

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений

ИГРУШОВА
Анна Александровна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ
ХАРАКТЕРИСТИК КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ *CATHARANTHUS ROSEUS*
(L.) G. DON И *VINCA MINOR* L. ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ
D-ТРИПТОФАНА В СРЕДУ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
к.б.н., доцент Филиппова С. Н.

Допущена к защите

« ____ » _____ 2018 г.

Зав. кафедрой клеточной биологии
и биоинженерии растений,
доктор биологических наук, доцент В.В. Демидчик

Минск, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1. Характеристика растений семейства <i>Aporocynaceae</i>	11
1.1.1. <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.	12
1.1.2. <i>Vinca minor</i> L.	17
1.2. Культуры клеток и тканей растений.....	21
1.2.1. Общая характеристика.....	21
1.2.2. Состав питательных сред культивирования.....	23
1.2.3. Каллусные культуры.....	25
1.3. Участие L- и D-триптофана в физиолого-биохимических процессах растительных организмов	29
1.3.1. Общая характеристика аминокислоты триптофан	31
1.3.2. Роль в физиолого-биохимических процессах растений.....	32
1.3.3. Влияние экзогенного L-триптофана на физиолого-биохимические процессы в растениях	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1. Объекты исследования.....	38
2.1.1. Культивирование каллусной культуры	39
2.1.2. Приготовление сред культивирования	39
2.2. Определение ростовых показателей.....	40
2.3. Анализ содержания суммы фенольных соединений	41
2.4. Определение содержания суммы флавоноидов	42
2.5. Статистическая обработка данных	42
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	43
3.1. Влияние D-триптофана на ростовые параметры каллусных клеток растений семейства <i>Aporocynaceae</i>	43
3.1.1. <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.	43
3.1.2. <i>Vinca minor</i> L.	45
3.2. Влияние D-триптофана на накопление суммы фенольных соединений и флавоноидов	47
3.2.1. <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.	47

3.2.2. <i>Vinca minor</i> L	49
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	51
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	52

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 57с., 18 рис., 2 табл., 104 источника

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ
ХАРАКТЕРИСТИК КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ *CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G.
DON И *VINCA MINOR* L. ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ D-ТРИПТОФАНА В СРЕДУ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Ключевые слова: каллус, триптофан, *Catharanthus roseus*, *Vinca minor*, фенольные соединения, флавоноиды.

Объектами исследования являлись гетеротрофные каллусные ткани *Catharanthus roseus* и *Vinca minor*.

Целью данной работы являлось исследование физиолого-биохимических характеристик каллусных тканей *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* при добавлении в среду культивирования аминокислоты D-триптофана.

Методы исследования: метод культуры клеток и тканей, морфометрические, спектрофотометрические.

В результате проведенной работы исследовано специфическое действие D-триптофана.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца 57с., 18 мал., 2 табл., 104 крыніцы

ДАСЛЕДАВАННЕ ФІЗІЁЛАГА-БІЯХІМІЧНЫХ ХАРАКТАРЫСТЫК
КАЛЛУСНЫХ ТКАНІН *CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G. DON I *VINCA
MINOR* L. ПРЫ ЎКЛЮЧЭННІ D-ТРЫПТАФАЛУ Ў СЕРАДУ
КУЛЬТЫВАВАННЯ

Ключавыя словы: каллус, трыптафан, *Catharanthus roseus*, *Vinca minor*,
фенольныя злучэнні, флаваноіды.

Аб'ектамі даследавання з'яўляліся гетератрофныя каллусныя тканіны
Catharanthus roseus і *Vinca minor*.

Мэтай дадзенай працы з'яўлялася даследаванне фізіёлага-біяхімічных
характарыстык каллусных тканін *Catharanthus roseus* і *Vinca minor* пры даданні
ў сераду культывавання амінакіслаты D-трыптафану.

Метады даследавання: метады культуры клетак і тканін, морфаметрычныя,
спектрафотаметрычныя.

У выніку праведзенай работы даследавана спецыфічнае дзеянне D-
трыптафану.

ABSTRACT

Thesis 57c., figure 18, 2 table., 104 sources

STUDY OF PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF CALLUS TISSUES OF *CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G. DON, *VINCA MINOR* L. DURING THE INCORPORATION OF D-TRYPTOPHAN IN THE ENVIRONMENT OF CULTIVATION

Key words: callus, tryptophan, *Catharanthus roseus*, *Vinca minor*, phenolic compounds, flavonoids.

The objects of study were heterotrophic callus tissues *Catharanthus roseus* and *Vinca minor*.

The aim of this work was to study the physiological and biochemical characteristics of the callus tissues *Catharanthus roseus* and *Vinca minor* when adding the amino acid D-tryptophan to the culture medium.

Research methods: cell and tissue culture method, morphometric, spectrophotometric.

As a result of the work the specific action of D - tryptophan was investigated.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время огромное количество веществ, находящихся в растениях, используется человеком, и запасы этих веществ не безграничны. В связи с этим необходим синтез вторичных метаболитов растений. Данный процесс способствует сохранению редких и исчезающих видов растений. Однако эти растения произрастают в тропических и субтропических регионах [3]. В Беларуси такие растения выращивать не представляется возможным из-за другого типа климата. В связи с этим является актуальным использование культуры клеток и тканей.

Культуры клеток и тканей, полученные *in vitro*, как и клетки растения, могут синтезировать вторичные метаболиты (ВМ), которые имеют большое практическое значение. Широкий спектр биологической активности и «мягкость» действия фармакологических препаратов из природного растительного сырья являются основными преимуществами [4]. Культура клеток растений очень часто находит широкое применение в самых различных фундаментальных и прикладных исследованиях [5]. На основе культивируемых клеток и тканей высших растений в настоящее время создаются и активно развиваются перспективные, принципиально новые технологии для различных отраслей промышленности и сельского хозяйства [1].

Культуры клеток и тканей применяются в различных областях биологии и медицины. В качестве тест-объектов клеточные культуры становятся альтернативой использования животных для испытания новых фармакологических средств [2]. Они необходимы при получении трансгенных растений, клонального размножения. Важную роль культура клеток играет и в биотехнологии при создании гибридов, производстве вакцин и биологически активных веществ [6].

На сегодняшний день из растений получают большое количество лекарственных субстанций, для использования в медицинской практике. Структура многих из них очень сложна и в связи с этим растения еще долго будут их единственным источником [7].

Катарантус розовый (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) – это вечнозеленый многолетний полукустарник семейства Кутровые [8]. Из различных частей растения катарантуса розового (или барвинка розового) выделяли более 100 алкалоидов, производных индола. Особый интерес представляют алкалоиды винбластин, винкристин, катарантин, аймалицин, виндолин, которые широко используются в комплексной терапии различных форм онкологических заболеваний и лечении диабета [10]. Некоторые алкалоиды, содержащиеся в данном растении (резерпин, серпентин), являются транквилизаторами. Помимо алкалоидов в различных тканях катарантуса содержатся стероиды, фенольные

соединения, антоцианы, жирные кислоты и другие метаболиты, обладающие антиоксидантными и противовоспалительными эффектами [9].

Vinca minor L. – многолетний вечнозеленый стелющийся полукустарник семейства – *Aporcunaseae*. В состав вторичных метаболитов данного растения входят: урсоловая кислота, флавоноиды, горькие и дубильные вещества, сапонины, сахара, витамин С, каротин, рутин, а также алкалоиды индольного ряда [11]. Препараты винкамина являются активаторами мозгового кровообращения [12].

Важными предшественниками в ряду первичных и вторичных метаболитов растений, а также структурными единицами которые участвуют в сборке белка являются ароматические L-аминокислоты. Аминокислота триптофан представляет собой один из ключевых интермедиатов принимающих участие в биосинтезе фитогормонов, алкалоидов, фенольных соединений и других метаболитов [13]. Триптофан является предшественником серотонина, который в растительных клетках как биогенный амин принимает участие в разных физиологических процессах: цветение, морфогенез и адаптация к меняющимся условиям окружающей среды [14]. Данная аминокислота также принимает участие в биосинтезе индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), но это не основная биосинтетическая ветвь образования данного фитогормона [15].

Триптофан – ароматическая альфа-аминокислота, которая существует в виде двух оптически изомерных формах – L и D, а также в виде рацемата (DL) [16,17]. Роль оптического D-изомера триптофана в физиолого-биохимических процессах растительных организмов практически не изучена. Поскольку энантиомеры могут обладать не только различными физиологическими свойствами, но и кардинально противоположными, представлялось **актуальным** выявить особенности действия D-триптофана на физиолого-биохимические параметры каллусных культур *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* [18].

Таким образом, **целью** настоящей работы являлось изучение влияния D-триптофана на ростовые параметры и накопление фенольных соединений и флавоноидов в гетеротрофной каллусной культуре *Catharanthus roseus* (L.) G. Don и *Vinca minor* L.

Для достижения указанной цели решались следующие **задачи**:

- выявить регуляторное действие D-триптофана на удельную скорость роста, время удвоения биомассы и индекс роста каллусных культур *Catharanthus roseus* (L.) G. Don и *Vinca minor* L.;

- установить закономерности влияния D-триптофана на накопление суммы фенольных соединений в каллусных культурах *Catharanthus roseus* (L.) G. Don и *Vinca minor* L.;
- выявить особенности действия D-триптофана на накопление суммы флавоноидов в каллусных культурах *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. и *Vinca minor* L.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Характеристика растений семейства *Аросунасеае*

Кутровые (рисунок 1.1) (лат. *Аросунасеае*) – это семейство двудольных цветковых растений, которое входит в порядок Горечавкоцветные [27]. Представителями этого семейства являются деревья, кустарники, лианы и травы. Большинство видов семейства – высокие деревья, которые растут в тропических и субтропических лесах, однако некоторые растут и в засушливых местах. Встречаются также многолетние травы, произрастающие в умеренном климате. Многие представители данного семейства выделяют млечный сок (латекс), который является ядовитым [19].

