

УДК 631.147+631.526.3+631.527

Редакционная коллегия:

академик НАН Беларуси В.Н. Решетников (отв. редактор), д.б.н. В.В. Титок (отв. редактор), к.б.н. Е.В. Спиридович, к.б.н. Т.И. Фоменко, к.б.н. А.А. Кузовкова

Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: материалы международной научной конференции 18–20 августа 2014 г., Минск. — Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2014.—277 с.

В сборник вошли материалы Международной научной конференции, посвященной актуальным проблемам сохранения биоразнообразия, селекции растений с использованием биотехнологических приемов, представленные учеными Беларуси, России, Украины, Казахстана, Сербии, Литвы, Молдовы, Таджикистана и Узбекистана.

УДК 631.147+631.526.3+631.527

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», 2014 г.

**ПЕРВИЧНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ КАЛЛУСОВ
ОТ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ ИСХОДНОЙ ФОРМЫ И СОМАКЛОНОВ
AGASTACHE RUGOSA (FISCH. & C.A.MEY.) KUNTZE (ЧАСТЬ 1)**

А.А. Кузовкова, Т.В. Мазур, В.Н. Решетников, Т.И. Новикова*, Е.В. Банаев*
ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск, ул. Сурганова,
2В, 220012, Беларусь, fioraia@nm.ru

*ФГБУН «Центральный сибирский ботанический сад СО РАН», г. Новосибирск,
ул. Золотодолинская, 101, Россия, alnus2005@mail.ru

Ключевые слова: Agastache rugosa (Fisch. & C.A.Mey.) Kuntze, соматклоны, каллус, 1-D- и 2-D-электрофорез

Введение. Многие высшие растения являются источниками ценных вторичных метаболитов, обладающих широким спектром биологического действия. Они применяются как в медицине, так и во многих отраслях пищевой и парфюмерно-косметической промышленности. В настоящее время 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]. Следует отметить, что любое растение, используемое в коммерческих целях, становится потенциальным кандидатом на включение в группу видов, находящихся под угрозой исчезновения [2]. 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 для массового производства биологически активных веществ (БАВ). К тому же эти технологии имеют ряд существенных преимуществ: 1) исключаются

