

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Е.В. Спиридович, Т.И. Фоменко, А.Б. Власова, Т.В. Мазур, А.Н. Юхимук

БИОХИМИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МНОГОКОЛОСНИКА МОРЩИНИСТОГО (*AGASTACHE RUGOSA* (FISCH. ET MEY.) KUNTZE) В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

*Разработана биотехнологическая схема клеточной селекции многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze), способствующая созданию новых соматоклональных генотипов лекарственных растений с повышенным содержанием биологически активных веществ. Биохимический анализ выявил высокую активность синтеза фенольных соединений и флавонолов в отобранных соматоклонах с максимальными значениями для соматоклона 11. Разработанная маркерная RAPD+ISSR система дифференцирования генотипов *A. rugosa* позволила оценить дискретность генотипов соматоклонов, а также исходной формы и идентифицировать соматоклон 11 как наиболее генетически удаленный от исходной формы. Предлагается использовать соматоклоны и разработанную маркерную систему в дальнейшей маркер-сопутствующей селекции сортов с повышенным накоплением фенольных соединений и флавонолов.*

*Ключевые слова: биотехнология, культура in vitro, *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze, соматоклоны, полифенольные соединения, молекулярно-генетические маркеры.*

ВВЕДЕНИЕ

Одной из характерных особенностей высших растений является их способность к образованию и накоплению веществ вторичного метаболизма, представленных различными группами соединений. Обозначение «вторичный» указывает на то, что рассматриваемые вещества образуются в метаболическом процессе, не связанном непосредственно с обменом веществ, обуславливающим рост растения. Эти соединения придают растениям специфический аромат, запах и цвет, обладают защитными свойствами в отношении вредителей и возбудителей болезней, а также других неблагоприятных воздействий. В современной литературе обсуждается ряд гипотез относительно роли вторичных метаболитов в функционировании ткани и их способности выполнять роль конституционных и индуцибельных защитных соединений [1]. Кроме этого, вторичный метаболизм рассматривается как процесс детоксикации продуктов первичного метаболизма, а также запасаения и транспорта веществ, что в конечном итоге представляет их как защитные метаболиты от абиотических и биотических факторов [2].

В медицине вещества вторичного метаболизма называют биологически активными веществами (БАВ) и именно они, обладая лечебным действием, обуславливают ценность лекарственного растительного сырья. Для решения вопросов, связанных с образованием, метаболизмом и функциями БАВ, широко используются культуры клеток и тканей растений: в качестве модельной системы для фундаментальных исследований клеточных процессов, а также для решения прикладных задач создания новых сортов, производства лекарственных средств и др.

К традиционным способам повышения продуктивности клеток и тканей *in vitro* относятся клеточная селекция, оптимизация сред, элиситация, использование предшественников синтеза, иммобилизация клеток и др. [3, 4]. Некоторые БАВ удается получить только в культуре клеток. Так, в длительно культивируемых каллусах мака (*Papaver bracteatum* Lindl.) с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) в сочетании со спектрофотометрическими методами во всех линиях каллусных тканей был идентифицирован бензафенантридиновый алкалоид сангвинарин, в то время как в органах растений

in vivo, из которых были получены каллусные ткани, сангвинарин не был обнаружен [5]. Эти данные указывают на наличие не только количественных, но и качественных изменений синтеза вторичных метаболитов в культуре ткани. Иногда может оказаться эффективным использование культур органов растений, трансформированных корневыми волосками (*hairly root*) [6] или так называемых плотных каллусных масс (*compact callus aggregates*, ССА), которые проявляют некоторые уровни клеточной или тканевой дифференциации [7]. Для производства вторичных метаболитов на основе ССА, в частности, получены суспензионные культуры радиолы сахалинской (*Rhodiola sachalinensis*) [8], радиолы розовой (*R. rosea*) [9], катарантуса розового (*Catharanthus roseus*) [10]. Однако в ряде случаев ССА не аккумулировали интересные метаболиты. Например, в лимоннике китайском (*Schizandra chinensis*) ценные лигнаны присутствуют в околоплоднике и семенах, но, несмотря на то, что чешские ученые получили ССА из цветочных почек *S. chinensis*, накопления лигнанов в ССА не происходило [11]. В подобных ситуациях необходимо использовать дифференцированные ткани или культуры органов, а иногда и микрорастения. Например, финские ученые показали, что антидепрессанты гиперидин, псевдогиперидин и гиперфорин накапливались в значительно больших количествах в микрорастениях зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.), чем в культуре ССА [12]. Таким образом, составление схемы культивирования *in vitro* является стратегическим моментом в биотехнологии, требующим особого внимания.

Строгой классификации БАВ до настоящего времени не разработано. По химической классификации наиболее значимыми БАВ являются каротиноиды, глюкозинолаты, фитоэстрогены, фитостерины, фенольные соединения, ингибиторы протеаз, сапонины, сульфиды, терпены [13]. Фенольные соединения (ФС) – один из важнейших классов вторичных метаболитов, имеющих широкое распространение в растениях. Разнообразие функций ФС в растительной клетке в сочетании с широким спектром биологического действия на живые организмы определяют актуальность и интерес к изучению этого класса соединений [14]. Установлено, что

полифенолы обладают широким спектром протекторных эффектов, включая антиканцерогенное, антимикробное, иммуностимулирующее, антиаллергенное, противовоспалительное, сосудорасширяющее и антиоксидантное действия. В культивируемых *in vitro* клетках и тканях растений чайного дерева показана возможность регулировать биосинтез ФС при введении в питательную среду гормоноподобных соединений, которые направленно регулирует синтез определенных типов этих соединений [15]. Ауксины способствуют синтезу растворимых фенольных соединений, в том числе и характерных для чайного растения флавонов, тогда как цитокинины преимущественно воздействуют на образование лигнина. При этом во всех вариантах происходили лишь количественные изменения в синтезе фенольных соединений, что обусловлено активацией ряда ферментов фенольного метаболизма (фенилаланинаммиаклиазы, оксикинамоил-КоА-лигазы и др.). Стабильность синтеза вторичных метаболитов неодинакова для различных классов соединений и для различных клеточных культур. Показано, что синтез вторичных соединений значительно изменяется при переходе клеточной культуры к образованию дифференцированных морфогенных структур [16]. В то же время практически отсутствуют данные об изменениях вторичного метаболизма у соматоклонов, полученных при прямом или непрямом морфогенезе в культуре тканей. Немногочисленные литературные данные по этому вопросу противоречивы [17].

