

О.В. КОВЗУНОВА

научный сотрудник отдела биохимии и биотехнологии растений Государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

А.Н. ЮХИМУК

научный сотрудник отдела биохимии и биотехнологии растений Государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

Статья поступила 4 октября 2017г.

**IN VITRO КУЛЬТУРЫ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ
КРАСНО– И БЕЛОЦВЕТКОВЫХ РАС: ПРОТЕОМНЫЙ
И МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

Аннотация. *Получены протеомные карты in vitro культур *Silybum marianum* двух рас при воздействии препарата «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» и электромагнитного поля низкого уровня мощности. Выявлены белки–маркеры, которые, предположительно, отвечают за повышенный биосинтез биологически активных веществ. На основе RAPD– и ISSR–анализов разработана система идентификации и ДНК–паспортизации генотипов рода *Silybum*. Методом UPGMA построено дерево генетического родства, отражающее таксономические взаимоотношения исследуемых образцов.*

Ключевые слова: *in vitro культуры, расторопша пятнистая, белки–маркеры, RAPD– и ISSR–маркеры, модификаторы метаболизма.*

Введение. Многие высшие растения являются источниками ценных вторичных метаболитов, обладающих широким спектром биологического действия. В настоящее время лекарственные растения широко применяют как в медицине, так и во многих отраслях пищевой и парфюмерно–косметической промышленности. Потребность населения в фитопрепаратах удовлетворяется не полностью и, главным образом, из–за увеличения спроса и дефицита сырья, что обусловлено целым рядом причин, в том числе сезонными и географическими [1, с. 16]. Изыскание путей компенсации дефицита лекарственного сырья можно решить, используя новый вид фитосырья – биомассу лекарственных растений, получаемую биотехнологическим способом. В современном мире биотехнологические подходы предоставляют альтернативу ныне распространенному способу получения растительных лекарственных соединений. Культуры клеток *in vitro* можно использовать как «фабрики» по производству БАВ [2, с.287; 3, с. 134]. По данным Всемирной организации здравоохранения, смертность от заболеваний печени находится на 9 месте в рейтинге наиболее опасных заболеваний, поэтому профилактика и лечение печеночных заболеваний остается серьезной проблемой здравоохранения во всем мире. Силимарин – это собирательное название флавонолигнанов, основных биологически активных веществ (БАВ) расторопши пятнистой, обладающих высоким антигепатотоксическим, иммуномодулирующим, гепатопротекторным и антихолестерологическим действием [4, с. 468; 5, с.412]. Известно, что растения, относящаяся к красно– и белоцветковой расам, характеризуются различной биосинтетической способностью, что инициирует поиск наиболее перспективных сортов [6, с. 28]. Разработка эффективных способов получения БАВ методом культуры тканей и создание новых технологий фитопрепаратов представляет собой актуальную научно–практическую проблему, решение которой позволит внести важный вклад в развитие фармацевтической промышленности [2, с. 284] и увеличить выпуск необходимых для здравоохранения лекарственных средств. Применение новейших современных подходов к исследованию генома, протеома и метаболома *in vitro* культур лекарственных растений позволяет углубить

фундаментальные знания о биосинтетических циклах и механизмах, ответственных за продукцию БАВ в растениях. Следует отметить, что в литературе отсутствуют данные о протеоме *in vitro* культур расторопши, а также нет данных о генетической гетерогенности.

Сырье, получаемое биотехнологическим методом, еще достаточно дорогое в связи с использованием дорогостоящих модификаторов метаболизма, поэтому остается актуальным поиск новых эффективных модификаторов метаболизма химической и физической природы, позволяющих не только снизить себестоимость сырья, но и также повысить продуктивность культуры. В Республике Беларусь в промышленных масштабах с целью повышения урожайности и качества сырья активно используется обработка семян электромагнитным полем сверхвысоких частот низкого уровня мощности (ЭМП СВЧ) и комплексный препарат наночастиц металлов «Наноплант – Со, Мн, Сu, Fe» [8, с. 29; 9, с.33]. Однако до сих пор данные модификаторы не были использованы на клеточных культурах *in vitro* высших растений. Целью нашей работы было определение белков в *in vitro* образцах *S. marianum* красно- и белоцветковой рас, экспрессируемых в ответ на воздействие модификаторов метаболизма, а также проведение мультилокусного маркирования тотальной ДНК в *in vitro* образцах.