Научная классификация

Домен: Эукариоты (*Eukaryota*)

Царство: Растения (*Plantae*)

Отдел: Цветковые (*Magnoliophyta*)

Класс: Двудольные (*Dicotyledones*)

Порядок: Горечавкоцветные (*Gentianales*)

Семейство: Кутровые (*Аросунасеае*)



Рисунок 1.1 – Представитель семейства Кутровые – Плюмерия (*Plumeria*) [24]

Данное семейство характеризуется простыми листьями, часто супротивными. Цветки двуполые с радиальной симметрией, а также с пятидольной чашечкой. Цветки собраны в кистевидные соцветия. Плоды – костянка, ягода, коробочка или стручок [20].

Виды семейства Кутровые зачастую распространены в тропических областях [21]. В дождевых лесах и болотах Индомалайского региона можно встретить очень высокие деревья – до 80м, часто с корнями-подпорками, например, *Alstonia* и *Dyera*. В Северной Австралии – маленькие вечнозелёные деревья: *Alstonia*, *Alyxia*, *Cerbera* и *Ochrosia*. В листопадных лесах Африки и Индии встречаются маленькие деревья и кустарники, например, *Carissa*, *Wrightia* и *Holarrhena* [26]. В тропической Америке, Индии, Мьянме и Малайзии – вечнозелёные деревья и кустарники, например *Rauwolfia*, *Tabernaemontana* и *Acokanthera*.

Центральная Америка – *Plumeria*, которая имеет белые или розовые восковые цветки со сладким запахом [22]. В Южной Америке, Африке и Мадагаскаре встречается большое количество лиан, например *Landolphia*. В Средиземноморском регионе распространены виды Олеандра *Nerium*. Во внутренних районах Европы распространены виды *Vinca* и *Vincetoxicum*. В Северной Америке – виды *Apocynum*, а также *Apocynum cannabinum* – источник традиционного индейского волокна [23]. Во внутренних районах Южной Африки и Мадагаскара (за исключением влажных вечнозелёных лесов восточной части острова и высот выше 2000м над уровнем моря) распространён род *Pachypodium*.

Применение растений семейства Кутровые

Вид *Amsonia*, *Nerium* (Олеандр), *Vinca* (Барвинок), *Allamanda*, *Plumeria*, *Thevetia* и *Mandevilla* культивируются в качестве декоративных растений. Вид Карисса (*Carissa macrocarpa*) и Каранда (*Carissa congesta*) выращивают и употребляют в пищу их съедобные плоды. *Rauwolfia serpentina* содержит часто применяемые в медицине алкалоиды – резерпин и ресципнамин. *Rauwolfia caffra* имеет в своем составе хинин [25].

Виды рода *Acokanthera*, *Apocynum*, *Cerbera*, *Nerium*, *Thevetia* и *Strophantu* являются источниками сердечных гликозидов. Растения рода *Apocynum* индейцы применяли при изготовлении волокна. Цветки *Fernaldia pandurata* съедобные и являются важной составляющей сальвадорской и гватемальской кухни [26].

1.1.1. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

Катаранту с розовый (рисунок 1.2) (лат. *Catharanthus roseus*) – это вид вечно зеленых многолетних полукустарников, рода Катарантус (*Catharanthus*) семейства Кутровые (*Apocynaceae*) [27]. Было доказано, что катарантус розовый – одно из наиболее изученных растений, обладающих противоопухолевой

активностью. В садоводстве известен под названием барвинок розовый (лат. *Vinca rosea*) [28].

Научная классификация

Царство: Растения (*Plantae*)

Отдел: Покрытосеменные (*Angiospermae*)

Класс: Двудольные (*Dicotyledones*)

Порядок: Горечавкоцветные (*Gentianales*)

Семейство: Кутровые (*Apocynaceae*)

Род: Катарантус (*Catharanthus*)

Вид: Катарантус розовый (*Catharanthus roseus*)



Рисунок 1.2 – Катарантус розовый – *Catharanthus roseus* (L.) G. Don [24]

1.1.1.1. Ботаническое описание

Ученые установили, что катарантус розовый – ветвистый вечнозелёный полукустарничек 30-60 см высотой. Корневая система стержневая, длина корня 25-35 см, с большим количеством боковых корней. Молодые корни не имеют корневых волосков [34]. Корни светло-желтой окраски, обладающие сильным специфическим запахом. Кора у розовоцветковых растений с антоциановой окраской, а у белоцветковых – зелёная или светло-зелёная. При старении междоузлия укорачиваются, стебель одревесневает [33].

Листья супротивные, ланцетные, короткочерешковые, цельнокрайние, имеют суженное клиновидное основание. Листья обладают тёмно-зелёным цветом; блестящие, голые или опушённые. Имеют перистое жилкование с белой жилкой сверху [37]. Длина листьев – 2,5-8 см, ширина – 3,5 см. Цветки розово-красные, с диаметром 3 см, имеющие слабый аромат. Зев венчика пурпурный, опушённый, мозолистый [29]. Венчик состоит из пяти сросшихся в

трубку лепестков с отдельными розовыми или белыми отгибами, отогнутыми в одной плоскости [30].

Цветение растения преимущественно в мае. В данный период на верхушке побегов раскрываются маленькие цветочки с правильной формой, имеющие белый или розовый цвет. Цветет долго – до первой декады осени, затем на месте цветков формируются семена в виде гладких стручков. Распространение культуры быстрое [31]. Она хорошо приживается в местах посадки и случайного попадания семян. В связи с этим, рядом с территориями высадки – парковая зона – появляются поляны с дикорастущей вечнозеленой травой, имеющей аккуратные розовые цветы.

Формула цветка катарантуса розового – *Ч(5)Л(5)Т5П(2)[38]. Плодом являются две серповидные листовки длиной 5 см и толщиной 3 мм, плодоножка короткая. Семена (рисунок 1.3) очень мелкие и имеют чёрный цвет [32].



Рисунок 1.3– Семена катарантуса розового [32]

1.1.1.1. Географическое распространение

Было установлено, что дикорастущий вид катарантуса розового встречается на островах Юго-Восточной Азии, культивируется во всех тропических и субтропических странах. В СССР барвинок розовый являлся однолетней культурой влажных субтропиков Черноморского побережья Кавказа. Он выращивался в районе Гагр. Его производство для промышленности налажено в зоне полувлажно-субтропического климата (Грузия). В Кубано-Приазовском районе Краснодарского края (Россия), в зоне умеренно континентального климата, а также в зоне аридного климата в Чимкентской области (Казахстан) [22].

Катаранту розовый можно встретить в разных частях мира. Он растет в Европе, где культивируется для декоративных и медицинских целей.

Произрастает в Азии, Северной и Южной Америке, в Африке, Австралии, Индии и Индокитае, на острове Ява, на Филиппинах, Кубе, острове Св. Маврикий. В 1958 году началось его культивирование в Западной Грузии, Закавказье, на Кубани, а также первые работы по интродукции этого растения начались и в СССР [35].

На сегодняшний день в России барвинок растет в Крыму, в южных и юго-западных его областях. Встречается на опушках леса и степных склонах, часто селится в зарослях кустарников. Для промышленности его культивируют в больших объемах как однолетнюю траву на черноморском побережье Кавказа [36].

1.1.1.2. Важнейшие классы вторичных метаболитов – алкалоиды и фенольные соединения

При проведенных исследованиях из надземной части катарантуса розового было выделено около 80 алкалоидов индольного ряда, димерами из которых являются 26. Среди последних были обнаружены алкалоиды, которые обладают противоопухолевой активностью. Важный интерес представляют собой такие как винбластин (рисунок 1.4), винкрестин, лейрозин. Было установлено, что содержание этих алкалоидов в листьях очень невелико: винбластин – около 0,005 %, винкрестина – 0,001 %.



Рисунок 1.4 – Структурная формула винбластина и винкрестина [40]

Такие алкалоиды как минорин, винкамин, винин, пубисцин по своему составу сходны с резерпином. Это химическое соединение, которое оказывает сложное влияние на организм [41]. Резерпин оказывает расслабляющее действие на периферическую нервную систему и повышает продуктивность нейробиохимических процессов. Препараты на основе резерпина находят применение в психиатрической практике для лечения психических расстройств [39].

Алкалоид девинкан представляет собой органическое соединение, которое умеренно понижает артериальное давление, а также проявляет седативные свойства [44]. Гипотензивное действие данного алкалоида связано с его способностью снижать сосудистый тонус, тем самым уменьшать выраженность сопротивления периферических сосудов и расширять сосуды головного мозга. На основе этого алкалоида, который был выделен из растения барвинок, начали изготавливать лекарственный препарат «Девинкан». Данный препарат назначают при повышенном давлении первой и второй степени [42].

Помимо алкалоидов в разных тканях катарантуса есть в наличии стероиды, фенольные соединения, антоцианы, жирные кислоты и другие метаболиты, которые обладают антиоксидантными и противовоспалительными эффектами [43]. В составе данного лекарственного растения имеются дубильные вещества, урсоловая кислота, высокое содержание витаминов С, каротина и рутина. Катарантус представляет собой ядовитое растение и в связи с этим требует осторожности и аккуратности при его использовании, а так же работе с ним.

1.1.1.3. Фармакологические свойства

Ученые выяснили, что катарантус розовый представляет собой важный интерес для медицины в связи с его противоопухолевой активностью, которая отмечалась как у галеновых препаратов данного растения, а также и у изолированных, выделенных из растения алкалоидов [48]. Доказано, что наиболее активными из алкалоидов являются винбластин и винкристин. Данные алкалоиды обладают противоопухолевой цитостатической активностью, а также оказывают блокирующее действие на митоз клеток на стадии метафазы, подавляя размножение опухолевых клеток и лимфоцитов, в малой степени влияют на эритропоэз [52]. Проведенные исследования показали, что по спектру действия винбластин имеет сходство с колхицином, хотя и имеет совершенно другое химическое строение. Имеются данные, что винкристин оказывает стимулирующее действие на функцию надпочечников, и

повышает продукцию кортикостерона. Это оказывает определенную роль в его противоопухолевом действии, повышая противоопухолевый иммунитет [46].

