

Литература

1. Кльшнев Л.Л. и др., Флавоноиды растений 1978 г.
2. Березкин В.Г., Бочков А.С. Количественная тонкослойная хроматография 1980
3. Оганесян Э.Т. Использование цианидиновой реакции в анализе флаваноидов –М.: Наука, 1975.
4. Муравьёва Д.А. Фармакогнозия (с основами биохимии лекарственных веществ)– М.: 1978.
5. Костюк В.А. Физико-химические методы идентификации флавоноидов. Минск. – 2003. – С. 44 – 52.
6. Георгиевский И.М. Физико-химические и аналитические характеристики флавоноидных соединений – М.: Наука, 1988 – С.235-260.
7. Тюкавкина Н.А., Руленко И.А., Колесник Ю.А. Природные флавоноиды как пищевые антиоксиданты и биологически активные добавки. Вопросы питания. - 1996. - N 2. - С. 33-3
8. Rice-Evans, C.A., Packer I., (Eds) Flavonoids in Health and Disease Marcel Dekker, New York (1997).
9. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. // Pharmacological Rev. 2000.
10. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е.В., Сенцов М.Ф. /Количественное определение силибина и суммы флаволигнанов в плодах *Silybum Marianum* (L.) Gaertn. / Растительные ресурсы, вып. 3, 1996 г.

ФИНГЕПРИНТИНГ БЕЛКОВ СТЕБЛЯ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОТИПОВ-ДОНОРОВ ВЫСОКОГО КАЧЕСТВА ЛЬНОВОЛОКНА

В.В. Титок¹, С.И. Юренкова¹, В.Н. Леонтьев², И.В. Лайковская²,
О.С. Игнатовец², Л.В. Хотылева¹

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь
²Белорусский государственный технологический университет, г. Минск, Беларусь

Цель работы состояла в изучении генетической гетерогенности коллекции сортов льна-долгунца на основе сравнительного электрофоретического и последующего хроматомасс-спектрометрического анализа белков стебля для оценки функциональной активности генома в ходе онтогенетического развития растений. В качестве материала для исследований была использована коллекция льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum* convar. *elongatum*), которая включала сорта отечественной и зарубежной селекции (50 сортов), различающиеся по продолжительности вегетационного периода и продуктивности льноволокна. Для электрофоретического, хроматографического и масс-спектрометрического методов анализа белков использовали стебли полевых растений льна-долгунца на стадиях: «быстрый рост» и «зеленая спелость».

Электрофоретическое разделение белков проводили в полиакриламидном геле (15 %) по методу Laemmly [2]. Анализ белковых фракций проводили методом жидкостной хроматографии (HPLC) на приборе Shimadzu LC-10, оснащенный ионообменной колонкой 75 × 7.5 мм BIO-Gel

TSK DEAE-5-PW (длина волны 280 нм). Для получения экстрактов стебли гомогенизировали в 0.02М Трис-ацетатном буфере (pH 9.0) в присутствии ингибитора протеиназ (La Roche, Complete cocktail). Экстракты очищали от хлорофиллов гель фильтрацией на сефадексе G-25. Полученные белковые фракции подвергали хромато-масс-спектрометрическому анализу с электро-спрей ионизацией на жидкостном хроматографе "Waters", оснащенном масс-детектором "Micromass ZQ 2000" [4]. Масс-спектры пептидов регистрировали в областях положительных и отрицательных ионов.

Электрофоретический анализ белковых ансамблей стебля у сортов льна-долгунца выявил широкий генетический полиморфизм (рис. 1). Межсортовая изменчивость белковых спектров может быть связана с различиями в уровне активности процессов, обусловленном неодинаковой генотипической экспрессией генов, контролирующих их биосинтез. На стадии «быстрый рост» у сортов льна-долгунца выявлено наибольшее количество белковых компонентов, что может указывать на высокую активность биосинтетических процессов, направленных на формирование клеточных стенок и удлинение до окончательных размеров основного количества лубяных волокон стебля (рис. 1А).

На стадии «зеленая спелость» отмечено снижение количества белковых фракций, которое связано со снижением интенсивности ростовых процессов в стебле - в волокнах происходят лишь процессы утолщения клеточных стенок и созревания (рис. 1Б). Исходя из этого, онтогенетическую изменчивость белковых ансамблей спектра можно объяснить существованием специальной регулирующей системы, обеспечивающей дифференциальную активность генов, детерминирующих синтез белка на протяжении онтогенетического развития растений льна-долгунца [1, 3].