Основная часть. Каллусы расторопши пятнистой красно- и белоцветковой расы инициировали из стеблевых и корневых эксплантов-сегментов размерами 4 мм, взятых с 17-дневных асептических растений, на среде Мурасиге-Скуга, содержащей гормоны 2,4-D (1 мг/л) и кинетин (0,4 мг/л). Пассирование каллусов каждые 14–17 дней проводили на свежую МС среду с добавлением гормонов 2 мг/л бензиламинопурина и 1 мг/л нафтилуксусной кислоты. Дальнейшее культивирование каллусов проводили в темноте при температуре 25 °С. Для анализов использовали каллусы 4-ого и 6-ого пассажа. Методом ТХУ–ацетоновой преципитации [10, с. 2511] были выделены общие пулы белков из *in vitro* культуры. Вертикальный электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в щелочной системе [10, с. 2513; 11, с. 683; 12, с. 269] (1D–электрофорез), а молекулярно–генетический анализ проводился с использованием RAPD и ISSR методик [13; 14, с. 58].

На основании ранее полученных данных [15, с.22; 16, с.6] было установлено, что максимальное накопление вторичных метаболитов наблюдается при обработке *in vitro* культур расторопши пятнистой ЭМП СВЧ в миллиметровом диапазоне волн мощностью 10 мВт и временем обработки 20 минут, а также при добавлении в культуральную среду комплексного препарата наночастиц металлов «Наноплант – Со, Мн, Сu, Fe» в концентрации 0,01 мг/л.

Были получены протеомные карты дедифференцированных тканей расторопши пятнистой красно- и белоцветковой рас, подвергнутых воздействию модификаторов метаболизма химической и физической природы. Обнаружены зоны, в которых присутствуют дифференциально экспрессируемые белки, претендующие на роль белков–маркеров, не характерных для контрольных образцов, культивируемых без добавления препарата наночастиц металлов «Наноплант – Со, Мн, Сu, Fe» (химический модификатор) и не подвергнутых обработке ЭМП СВЧ (физический модификатор). Были выявлены белки с молекулярными массами от 283,1 до 10,2 кДа, наблюдаемые у всех образцов. Экспрессия белков с одинаковой молекулярной массой у разных видов отличалась. Для корневого каллуса красноцветкового сорта Золушка было выявлено одиннадцать белков, не экспрессируемых в каллусе при воздействии модификаторов: 74,8; 65,8; 55,6; 42,9; 37,5; 34,8; 26,0; 24,9; 23,3; 21,0 и 19,9 кДа. Добавление в культуральную среду комплексного препарата наночастиц металлов «Наноплант – Со, Мн, Сu, Fe» в концентрации 0,01 мг/л вызвало экспрессию 11 белков, не характерных ни для контроля, ни экспрессируемых при воздействии ЭМП СВЧ. Это белки с молекулярными массами: 285,4; 117,7; 86,0; 69,9; 44,6; 39,6; 35,1; 28,1; 19,6; 18,6; 16,8 и 15,8 кДа. При обработке корневого каллуса ЭМП СВЧ нами идентифицирован двадцать один белок с молекулярным весом: 133,5; 121,0; 119,7; 106,7; 104,7; 88,9; 86,0; 83,7; 81,5; 80,6; 79,2; 59,1; 57,8; 38,0; 36,4; 35,7; 35,5; 33,1; 30,0; 26,7 и 16,0 кДа. 18 белков выявленные в корневом каллусе красноцветкового сорта являются «общими» белками для каллусной ткани, подвергнутой ЭМП СВЧ обработке. Также была выявлена группа белков, экспрессируемых в ответ на воздействие модификаторов метаболизма, это белки с молекулярными массами 221,4; 37,7; 29,0; 22,0; 21,7; 20,5; 17,0 и 16,6 кДа. Анализ общего пула белков корневого каллуса белоцветкового сортообразца Sibilla также выявил различия при воздействии на культуру *in vitro* модификаторов. Шесть белков экспрессируются лишь в контрольном образце, а 11 белков являются «общими»: 46,2; 39,4; 32,2; 30,0; 26,7; 21,5; 19,9; 18,0; 17,6; 11,6 и 10,2 кДа. При обработке корневого каллуса белоцветкового сортообразца ЭМП СВЧ Гц появляются «новые» белки: 137,8; 133,4; 128,8; 117,7; 81,4; 73,2; 42,6; 23,8; 18,6; 16,2; 28,4 и 33,1 кДа. Добавление в среду культивирования «Наноплант – Со, Мн, Сu,