При разработке технологий получения лекарственных средств и фармацевтических субстанций растительного происхождения на основе БАВ стоят задачи строгой стандартизации, контроля качества получаемых продуктов с использованием научно-аналитических подходов и методов. Для фармацевтических целей наряду с важной задачей идентификации принадлежности растения к определенному виду перед учеными стоит вопрос предварительной оценки активных фитохимических веществ в сырье. Идентификация/разработка ДНК-маркеров, которые могут выявлять корреляцию между данными ДНК-генотипирования и количеством селективных фитохимических маркеров у данного вида/сорта/линии растений стано-

вится все более актуальной [17, 18].

На сегодняшний день ДНК-маркеры (AFLP, RAPD, ISSR и др.) были применены для успешного прогнозирования фитохимических свойств у большого числа культивируемых лекарственных растений. Так, с помощью ISSR-маркеров была проведена оценка генетического разнообразия популяций *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae), которые позволили выявить высокий полиморфизм (89,7%) генотипами в популяциях [19]. На основе RAPD - и ISSR - маркеров была выявлена генетическая вариабельность таких культур, как *Momordica charantia* L. [20], *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) [21]. Генетическое разнообразие – одна из главных характеристик при исследовании и селекции образцов лекарственных растений, которую можно с высокой степенью достоверности оценить с помощью ISSR - маркеров [22].

Род *Agastache* Horsemint из семейства *Яснотковые (Lamiaceae)* включает 22 вида, произрастающих в Северной Америке, Мексике, Азии [27]. Два вида: *Agastache foeniculum* (Pursh.) O.Kuntze – многоколосник фенхельный (синоним *Lophanthus anisatus* Benth – лофант анисовый) и *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze – многоколосник морщинистый используются как пряно-ароматические и лекарственные растения. Многоколосник морщинистый – многолетнее лекарственное и декоративное растение, распространено в Корею, Китае, Тайване, Вьетнаме и Японии, обнаружено в России на Дальнем Востоке, о. Кунашир (Приморье), входит в 50 фундаментальных растений китайской медицины. Из разных частей многоколосника выделено 71 БАВ, которые обладают широчайшим биологическим действием, от противовоспалительного до противоопухолевого. *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze является сильнейшим биостимулятором, соперничающим с женьшенем [27–29].

Целью наших исследований являлось получение в условиях *in vitro* соматоклонов многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze), оценка их по биохимическим признакам – идентификация и изучение состава фенольных соединений, анализ особенностей проявления генетической (соматоклональной и/или эпигеномной) изменчивости с помощью молекулярно-генетических методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура ткани. Для введения в культуру *in vitro* были использованы семена *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze. Стерильные семена проращивали в темноте при температуре 24°C на среде Мурасиге-Скуга (МС) [23]. После прорастания семян их переносили на свет в люминостат и культивировали при температуре 23–25°C, освещенности 2500–3000 лк и 16-часовом фотопериоде. **Морфогенез:** Листовые и стеблевые экспланты одинакового размера культивировали на модифицированной питательной среде МС: тиамин гидрохлорид (2 мг/л), пиридоксин гидрохлорид (0,8 мг/л), гидролизат казеина (500 мг/л), сахароза (20 г/л) с добавлением различных концентраций фитогормонов: кинетин в концентрации 1, 2, 3 и 4 мг/л + 0,2 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК); 6-бензиламинопури (6-БАП) – 1, 2, 3 и 4 мг/л + 0,2 мг/л ИУК, рН среды 5,6–5,8. Культивирование проводили в темноте при температуре 24,5±0,5° С.

Приготовление экстрактов. Навеску сухого материала (1 г) измельчали в фарфоровой ступе и помещали в колбу со шлифом, прибавляли 30 мл 96% спирта этилового и оставляли в темном месте на ночь. Полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, далее материал заливали 70% спиртом этиловым и нагревали на водяной бане с обратным холодильником. Время экстракции 30 мин. Экстракцию проводили трижды. Затем фракции объединяли и доводили объем 70% спиртом этиловым до 100 мл.

Определение суммы фенольных веществ проводили с использованием реактива Фолина-Чокальтеу [24]. Для построения калибровочного графика была использована галловая кислота. Измерения проводили на фотоколориметре SOLAR при длине волны 765 нм в кювете толщиной 1 см.

Определение суммы флавонолов: 10 мл исследуемых экстрактов центрифугировали 10 мин при 7 тыс. об/мин, по 5 мл надосадочной жидкости переносили в круглодонную колбу и упаривали на роторном испарителе, приливали 2 мл воды очищенной и затем трижды обрабатывали экстракты диэтиловым эфиром для удаления хлорофиллов и других гидрофобных веществ.

Общий объем пробы для анализа составлял 2,5 мл: 1,5 мл 5% ацетата натрия, 0,5 мл 2% водного раствора хлорида алюминия, 0,5 мл исследуемого образца. Контроль – 0,5 мл этанола и 2,0 мл 5% ацетата натрия.

Калибровочный график построен по рутину. Измерение оптической плотности растворов проводили на фотоколориметре SOLAR при длине волны 440 нм в кювете толщиной 1 см.

Идентификация акацетина в экстракте *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze и соматклонов проводилась после кислотного гидролиза. Полный гидролиз гликозида акацетина происходил в условиях конечной концентрации кислоты хлористоводородной 1,5N в течение 4 часов. Количественное определение содержания акацетина в гидролизированных экстрактах определяли по реакции комплексообразования с хлоридом алюминия. Для этих целей был построен калибровочный график изменения оптической плотности раствора от концентрации стандарта акацетина.

Общий объем пробы составлял 5 мл: 0,4 мл 2% хлорида алюминия, 0,05% акацетин (10, 25, 50, 100, 150 мкл), спирт этиловый до общего объема 5 мл. Время реакции 30 мин. Оптическую плотность измеряли на фотоколориметре SOLAR при длине волны 471 нм в кювете толщиной 1 см. Измерения проводились против контрольного образца, не содержащего акацетин.