Ученые считают, что механизм действия природных и полусинтетических алкалоидов катарантуса розового имеет отличия, которые обусловлены различием в их химической структуре, а также взаимодействием с разными участками молекулы тубулина и разным взаимодействием с белками, ассоциированными с микротрубочками [51]. Данные белки могут менять характер взаимодействия алкалоидов с тубулином микротубул и благодаря этому определяют некоторые нюансы действия алкалоидов катарантуса розового. Так, в условиях *in vitro*, винбластин, винкристин и винорелбин обладают примерно одинаковой активностью при сборке тубулина в микротубулы, однако винорелбин не оказывает специфического действия в отношении индукции образования спиралей [49].

При экспериментальном сравнительном исследовании действия винбластина, винкристина и винорелбина на микротрубочки митотического веретена и микротрубочки аксонов у эмбрионов мышей на ранней стадии развития нейронов было показано, что винорелбин наиболее избирательно действует на микротрубочки митотического веретена [50]. Природные винкаалкалоиды (винкристин, винбластин) находят применение в лечении быстро пролиферирующих новообразований. Одним из широко используемых винкаалкалоидов является винкристин [53]. Его применяют в основном для комбинированной химиотерапии острого лейкоза, лимфогранулематоза, а также других опухолевых заболеваний (вводят внутривенно 1 раз в неделю). Нейротоксическое действие винкристина может проявиться в виде нарушения нервно-мышечной передачи, неврологическими осложнениями, а также парестезией, двигательными расстройствами, выпадением сухожильных рефлексов, возможен парез кишечника ведущий к запорам, вплоть до паралитического илеуса [45]. В отличие от винкристина, алкалоид барвинка – винбластин, оказывается в меньшей степени нейротоксичным лекарственным средством, хотя и вызывает миелосупрессию, а также выраженный раздражающий эффект с риском развития флебита, некроза (при экстравазальном попадании) [47].

1.1.2. *Vinca minor* L

1.1.2.1. Ботаническое описание

Барвинок малый (рисунок 1.5) (лат. *Vinca minor*) – это вид многолетних травянистых растений рода Барвинок (*Vinca*) семейства Кутровые (*Apocynaceae*) [60].

Научная классификация

Царство: Растения (*Plantae*)
Отдел: Цветковые (*Magnoliophyta*)
Класс: Двудольные (*Dicotyledones*)
Порядок: Горечавкоцветные (*Gentianales*)
Семейство: Кутровые (*Apocynaceae*)
Род: Барвинок (*Vinca*)
Вид: Барвинок малый (*Vinca minor*)



Рисунок 1.5 – Барвинок малый – *Vinca minor* (L.) [60]

Барвинок малый является вечнозелёным многолетним травянистым растением (или кустарничком) с тонким горизонтальным корневищем, а также прямостоячим цветоносным стеблям, достигающий высоты 15-20 см (в культуре до 40-60 см). Помимо цветоносных стеблей, растение имеет бесплодные простёртые укореняющиеся вегетативные стебли, достигающие длины 100-150 см. Листья – супротивные, эллиптические, кожистые, блестящие, голые. Имеют длину 2-5 см и ширину до 2,5 см. Листья острые или туповатые; сверху – тёмно-зелёные, а внизу – серо-зелёные. Их длина на черешках 2-5 мм, они собраны в мутовки по три штуки [55].

Цветки одиночные, имеющие диаметр 2-3 см, либо пазушные, на цветоножках, с длиной 1-3 см. Чашечка со спаянными листьями, лопасти которых имеют длину 3-4 мм, острые, ланцетно-треугольные и голые. Венчик воронковидный, тёмно-синий или лилово-синий, с длинной цилиндрической тонкой трубкой, достигающей длины до 12 мм, в середине немного расширенной, и с плоским пятираздельным отгибом с диаметром до 25 мм, со сдвинутыми, срезанными лопастями достигающими длины 10-12 мм [59].

Пестик имеет ворсинчатое рыльце. Имеется также расширенный на вершине связник согнутый по направлению к рыльцу, а на спинке в

верхушечной части он опушён торчащими длинными белыми волосками. Нити тычинок широкие, в очертании почти округлые, чашевидно вогнутые, при основании внезапно суженные и изогнутые в виде колена. Пыльники спрятаны в трубке венчика, имеющие овальную форму и достигающие длины 4 мм [56].
Формула цветка: $*K_{(5)}C_{(5)}A_5G_{(2)}$.

Плод представляет собой две листовки. Они цилиндрические, заострённые, зеленоватого цвета с длиной до 7-8 см. Семена имеют коричневый цвет, продолговатые, цилиндрические, имеются сосочки, а хохолки отсутствуют. Цветение в европейской части России начинается в мае-июне, плоды созревают к августу-сентябрю [59].

1.1.2.2. Географическое распространение

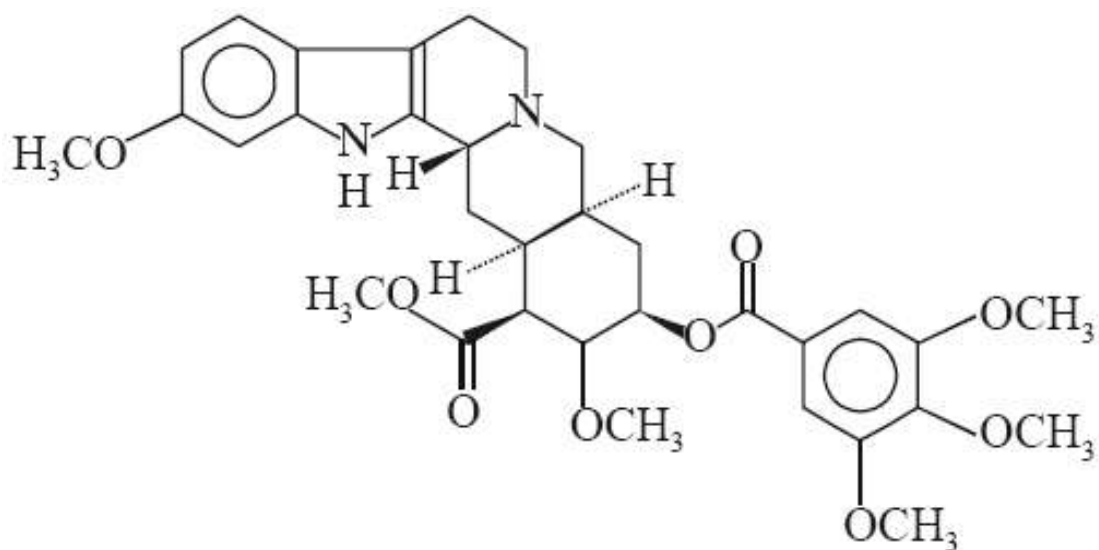
Было установлено, что родиной растения является материковая часть Европы и Малая Азия. Также встречается на Британских островах, в Северной Африке, Северной и Южной Америке, Австралии и Новой Зеландии [58]. Встречается в дикорастущем виде в средней, южной и западной полосе России и на Кавказе. Растёт на опушках лесов, степных склонах, в кустарниках [57].

Выявлено, что на территории Беларуси *V. minor* является интродуцентом и его растительное сырьё не заготавливается. В последние десятилетия распространение данного вида в Беларуси очень значительно расширилось. В Республике Беларусь было учтено более 120 местонахождений барвинка малого. Практически во всех административных областях и наибольшее его распространение было выявлено в западной и центральной частях республики. В этих регионах он встречается как в местах возделываемых человеком, так и в дикорастущем виде; встречается в естественных, преимущественно лесных фитоценозах [54]. В Беларуси *V. minor* цветет с конца апреля до конца июня длительностью 25-30 дней.

1.1.2.3. Важнейшие классы вторичных метаболитов – алкалоиды и фенольные соединения

В траве барвинка малого содержится более 20 алкалоидов, близких по своей природе к резерпину (рисунок 1.6), а также имеется минорин, винин, пубисцин, винкамин, изовинкамин, винкаминорпин, изомайдин, акуамицин и девинкан. Их общая сумма составляет около 2% [61]. Барвинок малый имеет в своем составе также урсоловую кислоту, флавоноиды, горькие и дубильные вещества, сапонины, сахара и витамины: С (993 мг), каротин (около 8 %),

рутин. При сборе данного сырья, а также сушке и упаковке следует соблюдать меры предосторожности [62].



Reserpine

Рисунок 1.6 – Структурная формула резерпина [65]

Фармакологическая ценность исследуемого растения определяется, прежде всего, алкалоидами индольного ряда. Учеными из свежесобранных листьев барвинка был получен препарат алкалоидов. Суммарное содержание алкалоидов в препарате составляло (в пересчете на абсолютно сухую массу ткани) 24,12 мг/г. Винкамин (рисунок 1.7) в этом препарате составил 324 мкг/г. Данные величины можно сопоставить с общим содержанием алкалоидов и винкамина в листьях барвинка малого [63].

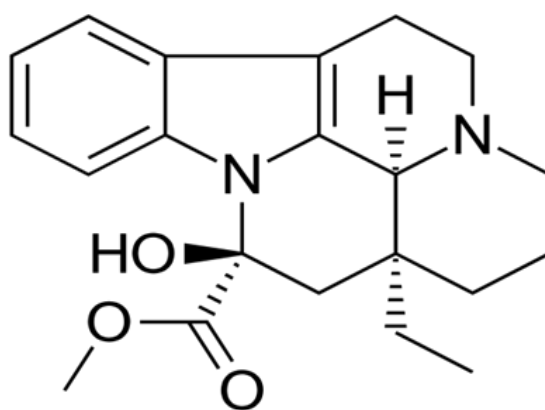


Рисунок 1.7 – Структурная формула винкамина [66]

Также учеными было определено содержание фенольных соединений и флавоноидов в сухих листьях барвинка малого. Было установлено, что максимальное количество фенольных соединений (10,58%) извлекается 70% этанолом, а флавоноидов (0,69%) – 94% этанолом [63].

1.1.2.4. Фармакологические свойства

Фармакологическая ценность растений рода *Vinca* обусловлена высоким содержанием в них алкалоидов индольного ряда. Самым известным представителем рода является барвинок малый *Vinca minor* L. Надземная часть растения заготавливается в качестве сырья и используется при выделении суммы алкалоидов, основным из которых является – винкамин [64].

