

УДК 581.4:581.19

О.В. ЧИЖИК, канд. биол. наук, доцент,
заведующая лабораторией клеточной биотехнологии
Государственное научное учреждение
«Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Минск, Республика Беларусь
E-mail: chizhikolga17@gmail.com, chizhik@cbg.org



Статья поступила 16.04.2025

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕТЕРОГЕННОСТИ БЕЛКОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *ERICACEAE* И ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ ДЕДИФФЕРЕНЦИАЦИИ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Проведен скрининг ягодных растений сем. Ericaceae (брусника обыкновенная) на повышенное накопление вторичных метаболитов (в т.ч. арбутина). Отобраны сорта, наиболее перспективные для получения БАВ с использованием биотехнологических способов.

Впервые проведен протеомный анализ брусники обыкновенной разных сортов, а также каллусных культур, иницированных их разных типов ткани (лист, стебель). Получены протеомные карты. Установлена видо- и сортоспецифичность продуктов экспрессированного генома. Определены белки, претендующие на роль маркеров видовой и сортовой принадлежности исследованных таксонов. Выявлены биохимические маркеры, отражающие общие закономерности развития растений и каллусных культур.

Ключевые слова: брусника, протеомный анализ, белки-маркеры, каллус.

CHIZHIK O.V., PhD in Biol. Sc., Associate Professor,
Head of the Laboratory of Cellular Biotechnology
State Scientific Institution «Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus»,
Minsk, Republic of Belarus
E-mail: chizhikolga17@gmail.com, chizhik@cbg.org.by

CHARACTERISTICS OF PROTEIN HETEROGENEITY OF THE *ERICACEAE* FAMILY REPRESENTATIVES AND THE MARKERS OF PLANT TISSUE DEDIFFERENTIATION IDENTIFICATION

The Ericaceae family berry plants (lingonberry) screening for the secondary metabolites high concentration (including arbutin) was carried out. The most promising varieties for the biologically active substances obtaining by the biotechnological methods were selected.

Proteomic analysis of lingonberry, as well as the callus cultures initiated from different types of tissue (leaf, stem) was carried out for the first time. The proteomic maps were obtained. The proteins that claim to be specie's and cultivar's markers were identified. The biochemical markers of plant and callus culture development were identified.

Keywords: lingonberry, proteomic analysis, marker proteins, callus.

Введение. В последнее десятилетие наблюдается большой спрос на биологически активные вещества природного происхождения. Растения отличаются высокой гибко-

стью синтеза: спектр синтезируемых химических структур значительно шире, чем у любой другой группы организмов, что делает растения крупнейшим источником натураль-

ных средств в области фармации, продуктов питания и косметологии [1].

Культуры клеток и тканей растений обеспечивают полезные альтернативы для производства ценных биологически активных ингредиентов, представляя собой стандартизированные, не содержащие загрязнений биостойчивые системы, позволяющие получать целевые соединения в промышленном масштабе с возможностью направленно регулировать биосинтез биологически активных веществ. Чтобы изучать и контролировать биосинтез целевых веществ, продуцируемых растением, необходимо использовать знания не только его метаболизма, но и определяющих ее геномики и протеомики в качестве теоретического и методического подхода для определения соответствующих биологических путей, молекулярных механизмов и функциональных белковых сетей на всех уровнях биологической организации организма (клетки, ткани, органа) [2].

Переход клетки *in vitro* из дифференцированного состояния к дедифференцировке и активным клеточным делениям происходит из-за изменения активности генов: активирования одних и репрессирования других, что приводит к изменению общего белкового состава клеток [3].

Исследования биохимического, транскриптомного и белкового профилей в настоящее время позволили идентифицировать ряд генов, кодирующих белки, вовлеченные в процессы развития растений. Эти белки принадлежат к различным метаболическим путям и играют центральную роль в репрограммировании клеток в ответ на стрессовые и гормональные сигналы *in vitro* [4].

Поиск белковых маркеров, позволяющих определять функциональное состояние растений-продуцентов биологически активных соединений, имеет не только научное, но и практическое значение, поскольку даст возможность разработать способы определения биопродуктивности клеточных культур лекарственных растений.