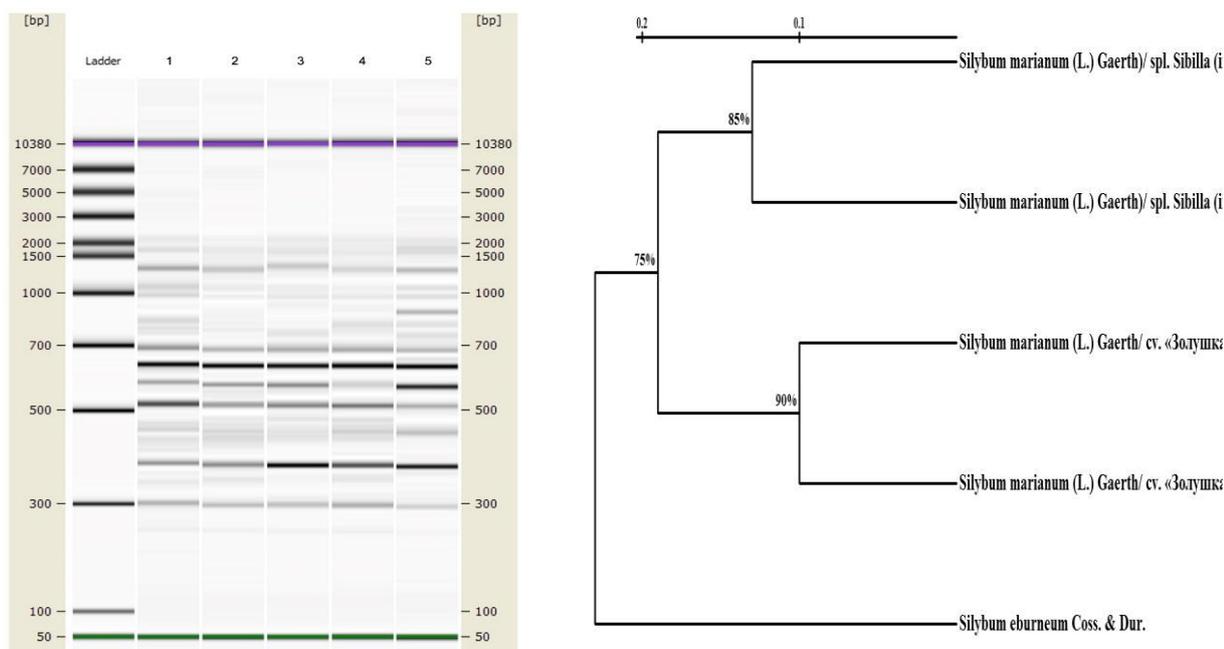
Fe» в концентрации 0,01 мг/л вызвало экспрессию 10 «специфических» белков: 88,9; 86,0; 74,8; 55,6; 34,0; 30,3; 27,2; 22,0; 19,7 и 15,1 кДа. 13 белков с молекулярными массами 262,6; 195,7; 50,7; 43,7; 37,7; 29,0; 23,4; 20,2; 18,1; 17,4; 17,0; 15,8 и 15,0 кДа, экспрессируемые под действием модификаторов метаболизма, вероятно, отвечают за повышенный биосинтез БАВ в корневой культуре расторопши пятнистой белоцветковой расы. В результате 1–D электрофореза для стеблевого каллуса красноцветкового сорта Золушка также была выявлена группа белков, характерная при воздействии модификаторов: 283,1; 55,6; 50,7; 46,2; 39,9; 36,7; 35,6; 30,0; 18,1; 15,8; 11,7 и 10,3 кДа. Белками–маркерами при воздействии ЭМП СВЧ предположительно являлись белки с молекулярными весами: 76,2; 41,2; 30,3; 28,4; 19,4; 27,2 и 33,1 кДа, а для химического модификатора метаболизма – 17 белков: 262,6; 221,4; 171,1; 113,0; 86,0; 73,9; 43,7; 35,8; 34,0; 26,4; 23,3; 22,3; 22,0; 20,2; 17,0 и 16,7 кДа. После анализа полученных данных, были определены белки, экспрессируемые лишь в ответ на воздействие использованных модификаторов метаболизма: 49,8; 38,9; 37,7; 35,1; 31,8; 29,7; 29,0; 27,8; 25,7; 17,0; 15,4 и 15,0 кДа.