сезонные ограничения при получении вторичных метаболитов; 2) объем продукции БАВ является прогнозируемым показателем; 3) экстракция БАВ из тканей *in vitro*, как правило, проще, быстрее и эффективнее, чем экстракция из сложно организованных тканей целого растения; 4) в культуре *in vitro* можно избежать наличия интерферирующих соединений, которые присутствуют в растениях из природы; 5) манипулируя химическими или физическими факторами среды культивирования, можно изменить метаболомный профиль культур *in vitro* и получить соединения с потенциально более высокой ценностью для человека [3]. 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. Нами с целью усиления продукции БАВ в лекарственном растении многоколосник морщинистый (*A. rugosa* (Fisch. & C.A.Mey.) Kuntze) было проведено усовершенствование его дикой формы: из стеблевых и листовых эксплантов на питательных средах с разным содержанием цитокининов и ауксинов были получены 4 растения-регенеранта, отличающиеся повышенным содержанием в надземной массе суммарных фенольных веществ, флавонолов и дубильных веществ: *Aga11* из листовых, *Aga20*, *Aga34*, *Aga36* — из стеблевых эксплантов. Данные растения-регенеранты являются соматоклонами — новыми формами растений, отличающимися как по фенотипическим, так и по генетическим признакам от исходных растений. В настоящее время наиболее популярной технологией получения ценных БАВ из лекарственных растений *in vitro* является получение суспензионных культур из неорганизованных каллусов, поэтому далее нами из листовых эксплантов соматоклонов-гиперпродуцентов БАВ и исходной формы *A. rugosa* были получены каллусы и проведен их биохимический анализ, в частности, сравнительный протеомный анализ методами 1-D- и 2-D-электрофореза. Изучение протеомного статуса дедифференцированных клеток многоколосника морщинистого является частью разрабатываемой нами в рамках гранта НАНБ (БРФФИ) — СО РАН Б12СО-017 новой стратегии прогнозирования вероятного изменения метаболома культур *in vitro* лекарственных растений на основе анализа их протеома. **Материалы и методы.** Растения *A. rugosa* культивировали асептически на среде Мурасиге-Скууга (МС) без добавления гормонов при фотопериоде — 16/8 часов свет/темнота, освещенности — 2–3 клк, температуре — 24±1°C. Каллусы инициировали в темноте из листьев асептических растений *A. rugosa* на твердой ½ среде МС с 1 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП. Каждые 15-16 дней каллусы пассировали на новую среду. В течение первых пассажей (как минимум до 4-го пассажа) каллус сохранял определенную плотность и, вероятно, очаги дифференциации, к 15-му пассажу каллусные клетки были полностью дедифференцированными. У каллусов 3- и 15-го пассажей анализировали состояние протеома. Методом ТХУ-ацетоновой преципитации [4] из листовых каллусов 3-го пассажа от 4-х соматоклонов и исходной формы *A. rugosa* были выделены общие пулы белков и проанализированы 1D-электрофорезом в щелочной системе в денатурирующих условиях [5]. Тем же методом из листовых каллусов 15-го пассажа от соматоклона *Aga11* и исходной формы *A. rugosa* были выделены общие пулы белков и проанализированы 2D-электрофорезом (изоэлектрофокусирование на стрипах ReadyStrip™ IPG Strips pH 3-10 NL, длиной 11 см (производство Bio-Rad, США), и электрофорез в щелочной системе в денатурирующих условиях) согласно прилагаемой к стрипам прописи. Содержание белка в образцах определяли с помощью набора реагентов RC DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, США) по прилагаемой прописи. При 1D-электрофорезе образцы были уравнены по содержанию белка (по 25 мкг белка). При 2D-электрофорезе образцы были уравнены по содержанию белка (по 30 мкг белка).

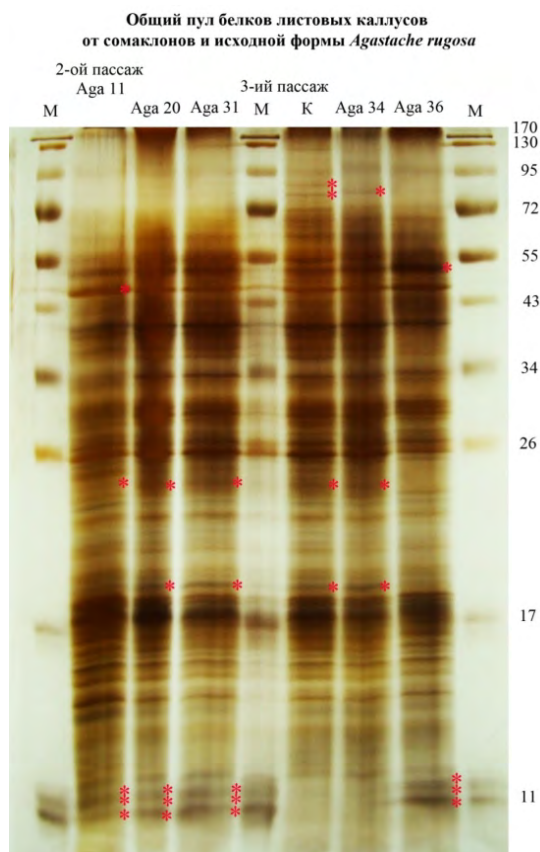
Белки фиксировали в 50% спирте с 10% уксусной кислотой и окрашивали раствором серебра, используя набор реагентов PageSilver™ Silver Staining Kit фирмы Fermentas (Литва). Окрашенные гели фотографировали с помощью цифровой фотокамеры.

Результаты и их обсуждение. Полученные 1D-электрофореграммы клеточных белков из листовых каллусов 3-го пассажа от 4-х соматклонов и исходной формы *A. rugosa* представлены на рисунке 1.

