Е.В., Решетников В.Н.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: fioraia@nm.ru

Резюме. Впервые получены 2D-протеомные карты клеток листа и стебля *in vitro* растений *Agastache rugosa*, а также клеток листовых, стеблевых и корневых каллусов *A. rugosa*, находящихся на разных стадиях дедифференцирования. Обнаружены белки-маркеры тканеспецифичности листа и стебля *A. rugosa*. Признаки тканеспецифичности сохраняются и при дедифференцировании клеток *A. rugosa*. Процесс дедифференцирования клеток *A. rugosa* сопровождается изменением их протеомной гетерогенности.

Summary. For the first time 2D-proteome cell cards of the leaf and stem of the *Agastache rugosa in vitro* plants and also those of the leaf, stem and root *A. rugosa* calluses at the different stages of dedifferentiation are received. Protein markers of the leaf and stem tissue specificity of the *A. rugosa* are found out. The tissue specificity features remain for the *A. rugosa* cell dedifferentiation. The *A. rugosa* cell dedifferentiation is accompanied by the changing of proteome heterogeneity.

Введение. В настоящее время лекарственные растения широко применяют как в медицине, так и во многих отраслях пищевой и парфюмерно-косметической промышленности. Сегодня активно используется более 300 видов, из которых около 60 — специально выращиваются, а остальные — дикорастущие. При этом запасы большинства лекарственных растений в природе ограничены, многие из них являются редкими или эндемичными, для целого ряда видов не разработаны (или невозможны) технологии размножения *in vivo*, ввиду особенностей их биологии [1]. Решить проблему дефицита сырья и сохранить в природе лекарственные растения могут клеточные технологии. Биотехнологические подходы предоставляют альтернативу ныне распространенному способу получения растительных лекарственных соединений в виде экстрактов или эфирных масел. Культуры клеток, тканей, органов и микрорастения *in vitro* можно использовать как «фабрики» по производству биологически активных веществ (БАВ) [2]. Однако следует указать, что в большинстве случаев биосинтез вторичных метаболитов в культурах клеток и тканей протекает не так активно, как в исходных растениях. Используют несколько стратегий усиления продукции вторичных метаболитов — усовершенствование исходных сортов растений, отбор высокопродуктивных клеточных линий, оптимизацию сред культивирования и, наконец, направленную регуляцию биосинтеза в клеточных культурах растений желаемых соединений с помощью биотических и абиотических элиситоров [3]. Последняя стратегия представляется самой перспективной, однако ее реализации мешает недостаточность фундаментальных знаний о биосинтетических циклах и механизмах, ответственных за продукцию растительных метаболитов.

Сегодня применение новейших современных подходов к исследованию протеома и метаболома лекарственных растений позволяет углубить фундаментальные знания о биосинтетических циклах и механизмах, ответственных за продукцию БАВ в растениях. При использовании комбинации протеомных методов исследования с метаболомными может быть дана детальная характеристика биохимического статуса целого организма или отдельной ткани [4]. Подобных исследований на настоящий момент проведено мало, единичные — касаются культуры клеток и тканей *in vitro*. В частности, протеомные подходы были применены для анализа изменений белковых профилей в процессе дифференциации каллуса риса [5,6] и индукции соматического эмбриогенеза люцерны (*Medicago truncatula*) [7], цикламена (*Cyclamen persicum*) [8], вигны (*Vigna unguiculata*) [9], винограда (*Vitis vinifera*) [10]. Метаболомные подходы были применены лишь для изучения соматического эмбриогенеза ели канадской (*Picea canadensis* Britton) [11], и только французские ученые при исследовании органогенеза побегов ванили (*Vanilla planifolia*) из эбриогенного/органогенного каллуса применили комбинацию методов протеомики и метаболомики [12]. Следует отметить, что к настоящему времени нет ни одной работы, где комбинация методов протеомики и метаболомики была использована для усовершенствования биотехнологий получения вторичных метаболитов в системах *in vitro*. Представленные нами исследования посвящены установлению различий в протеомном статусе де- и дифференцированных клеток лекарственных растений и использованию их в качестве показателей метаболомного состояния каллусных тканей и суспензионных клеток лекарственных растений. Протеомный и метаболомный анализы нами рассматриваются интегрально как два комплементарных подхода. На их основе предлагается новая стратегия в биотехнологии получения вторичных метаболитов в культурах *in vitro* лекарственных растений. Суть ее заключается в применении современных методов протеомики как ключевых в тандеме с метаболомными методами при прогнозировании накопления ценных вторичных метаболитов в культуре клеток лекарственных растений, а также в отборе соматоклон-гиперпродуцентов БАВ и биокорректоров.