Фракционирование белков стебля исследуемых сортов льна-долгунца при использовании HPLC позволило выявить вариабельность по полипептидным компонентам со временами удерживания 29 и 39 мин (рис. 2, выделено стрелками). Обнаружено, что у высокопродуктивных генотипов высота и площадь пиков этих белковых фракций на стадиях «быстрый рост» - «зеленая спелость» практически сохраняются на неизменном уровне. Это может быть обусловлено высокой экспрессией генов в ходе онтогенеза, детерминирующих активность функционирования метаболических реакций, направленные на образование структурных и ферментных белков, необходимых для ростсинтетических процессов, эффективность которых может служить одним из факторов повышения продуктивности.

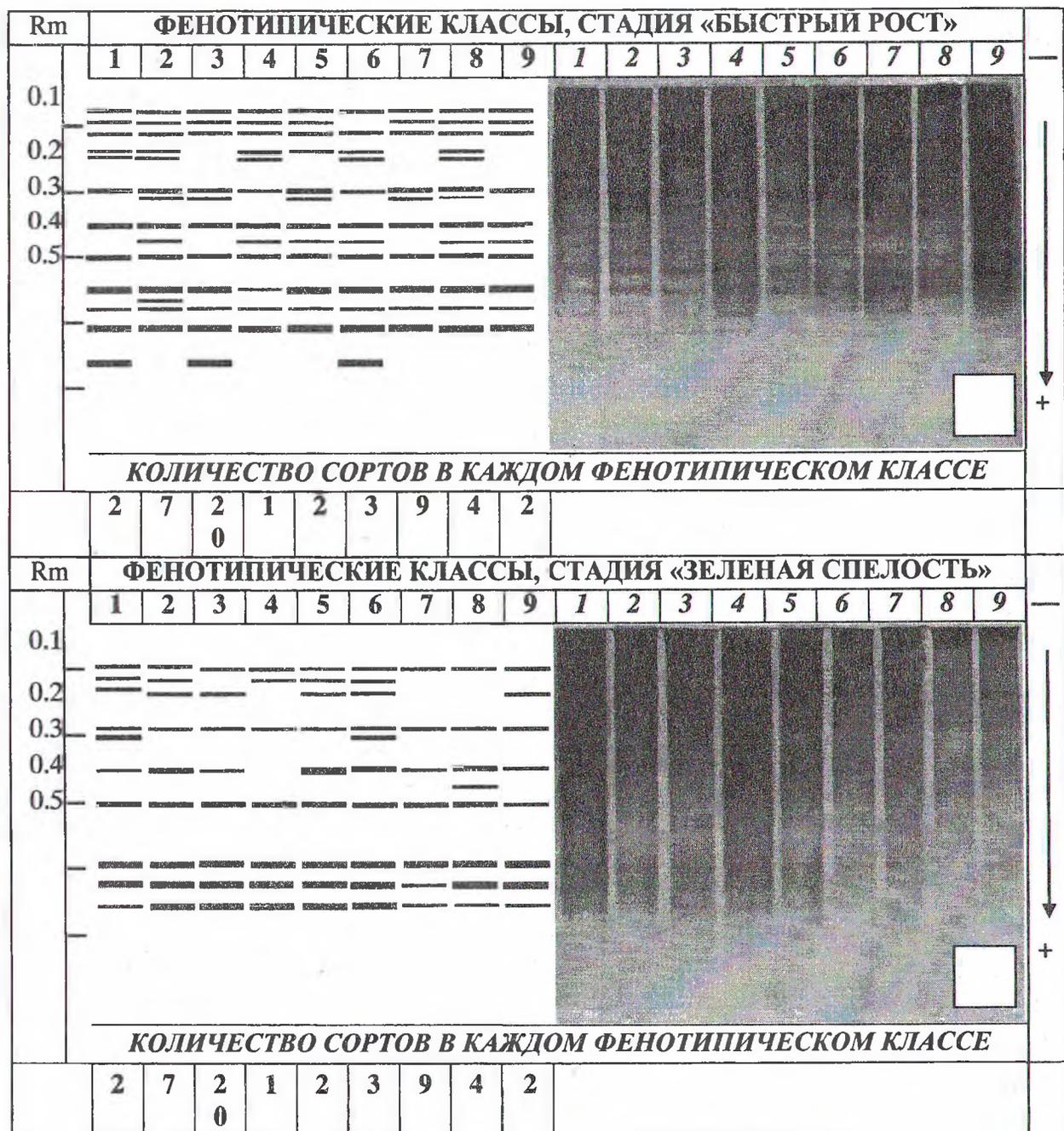


Рис. 1. Диаграммы и электрофореграммы растворимых белков стебля коллекции сортов льна-долгунца на стадиях «быстрый рост» (А) и «зеленая спелость» (Б). Фенотипические классы: 1 – Белочка, Оршанский-2; 2 – Viking, Лазер, Дымок, Regina, Архангельский кряж, Vander, Agiane; 3 – Eva, К-6, Могилевский-1, Belinka, Baltuchai, Батист, Тверца, Новоторжский, Fortuna, Viera, Призыв-2, Визит, К-6307, Khilda, Hera, Vera, М-12, Ruda, Fibra, Madonna; 