Сравнительный компьютерный анализ с помощью программы Quantity One (Bio-Rad, США) показал, что в протеомах листовых каллусов исходной формы и соматклонов *A. rugosa* присутствует около 60 полипептидов с молекулярными массами (Мм) от 11 до 125,6 кДа. При этом большая часть белков характерна для всех исследуемых протеомов, однако по-прежнему есть и различия по ряду белков (таблицы 1,2).

Наиболее близкими к контролю являются протеомы листовых каллусов соматклонов *Aga20* и *Aga34*. Они отличаются от каллуса исходной формы по 5-ти белкам, и процент сходства составляет 91,94. Между собой протеомы данных каллусов похожи на 96,97% (различаются по 2-м белкам). Протеом листового каллуса *Aga11* схож с протеомом контроля на 90,32 % (различаются по 6-ти белкам), соматклонов *Aga20* и *Aga34* — на 98,39 % (отличия по 1 белку), соматклона *Aga36* — на 83,87 % (различаются по 10-ти белкам).

Более детальный анализ протеомов листовых каллусов исходной формы и соматклонов *A. rugosa* можно провести, используя 2D-электрофорез. На рисунке 2 представлены 2D-электрофореграммы клеточных белков из листовых каллусов 15-го пассажа от соматклона *Aga11* и исходной формы многоколосника морщинистого. Как видно из рисунка 2, протеомы листа исходной формы и соматклона *Aga11* *A. rugosa* в целом похожи, однако выявлено 14 групп белковых пятен, дифференциально экспрессирующихся в каждом из исследуемых протеомов. С помощью программы PDQuest 8.0.1. Advanced (Bio-Rad, США) проведен анализ экспрессии данных белковых пятен (данные не представлены).



Aga 11, Aga 20, Aga 31, Aga 34, Aga 36 — соматклоны, К — исходная форма,

М — белки-маркеры молекулярных весов в кДа; звездочками обозначены дифференциально экспрессирующиеся белки

Рисунок 1 — 1D-электрофореграммы общего пула клеточных белков листовых каллусов, инициированных из соматклонов и исходной формы *A. rugosa*

Таблица 1 — Сравнительная матрица сходства (в %) протеомов листовых каллусов исходной формы и соматклонов *A. rugosa*

| Каллус, полученный от | исходной формы | соматклона <i>Aga11</i> | соматклона <i>Aga20</i> | соматклона <i>Aga34</i> | соматклона <i>Aga36</i> |
|-------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| исходной формы | 100 | 90,32 | 91,94 | 91,94 | 83,87 |
| соматклона <i>Aga11</i> | 90,32 | 100 | 98,39 | 98,39 | 93,55 |
| соматклона <i>Aga20</i> | 91,94 | 98,39 | 100 | 96,77 | 91,94 |
| соматклона <i>Aga34</i> | 91,94 | 98,39 | 96,77 | 100 | 91,94 |
| соматклона <i>Aga36</i> | 83,87 | 93,55 | 91,94 | 91,94 | 100 |

Таблица 2 — Дифференциальная экспрессия ряда белков в протеомах листовых каллусов 3-го пассажа исходной формы и соматклонов *A. rugosa*

| Номер полипептида | Мм, в кДа | Присутствие в протеоме | | | | |
|-------------------|-----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | Исходная форма | Соматклон <i>Aga11</i> | Соматклон <i>Aga20</i> | Соматклон <i>Aga34</i> | Соматклон <i>Aga36</i> |
| 1 | 125.853 | + | – | + | – | – |
| 2 | 87.529 | + | – | – | – | – |
| 3 | 81.406 | + | – | – | + | – |
| 4 | 24.484 | + | + | + | + | – |
| 5 | 23.960 | + | + | + | + | – |
| 6 | 23.608 | + | + | + | + | – |
| 7 | 18.378 | + | + | + | + | – |
| 8 | 11.785 | – | + | + | + | + |
| 9 | 11.339 | – | + | + | + | + |
| 10 | 11.001 | – | + | + | + | + |