Анализ протеома стеблевого каллуса белоцветкового сортообразца под рабочим названием Sibilla выявил белки, экспрессируемые в ответ на ЭМП СВЧ: 221,4; 195,7; 147,0; 99,6; 80,6; 76,2; 69,8; 67,8; 52,6; 51,9; 46,2; 38,9; 35,8; 33,1; 30,0; 29,7; 29,3; 29,0; 25,7; 23,1; 21,0; 19,7; 19,0 и 10,2 кДа, а также 21 белок, характерный только для контрольного образца. Белки 73,9; 55,6; 53,7; 40,8; 37,7; 26,4; 18,6; 17,6; 15,9; 15,7; 15,4; 15,0 кДа идентифицировались и при обработке каллуса и являются «общими» белками. Полученные нами данные позволили выявить группу маркерных белков, что в дальнейшем последует «отправной» точкой для их идентификации.

Для получения данных об уровне генетической дифференциации клеточных культур, а также для подтверждения принадлежности к расе был проведен молекулярно–генетический анализ. Мультилокусное маркирование тотальной ДНК 5 таксонов расторопши пятнистой было проведено с использованием ПЦР–техники на основе RAPD– и ISSR–праймеров. Выявленные ДНК–маркеры, позволили провести генетическую идентификацию таксонов расторопши пятнистой и создать для каждого из них молекулярно–генетические паспорта. В общей сложности было выявлено 72 локусов для расторопши пятнистой, из которых 53% являлись полиморфными. Большое количество идентифицированных локусов и достаточно высокий уровень полиморфизма позволили статистически достоверно различить все исследованные образцы и охарактеризовать каждый из них уникальным набором аллелей (генетическим паспортом).

Для ПЦР–анализа генома расторопши из коллекции ЦБС НАН Беларуси были отобраны следующие представители *Silybum marianum* (L.): красноцветковый сорт Золушка (*in vitro* 6 пассаж), красноцветковый сорт Золушка (*in vivo*), белоцветковый сортообразец Sibilla (*in vitro* 6 пассаж), белоцветковый сортообразец Sibilla (*in vivo*) и *Silybum eburneum* Coss. & Dur., которая использовалась в качестве аут–группы при построении дендрограммы. Мультилокусное ДНК–маркирование проведено с использованием RAPD– и ISSR–техник. После предварительного скрининга праймеров были отобраны четыре RAPD (OPA–03, OPC–02, OPS–10 и OPP–19) и два ISSR (UBC–827 и UBC–856) праймера, выявляющие наибольший полиморфизм между исследованными соматклонами. В результате ПЦР тотальной ДНК 5 таксонов рода расторопша с отобранными произвольными и микросателлитными праймерами были получены четкие воспроизводимые ампликоны, набор которых для каждого исследуемого таксона характеризовался уникальностью, т.е. праймеры обнаруживали полиморфизм между образцами и, таким образом, позволили дифференцировать все исследованные генотипы. На рисунке 1 (А) представлены результаты микрокапиллярного электрофоретического разделения ампликонов, синтезированных в результате RAPD–ПЦР геномной ДНК таксонов рода Расторопша с праймером OPP–19, проведенной на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent), США. Всего было сгенерировано 44 RAPD– (в среднем 12 маркеров на праймер) и 28 ISSR–маркеров (в среднем 12 маркеров на праймер). В общей сложности было выявлено 72 дискретных ДНК–локуса, из них 38 оказались полиморфными. Уровень полиморфизма составил 53%. Коэффициенты подобия рассчитаны на основе ISSR и RAPD анализа, как по отдельности, так и совместно (RAPD+ISSR).