Синтетическим аналогом винкамина является алкалоид – девинкан, который умеренно снижает артериальное давление и обладает седативными свойствами [84]. Было установлено, что препараты которые были получены из барвинка малого обладают следующими действиями: вяжущим, кровоостанавливающим и противовоспалительным, а также расслабляют и снижают тонус мускулатуры тонкого кишечника и тонизируют гладкую мускулатуру матки. В основе снижающего артериальное давление действия лежат их свойства снижать тонус и сопротивление в периферических сосудах [66].

В современной лечебной практике используют: винкатон («Гедеон Рихтер», Венгрия), винкапан (Болгария), винканор (Украина). Данные препараты применяются при спазмах сосудов мозга, при I и II стадиях гипертонической болезни, неврогенной тахикардии, головных болях разного происхождения, а также при депрессивных состояниях. Кроме того, препараты барвинка также эффективны для лечения детей с невритами лицевого нерва, полиневритами, остаточными явлениями менингоэнцефалита [68]. Они также широко используются в отоларингологической и офтальмологической практике [67]. Свое терапевтическое действие оказывают синтезируемые в растении фенольные соединения. Препараты на основе фенольных соединений широко используются в качестве противомикробных, желчегонных, диуретических и слабительных средств [69].

1.2. Культуры клеток и тканей растений

1.2.1. Общая характеристика

Клетки растений *in vitro* являются удобной моделью для изучения многих физиолого-биохимических процессов и генетики растительного организма (рисунок 1.8). Было установлено, что культивируемые растительные клетки используются для изучения вторичного метаболизма, его регуляции путем блокирования или усиления работы отдельных ферментов, а также под действием различных факторов.

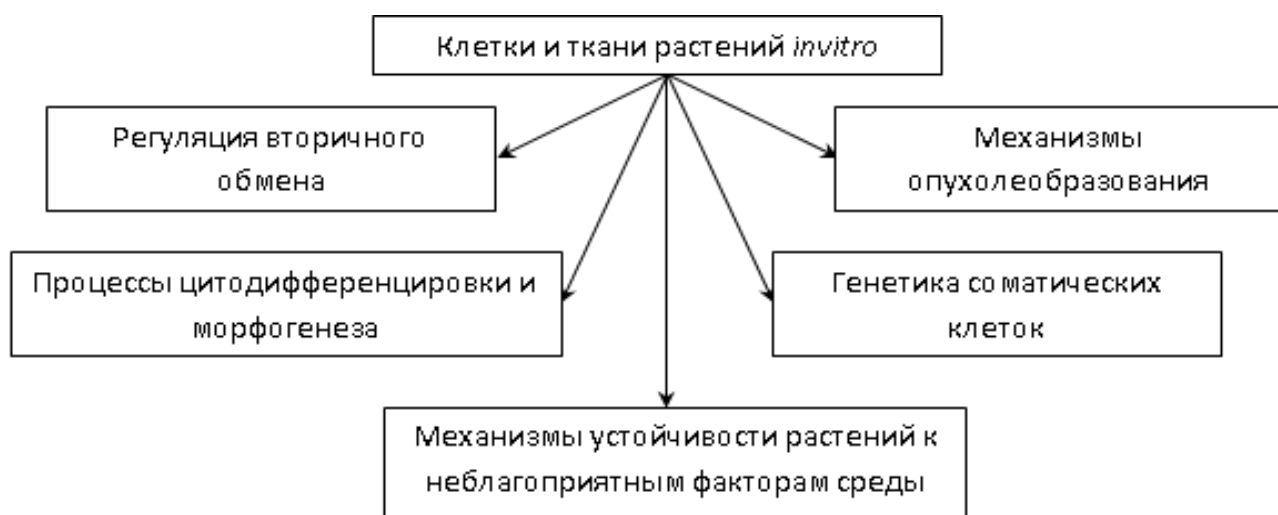


Рисунок 1.8– Направления использования культуры клеток и тканей для решения теоретических вопросов физиологии, биохимии и генетики растений [70]

Важной проблемой физиологии растений является познание сущности процессов роста, клеточной дифференциации и морфогенеза. Для ее решение имеется путь моделирования этих процессов в культуре клеток и тканей (рисунок 1.9), а также применение методов молекулярной биологии и генетики. На культивируемых клетках-моделях стало возможно изучать следующие процессы: деление и растяжение клеток, индукция делений и образование каллуса, дифференцировка клеток и морфогенез под влиянием как внешних, так и внутренних факторов, прежде всего фитогормонов [70].

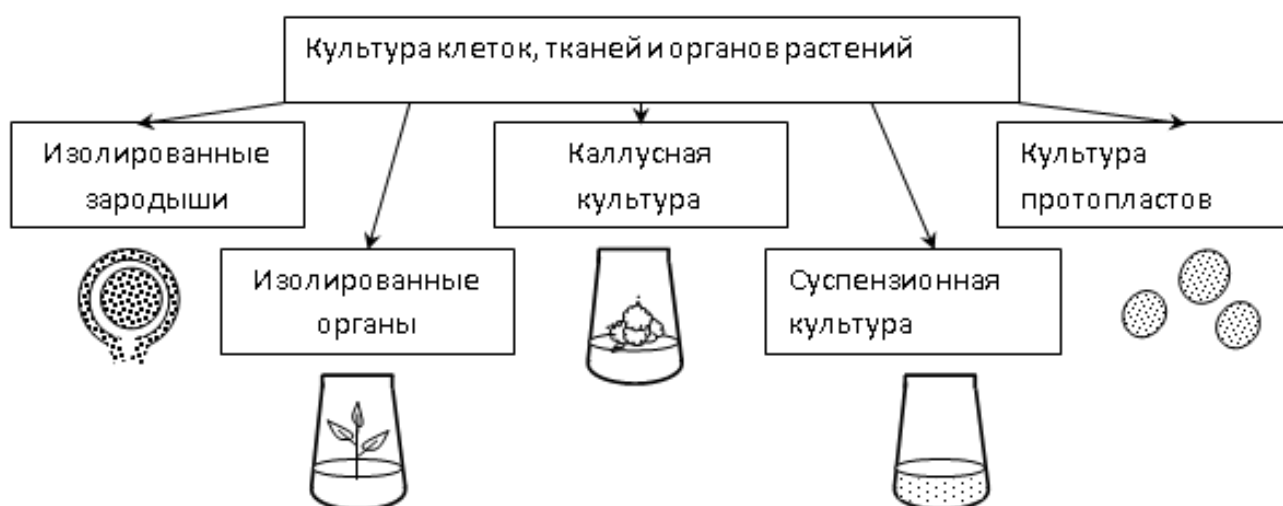


Рисунок 1.9 – Варианты культивирования клеток, тканей и органов растений на искусственных питательных средах [71]

Метод культуры тканей позволяет создать хорошую биологическую модель при изучении опухолевого роста. Для выявления структурных и метаболических особенностей опухолевой ткани ее необходимо сравнить с

нормальной тканью того же растения. Культура клеток широко используется при изучении генетики соматических клеток. В данных исследованиях наряду с моделями, близкими по характеристикам к клеткам естественного растения, широко используются модельные системы, созданные методами клеточной и генетической инженерии [74]. Данными методами широко получают гибридные клетки с самыми различными сочетаниями информационных систем не только ядер, но и хлоропластов и митохондрий [71].

Культуры клеток и тканей растений представляют собой наиболее уникальный источник для получения биологически ценных, экологически чистых вторичных метаболитов. Культура клеток и тканей является моделью для изучения устойчивости растений к разным неблагоприятным факторам окружающей среды: абиотическим (засолению, кислой среде, низким температурам) или биотическим факторам (патогены разного происхождения, вызывающие болезни растений). На культивируемых клетках и тканях растений исследуются разные аспекты фитопатологии, физиологии и биохимии больного растения [75]. Данный подход позволяет наблюдать прямую реакцию растительной клетки на воздействие какого-либо патогена [72].

Однако при использовании культуры клеток и тканей при моделировании физиологических процессов очень важно помнить, что клетки в системе *in vitro* и в живом организме не всегда являются равноценными. Дальнейшее изучение биологии культивируемой клетки и совершенствование методов культивирования с целью максимально приблизить условия *in vitro* к естественным, позволят по-новому и эффективно решать важнейшие проблемы физиологии, биохимии и генетики растений [73].

1.2.2. Состав питательных сред культивирования

Для культивирования культуры клеток и тканей необходимо приготовить питательную среду. Компоненты этой среды для выращивания растительных объектов *in vitro* можно разделить на 5 групп:

- макроэлементы;
- микроэлементы;
- источники углерода;
- витамины;
- регуляторы роста.

В настоящее время производят несколько типов готовых сред, которые имеют вид сухих порошков, содержащих в себе все необходимые элементы, исключая регуляторы роста, сахарозу и агар. Наличие макро- и

микроэлементов в составе культуральных сред определяется потребностями объектов культивирования. Готовые среды, конечно, удобны в использовании при обычном культивировании. Однако у этих сред имеются недостатки: они дорогие, а их применение ограничено для исследований, в которых необходимо варьирование компонентов сред [76].

На сегодняшний день известно большое количество различных по составу питательных сред (таблица 1). Среду Гамборга и Эвелега (среда В-5) используют при культивировании клеток и тканей бобовых растений и злаков. Среда Уайта применяется для укоренения побегов и нормального роста стеблевой части после регенерации [77].