4 – Bison; 5 – Родник, Дашковский; 6 – Л-41, Krista, Светоч; 7 – Silva, Fany, Leorkovski, Daga, К-65, Томский-10, Gogan, Мирный, Л-1120; 8 – Успех, К-4096, Славный-82, Заря; 9 – Вита, А-29.

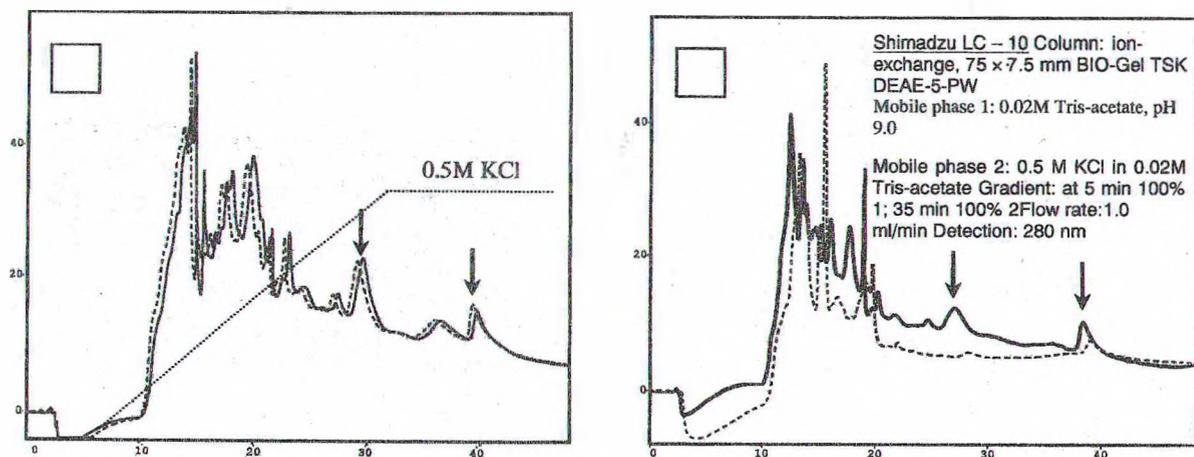


Рис. 2 Хроматограммы разделения белков стеблей льна-долгунца на стадиях «быстрый рост» (сплошная линия) и «зеленая спелость» (прерывистая линия) у сортов *Agian* (А) и *Bison* (Б)

Сравнительный анализ данных, полученных масс-спектрометрическим методом, показал генотипические и онтогенетические различия у исследуемых сортов льна-долгунца по наличию-отсутствию ионов с m/z 453, 397 и 541 (таблица и рис. 3). У сортов *Ariane*, *Bison* и *Вита* вышеназванные ионы обнаруживаются только на стадии «быстрый рост». У сортообразцов *Оршанский-2* и *Славный-82* они вообще не выявлялись, а для сорта *Belinka* характерно присутствие этих ионов как на стадии «быстрый рост», так и «зеленая спелость». Эти результаты свидетельствуют об индивидуальных генотипических особенностях состава и структурно-функциональных характеристиках белков клеточных стенок стебля растений, прямо или опосредованно связанных с показателями качества лубяного волокна.