Дистанционные матрицы на основе рассчитанных RAPD и ISSR маркеров использованы для построения дендрограмм по методу UPGMA. Дендрограммы, основанные на данных RAPD– и ISSR–анализа, обнаруживали довольно схожую кластеризацию. 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 (Б).



1 – красноцветковый сорт Золушка (*in vitro* 6 пассаж), 2 – красноцветковый сорт Золушка (*in vivo*), 3 – белоцветковый сортообразец Sibilla (*in vitro* 6 пассаж), 4 – белоцветковый сортообразец Sibilla (*in vivo*), 5 – *Silybum eburneum* Coss. & Dur.

А Б
Рисунок – Разделение ампликонов (А) и консенсусная дендрограмма (Б)

Из представленной дендрограммы видно, что для исследованных таксонов рода *Silybum* L. характерна отчетливая кластеризация, отражающая их таксономические взаимоотношения. Сорта, относящиеся к виду *Silybum marianum* (L.) Gaertn. отчетливо группируются в большой кластер. В границах данного кластера явно выделяются два субкластера, в один из которых сгруппированы *in vitro* и *in vivo* образцы красноцветкового сорта Золушка, а во второй — представители белоцветкового сортообразца Sibilla. Генетические дистанции между *in vitro* и *in vivo* образцами внутри каждого из этих субкластеров различны и указывают на более высокий уровень генетической дифференциации, возникающий при *in vitro* культивировании у белоцветкового сортообразца Sibilla по сравнению с красноцветковым сортом Золушка. Это может быть объяснено тем, что белоцветковый сортообразец является менее устойчивой генетической системой по сравнению с сортом. Величины бутстреп-анализа, расположенные около узлов дендрограммы, превышают 50%, что указывает на статистически достоверную топологию ветвей.

Заключение. На основании экспериментально полученных данных можно сделать заключение о том, что белки с молекулярными весами 86,0; 37,7; 33,1; 29,0; 22,0; 17,0 и 15,0 кДа, экспрессируемые в корневой и стеблевой культуре бело- и красноцветковой рас расторопши пятнистой? в ответ на воздействие комплексного препарата наночастиц металлов «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» в концентрации 0,01 мг/л, а также на электромагнитное облучение низкого уровня мощности в диапазоне 65–71 ГГц и времени экспозиции 20 минут, являются маркерами и, вероятно, отвечают за повышенный биосинтез БАВ в *in vitro* культуре расторопши пятнистой. Предположительно, белком-маркером повышенного биосинтеза БАВ при воздействии ЭМП СВЧ (65–71 ГГц, 20 минут) является белок с массой 33,1 кДа, а при добавлении в культуральную среду комплексного препарата наночастиц металлов «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» (концентрации 0,01 мг/л) белки с молекулярными массами 86,0 и 22,0 кДа. Созданы уникальные профили для 5 таксонов *Silybum* с помощью праймеров ОРА-03; ОРС-02; ОРС-10; ОРР-19; УВС-827; УВС-856. Выявлено, что средний уровень полиморфизма составил 53%. Методом UPGMA построено дерево генетического родства между исследованными видами рода *Silybum*. Величины бутстреп анализа превышают 50%, что указывает на статистически достоверную топологию ветвей. Установлено, что генетические дистанции между *in vitro* и *in vivo* образцами внутри каждого из этих субкластеров различны и указывают на более высокий уровень генетической дифференциации, возникающий при *in vitro* культивировании у белоцветкового сортообразца Sibilla по сравнению с красноцветковым сортом

Золушка, что говорит о том, что сортообразец является менее устойчивой генетической системой по сравнению с сортом. Полученные данные включены в информационно-поисковую базу ЦБС.