Таблица 1 – Примеры составов наиболее употребляемых питательных сред для культивирования растительных клеток тканей [100]

Составные компоненты	Концентрация компонентов в среде, мг/л				
	Уайта	МС	В5	Нича	N6 (Chu)
NH ₄ NO ₃	–	1 650	–	720	–
KNO ₃	80	1 900	2 500	950	2 830
CaCl ₂ ·2H ₂ O	–	440	150	–	166
CaCl ₂	–	–	–	166	–
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	750	370	250	185	185
KH ₂ PO ₄	–	170	–	68	400
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	–	134	–	463
Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	300	–	–	–	–
Na ₂ SO ₄	200	–	–	–	–
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	19	–	150	–	–
KCl	65	–	–	–	–
KI	0,75	0,83	0,75	–	0,8
H ₃ BO ₃	1,5	6,2	3	10	1,6
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	5	22,3	–	25	–
MnSO ₄ ·H ₂ O	–	–	10	–	3,3
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	3	8,6	2	10	1,5
NaMoO ₄ ·2 H ₂ O	–	0,25	0,25	0,25	–
MoO ₃	0,001	–	–	–	–
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01	0,025	0,025	0,025	–
CoCl ₂ ·6H ₂ O	–	0,025	0,025	–	–
Fe(SO ₄) ₃	2,5	–	–	–	–
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	–	27,8	27,8	27,8	27,8
Na ₂ ЭДТА·2 H ₂ O	–	37,3	37,3	37,3	37,3
Органические вещества:					
Никотиновая кислота	0,5	0,5	1	5	0,5
Пиридоксин гидрохлорид	0,01	0,5	1	0,5	0,5
Тиамин гидрохлорид	0,01	0,1	10	0,5	1
Биотин	–	–	–	0,05	–
Инозит	–	100	100	100	–
Глицин	3	2	–	2	–
Фолиевая кислота	–	–	–	0,5	–
Сахароза	20 000	30 000	20 000	20 000	50 000
pH	–	5,8	5,5	–	5,8

1.2.3. Каллусные культуры

Каллус – это неорганизованная масса ткани, состоящая из дедифференцированных клеток. Каллусная ткань обычно появляется на месте ранения тканей и обеспечивает защиту раны, а также накопление необходимых питательных веществ для регенерации утраченного органа [82]. Каллус может быть получен из эксплантов различного типа (корней, побегов, листьев,

пыльцы, эндосперма). Эффективность каллусогенеза зависит от особенностей вида, физиологического состояния растения, типа экспланта и условий его культивирования. Каллусогенез свойственен как покрытосеменным так и голосеменным растениям, а также папоротникам, мхам, печеночникам [87]. Двудольные растения образуют каллус наиболее интенсивно по сравнению с однодольными. Были замечены различия между генотипами и их способностью к каллусогенезу. Молодые ткани наиболее предпочтительны по сравнению со старыми. Размер и форма экспланта не имеют определенного значения. Однако существует минимальный критический размер, уменьшив который, нельзя вызвать рост экспланта [89].

Взятая из корня или листа клетка образует целое растение. Регенерации полноценных растений из каллуса получают двумя путями: дифференциацией побегов и корней благодаря изменению соотношения гормонов цитокинина и ауксина либо образованием эмбриоидов. Данный соматический эмбриогенез впервые был отмечен в 1959 г. у моркови; со временем его стали применять при производстве жизнеспособных растений у разных видов [83].

Каллусная ткань *in vitro* чаще всего бывает белого или желтоватого, реже светло-зеленого цвета. Довольно редко она имеет интенсивную зеленую окраску [85]. Темно-коричневая окраска появляется чаще при старении каллусных клеток и она связана с накоплением в них фенолов, которые затем окисляются в хиноны. Для избавления от них в питательные среды вносят антиоксиданты.

Каллусная ткань аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, но в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть различной по *консистенции*:

- рыхлой, состоящей из сильно оводненных клеток, легко распадающейся на отдельные мелкие агрегаты;
- средней плотности, но с хорошо выраженными меристематическими очагами;
- плотной, в которой дифференцированы элементы камбия [86].

Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и превращения ее в каллусную является присутствие 2 групп фитогормонов:

- ауксинов, вызывающих процесс дедифференцировки клетки, подготавливающий ее к делению;
- цитокининов, вызывающих пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток.

Если в питательную среду, не содержащую этих гормонов, поместить растительный эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деления клеток не произойдет и каллусная

ткань не образуется. Это связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению. Каждая клетка проходит 3 фазы роста:

- деление;
- растяжение;
- дифференцировку.

Характерной чертой заключительной фазы роста является утолщение вторичной клеточной оболочки и потеря клеткой способности к делению. Для того чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка. Размножение этих клеток приводит к беспорядочному росту, в результате чего образуется каллусная ткань. Таким образом, превращение специализированной клетки в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому она утратила при дифференцировке. Полагают, что данную индукцию вызывают не ауксины и цитокинины, а полисахариды [5].

Процесс перехода к каллусному росту начинается с прекращения клеточных делений. Эта фаза продолжается 24-48 ч. За этот период клетки увеличиваются в размерах и ткань становится разрыхлой.

Дедифференцировка специализированных клеток обусловлена влиянием фитогормонов. Эффект, оказываемый действием одних и тех же фитогормонов, может отличаться в зависимости от физиологической характеристики ткани-мишени.

Было также установлено, что каллусные клетки *in vitro* могут сохранять некоторые физиолого-биохимические особенности растения, с которого был взят эксплант. Каллусные культуры теплолюбивых растений лучше растут при более высоких температурах, чем культуры растений умеренного климата. Каллусные клетки при определенных условиях сохраняют способность синтезировать вторичные метаболиты, характерные для растений-доноров эксплантов (например, панаксазиды женьшеня). Каллусным клеткам свойственна устойчивость к токсинам, гербицидам, антибиотикам, засолению, морозо- и жаростойкость и другие свойства, если они имели место у интактных растений.

1.2.3.1. Приемы инициации

Эксплант после стерилизации помещают на поверхность твердой питательной среды и слегка вдавливают его в агар для обеспечения контакта со средой. Культуральные сосуды – пробирки, чашки Петри, колбы, стеклянные или пластмассовые баночки с завинчивающимися крышками. В качестве питательных сред используют обычно среды Мурасиге-Скуга (МС); Шенка,

Хильдебрандта (ШХ), Гамборга (В5) и другие. Оптимальная температура для образования каллуса 22-28°C. Каллус способен образовываться как на свету так и в темноте [88].

Главное условие успешного каллусообразования – концентрация и баланс эндогенных и экзогенных ауксинов и цитокининов. Присутствие ауксинов вызывает дедифференцировку клеток, то есть утрату специализации и связанных с ней структур и возвращение к состоянию делящейся клетки. Для инициации каллуса обычно используют 2,4-Д и ИУК. При индукции образования каллуса ауксины обычно применяются в концентрациях в 10 раз более высоких, чем та, которая используется для поддержания его роста [89]. Процесс деления дедифференцированных клеток происходит под действием цитокининов. Соотношение ауксинов к цитокининам для получения каллуса – 10:1.

Образующаяся каллусная ткань не имеет анатомической структуры и может быть разной консистенции. Рыхлый каллус быстрее растет и используется для получения суспензионной культуры, плотный каллус может применяться для морфогенеза. Цвет каллусной ткани может быть белым, желтоватым, зеленым, красноватым, бурым, пигментированным полностью или зонально присутствием хлорофилла и антоцианов [77]. Клетки каллуса, как и другие клетки проходят три фазы роста (деление, растяжение, дифференцировка), после чего отмирают.

В течение лаг-фазы не происходит увеличения числа клеток, данная фаза отличается интенсивностью деления клеток и увеличения массы каллуса. В линейной фазе скорость роста числа клеток постоянна, в фазе замедленного роста уменьшается интенсивность деления, в стационарной фазе число делящихся клеток уравнивается числом деградировавших, в результате их общее количество не меняется. После стационарной фазы происходит старение и отмирание клеток каллуса. Обычно это процесс сопровождается потемнением тканей каллуса. Старение клеток каллуса обусловлено не только естественными циклами в развитии клеток и тканей, но и изменениями, которые происходят в составе питательной среды: расходование питательных веществ, повышение концентрации отдельных компонентов в результате испарения воды с поверхности среды, выделение каллусом в состав среды некоторых метаболитов, в том числе токсичных. Все эти причины заставляют переносить часть первичного каллуса на свежую питательную среду через 4-6 недель. Такой прием называется пассированием [4]. Масса переносимого кусочка при культивировании колеблется от 60 до 100 мг ткани на 20-40 мл питательной среды. Опытным путем было установлено, что при субкультивировании первичный каллус, достигший 2-3 см в диаметре, необходимо отделить от экспланта и разделить на 4-8 частей для пересадки на свежую питательную

среду. Каллусная ткань может пассироваться в течение длительного времени. Так, культура каллусной ткани моркови, полученная Р.Готре более 60 лет назад, поддерживается до сих пор. Поскольку первичный каллус может образоваться из клеток, различных по своей специализации, в процессе длительного пассирования (субкультивирования) образуются штаммы каллусных клеток, имеющие индивидуальные генетические и физиологические особенности.

1.2.3.2. Физиолого-биохимические особенности

Переход клетки *in vitro* из дифференцированного состояния к дедифференцировке и активным клеточным делениям происходит из-за изменения активности клеточных генов: активирование одних генов и репрессирование других приводит к изменению белкового состава клеток. При переходе дедифференцированной клетки к бесконтрольному размножению в клетках происходят биохимические и цитологические изменения, приводящие к образованию каллусной ткани [43].

Дедифференцировка начинается с использования запасных веществ и разрушения специализированных клеточных органелл. Через 6-12 ч после индукции дедифференцировки клеточная оболочка разрыхляется и разбухает, увеличивается число свободных рибосом, возрастает число элементов аппарата Гольджи, увеличиваются размеры и число ядрышек. Все эти изменения предшествуют началу делений, которые начинаются через 48-72 ч. Кроме того, в клетках экспланта в начале культивирования могут наблюдаться изменения в метаболизме, вызванные как дедифференцировкой, так и травматическими синтезами. Для разделения этих процессов лучше производить преинкубацию экспланта на среде без гормонов 3-6 суток [43].

1.3. Участие L- и D-триптофана в физиолого-биохимических процессах растительных организмов

Аминокислоты являются основными исходными веществами, обеспечивающими синтез белка растущих органов и частей растений. Физиология растений на сегодняшний день опирается на изучение химического, физико-химического и физического аспектов жизнедеятельности организма; возникли самостоятельные науки – биохимия, биофизика, биофизическая химия, посвященные этим аспектам. Они являются базисом физиологии, т.к. последняя может преуспевать в познании явлений

жизнедеятельности лишь при обнаружении закономерностей взаимосвязи химических и физических процессов [95].