Гидролизированные экстракты центрифугировали 15 мин при 12,5 тыс. об/мин. В реакцию брали от 20 до 200 мкл

гидролизата. Условия проведения реакции аналогичны условиям для построения калибровочного графика.

ВЭЖХ-анализ проводили на хроматографе «Agilent 1100» (США) с диодноматричным детектором. Исследование проводили на обращеннофазовой колонке «С-18» фирмы «Диасфер» (Россия) (250×4 мм) с размером частиц 5 мкм, объем инъекции – 20 мкл. Хроматографию проводили в градиенте вода-ацетонитрил-метанол по методу Н.М. Merken [25]. Регистрация разделяемых веществ осуществлялась при двух длинах волн – 270 нм и 325 нм. Идентификацию компонентов осуществляли спектрально в диапазоне волн 220–500 нм.

Молекулярно-генетический анализ соматклонов *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze. Для проведения мультилокусного ДНК-маркирования использовали свежие или зафиксированные при температуре –20°C листья соматклонов многоколосника морщинистого в культуре *in vitro* и соматклонов *ex vitro* в фазе цветения. Для выделения тотальной ДНК использовали навеску растительной ткани в 0,1 г. ДНК выделяли СТАВ-методом с модификациями [26]. Для проведения полимеразой цепной реакции использовали предварительно селектированные праймеры, которые выявляли наибольший полиморфизм между соматклонами (таблица 1).

ДНК-маркирование проводили с использованием двух техник: RAPD-ПЦР и ISSR-ПЦР.

RAPD-ПЦР проводили в 25 мкл смеси, содержащей 2,5 мкл 10× PCR-буфера

Таблица 1 — Характеристики праймеров, использованных для ДНК-маркирования соматклонов многоколосника морщинистого

№	Название	5'→3'	nN	% GT	T _m
RAPD					
1	OPA-03	AGTCAGCCAC	10	60	32
2	OPC-02	GTGAGGCGTC	10	70	34
3	OPP-19	GGGAAGGACA	10	60	32
ISSR					
4	UBC-827	ACACACACACACACACG	17	53	52
5	UBC-856	ACACACACACACACACYA	18	46-48	51-54

Примечание:

Y — цитозин или тимин;

nN — количество нуклеотидов;

% GT — процент G+T оснований;

T_m — температура плавления праймера с учетом концентрации солей.

(ОДО «Праймтех», Беларусь), 2,5 мкл 10× смеси dNTP (ОДО «Праймтех», Беларусь), 20 пМ праймера (ОДО «Праймтех», Беларусь), 0,5 ед. ДНК-полимеразы PrimeTaq

(ОДО «Праймтех», Беларусь) и 20 нг ДНК-матрицы. Реакцию проводили в термоциклере Mastercycle Personal (Eppendorf). Устанавливали следующий режим:

96°C	—	5 минут	}	начальная денатурация
T_a	—	30 секунд		
72°C	—	2 минуты	}	35 циклов
96°C	—	30 секунд		
T_a	—	30 секунд	}	финальная элонгация
72°C	—	2 минуты		
96°C	—	30 секунд	}	
T_a	—	30 секунд		
72°C	—	10 минут	}	
4°C	—	хранение		

Как T_a (здесь и ниже) обозначена температура отжига, при которой праймер комплиментарно связывается с ДНК-матрицей. T_a обычно на 2–3°C ниже температуры плавления (T_m) праймера, которая в свою очередь зависит от его нуклеотидного состава.

ISSR амплификацию выполняли в 25 мкл смеси, содержащей 2,5 мкл 10× PCR-

буфера (ОДО «Праймтех», Беларусь), 2,5 мкл 10× смеси dNTP (ОДО «Праймтех», Беларусь), 30 пМ праймера (ОДО «Праймтех», Беларусь), 0,5 ед. ДНК-полимеразы PrimeTaq (ОДО «Праймтех», Беларусь) и 20 нг ДНК-матрицы. Реакцию проводили в термоциклере Mastercycle Personal (Eppendorf). Для проведения реакции устанавливали следующий режим:

96°C	—	5 минут	}	начальная денатурация
T_a	—	30 секунд		
72°C	—	1 минута	}	30 циклов
96°C	—	30 секунд		
T_a	—	30 секунд	}	финальная элонгация
72°C	—	1 минута		
96°C	—	30 секунд	}	
T_a	—	30 секунд		
72°C	—	10 минут	}	
4°C	—	Хранение		

Электрофоретическое разделение RAPD и ISSR ампликонов проводили с использованием прибора *Bioanalyzer 2100* (Agilent). Расчет молекулярных размеров фрагментов осуществляли с использованием пакета специализированного программного обеспечения *2100 Expert* (Agilent), попарное сравнение и кластеризацию данных проводили в программе *TREECON for Windows*[®].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Органогенез *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze достигнут варьированием гормонов группы цитокининов и ауксинов.

В зависимости от содержания определенных регуляторов роста на листьях и стеблях многоколосника морщинистого наблюдали каллусогенез, индукцию и формирование адвентивных почек и побегов (рисунок 1), либо ризогенез [30].

На морфогенных средах с добавлением 6-БАП в концентрации 1 мг/л и ИУК 0,2 мг/л получен стабильный стеблевой органогенез из каллусной ткани. Полученные при стеблевом органогенезе побеги переносили на питательную среду МС с половинным составом и добавлением ИУК в концентрации 1 мг/л, которые укоренялись и давали начало целым растениям. В результате проделанной работы в ходе