Таблица 1 - Удельная площадь хроматографических пиков (%) и различия в -спектрах в области положительных ионов в белковых экстрактах из сортов льна -долгунца на стадиях «быстрый рост» (БР) и «зеленая» (ЗС)

СОРТА	Стадии онтогенеза	Время удерживания, мин		m/z		
		29	39	453	497	541
<i>Ariane</i>	БР	7.48	4.45	+	+	+
	ЗС	7.99	3.67	НД*	НД*	НД*
<i>Belinka</i>	БР	НД*	2.98	+	+	+
	ЗС	0.56	1.76	+	+	+
<i>Bison</i>	БР	4.80	4.95	+	+	+
	ЗС	0.23	1.93	НД*	НД*	НД*
Оршанский 2	БР	НД*	5.15	НД*	НД*	НД*
	ЗС	2.21	3.36	НД*	НД*	НД*
Славный 82	БР	1.47	4.72	НД*	НД*	НД*
	ЗС	0.18	1.60	НД*	НД*	НД*
Вита	БР	1.72	2.62	+	+	+
	ЗС	4.61	0.76	НД*	НД*	НД*

* НД – не детектированы

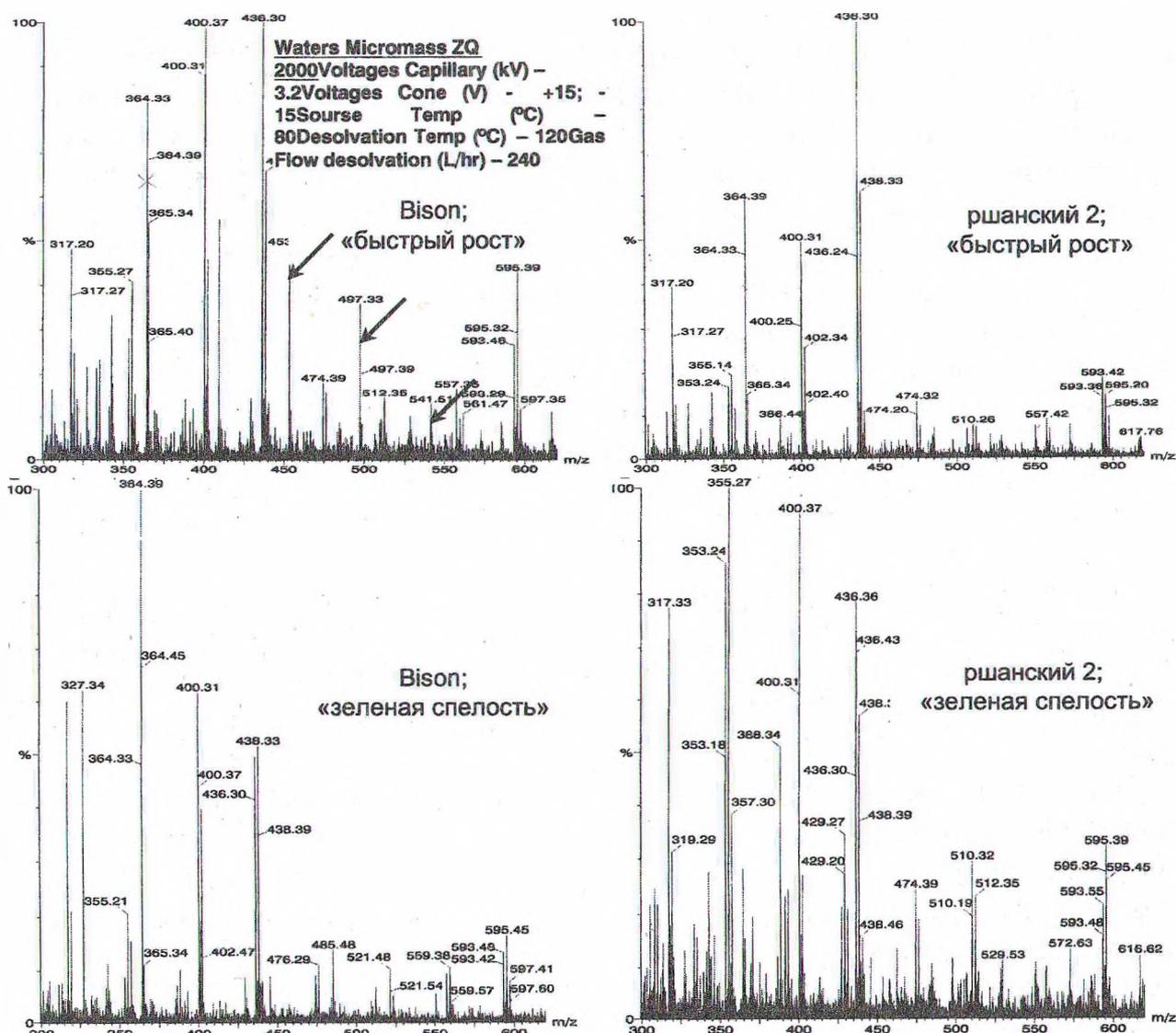


Рис. 3 Масс спектры пептидов в области положительных ионов из хроматографических фракций белков со временем удержания 39 мин. на стадиях «быстрый рост» и «зеленая спелость» у сортов Bison и Оршанский 2.

На основании результатов, полученных с помощью электрофоретического, хроматографического и масс-спектрометрического методов анализа белков стебля растений, можно заключить, что исследуемые сорта льна-долгунца характеризуются генетическим разнообразием. Обнаруженные изменения в количественном составе белковых компонентов спектра сортов льна-долгунца на стадии «зеленая спелость» могут быть обусловлены завершением структурной дифференциации и роста клеток тканей стебля. Эти процессы на наш взгляд сопровождаются постепенным уменьшением скорости синтеза и обновления белка, что приводит к снижению его уровня в стебле. На стадии «быстрый рост» происходит увеличение размеров клеток стебля, которое связано с ростом клеточной стенки и интенсивным накоплением белков, входящих в различные структуры ядра и цитоплазмы. В связи с этим, качественные и количественные изменения, обнаруженные в спектрах белков в ходе онтогенеза, по-видимому, обусловлены различиями в уровне и

направленности метаболических процессов в растущих и дифференцированных тканях стебля растения. Полученные данные указывают на то, что рост и развитие стебля льна-долгунца представляет собой результат тонко сбалансированного динамического взаимодействия активизации и транскрипции генов, новообразования и распада структурных и ферментативных белков, полисахаридов и др., приводящий к реальным изменениям метаболизма целого растения.