Исследуя растворимые аминокислоты и амиды в органах растений в процессе их роста учитывается изменчивый характер их содержания. На концентрацию и качественный состав аминокислот влияют как внутренние процессы, определяющие течение азотного обмена в широком смысле слова (обмен белков, нуклеиновых кислот, пигментов, ростовых веществ), так и внешние факторы. Теперь известно более 100 аминокислот, из которых только 22 встречаются в растениях в составе белков. Многие из аминокислот обнаруживаются в низких концентрациях, а другие пока не удается уловить существующими методами. Свободные аминокислоты, не входящие в состав белков, необходимы для жизнедеятельности организмов и играют важную роль во многих обменных процессах, в том числе в процессах обмена с белковыми аминокислотами, с органическими кислотами, с синтезом физиологически активных веществ. Иначе говоря, непосредственно или опосредствованно все свободные аминокислоты участвуют в метаболизме ростовых процессов [96].

По составу и количеству аминокислот не всегда представляется возможным судить об их роли в отдельных процессах жизнедеятельности растений. Состав аминокислот тесно связан с процессами роста и развития, поскольку последние вызывают изменения в оттоке аминокислот из листа и их использовании в синтезе белка. Однако эти связи аминокислотного обмена с ростом растений нередко оказываются незаметными или их трудно установить, так как во время вегетации по самым разнообразным причинам меняется состав веществ, в том числе и аминокислот. Изменения в составе свободных и белковых аминокислот могут быть связаны с процессом фотосинтеза, но могут явиться и результатом передвижения по растению, когда, например, аминокислоты поступают в листья из корней, где они образуются в значительных количествах и в большом разнообразии.

Аминокислоты являются одними из самых активных участников метаболизма. Образуясь в процессе фотосинтеза или в результате синтетической деятельности корней, они в дальнейшем участвуют в самых разнообразных биохимических процессах, в том числе в синтезе белковых и ростовых веществ, от которых, в свою очередь, зависят ростовые процессы. Установлено, что аланин и серин у *Chlorella pyrenoidosa* образуются в результате дальнейших превращений первого стабильного продукта фотосинтеза – фосфоглицериновой кислоты.

Показателем интенсивности ростовых процессов служит содержание в них определенных аминокислот. Амиды и аспарагиновая кислота преобладают в молодых листьях фасоли и бобов – они составляют 50-60% всего аминного азота. Однако по мере роста листьев исчезает аспарагин, начинают преобладать

аланин, серин, глутаминовая кислота. В зрелых листьях накапливается γ -аминомасляная кислота, что, возможно, связано с замедлением и прекращением ростовых процессов через торможение новообразования белка [97].

Ученые отметили сезонные изменения аминокислот в тканях одиночных побегов яблони и сливы, в связи с их ростовой активностью. Оказалось, что в начале роста (май) в коре яблони выявляется 9 аминокислот, а сливы – 13.

Из других аминокислот наибольшее внимание многих исследователей привлек триптофан, который считается предшественником гетероауксина в растении. Предполагают, что биосинтез этой важной аминокислоты осуществляется у разных организмов по-разному. О.Л. Поляновский подтвердил возможность образования триптофана из индолпировиноградной кислоты и связующую роль последней между триптофаном и индолил уксусной кислотой. Он показал, что синтез триптофана из индол-пировиноградной кислоты идет в растении двумя путями: переаминированием аминокислот и другим путем – с участием АТФ и NH_3 . Это связано с образованием глутамина, который вступает в реакцию переаминирования с индол-пировиноградной кислотой (ИПВК) [98].

1.3.1. Общая характеристика аминокислоты триптофан

L-триптофан (рисунок 1.10) является протеиногенной ароматической альфа-аминокислотой и входит в состав белков всех известных живых организмов. Относится к ряду гидрофобных аминокислот, поскольку содержит ароматическое ядро индола. Участвует в гидрофобных и стэкинг-взаимодействиях. Существует в двух оптически изомерных формах, L и D, и в виде рацемата (DL) [93]. В то же время, роль его оптического D-изомера в физиолого-биохимических процессах растительных организмов мало изучена. Известно, что энантиомеры могут обладать не просто различными физиологическими свойствами, но и кардинально противоположными [94].

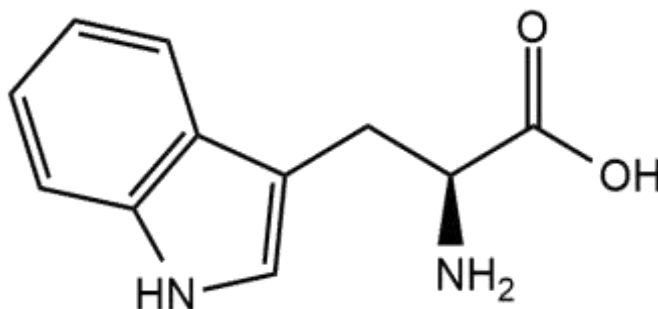


Рисунок 1.10 – Структурная формула триптофана

1.3.2. Роль в физиолого-биохимических процессах растений

Триптофан синтезируется бактериями, грибами и растениями и необходим для биосинтеза белков. Кроме того, у растений триптофан служит предшественником таких веществ, как фитоалексины, глюкозинолаты, ряд алкалоидов, участвующих в процессах защиты от патогенов и вредителей, а также ауксина, ключевого гормона морфогенеза растений. Кроме того, триптофан, как аминокислота, является субстратом для синтеза белков. Следует отметить, что реакция синтеза белков двадцатисубстратная, по числу аминокислот [104].

Прорастание является важным процессом в жизни растения, определяющим его дальнейший рост и развитие. Физиологические и биохимические события, сопровождающие прорастание семян, могут заметно влиять на жизнеспособность и продуктивность культурных растений.

В последние годы очень большое внимание уделяют изучению стереохимии вторичного метаболизма аминокислот, собрано достаточно много данных о природных аминокислотах, процессах, в которых они участвуют. Некоторые авторы рассматривают триптофан в качестве предшественника ИУК. Выявлен эффект триптофана в стимуляции роста культуры клеток и в стимуляции корнеобразования у интактных растений. Существуют некоторые данные об образовании, превращениях и биологическом действии триптофана в тканях растений.

В семенах многих растений при созревании образуется триптофан. При прорастании семян образование триптофана возобновляется. Освещение резко замедляет рост проростков в длину и накопление в них триптофана, и незначительно влияет на содержание свободного триптофана [103].

При исследовании синтеза триптофана из ИПВК в отдельных проростках и колосьях пшеницы было установлено, что синтез триптофана в течение 10 часов идет линейно во времени. Данный процесс указывает, что растительный организм медленно расходует синтезированный триптофан для синтеза белка. Интенсивность освещения растения влияет на синтез триптофана. В этиолированных проростках и корнях гороха синтез триптофана из индола и серина шел слабо, в зеленых проростках – сильнее, а в зеленых верхушках проростков – наиболее интенсивно. Синтез триптофана из индола и ИПВК на свету шел более интенсивно, чем в темноте. При накоплении ИПВК и триптофана в проростках на свету наблюдается образование ряда аминокислот: лейцина, валина, треонина и γ -аминомасляной кислоты.

Триптофан накапливается в зонах этиолированных проростков, активно продуцирующих ауксин. В то же время, не существует значительных различий между органами и зонами роста проростков по содержанию триптофана.

Экзогенный триптофан эффективнее, чем ИУК стимулирует корнеобразование и рост первого листа у изолированных зародышей в культуре.

В проростках пшеницы и томата функционирует система биосинтеза ИУК из триптофана в которой триптофанрацемаза играет ключевую роль. Благодаря образованию эндогенного триптофана, биосинтез ИУК может быть обеспечен стабильно поступающим субстратом. Изученные превращения триптофана существенно углубляют представление о гормональной регуляции гетеротрофного роста проростка.

В проростках как пшеницы, так и томата активно функционирует D-триптофантрансаминаза, для работы которой важным и закономерным условием является присутствие субстрата D-триптофана. Накопление свободного D-триптофана в проростках мало вероятно, т.к. в клетках растений он быстро подвергается малонилированию. Следовательно, единственным источником субстрата для пшеницы и томата может быть эндогенный D-триптофан [103].

При изучении биологического действия ИУК и её предшественников на рост изолированных зародышей пшеницы удалось выявить стимулирующий эффект D-триптофана на корнеобразование и рост в длину первого настоящего листа. D-триптофан оказался более эффективным в стимуляции, чем L-триптофан и ИУК.

Влияние ИУК и её предшественников на рост зародышей в культуре нельзя полностью идентифицировать с их физиологической ролью, поскольку ясно, что распределение экзогенных веществ не воспроизводит их природное распределение. Тем не менее, полученные данные подтверждают предположение об участии D-триптофана в биосинтезе ИУК в проростках в качестве предшественника [103].

1.3.2.1. Участие триптофана в биосинтезе первичных и вторичных метаболитов растений

Триптофан – аминокислота, содержащаяся в большинстве белков. Все встречающиеся в природе производные индола происходят из триптофана в результате различных биохимических превращений [92]. Важнейшими предшественниками ряда первичных и вторичных метаболитов в растениях, а также структурными единицами при сборке белков являются ароматические L-аминокислоты. Триптофан среди них представляет собой один из ключевых интермедиатов в биосинтезе фитогормонов, алкалоидов, фенольных соединений и других метаболитов [14]. Так, например, он является предшественником серотонина (рисунок 1.11), который в растительных

организмах как биогенный амин участвует в различных физиологических процессах, таких как цветение, морфогенез и адаптация к изменяющимся условиям окружающей среды [16]. Триптофан также участвует в биосинтезе индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), но это не основная биосинтетическая ветвь образования данного фитогормона [12].