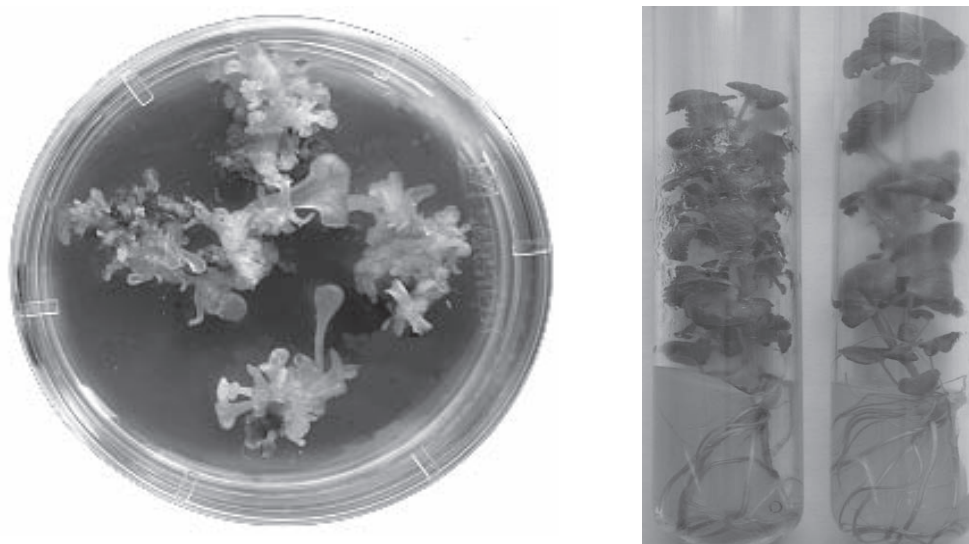


Рисунок 1 – Индукция непрямого морфогенеза и соматклоны в культуре *in vitro*

изучения особенностей морфогенеза и влияния различных факторов на развитие изолированных культур была разработана биотехнологическая схема создания и размножения новых форм многоколосника морщинистого с использованием методов клеточной инженерии (рисунок 2).

Соматклоны проходили адаптационный период в теплице. В дальнейшем вегетация растений проходила на экспери-

ментальных делянках Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

Из 36 полученных соматклонов для биохимического анализа были отобраны растения, которые имели выраженные отличия от родительской формы по морфофизиологическим показателям – соматклоны 6, 7, 11, 20, 31, 34, 36. Суммарное содержание ФС отобранных соматклонов представлено на диаграмме (рисунок 3).

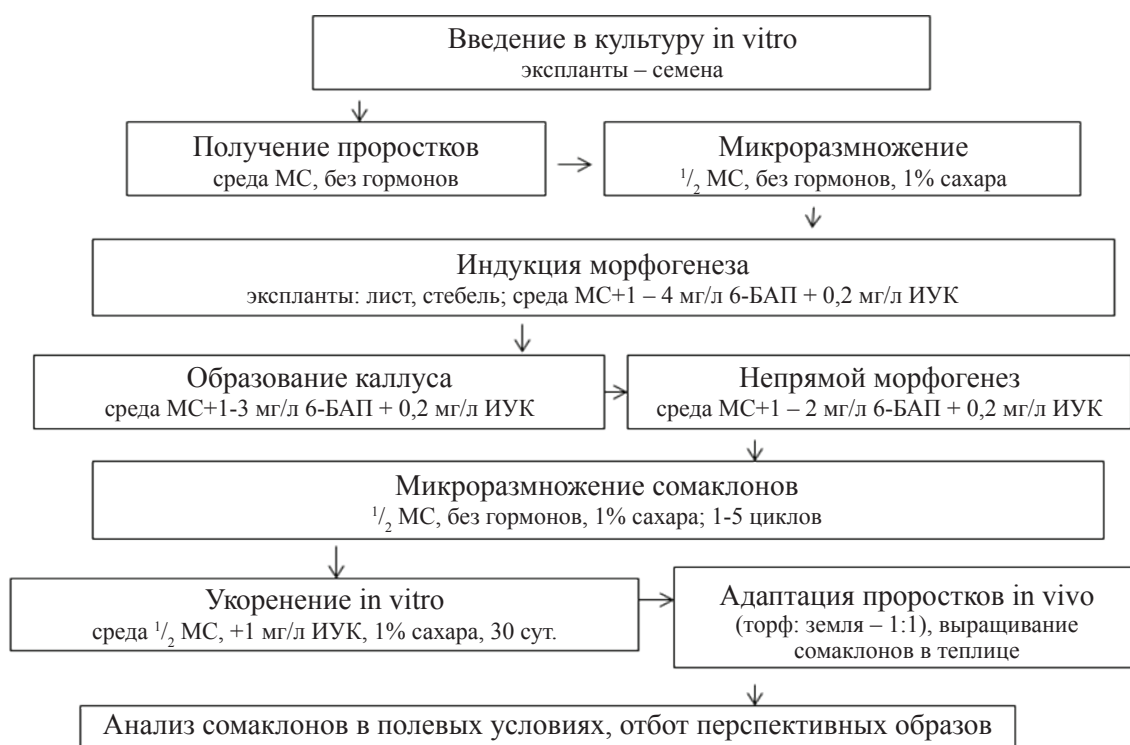


Рисунок 2 - Биотехнологическая схема получения соматклонов многоколосника морщинистого в культуре *in vitro*

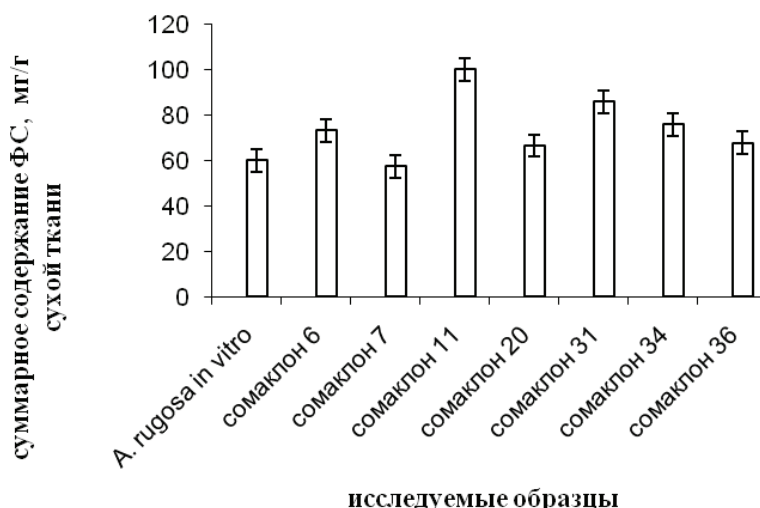


Рисунок 3 – Суммарное содержание ФС в растении многоколосника морщинистого и полученных соматклонов

Биохимический анализ показал отличия соматклонов по суммарному содержанию ФС. Так, соматклон 11 превышает по сумме фенольных веществ исходное растение на 66,6%, а соматклон 20 - на 42,8%, у соматклона 34 - на 26,3%. Имеется и соматклон, у которого количество фенольных веществ сопоставимо с интактным растением - соматклон 7.