Данные по протеому представителей рода *Vaccinium* (сем. *Ericaceae*), в том числе *in vitro* культур, практически отсутствуют. В связи с вышесказанным, исследование протеомного состава растений-продуцентов биологически активных веществ (БАВ) весьма актуально, поскольку составление биохими-

ческого паспорта и выявление белковых маркеров дедифференциации растительных тканей поможет отобрать перспективные каллусные культуры как потенциальные объекты биотехнологии растений.

Для производства ценных биологически активных веществ важное значение имеет выбор растения-продуцента. Брусника обыкновенная является ценным источником широкого ряда БАВ.

Цель работы – получение новых знаний о явлениях, происходящих в клеточных популяциях *in vitro* как уникальных моделях обратимо-регрессивного изменения биологической системы от многоклеточного специализированного уровня к одноклеточному, что явится основой разработки клеточных культур-продуцентов БАВ.

Основной задачей представленного исследования являлось получение и сопоставление протеомных карт для оценки функциональных особенностей продуктов экспрессированного генома растений – представителей сем. *Ericaceae in vivo* и *in vitro*, а также выявление биохимических маркеров, отражающие закономерности развития растений и каллусных культур, полученных на их основе.

Объектами исследований служили растения сем. *Ericaceae*: дикие формы подвидов брусники обыкновенной *Vaccinium vitis-idaea* subsp. *minus* Ait., брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* Ait.) сортов Koralle, Rubin, Red Pearl, Mazovia, Erntesegen из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси и каллусы, полученные из этих растений. Все образцы, включенные в исследование, были протестированы на сортоответствие.

Методы исследований. Общую фракцию клеточных белков из растительной ткани получали на основе методологий, разработанных Amme et al. [5] и Vincent et al. [6] с нашими модификациями.

Гетерогенность общей фракции белков определяли методом 2D-электрофореза в двух направлениях.

1-е *направление* – изоэлектрофокусирование.

Для изоэлектрофокусирования (IEF) использовали иммобилизованные сухие стрипы (ReadyStrip™ IPG) с иммобилизованным градиентом pH (pI 3-10 L) длиной 11 см (производство Bio-Rad Laboratories, США). IEF

проводили на автоматической станции Protean i12 IEF Cell (производство Bio-Rad, США). IPG стрипы предварительно регидратировали в 200 мкл регидратирующего раствора ReadyPrep Rehydration/Sample buffer (Bio-Rad).

После проведения IEF IPG-стрипы с иммобилизованным градиентом pH уравнивали с буферными системами I и II (ReadyPrep 2-D Starter Kit Equilibration Buffer, Bio-Rad) для последующего вертикального SDS-электрофореза белков в денатурирующих условиях. Применение данных буферных систем способствует восстановлению дисульфидных связей и алкилированию сульфгидрильных групп.

2-е направление – вертикальный электрофорез белков в денатурирующих условиях в щелочной системе по методу *Laemmli* [7] проводили в камере для электрофореза Criterion Cell (Bio-Rad) на готовых гелях Criterion TGX Precast Midi Protein Gel, 13,3 x 8,7 см, IPG/1 prep well, 4-15%, 11 см, 550 мкл (Bio-Rad). Параллельно с исследуемыми образцами разделяли окрашенные белки-маркеры ("Precision Plus Protein Unstained Standards" с диапазоном Мм 10–250 kDa, Bio-Rad). Электрофорез проводили при температуре не выше +35°C в TGS буфере, pH 8,3 (Bio-Rad) при постоянной силе тока 100 V нагель.

После электрофореза гели окрашивали красителем Oriole Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad). Окрашенные гели фотографировали, используя систему VersaDoc (Bio-Rad). Анализ протеомных карт осуществляли с помощью специализированного программного обеспечения PDQuest 2-D Analysis Software, Bio-Rad. Молекулярные массы белков определяли, используя базу данных UniProt.

Для идентификации и количественного анализа вторичных метаболитов, содержащихся в листовой ткани брусники обыкновенной, использовали метод ВЭЖХ (исследования выполнены на базе Института биорганической химии НАН Беларуси) и масс-спектрометрию [8].

Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием программы «Statistica 7.0» [9]. Изменения считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Брусника является официальным лекарственным растительным сырьем и содержит большое количество веществ вторичного метаболизма (фенолы, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты и др.) [10]. Проведенные исследования показали, что по содержанию БАВ брусника лесная (контроль) превышает сортовую. Однако у исследованных образцов выявлены существенные сортовые особенности: сорт Рубин содержит наибольшее количество арбутина, превышающее таковое в контроле (на 11,8%) и эпикатехина (на 23%). Сорт Мазовия – преобладающее количество хлорогеновой кислоты и проантоцианидина, сорт Коралл – кверцетина [8].

Для дальнейших исследований были отобраны наиболее перспективные таксоны.

Протеомный анализ представителей вида *Vaccinium vitis idaea* Ait.

В ходе проведения исследовательских работ впервые были получены протеомные карты общего пула белков листовой ткани растений брусники обыкновенной с высоким содержанием БАВ, а также каллусных культур, инициированных из листовой и стеблевой ткани.

При анализе 2D-электрофореграмм учитывали только хорошо различимые пятна. Поскольку ряд минорных белков перекрывается доминирующими белками или находится ниже порога чувствительности к красителю, обнаруженное число белковых пятен могло быть занижено. Визуализация этих белков впоследствии может быть осуществлена посредством проведения 2D-электрофореза в более узком диапазоне pI. Определено, что основная масса белков на протеомных картах брусники обыкновенной находится в области молекулярных масс (Mm) от 12 до 69 kDa и диапазоне pI 4,0–6,5. У всех образцов брусники наблюдали сходные группы белков и отдельные белки, по нашему мнению, являющиеся характерными для конкретного вида. При анализе протеомных карт брусники обыкновенной на электрофореграммах листовой ткани всех исследованных образцов отчетливо выделяются 6 зон, включающие изоформы белков, сходные по Mm и диапазонам pI (38,8 –17,2 kDa, pI 4,3–5,5). Также были выявлены 3 индивидуальных белка, лежащих в области Mm 9,8–12,8 kDa, pI 5,5–6,2 (таблица 1).

Таблица 1. – Характеристика белков, дифференциально экспрессирующиеся в листовой ткани растений *Vaccinium vitis-idaea* Ait. и характерных для всех исследованных таксонов (определены по базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org>))

№	Мм, kDa	pI	Ген	Белок
1	9,8-11,1	4,6-4,8	ATPC1	ATP synthase (gamma chain 1 (fragment))
2	11,5-12,8	6,0-6,2	rpoB	DNA-directed RNA polymerase
3	13,5-15,0	5,5-5,7	nad3	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3

С целью применения белков в качестве молекулярных маркеров желательно, чтобы это были белки с выраженной экспрессией, поэтому при сравнении и анализе полученных протеомных карт мы, в первую очередь, сосредоточили внимание на поиске именно таких белков.

Сопоставляя рассчитанные с помощью программы Quantity 2 молекулярные массы белков с базой данных UniProt, мы определили белки брусники, претендующие на роль маркеров видовой принадлежности: ДНК-зависимая РНК-полимераза, цитохромы f и b6, большая субъединица РБФК, АТФ-синтаза, НАДФ убикинон-оксидоредуктаза.

В результате скрининга протеомов брусники разных сортов были обнаружены дифференциально экспрессирующиеся белки, характерные только для растений брусники определенного таксона, которые могут претендовать на роль белков-маркеров сортовой принадлежности растений *Vaccinium vitis-idaea*.

У брусники Koralle на роль маркерных белков сорта претендуют основной белок с Мм 28,9 kDa и pI 7,9 (предположительно, фрагмент фермента Maturase K) и низкомолекулярный кислый белок с Мм 18,8 kDa и pI 4,8 (предположительно, фрагмент фитохрома В). В процессе анализа протеомов брусники обыкновенной сортов Mazovia и Erntesegeen также были выявлены белки, претендующие на роль маркерных для данных сортов. Сорт Mazovia: белки с Мм 35,9 kDa, pI 9,7 и Мм 15,4 kDa - pI 6,4. Сорт Erntesegeen: белки с Мм 59,9 kDa, pI 5,6; 43,0 kDa, pI 5,5-5,8; 35,8 kDa, pI 5,8 и Мм 22,6 kDa, pI 9,0.