Объектом наших исследований является многоколосник морщинистый (*Agastache rugosa* (Fisch. & C.A.Mey.) Kuntze). Это многолетнее лекарственное и декоративное растение из семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) или Губоцветные (*Labiatae*) распространено в Корее, Китае, Тайване, Вьетнаме и Японии [13], обнаружено в России на Дальнем Востоке, о. Кунашир (Приморье), культивируется в Европе и Северной Америке [14]. В ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» многоколосник морщинистый находится в коллекциях плантационных лекарственных и *in vitro* растений. *A. rugosa* входит в 50 фундаментальных растений китайской медицины [15]. Согласно Фитохимической и этноботанической базе данных д-ра Дюка [16] с нашими дополнениями к настоящему времени из различных органов многоколосника морщинистого *in vivo* выделено 97 БАВ, а в его суспензионной культуре — лишь 27, поэтому разработка подходов к усилению биосинтеза вторичных метаболитов в культуре клеток *A. rugosa* является актуальным вопросом.

Главной целью 1-го этапа наших исследований стало выявление белков-маркеров функционального состояния клетки *A. rugosa* путем сопоставления ее протеомного статуса на разных стадиях и в разных состояниях развития.

Материал и методы исследований. Растения *A. rugosa* культивировали *in vitro* асептически на среде Мурасиге и Скууга (МС) без добавления гормонов при 22-25°C и 16-часовом фотопериоде. Для анализов использовали 45-дневные растения. Каллусы инициировали в темноте из листьев, стеблей и корней асептических растений *A. rugosa* на твердой среде МС с 2,4-Д (1 мг/л) и БАП (0,1 мг/л). Каждые 15–16 дней каллусы пассировали на новую среду. Для анализов использовали каллусы 3 и 4-го пассажей. Общие пулы белков из клеток стеблей и листьев асептически выращенных растений, а также из листовых, стеблевых и корневых каллусов *A. rugosa* выделяли методом ТХУ-ацетоновой преципитации [17] и анализировали методом 2D-электрофореза (1-ое направление — изоэлектрофокусирование на ПААГ-стрипах с иммобилизованным градиентом pH, 2-ое направление — электрофорез в ПААГ в щелочной системе в денатурирующих условиях) по прописям компаний GE Healthcare (США) и Bio-Rad Laboratories (США), производящим ПААГ-стрипы. Белковые фракции очищали от примесей с помощью набора реагентов «2D Clean-Up Kit» (GE Healthcare, США). Содержание белка в образцах определяли с помощью набора реагентов «RC DC Protein Assay» (Bio-Rad Laboratories, США). При 2D-электрофорезе образцы были уравнены по содержанию белка (по 100 мкг). Изоэлектрофокусирование общих пулов клеточных белков из стеблей и листьев растений *A. rugosa* проводили на ПААГ-стрипах с градиентом pH 3-11 NL (GE Healthcare, США), для каллусных белков использовали те же стрипы, а также с градиентом pH 3-10 NL (Bio-Rad Laboratories, США).

Результаты исследований. Методом 2D-электрофореза были получены протеомные карты дифференцированных тканей листа и стебля многоколосника морщинистого и проведен их первичный сравнительный анализ (рисунок 1). Обнаружены 12 зон, в которых присутствуют дифференциально экспрессируемые белки, претендующие на роль маркеров тканевой специфичности стебля и листа. Данные белки определяют особенности физиологии и биохимии стебля и листа.

Как известно, пути биосинтеза вторичных метаболитов во многих случаях требуют кооперации между клетками, тканями и органами растений на внутри- и межмолекулярном уровне, поэтому для отдельных этапов биосинтеза некоторая степень дифференциации клеток является критичным фактором. Целая метаболическая система строго регулируется и очень чувствительна к ряду внутренних (разные стадии развития растений) и внешних (различные виды стресса) факторов [18,19]. Вследствие этого наиболее перспективными являются суспензионные культуры лекарственных растений, полученные на основе так называемой плотной каллусной массы (compact callus aggregates, CCA). Такие каллусы проявляют некоторые уровни клеточной или тканевой дифференциации [20,21]. При этом исходным эксплантом, из которого инициируют образование CCA, должен быть тот орган растения, в котором накопление интересующего метаболита происходит на максимальном уровне.