Данные по исследованию суммы флавонолов представлены в виде диаграммы на рисунке 4. Полученные результаты показывают, что и по количественному содержанию флавонолов все соматклоны превосходят исходную форму *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze, особенно

соматклон 11, который превосходит контроль в 7 раз, 34 соматклон - в 4,5 раза и 31 - в 3,7 раза.

Использование ВЭЖХ позволяет эффективно разделить и идентифицировать нелетучие и термолабильные компоненты водноспиртовых экстрактов лекарственных растений, которые невозможно идентифицировать другими методами. В связи с этим проанализирован состав экстрактов *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze и соматклонов *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze с помощью ВЭЖХ (рисунки 5 и 6) и определен акацетин после кислотного гидролиза. Увеличение площади пика акацетина после проведения гидролиза

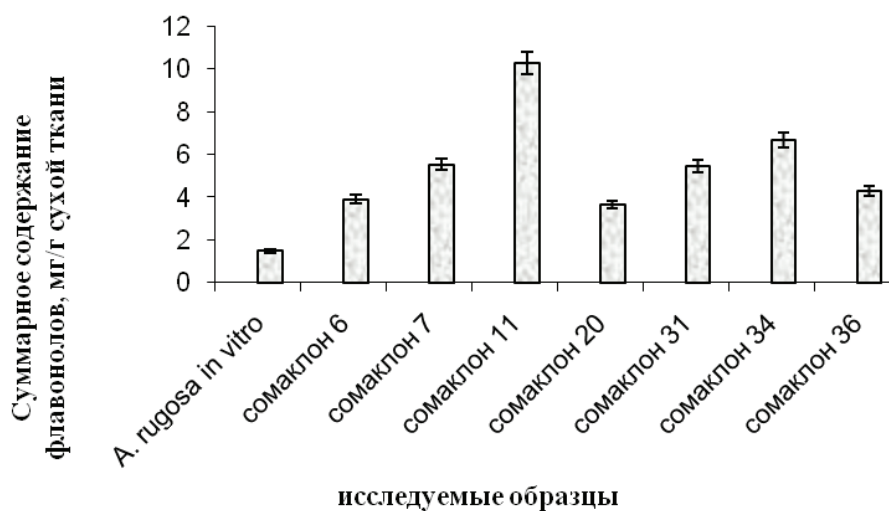
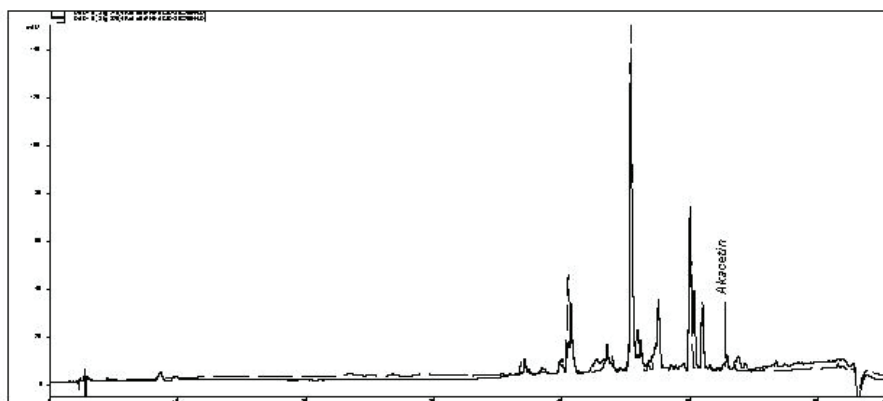


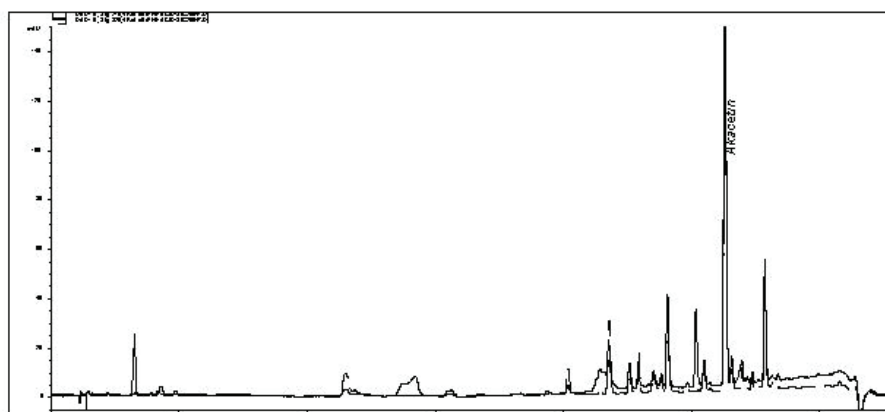
Рисунок 4 – Суммарное содержание флавонолов в растении многоколосника морщинистого и полученных соматклонов

Рисунок 5 – ВЭЖХ водноспиртового экстракта *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze

свидетельствует о присутствии значительного количества гликозилированной формы этого соединения в экстракте многоколосника морщинистого (рисунок 6).

Установлено повышение содержания флавоноидов, в частности акацетина, в гидролизатах экстрактов изученных образцов, по сравнению с аналогичными, которые не подвергались кислотному ги-

дролиту. Такое повышение можно объяснить тем, что указанные соединения, по-видимому, являются агликоновой частью гликозидов, освобожденной в результате гидролиза. Получены данные по количественному содержанию акацетина в исследуемых экстрактах (таблица 2). Сравнительный анализ показал, что количественное содержание данного флавоноида

Рисунок 6 – ВЭЖХ кислотного гидролизата водноспиртового экстракта *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze после гидролизаТаблица 2 – Содержание акацетина в гидролизатах *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze

Наименование образца	Содержание акацетина в экстрактах до гидролиза, мг/мл	Содержание акацетина в гидролизатах экстрактов, мг/мл
Исходная форма	–	1,64±0,09
Сомаклон 6	–	1,28±0,11
Сомаклон 7	–	0,8±0,22
Сомаклон 11	–	1,09±0,15
Сомаклон 20	–	1,74±0,13
Сомаклон 31	–	1,10±0,08
Сомаклон 34	–	0,92±0,07
Сомаклон 36	–	1,15±0,09

в соматонах сравнимо с интактным растением и только для клона 20 отмечено незначительное увеличение акацетина.