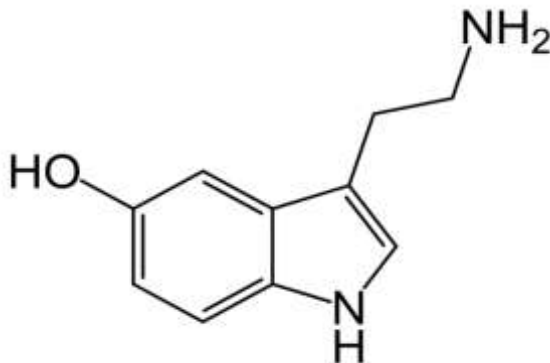


Рисунок 1.11 – Структурная формула серотонина

Ткани высшего растения превращают триптофан в индолуксусную кислоту в 20-30 раз слабее. Триптамин и триптофан в живой природе подвергаются окислительному метаболизму. Один из путей его – деградация боковой цепи. Продукты промежуточных стадий этого процесса играют важную роль в жизни растений. При ферментативном окислении триптофана, образуется неустойчивый индолил-3-ацетальдегид, который быстро окисляется дальше до индолил-3-уксусной кислоты. Это вещество носит название гетероауксин и относится к гормонам растений [92].

Все высшие растения синтезируют метаболит – гетероауксин, и он всегда присутствует в растительных тканях в количествах 1-100 мг/кг. Его биосинтез начинается с момента прорастания семян и продолжается в течение всей жизни растения в верхушках молодых побегов, в растущих листьях и плодах, в камбиальном слое и, вероятно, в кончиках корней. Функции индолил-3-уксусной кислоты как фитогормона многообразны [92].

В то же время в одной или двух субстратных реакциях субстраты часто становятся регуляторами собственных реакций. Соответственно триптофан, будучи в пути биосинтеза ауксина у растений субстратом односубстратной реакции, играет роль ее регулятора. Таким образом, триптофан участвует в специфической регуляции экспрессии генов, т.к. ауксин – регулятор транскрипции ряда генов [104].

1.3.3. Влияние экзогенного L-триптофана на физиолого-биохимические процессы в растениях

Особый интерес вызывает стимулирующее действие D-триптофана на рост первого настоящего листа, поскольку этот эффект обнаружен впервые. Экзогенные ИУК и L-триптофан не оказывают такого действия, ингибируя рост листа. Предположительно, в отличие от D-триптофана, они не подвергаются быстрой инактивации и резервированию, а разрушаются с образованием токсичных продуктов. В листе эндогенный триптофан накапливается в очень небольших количествах, но достаточно большое его количество образуется в переходной зоне, меристематические клетки которой участвуют в образовании листьев. В переходной зоне была обнаружена самая высокая активность. По всей видимости эта часть проростка пшеницы продуцирует ауксин, также, как и верхняя зона coleoptily. Хотя пики активности этих зон в продукции ауксина, по-видимому, не совпадают по времени, каждая из них в определённый период прорастания является функционально важным центром, обеспечивающим рост и морфогенез, благодаря активному биосинтезу ИУК [103].

Изучение влияния триптофана на физиолого-биохимические характеристики растений было проведено рядом ученых на разных видах растений. Было выявлено, что включение триптофана в среду культивирования, либо обработка листьев растений приводила к стимуляции ростовых процессов. Так, например, триптофан в высоких концентрациях повышал формирование эмбрионного каллуса в некоторых сортах риса [90].

Для каллусной индукции использовались зрелые семена четырех сортов малазийского риса: Кусан, Ламсан, Селаси и Сиам. Каллусы получали из четырех сортов через 3-4 недели. Согласно результатам из экспериментов, было отмечено, что на оба сорта эффекты триптофана были значительными. Кроме того, не наблюдалось различий во взаимодействии между сортами и средними обработками. Что касается сортов, Ламсан показал максимальную частоту каллусной индукции (85,6%), а Сиам показал минимум (47,4%) [90].

Согласно отдельному анализу для каждого культивирования реакция индукции каллуса существенно отличалась при добавлении разных уровней триптофана для всех сортов, кроме Селаси. Оптимальная концентрация триптофана для индукции каллуса сортов Кусан и Сиам составляла 100 мкмоль, в то время как у Ламсана максимальный ответ был получен при 200 мкмоль и при этих концентрациях три сорта демонстрировали максимальную частоту индукции каллуса.

Однако двусторонний дисперсионный анализ подтвердил существенные различия между концентрацией глутамина и сортами. Аналогично добавление триптофана в каллусную индуцирующую среду, среди экспериментальных

сортов Ламсан показал лучший результат на индукцию каллуса – 84,2%, в то время как результат сорта Сиам составил 48,4%. Однако отдельный анализ для каждого сорта указывал только на положительный эффект глутамина на частоту показаний каллуса Ламсана. Фактически, в Ламсан добавление 100 мкмоль привело к самому высокому результату 97,9%. Как видно из исследования триптофана, между сортами, уровнями триптофана и взаимодействием между ними обнаружены положительные эффекты [90].

Частота регенерации варьировалась от 0 до 75,0% среди различных сортов и уровней триптофана. Ламсан дал самую высокую реакцию регенерации (50,5%), а Кусан – самую низкую (3,70%). Добавление триптофана оказало положительное влияние на реакцию регенерации растений [90].

Отмечено, что все испытываемые культиваторы, за исключением Ламсана, достигли наивысшей частоты регенерации при 100 мкмоль триптофана. Ламсан достиг частоты регенерации в среде с 200 мкмоль триптофана. Интересно отметить, что в сорта Сиам включение 100 мкмоль триптофана увеличило частоту регенерации от 5% до 40%. Результаты также показали, что инокуляция различных концентраций глутамина в среду не может привести к значительному отклику в системе регенерации во всех тестируемых сортах [90]. Тем не менее, как эффекты сорта, так и взаимодействие между культурами и уровнями глутамина были статистически значимыми.

Учеными оценено влияние триптофана и глутамина на тканевую культуру четырех сортов риса. Результаты показали, что когда триптофан был добавлен в среду для индукции каллуса и регенерации растений, он способствовал развитию каллуса в культиваторах Кусан, Ламсан и Сиам и способствовал регенерационному ответу во всех тестируемых культурах. Для сравнения, глутамин только улучшал производство каллусов сорта Ламсан, и не повышал частоту регенерации семян в других сортах. Коэтти сообщил, что триптофан увеличил массу эмбриогенного каллуса в незрелых культурах эмбрионов риса [90].

Аналогично, Ховдрийяснил, что добавление триптофана к индукционной среде каллуса не могло привести к общему увеличению частоты индукции каллуса, а скорее к увеличению частоты образования эмбриогенных каллусов. Хорошо известно, что триптофан действует как предшественник ИУК на растениях и что он может способствовать росту или индуцировать морфогенез, и это наблюдалось в данном исследовании.

Исследователи не смогли увидеть какого-либо положительного эффекта глутамина на тканевую культуральную систему риса (кроме сорта Ламсан относительно индукции каллуса). На тканевой культуре моркови (*Cryptomeria japonica*) и на эмбриогенезе пыльцы в табаке и картофеле был показан положительный эффект глутамина. В культуре рисовых тканей, хотя глутамин

рекомендуется исследователями, они, как правило, не доказали или не обсудили вклад глутамина в деталях.

Добавление аминокислот обеспечивает легкодоступный первичный источник азота в тканевых культуральных системах, и поглощение может происходить гораздо быстрее, чем из неорганического азота в той же среде. Таким образом, положительный результат. Ответ на индукцию и регенерацию каллуса наблюдали при добавлении соответствующего количества триптофана, и эти ответы значительно различались между сортами [90].

В следующем эксперименте проводимом исследователями использовались апельсиновые деревья Валенсии. Обработка листьев *Valencia orange* раствором L-триптофана в концентрации 100 мг/л приводила к стимуляции ростовых параметров. При этом, стимулирующее действие L-триптофана на ростовые процессы может быть объяснено превращением экзогенного триптофана в индолилуксусную кислоту [91].

Левитт установил, что благоприятное влияние аминокислот на производство новых клеток путем восстановления специфических ферментов для высокого уровне триптофана (100 мг/л), в котором были получены низкие значения синтеза белка. Вандерхоф указал, что триптофан влияет на генную экспрессию для получения специфических макромолекул, необходимых для постоянного удлинения клеток. Рассел сообщил, что удлинение ствола, которое обычно наблюдалось у растений, обработанных триптофаном (особенно *Mentha viridis* и *Mentha longifolia*), можно объяснить превращением триптофана в ИУК [15]. Кроме того, результаты исследователей показали, что большинство изученных признаков роста было получено с помощью дерева, обработанного любой из трех различных концентраций триптофана [91].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись гетеротрофные каллусные культуры *Vinca minor* L. (рисунок 2.2) и *Catharanthus roseus* L.(рисунок 2.1).



Рисунок 2.1 – Каллусная культура *Catharanthus roseus* L.



Рисунок 2.2 – Каллусная культура *Vinca minor* L.

2.1.1. Культивирование каллусной культуры

Культивирование каллусов производили на питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением фитогормонов (1 мг/л 1-нафтилуксусную кислоту и 0,1 мг/л кинетин). Культивирование каллусов осуществлялось в темноте в условиях термостата при температуре 25 °С в течении 30 суток (рисунок 2.3). D-триптофан добавляли в среду инкубации в концентрациях 25, 50, 100 и 200 мг/л.



Рисунок 2.3 – Каллусная культура

2.1.2. Приготовление сред культивирования

Для культивирования клеток, тканей и органов тех или иных растений используют питательные среды различного состава. Наиболее широко применяются среда Мурасиге-Скуга.

Количество солей, необходимое для приготовления маточных растворов, а также количество маточного раствора, которое надо взять для приготовления питательной среды, приведены в таблице 2.

Приготовленный раствор разливали по 5 колбам объемом 200 мл на каждой колбе подписали концентрации D-триптофана: 25, 50, 100, 200 мг/л.