Список литературы

1. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites / R. Verpoorte, A. Contin, J. Melink // *Phytochem.* – 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. – P. 281 – 292
3. Rao, R.S. Plant tissue cultures: chemical factories of secondary metabolites / R.S. Rao, G.A. Ravishankar // *Biotechnol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 101 – 153
4. Wellington, K. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders / K. Wellington, B. Jarvis // *Biodrugs.* – 2001. – Vol. 15. – № 7. – P. 465 – 489
5. Luper, S. A review of plants used in the treatment of liver diseases. / S. Luper // *Altern Med Rev.* – 1998. – Vol. 3. – P. 410 – 421
6. Содержание флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой различных хеморас / А.С. Чубарова, М.А. Капустин, Е.В. Спиридович, В.П. Курченко // *Вестник фармации.* – 2012. – № 58. – С. 28 – 31
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. Биопрепараты для повышения продуктивности и устойчивости растений к стрессам / В. И. Домаш, Т.П. Шарпио, С.Д. Забрейко, О.А. Иванов, С.Г. Азизбекян, А.Р. Набиуллин // *Органическое сельское хозяйство Беларуси: перспективы развития. Материалы Международной научно-практической конференции.* – 2012. – С. 29 – 32
9. Пушкина, Н.В. Влияние предпосевной обработки семян электромагнитным полем сверхвысокочастотного диапазона на структурно-функциональное состояние проростков кукурузы / Н.В. Пушкина // *Международный Научно-исследовательский журнал.* – 2016. – №4 (46). – Ч. 5. – С. 32 – 35.
10. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes / S. Amme [et al.] // *Proteomics.* – 2005. – № 5. – P. 2508 – 2518
11. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – 227(5259). – P. 680 – 685
12. Protein measurement with the Folin phenol Reagent/ O.H. Lowry [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* — 1951. — № 193. — P. 265 – 275
13. Software for NMR [Электронный ресурс] / Software for NMR. – Режим доступа: acdlabs.com. – Дата доступа: 15.01.2012.
14. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев // Мн.: Юнипол. – 2007. – 176 с.
15. Воздействие электромагнитного поля сверхвысоких частот низкого уровня мощности на биосинтез биологически активных веществ в клеточных культурах *Silybum marianum* L. / О.В. Копач, Н.В. Пушкина, А.А. Кузовкова, В.А. Карпович // *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук.* – 2015. – № 2. – С. 5 – 8
16. *In vitro* культуры *Silybum marianum* (L.) как потенциальный источник целевых БАВ. / О.В. Ковзунова, Н.В. Пушкина, С.Г. Азизбекян // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* – 2017. – №. 7. – Т. 20 – С. 3 – 6.

KOVZUNOVA O.V.

YUHIMUK A.N.

IN VITRO CULTURES MILK THISTLE RED AND WHITE RACE: PROTEOM AND MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS

Summary. *Proteomic maps of in vitro cultures of Silybum marianum of two races under the influence of the preparation "Nanoplant – Co, Mn, Cu, Fe" and electromagnetic field of low power level were obtained. Identified protein markers, which, presumably, are responsible for the increased biosynthesis of biologically active substances. Based on RAPD- and ISSR-analyzes, a system for identification and*

DNA–passportization of genotypes of the genus *Silybum* has been developed. The tree of genetic relationship was constructed using the UPGMA method, reflecting the taxonomic relationships of the samples under study.

Keywords: *in vitro* cultures, milk thistle, marker proteins, RAPD– and ISSR–markers, metabolic modifiers.