Таким образом, при индукции непрямого морфогенеза на основе соматональной вариабельности получены соматональные многоколосника морщинистого, которые проявили полиморфизм по следующим показателям: сумма фенольных соединений, сумма флавонолов.

С целью выяснения возможной генетической природы зафиксированной вариабельности биохимических параметров у отобранных соматоналов по сравнению с исходной формой *A. rugosa* было предпринято мультилокусное ДНК-маркирование генотипов с использованием RAPD- и ISSR-техник. После предварительного скрининга 42 праймеров были отобраны три RAPD (OPA-03, OPC-02 и OPP-19) и два ISSR (UBC-827 и UBC-856) праймера, выявляющие наибольший полиморфизм между исследованными соматонами. В результате ПЦР тотальной ДНК многоколосника морщинистого с отобранными произволь-

ными и микросателлитными праймерами были получены четкие воспроизводимые ампликоны, набор которых для каждого исследуемого соматона и исходной формы характеризовался уникальностью, то есть праймеры обнаруживали полиморфизм между образцами и таким образом позволили дифференцировать все исследованные генотипы. На рисунке 7 представлены результаты микрокапиллярного электрофоретического разделения ампликонов, синтезированных в результате ISSR-ПЦР геномной ДНК соматоналов и исходной формы *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze с праймером UBC-827, проведенного на приборе *Bioanalyzer 2100* (Agilent).

Всего было сгенерировано 118 дискретных ДНК-маркеров, из них 73 RAPD- (в среднем 24,5 маркера на праймер) и 45 ISSR-маркеров (в среднем 22,5 маркера на праймер). Число амплифицированных фрагментов варьировало от 19 (праймер UBC-827) до 26 (UBC-856). Разрешающие характеристики использованных праймеров представлены в таблице 3.

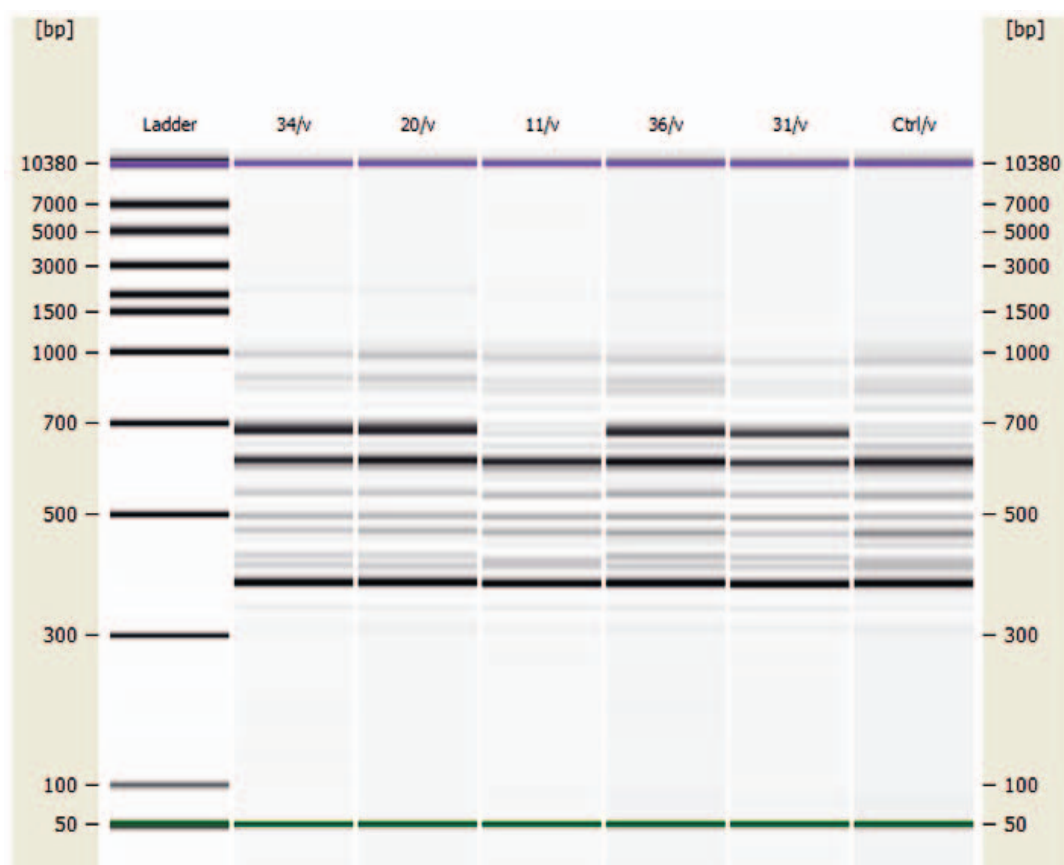


Рисунок 7 – Разделение ампликонов, синтезированных в результате амплификации геномной ДНК соматоналов и исходной формы *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze с праймером UBC-827 на *Bioanalyzer 2100*

Таблица 3 – Разрешающие параметры праймеров, использованных для мультилокусного ДНК-маркирования соматклонов и исходной формы многоколосника морщинистого