В Фитохимической и этноботанической базе данных д-ра Дюка [16] представлена информация об органоспецифическом накоплении БАВ в *A. rugosa*. Поэтому при разработке научных подходов к получению высокопродуктивной суспензионной культуры *A. rugosa* одной из наших задач стала оценка потенциала каллусных тканей, инициированных из разных эксплантов — корня, стебля, листа. В течение первых пассажей (как минимум до 4-го пассажа) каллус сохранял определенную плотность и, вероятно, очаги дифференциации. Используя 2D-электрофорез, были получены протеомные карты клеток листовых, стеблевых и корневых каллусов многоколосника морщинистого 3-го и 4-го пассажей и проведен их первичный сравнительный анализ (рисунки 2 и 3). Следует отметить, что данные протеомные карты в высокой степени идентичны друг другу. В то же время установлено, что признаки тканеспецифичности сохраняются и при дедифференцировании клеток *A. rugosa*, по крайней мере, в течение 4-х пассажей на новую среду культивирования. Так, в протеомных картах корневого, стеблевого и листового каллусов 3-го пассажа выделены 6 зон с гетерогенным пулом белков.

Таким образом, впервые нами был исследован протеомный статус клеток дифференцированных тканей листа и стебля *in vitro* растений *A. rugosa*, а также клеток листовых, стеблевых и корневых каллусов *A. rugosa*, находящихся на разных стадиях дедифференцирования. Об-

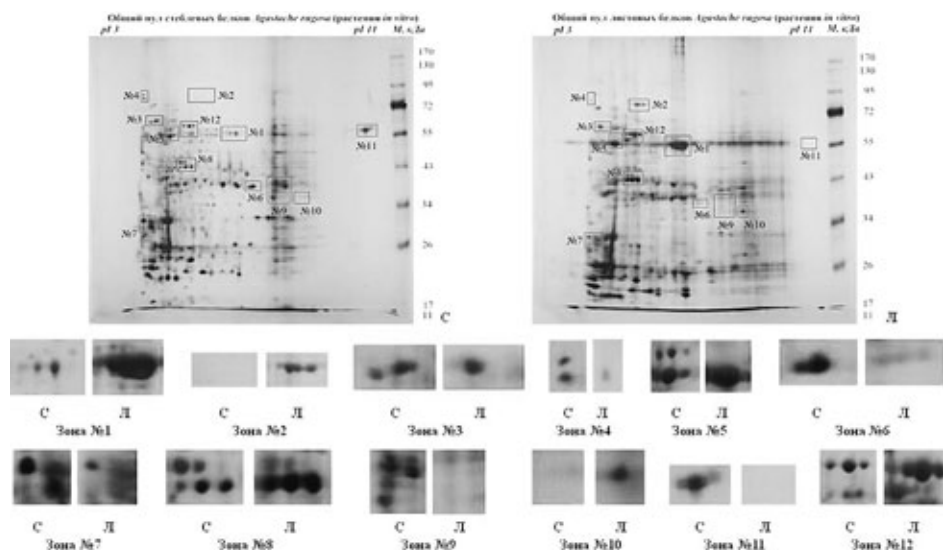


Рисунок 1. 2D-электрофореграммы общего пула клеточных белков стеблевых (С) и листовых (Л) тканей *in vitro* растений *Agastache rugosa*