References

1. Verpoorte R., Contin A., Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem*, 2002, Vol.1, pp. 13 – 25
2. Zschocke S., Rabe T., Taylor J.L., Jäger A.K., van Staden J. Plant part substitution – a way to conserve endangered medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, Vol.71, no.1, pp. 281 – 292
3. Rao R.S., Ravishankar G.A. Plant tissue cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology*, 2002, Vol. 20, pp. 101 – 153
4. Wellington K., Jarvis K. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs*, 2001, Vol. 15, no. 7, no. 465 – 489
5. Luper S. A review of plants used in the treatment of liver diseases. *Alternative Medicine Review*, 1998, Vol. 3, pp. 410 – 421
6. Chubarova A.S., Kapustin M.A., Spiridovich E.V., Kurchenko V.P. *Soderzhanie flavolignanov v plodakh rastoropshi piatnistoi razlichnykh khemorov* [The content of flavolignans in the fruit of spotted thistle of various hemorrhages]. *Vestnik farmatsii*, 2012, no. 58, pp. 28 – 31 (In Russian)
7. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures . *Journal of Medicinal Plants Research*, 2009, Vol. 3, no.13, pp. 1222 – 1239
8. Domash V. I., Sharpio T.P., Zabreiko S.D., Ivanov O.A., Azizbekian S.G., Nabiullin A.R. *Biopreparaty dlia povysheniia produktivnosti i ustoichivosti rastenii k stressam* [Biological preparations used to increase the productivity and resistance of plants to stress]. *Organicheskoe sel'skoe khoziaistvo Belarusi: perspektivy razvitiia. Materialy Mezhdunarodnoi nauchno–prakticheskoi konferentsii*, 2012, pp. 29 – 32 (In Russian)
9. Pushkina N.V. *Vliianie predposevnoi obrabotki semian elektromagnitnym polem sverkhvysokochastotnogo diapazona na strukturno–funktsional'noe sostoianie prorostkov kukuruzy* [Effect of presowing seed treatment on the electromagnetic field of the microwave range on the structural and functional state of maize seedlings]. *Mezhdunarodnyi Nauchno–issledovatel'skii zhurnal* [International Research Journal], 2016, no.4 (46), Part. 5, pp. 32 – 35. (In Russian)
10. Amme S., Rutten T., Melzer M., Sonsmann G., Vissers J.P., Schlesier B., Mock H.P. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes. *Proteomics*, 2005, no. 5, pp. 2508 – 2518
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, no. 227 (5259), pp. 680 – 685
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, no. 193, pp. 265 – 275
13. Software for NMR. Available at: acdlabs.com (Accessed 15.01.2012)
14. Padutov V.E., Baranov O.Iu., Voropaev E.V. *Metody molekuliarno–geneticheskogo analiza* [Methods of molecular genetic analysis]. Minsk, Iunipol Publ., 2007, 176 p. (In Russian)
15. Kopach O.V., Pushkina N.V., Kuzovkova A.A., Karpovich V.A. *Vozdeistvie elektromagnitnogo polia sverkhvysokikh chastot nizkogo urovnia moshchnosti na biosintez biologicheski aktivnykh veshchestv v kletochnykh kul'turakh Silybum marianum L.* [Effect of electromagnetic field of ultra–high frequency of low power on the biosynthesis of biologically active substances in cell cultures of *Silybum marianum* L.]. *Vesti Natsyional'nai akademii navuk Belarusi. Seryia biialagichnykh navukiu* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological Series], 2015, no. 2, pp. 5 – 8 (In Russian)
16. Kovzunova O.V., Pushkina N.V., Azizbekian S.G. *In vitro kul'tury Silybum marianum (L.) kak potentsial'nyi istochnik tselevykh BAV* [In vitro planting of *Silybum marianum* (L.) as a potential source of target BAS]. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii* [Problems of Biological, Medical, and Pharmaceutical Chemistry], 2017, Vol. 20, no. 7, pp. 3 – 6 (In Russian)

Received 4 october 2017