Протеомный анализ каллусных культур брусники обыкновенной, инициированных из различных типов ткани.

Проведен протеомный анализ каллусных культур растений брусники, инициирован-

ных из различных типов тканей (лист, стебель).

При анализе протеомных карт брусники обыкновенной разных таксонов было подтверждено, что каллусы, инициированные из определенного типа ткани (лист, стебель), содержат белки, характерные для того же типа ткани, из которой был получен каллус.

Протеомный анализ общего пула белков каллусных культур брусники обыкновенной разных таксонов, инициированных из различных эксплантов (лист, стебель), позволил определить белки, претендующие на роль потенциальных маркеров происхождения каллуса (листовой, стеблевой). При сравнении 2D-электрофореграмм общего пула белков листовой ткани и листового каллуса брусники обнаружены ферменты фотосинтеза: белки, входящие в состав большой субъединицы РБФК, белки субъединицы НАДФ-дегидрогеназы и цитохрома b6.

Несмотря на большое сходство полученных электрофореграмм показано, что протеомы листового и стеблевого каллусов имеют различия как по уровню экспрессии отдельных белков, так и по числу изоформ. Были выявлены индивидуальные белки, характерные для каллусов, инициированных из различных типов тканей – листа или стебля.

На протеомной карте листового каллуса брусники *Vaccinium vitis idaea* minus детектируются сильно экспрессирующиеся белки с Мм 56,1 и 56,4 kDa (pI 6,5 и 6,8). Экспрессия кислых низкомолекулярных белков листового каллуса с Мм 24,8; 23,1; 22,6 kDa (pI 5,2; 5,5; 5,7) больше, чем у стеблевого. Белок листового каллуса с Мм 50,5 kDa (pI 9,2) характеризуется сильной экспрессией, также ярко выражен белок с Мм 35,2 kDa (pI 9,6) который у стеблевого каллуса присутствует в следовых количествах. На протеомных картах листового каллуса брусники выявлены 4

Заклучение. Проведен биохимический скрининг форм и подвидов брусники обыкновенной и брусники обыкновенной сортовой, характеризующихся повышенным накоплением биологически активных веществ.

Отобраны таксоны растений, наиболее перспективные для биотехнологического использования. Получены *in vitro* и каллусные культуры.

Впервые проведен 2D-электрофорез и получены протеомные карты представителей сем. *Ericaceae* – дифференцированных и недифференцированных тканей брусники обыкновенной, а также каллусных культур, инициированных из листовых и стеблевых тканей этих таксонов.

В результате проведенных исследований установлена видо- и сортоспецифичность продуктов экспрессированного генома исследуемых растений. Впервые определены белки, претендующие на роль маркерных для вида *Vaccinium vitis-idaea* Ait., а также маркеры сортовой принадлежности представителей данного семейства. Протеомный анализ общего пула белков каллусных культур позволил определить белки, претендующие на роль маркеров происхождения каллуса, инициированного из эксплантов разного происхождения – лист, стебель.

Полученные результаты не только проясняют механизмы морфогенетических процессов, происходящих в клеточных популяциях *in vitro*, как уникальных моделях обратимо регрессивного изменения биологической системы от многоклеточного специализированного уровня к одноклеточному, но и позволяют сделать первичную оценку биопродуктивности полученных каллусных культур.