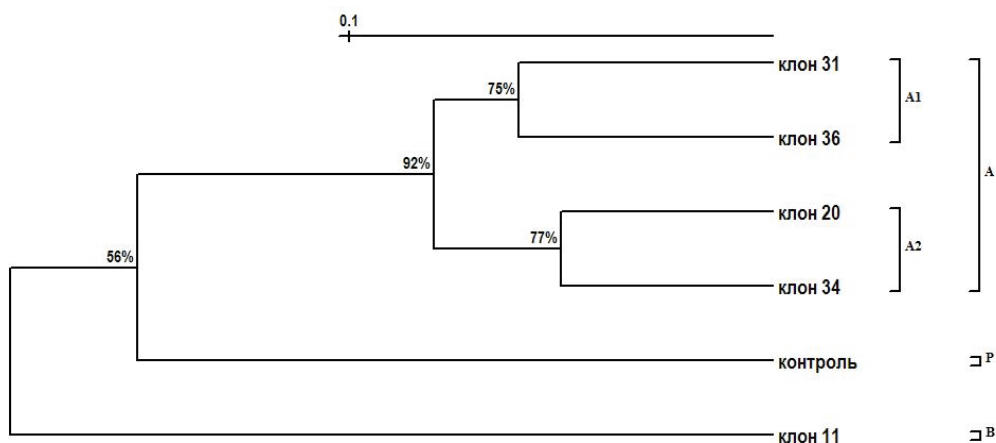
Праймер	Н маркеров	Длина фрагментов, бр	Н фрагментов на образец (min/ max/ среднее)	Н полиморфных маркеров/% полиморфизма
<i>RAPD</i>				
OPA-03	25	210–1260	18/22/20,7	8/32,0
OPC-02	24	205–1565	13/20/17	15/62,5
OPP-19	24	160–1300	18/20/19,2	11/45,8
<i>ISSR</i>				
UBC-827	19	345–975	12/16/13,8	9/47,4
UBC-856	26	205–1005	19/22/20,5	12/46,2
Среднее	23,6			11/46,8

Несмотря на сравнительно невысокий уровень выявляемого полиморфизма (от 32% до 62,5%), использованные праймеры OPA-03, OPP-19, UBC-827 и UBC-856 позволили различить все генотипы.

Коэффициенты подобия Nei & Li были рассчитаны для пяти соматклонов и исходной формы *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze на основе ISSR - и RAPD - анализов, как по отдельности, так и совместно (RAPD+ISSR). Дистанционные матрицы на основе рассчитанных RAPD - и ISSR - маркеров (данные не представлены) были использованы для построения дендрограмм по методу UPGMA. Дендрограммы, основанные на данных RAPD- и ISSR-анализа, обнаруживали довольно схожую кластеризацию соматклонов многоколосника морщинистого (данные не

представлены). Далее для получения более детальной кластеризации и степени генетического родства генотипов данные RAPD- и ISSR-анализа были объединены в сводной RAPD+ISSR матрице (данные не представлены), на основе которой, используя UPGMA алгоритм, была сгенерирована консенсусная RAPD+ISSR дендрограмма, представленная на рисунке 8.

Из представленной дендрограммы видно, что для исследованных соматклонов характерны два направления генетической изменчивости относительно исходной формы (*P*). Одно из этих направлений представляют соматклоны 31, 36, 20 и 34, сформировавшие на дендрограмме кластер *A*, который в свою очередь подразделяется еще на два субкластера, состоящих из пары генетически более



Примечание: Горизонтальная шкала отражает генетическую дистанцию между соматклонами. Числа около узлов отражают величины поддержки (в %), основанные на 100 репликах анализа Bootstrap

Рисунок 8 - Консенсусная дендрограмма генотипов *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze, сгенерированная с использованием UPGMA алгоритма на основе 73 RAPD и 45 ISSR маркеров

близких соматклонов: **A1** – соматклоны 31 и 36, **A2** – соматклоны 20 и 34. Второе направление генетической изменчивости относительно исходной формы – это кластер **B**, представленный соматклоном 11. Как наглядно видно из представленной дендрограммы (рисунок 8), соматклон 11 генетически наиболее отдален от исходной формы, что согласуется с данными анализа биохимических показателей генотипов: сумме фенольных соединений и сумме флавонолов.

Также можно отметить, что соматклоны, формирующие кластер **A**, в генетическом плане менее отличимы между собой и менее удалены от исходной формы многоколосника морщинистого, чем соматклон 11, формирующий кластер **B**.

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

Сегодня 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 [32]. Разработанная нами система идентификации и ДНК-паспортизации соматклонов *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze основана на использовании RAPD- и ISSR-маркеров. Метод позволяет проводить идентификацию отдельных генотипов с помощью анализа ДНК из любых органов растений на различных стадиях онтогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые для многоколосника морщинистого *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze была разработана биотехнологическая схема создания новых форм лекарственных растений с повышенным содержанием БАВ на основе клеточной селекции. В качестве заключительного этапа предлагается микроклональное размножение, которое позволяет быстро размножить полученные и отобранные соматклоны, представляющие собой самостоятельный способ клонирования ценных

образцов - кандидатов на сорт. Проведен их первичный биохимический анализ. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой активности синтеза фенольных соединений и флавонолов в отобранных соматклонах, максимальные отличия характерны для соматклона 11. Для дифференцировки генотипов *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze разработана эффективная RAPD+ISSR маркерная система: комплекс из трех RAPD и двух ISSR праймеров позволил констатировать наличие генетических различий между анализируемыми соматклонами, вычислить генетические дистанции между ними и исходной формой, сертифицировать все генотипы.

Данные генотипирования полученных соматклонов на основе комплексного использования набора произвольных и микросателлитных праймеров коррелируют с результатами измеренных биохимических показателей растений, что позволяет рекомендовать предложенную систему для проведения дальнейшей направленной селекции желаемых физиологических признаков культуры на внутривидовом уровне. Поскольку маркер - основанная селекция является инструментом, существенно ускоряющим эффективную селекцию сортов/линий растений с повышенным биосинтезом желаемых вторичных метаболитов, то SCAR - маркеры могут быть разработаны на основе полученных RAPD - и ISSR - маркеров и далее помочь при функциональном анализе целевых генов.

SUMMARY

E.V. Spiridovich, T.I. Fomenko,
A.B. Vlasova, T.V. Mazur, A.N. Yukhimuk
BIOCHEMICAL AND MOLECULAR-
GENETIC ANALYSIS OF AGASTACHE
RUGOSA (FISCH. ET MEY.) KUNTZE IN
THE CULTURE IN VITRO

Biotechnology cell selection scheme for the creation of new somaclonal genotypes of giant-hyssop (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze) with a high content of biologically active substances was developed. Biochemical analysis revealed a high activity of synthesis of phenolic compounds and flavonoids in selected somaclones, with maximum characteristic at somaclones 11. Developed RAPD+ISSR marker system of differentia-

tion of *A. rugosa* genotypes made possible to assess the discreteness of somaclones' genotypes between each other and the original form, and identify somaclone 11 as the most genetically distinct from the original form. Somaclones and developed a marker system are proposed to use for further marker-assisted selection of cultivars with increased accumulation of phenolic compounds and flavonoids.