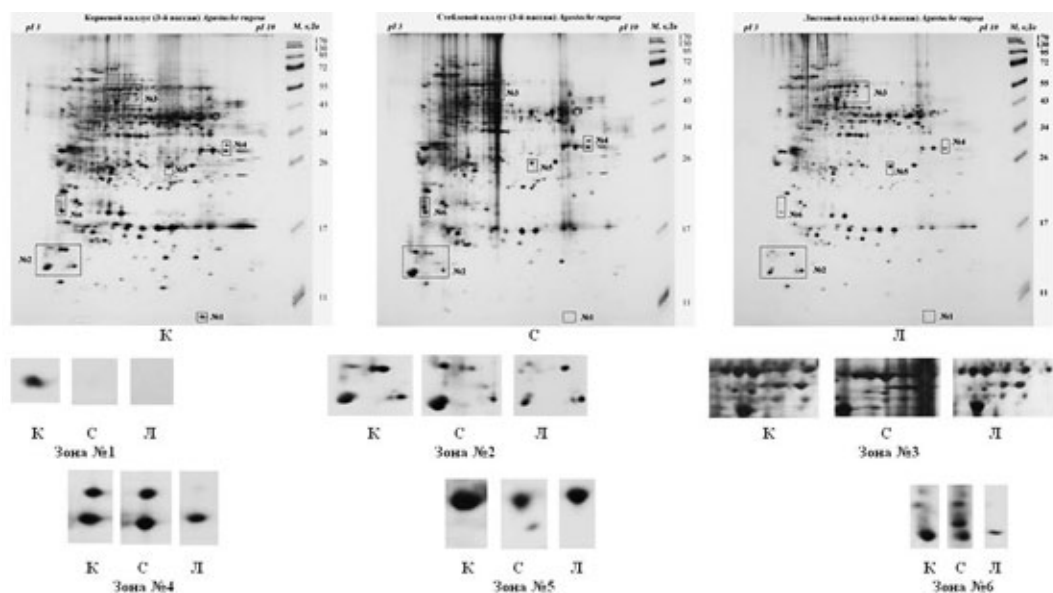


Рисунок 2. 2D-электрофореграммы общего пула клеточных белков корневого (К), стеблевого (С) и листового (Л) каллусов (3-й пассаж) *Agastache rugosa*

наружены белки-маркеры тканеспецифичности листа и стебля *A. rugosa*. Признаки тканеспецифичности сохраняются и при дедифференцировании клеток *A. rugosa*. Процесс дедифференцирования клеток *A. rugosa* сопровождается изменением их протеомной гетерогенности. Анализ изменений протеомного статуса каллусов *A. rugosa* в процессе их дедифференцирования будет продолжен. Также планируется оценить состояние протеома длительнопассируемых каллусов *A. rugosa*, достигших максимальной степени дедифференцирования.

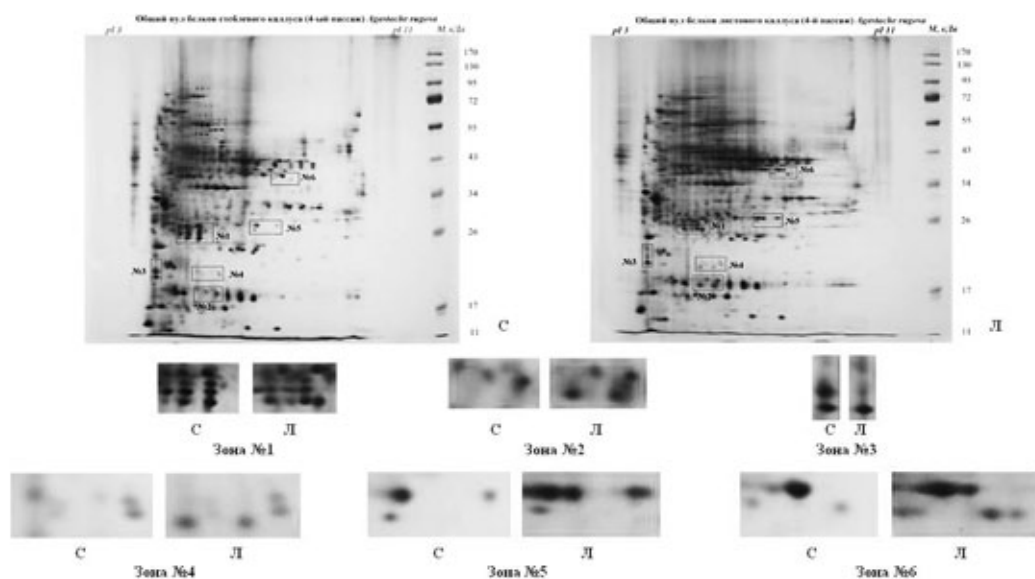


Рисунок 3. 2D-электрофореграммы общего пула клеточных белков стеблевого (С) и листового (Л) каллусов (4-й пассаж) *Agastache rugosa*

Список литературы:

1. Verpoorte, R. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites / R. Verpoorte, A. Contin, J. Memelink // *Phytochem. Rev.*— 2002.— Vol.1.— P. 13–25.
2. Rao, R.S. Plant tissue cultures; chemical factories of secondary metabolites / R.S. Rao, G.A. Ravishankar // *Biotechnol. Adv.*— 2002.— Vol. 20.— P. 101–153.
3. Karuppusamy, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures / S. Karuppusamy // *Journal of Medicinal Plants Research.*— 2009.— Vol.3, №13.— P. 1222–1239.
4. Vascular proteomics: Linking proteomic and metabolomic changes / M. Mayr [et al.] // *Proteomics.*— 2004.— V.4.— P. 3751–3761.
5. Proteomic and transcriptomic analysis of rice mature seed-derived callus differentiation / Yin L. [et al.] // *Proteomics.*— 2007.— V. 7.— P. 755–768.
6. Yin, L. Analysis of the protein expression profiling during rice callus differentiation under different plant hormone conditions / L. Yin, Y. Lan, L. Zhu // *Plant Mol Biol.*— 2008.— Vol. 68.— P. 597–617.
7. Proteomic Analysis of Somatic Embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant Cultures Grown under 6-Benzylamino-purine and 1-Naphthaleneacetic Acid Treatments / N. Imin [et al.] // *Plant Physiol.*— 2005.— Vol. 137.— P. 1250–1260.
8. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology / T. Winkelmann [et al.] // *Planta.*— 2006.— Vol. 224.— P.508–519.
9. Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea (*Vigna unguiculata*) / F.C.S. Nogueira [et al.] // *Plant Cell Rep.*— 2007.— Vol. 26.— P. 1333–1343.
10. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera* / M Marsoni [et al.] // *Plant Cell Rep.*— 2008.— Vol.27.— P. 347–356.
11. Metabolic footprinting study of white spruce somatic embryogenesis using NMR spectroscopy / R. Dowlatabadi [et al.] // *Plant Physiol Biochem.*— 2009.— Vol. 47.— P. 343–350.
12. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage / L. Palama T. [et al.] // *BMC Plant Biology.*— 2010.— Vol. 10.— P. 82–101.
13. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network – (GRIN) [Electronic resource].— 2011.— Mode of access : <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?1675> – Date of access : 10.04.2011.
14. Lee, C.B. Korean Flora / C.B. Lee. – Seoul, 1980. – P. 649.
15. Scientific-web [Electronic resource].— 2008.— Mode of access : <http://www.scientific-web.com/en/Biology/Plants/Magnoliophyta/AgastacheRugosa01.html> – Date of access : 10.04.2011.
16. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases [Electronic resource]. – 2011.— Mode of access : <http://sun.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/plantdisp.xsql?taxon=1978> – Date of access : 11.04.2011.
17. Amme, S. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes / S. Amme [et al.] // *Proteomics.*— 2005.— Vol.5.— P. 2508–2518.
18. Pasquali, G. Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma / G. Pasquali, D.D. Porto, A.G. Fett-Neto // *J. Biosci. Bioeng.*— 2006.— Vol. 101.— P. 287–296.
19. Kutchan, T.M. A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis / T.M. Kutchan // *Curr. Opin. Plant Biol.*— 2005.— Vol.8.— P. 292–300.
20. György, Z. Production of cinnamyl glycosides in compact callus aggregate cultures of *Rhodiola rosea* through biotransformation of cinnamyl alcohol / Z. György, A. Hohtola // *Methods Mol Biol.*— 2009.— Vol.547.— P.305–312.
21. Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus cluster cultures of *Catharanthus roseus* / J. Zhao [et al.] // *Appl. Microbiol. and Biot.*— 2001.— Vol.55, №6.— P. 693–698.

Влияние регуляторов роста на содержание пигментов в регенерантах рододендронов (*Rhododendron L.*) в стерильной культуре

Кутас Е.Н., Гаранинова М.В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
e-mail: vinogradova-kira@tut.by

Summary. The paper present the results of experimental research concerning the influence of epibrassinolide, emistim C and cvartasin on content of photosynthetic pigments *a*, *b*, *a+b* carotinoide in regenerants of four *Rhododendron* species: *Ponticum*, *Japonicum*, *Forchthuna*, *Smirnova* in the aseptical culture. It was found the content of photosynthetic pigments in regenerants of *Rhododendron L.* in vitro depends on the selectivity action of the regulate growth, their concentration in nutritiv medium and plant species.

Введение. Общеизвестно, что рост и развитие растений регулируется эндогенными фитогормонами, синтезируемыми в самом растении. Биологически активные соединения (регуляторы роста), полученные искусственным путем, оказывают влияние на изменение эндогенного уровня природных фитогормонов. Это позволяет исследователю регулировать рост и развитие растений в нужном ему направлении.