Список литературы

1. Новиков, Н. Н. Биохимия растений : монография. М.: Ленанд, 2014. – 680 с.
2. George, E.F. Plant Propagation by Tissue Culture / E.F. George // Springer. – 2008. – Vol. 3. – 540 p.
3. Калинин, Ф. Л. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
4. Yin, L. Proteomic and transcriptomic analysis of rice mature seedderived callus differentia-

- tion / L. Yin, Y. Tao, K. Zhao // J. Of Proteomics. – 2007. – Vol. 7. – P. 755-768.
5. Amme, S. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes / S. Amme // J. Of Proteomics. – 2005. – Vol. 5, № 10. – P. 2508-2518.
6. Vincent, D. Optimization of protein isolation and solubilization for ripe grapes / D. Vincent, M.D. Wheatley, G.R. Kramer // Electrophoresis. – 2006. – Vol. 27. – P.1853-1865.
7. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227. – № 5259. – P. 680-685.
8. Стрелковский, В. В. Скрининг растений *Vaccinium vitis-idaea* L. на повышенное содержание биологически активных веществ / В.В. Стрелковский [и др.] // Настоящее и будущее биотехнологии растений : сб. материал. Междунар. научн. конф., НАН Беларуси, Центральный ботанический сад, Отделение биол. наук НАН Беларуси, Совет ботанических садов стран СНГ при МААН; подобщ. ред. В. Н. Решетникова. – Минск, ИВЦ Минфина, 2023. – 156 с.
9. Кабанов С. В. Использование пакета Statistica 5.0 для статистической обработки опытных данных: методические указания для дипломного проектирования для студентов лесного факультета специальностей 260400 «лесное хозяйство» и 260500 «садово-парковое и ландшафтное строительство» : монография / С. В. Кабанов. – Саратов : СГАУ им. Н.И.Вавилова, 2000. – 42 с.
10. Skupiena, K. In vitro antileukaemic activity of extracts from berry plant leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells / K. Skupiena, J. Oszmianski, D. Kostrzewa // Cancer Letters. – 2006. – Vol. 236. – P. 282–291.

References

1. Novikov N.N. *Biohimiya rastenij* [Plant biochemistry]. Moscow: Lenand, 2014, 680 p. (In Russian)
2. George, E.F. Plant Propagation by Tissue Culture. Springer. 2008. Vol. 3. 540 p.
3. Kalinin F.L. Sarnackaya V.V., Polishchuk V.E. *Metody kul'tury tkani v fiziologii i bio-*

- himii rastenij* [Tissue culture methods in plant physiology and biochemistry]. Kiev, Navukova dumka, 1980, 488 p. (In Russian)
4. Yin L. Tao Y., Zhao K. Proteomic and transcriptomic analysis of rice mature seedderived callus differentiation. *Journal of Proteomics*, 2007, vol. 7, pp. 755-768.
 5. Amme S. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes. *Journal of Proteomics*, 2005, Vol. 5, no 10, pp. 2508-2518.
 6. Vincent D., Wheatley M.D., Kramer G.R. Optimization of protein isolation and solubilization for ripe grapes. *Electrophoresis*, 2006, vol. 27, pp. 1853-1865.
 7. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no 5259, pp. 680-685.
 8. Strelkovskij V. V., Shabunya P. S., Chizhik O.V. Skrining rastenij *Vaccinium vitis-idaea* L. na povyshennoe sodержanie biologicheskii aktivnyh veshchestv [Vaccinium vitis-idaea L. plants screening for the biologically active substances high concentration]. *Nastoyashchee i budushchee biotekhnologii rastenij* [The Present and Future of Plant Biotechnology]. Minsk, 2023, p. 92. (In Russian)
 9. Kabanov S.V. *Ispol'zovanie paketa Statistica 5.0 dlya statisticheskoy obrabotki opytnykh dannyh: metodicheskie ukazaniya dlya diplomnogo proektirovaniya dlya studentov lesnogo fakul'teta special'nostej 260400 «lesnoe hozyajstvo» i 260500 «sadovo-parkovoe i landshaftnoe stroitel'stvo»* [Using the Statistica 5.0 package for statistical processing of experimental data: guidelines for diploma design for students of the forestry faculty majoring in 260400 «forestry» and 260500 «garden and park and landscape construction»]. Saratov, Vavilov University, 2000, 42 p. (In Russian)
 10. Skupiena K., Oszmianski J., Kostrzewa D. In vitro antileukaemic activity of extracts from berry plant leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. *Cancer Letters*, 2006, vol. 236, pp. 282–291.

Received 16.04.2025