Keywords: biotechnology, culture in vitro, *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze, somaclones, qualitative structure, polyphenolic connections, molecular-genetic markers.

ЛИТЕРАТУРА

1. Носов, А.М. Функции вторичных метаболитов растений in vivo и in vitro / А.М. Носов // Физиология растений. - 1994. - Том 41, № 6. - С.873–878.

2. Stapleton, A.E. Ultraviolet Radiation and Plants: Burning Questions / A.E. Stapleton // Plant Cell. - 1992. - V.4. - P. 1353–1358.

3. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе: учебное пособие / Р.Г. Бутенко. - М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. - 160 с.

4. Feher, A. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state / A. Feher, T.P Pasternak., D. Dudits // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. - 2003. - V.74. - P. 201–228.

5. Рабинович, С.А. Алкалоиды каллусных тканей *Papaver bracteatum* Lindl. / С.А. Рабинович, А.М. Смирнов // Культура клеток растений и биотехнология. Тезисы докладов IV всесоюзной конференции. - Кишинев, 1983. - С. 63–64.

6. Флавоны генетически трансформированных корней шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) и индукция их образования при элиситации метилжасмонатом / И.Н. Кузовкина [и др.] // Физиология растений. - 2005. - Т.52. - С. 90–96.

7. 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.

8. Xu, J. Suspension culture of compact callus aggregate of *Rhodiola sachalinensis* for improved salidroside production / J. Xu, Z. Su, P. Feng // Enzyme Microb. Tech. - 1998. - Vol. 23. - P. 20–27.

9. 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.

10. Zhao, J. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites / J. Zhao, L. C. Davis, R. Verpoorte // Biotechnology Advances. - 2005. - V. 23, Issue 4. - P. 283–333.

11. In vitro culture establishment of *Schizandra chinensis* (turz.) Baill. and *Rhodiola rosea* L., two adaptogenic compounds producing plants / J. Martin [et al.] // Journal of Phytology. Tissue Culture. - 2010. - V. 2, №11. - P. 80–87.

12. Identification of a common polymorphism in the TopBP1 gene associated with hereditary susceptibility to breast and ovarian cancer / S.M. Karppinen [et al.] // Eur. J. Cancer. - 2006. - V. 42. - P. 2647–2652.

13. IUPAC. Nomenclature of cyclitols // Biochem.J. - 1976. - V. 153. - P. 21–31.

14. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения / М.Н. Запрометов. - М., 1996. - 45 с.

15. Загоскина, Н.В. Культура ткани чайного растения: некоторые аспекты образования полифенолов / Н.В. Загоскина, М.Н. Запрометов // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. - М.: Наука, 1991. - С. 32–35.

16. Rolph, C.E. Phosphatidylcholine Biosynthesis in Celery Cell Suspension Cultures with Altered Sterol Compositions / C.E. Rolph, L.J. Coad // Physiol. Plantarum. - 1991. - V.83. - №4. - P. 605.

17. Molecular markers in herbal drug technology / J. Kalpana [et all] // Current Science. - 2004. - V. 87. - №2. - P. 159–165.

18. O'Connor, S. Methods for molecular identification of biosynthetic enzymes in plants / S. O'Connor // Plant-derived natural products; eds.: A.E. Osbourn, V. Lanzotti. - Springer Science + Business Media, LLC, 2009. - 598 p.

19. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae) / Xia Tao [et al.] // Biochemical Systematics and Ecology. - 2007. - V. 35. - P. 209–214.

20. Behera, K. Comparative analysis of genetic diversity in Indian bitter gourd (*Momordica charantia* L.) using RAPD and ISSR markers for developing crop improvement strategies / K. Behera, A.K.

Singh, Jack.E. Staub // *Scientia Horticulturae*. - 2008. - V.115. - P. 209–217.

21. Verma, Praveen C. The extent of genetic diversity among *Vanilla* species: Comparative results for RAPD and ISSR / Praveen C. Verma [et al.] // *Industrial crops and products*. - 2009. - V.29. - P. 581–589.

22. Kurane, J. Application of ISSR marker in pharmacognosy: current update / J. Kurane, V. Shinde, A. Harsulkar // *Phcog. Rev.* - 2009. - V.3. - Issue 6. - P. 216–228.

23. Murashige, T., Skoog, F. // *Physiol. Plant.* - 1962. - V.15. - №13. - P. 473–497.

24. Riedl, K.M. Tannin-protein complexes as radical scavengers and radical sinks/ K.M. Riedl, A.E. Hagermann // *J. Agric. and Food Chem.* - 2001. - Vol. 49, № 10. - P. 4917–4923.

25. Merken, H.M. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones / H.M. Merken, G.R. Beecher // *Journal of chromatography*. - 2000. - № 897. - P. 177–184.

26. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses / E.L. Dempster [et al.] // *Biotechniques*. - 1999. - V 27(1). - P. 66–68.

27. Vogelmann, J.E. Flavonoids of *Agastache* section *Agastache* / J.E. Vogelmann // *Biochemical Systematic and Ecology*. - 1984. - V.12. - №4. - P. 363–366.

28. Inhibition of cytokine-induced I κ B kinase activation as a mechanism

contributing // *Atherosclerosis*. - 2005. - V.180. - №1. - P. 27–35.

29. Биологически активные вещества растительного происхождения: в 3-х томах. - М., 2001. - С. 740-760.

30. Мазур, Т.В. Культивирование многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze) in vitro / Т.В. Мазур, В.Н. Решетников // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. - Минск, 2005. - №3. - С. 5–9.

31. Nei, M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases / M. Nei, W.H. Li // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 1979. - V.76. - P. 5269–5273.

32. Recent advances in medical plant biotechnology / M.V. Khan [et al.] // *Indian journal of biotechnology*. - 2009. - V.8. - P. 9–22.

Адрес для корреспонденции:

220012, Республика Беларусь,
г. Минск, ул. Сурганова, 2в,
ГНУ ЦБС НАН Беларуси,
лаборатория прикладной биохимии,
тел.: (+375-17) 284-14-73,
эл. почта: E.Spiridovich@cbg.org.by .
Спиридович Е.В.

Поступила 09.11.2012 г.