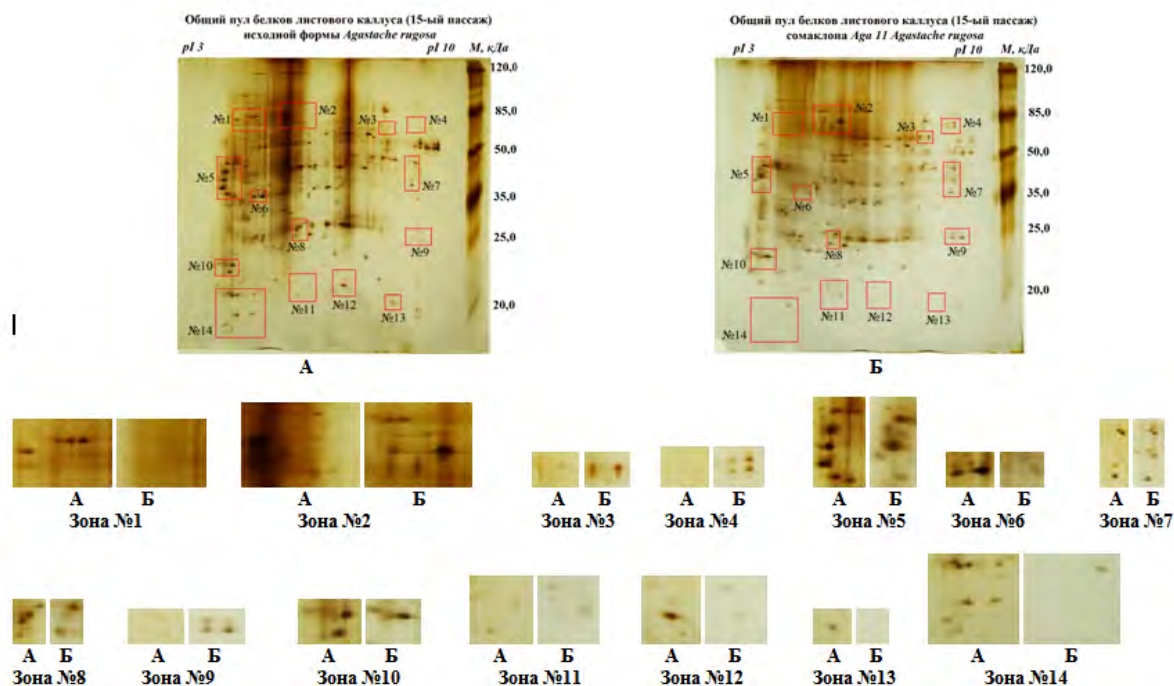


Рисунок 2 — 2-D-электрофореграммы общего пула клеточных белков листового каллусов (15-й пассаж) исходной формы (А) и соматклона *Aga11* (Б) *A. rugosa*

Заключение. Выявлена дифференциальная экспрессия ряда белков от 11 до 125,9 кДа в протеомах листовых каллусов 3-го пассажа исходной формы и соматклонов *A. rugosa*. Среди полученных нами соматклонов многоколосника морщинистого наиболее специфическим протеомом обладают листовые каллусы соматклона *Aga36*: процент различия составляет ~6,5 по отношению к протеому *Aga11*, ~8 — к протеомам соматклонов *Aga20* и *Aga34* и 16 — к протеому исходной формы. Измененная экспрессия белков сохранятся и в длительнопассируемых листовых каллусах (15-й пассаж) от соматклонов *A. rugosa*.

Исследование поддержано грантом НАНБ (БРФФИ) – СО РАН Б12СО-017.

Литература

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. Plant part substitution – a way to conserve endangered medicinal plants? / S. Zschocke [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2000. – Vol.71, №1-2. – P. 281–292.
3. 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.
4. Amme, S. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes / S. Amme [et al.] // *Proteomics.* – 2005. – Vol.5. – P. 2508–2518.
5. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4/ U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – V.227. – P.680–685.