Изучение стебля льна-долгунца в процессе роста методами HPLC и масс-спектрометрии позволило получить новую информацию о генотипических особенностях состава и структурно-функциональной организации белков клеточных стенок растений, связанных с показателями качества лубяного волокна.

Литература

1. Gorshkova T.A., Salnikov V.V., Chemikosova S.B. et al. The snap point: a transition point in *Linum usitatissimum* bast fiber development // *Industr. Crops Prod.*– 2003.– Vol. 18, N 3.– P. 213–221.
2. Laemmly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*– 1970.– Vol. 227, N 9.– P. 680–685.
3. Morvan C., Andème-Onzighi C., Girault R. et al. Building flax fibres: more than one brick in the walls // *Plant Physiol. Biochem.*– 2003.– Vol. 41.– P. 935–944.
4. Newton R.P., Brenton G.B., Smith C.J., Dudley E. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments // *Phytochemistry.*– 2004.– Vol. 65.– P. 1449–1485.

Summary

Electrophoretic, chromatographic and mass-spectrometric analysis of proteins from the fiber flax stem were made at different stages of plant ontogenetic development. Polymorphism of protein spectra of the plant stem caused by the change in gene expression regulation during ontogenesis was detected. The genotypes showing a unique set of protein components were revealed. When studying protein extracts from the stem of these forms, polypeptides, which were absent in accessions with poor flax fiber quality, were detected.

Резюме

Проведен электрофоретический, хроматографический и масс-спектрометрический анализ белков из стебля льна-долгунца на различных этапах онтогенетического развития растений. Выявлен полиморфизм белковых спектров стебля растений, обусловленный изменением регуляции экспрессии генов в ходе онтогенеза. Выявлены генотипы, характеризующиеся уникальным набором белковых компонентов. При исследовании белковых экстрактов из стебля этих форм обнаружены полипептиды, отсутствующие у образцов с невысоким качеством льноволокна.