Таблица 2 – Состав среды Мурасиге – Скуга

№	Компонент среды	Количество вещества
	Маточный раствор макросолей(г на 1 л маточного раствора)	
1.	KNO ₃	38
2.	NH ₄ NO ₃	33
3.	KH ₂ PO ₄	3,4
4.	MgSO ₄ . 7H ₂ O или MgSO ₄ безводный	7,4
5.	CaCl ₂ . 2H ₂ O или CaCl ₂ безводный	3,6
	Маточный раствор микросолей (мг на 100 мл маточного раствора)	
6.	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	25
7.	CuSO ₄ . 5H ₂ O	2,5
8.	H ₃ BO ₃	620
9.	MnSO ₄ . 5H ₂ O или MnSO ₄ . 4H ₂ O	2410 2230
10.	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	860
11.	KJ	83
12.	CoCl ₂ . 6H ₂ O	2,5
13.	FeSO ₄	557
14.	Na ₂ ЭДТА	745

2.2. Определение ростовых показателей

Для характеристики ростовой активности каллусной культуры барвинка малого в работе производилось определение следующих параметров: удельная скорость роста, время удвоения биомассы и индекс роста.

Удельную скорость роста рассчитывали по следующей формуле:

$$V = (Wt - W0) / \Delta t * W0,$$

где W₀ – начальная масса суспензии, г.;

W_t – масса суспензии в конце цикла выращивания, г.;

t – продолжительность культивирования, сут.

Время удвоения биомассы рассчитывали по формуле:

$$T = \ln 2 / V,$$

где V – удельная скорость роста.

Индекс роста – показатель, характеризующий прирост биомассы каллусов на 1г исходного веса.

$$I = (mt - m0) / m0$$

где m0 – начальная масса каллуса, г;

mt – масса каллуса в конце цикла выращивания, г.

2.3. Анализ содержания суммы фенольных соединений

Для приготовления экстракта взяли колбу в которую поместили 0,3 г сухого каллуса, добавили 30 мл 70% этанола и положили осколок стекла (центр кипения). Колбу подсоединили к установке обратный холодильник (обратный холодильник применяется для конденсирования паров и возврата конденсата в реакционную массу. Устанавливают такие холодильники обычно вертикально). Кипятили 2 часа. Затем отсоединили колбу от обратного холодильника, остудили и отфильтровали. Полученный экстракт поместили в стеклянный флакон и поставили в холодильник.

К 0,2 мл полученного экстракта прибавляли 7,7 мл воды очищенной, 0,1 мл реактива Фолина-Дениса и 2 мл 10 % раствора карбоната натрия, все тщательно перемешивали и оставляли в темном месте. Через 15 минут измеряли оптическую плотность полученного раствора на фотокolorиметре при длине волны 720 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы фенольных соединений в процентах (X) в пересчете на галловую кислоту в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле :

$$X = \frac{50 * 10 * D * 100}{0,2 * m * (100 - W) E_{1\%1\text{см}}}$$

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

E 1%1 см – удельный показатель поглощения галловой кислоты в комплексе с реактивом Фолина при длине волны 720 нм, равный 90;

m – масса сырья в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

2.4. Определение содержания суммы флавоноидов

К 0,4 мл полученного экстракта прибавляли 4 мл 0,05 моль/л раствора алюминия хлорида в этаноле. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на фотоколориметре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм. В качестве раствора сравнения использовали 0,05 моль/л раствор алюминия хлорида в этаноле.

Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на гликозиды кверцетина в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{50 * 5,1 * D * 100 * 2}{1 * E_{1\%1\text{см}} * m * (100 - W)}$$

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

E 1%1 см – удельный показатель поглощения гликозидов кверцетина в комплексе с алюминия хлоридом в этаноле при длине волны 410 нм, равный 330;

m – масса сырья в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

2.5. Статистическая обработка данных

Для обработки полученных результатов использовали стандартные методы вариационной статистики. Основными статистическими характеристиками служили: среднее арифметическое (x), среднее квадратичное отклонение (σ), ошибка средней величины (Sx) и достоверность отличий между средними величинами (t)[99].

Для определения среднего арифметического (x), среднего квадратичного отклонения (σ), ошибки средней величины (Sx) использовали пакет статистического анализа данных программы Excel.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние D-триптофана на ростовые параметры каллусных клеток растений семейства *Aporosynaceae*

3.1.1. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

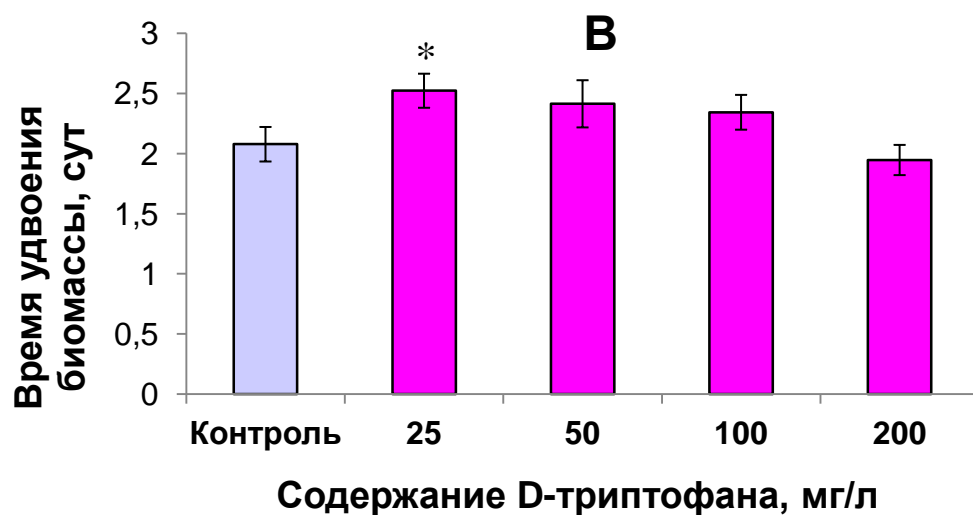
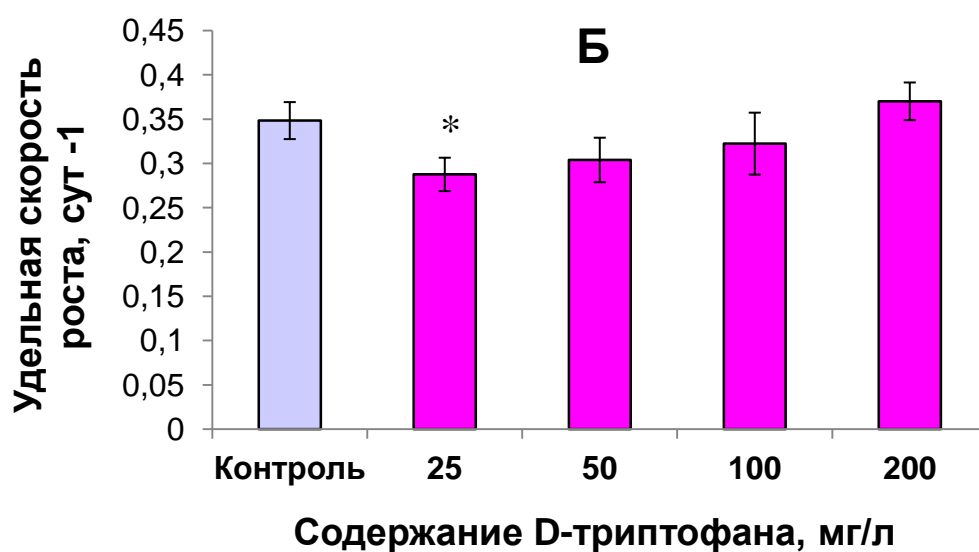
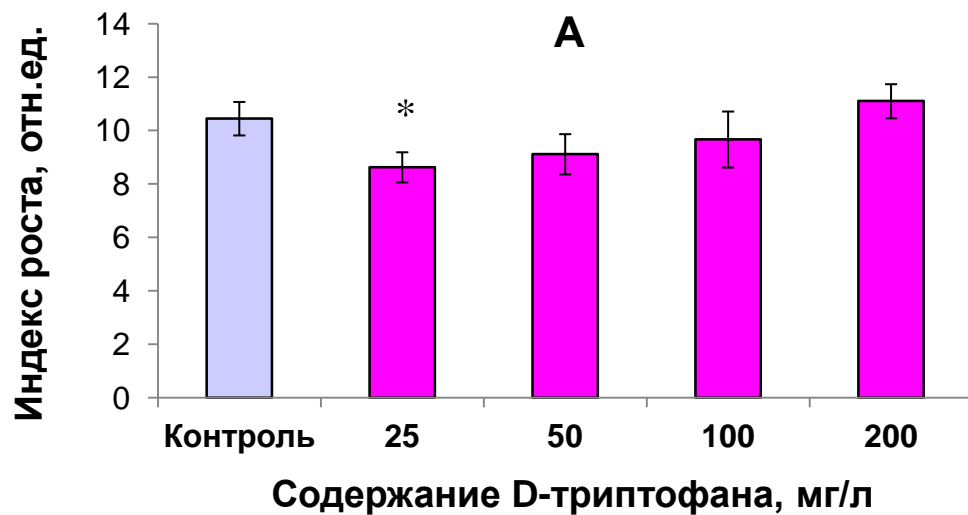
Важнейшей характеристикой, позволяющей оценить активность первичных процессов метаболизма в культурах клеток и тканей, являются ростовые параметры данной культуры. Нами оценивались удельная скорость роста, время удвоения биомассы и индекс роста.

На первом этапе исследования было проведено изучение влияния D-триптофана на ростовые характеристики каллусных тканей катарантуса розового (рисунок 3.1) и барвинка малого. В результате проведенных исследований было выявлено, что добавление D-триптофана в среду культивирования в концентрациях 50 мг/л, 100 мг/л и 200 мг/л не оказало статистически достоверного влияния на ростовые параметры каллусной культуры *Catharanthus roseus* по сравнению с контрольным вариантом.

При анализе индекса роста, было установлено, что включение D-триптофана в среду культивирования каллусной ткани *Catharanthus roseus* в концентрации 25 мг/л приводило к снижению (ингибированию) данного ростового параметра на 21% по сравнению с контролем. В контрольном варианте индекс роста составлял 10,45 отн.ед., а при добавлении в питательную среду D-триптофана в концентрации 25 мг/л – 8,63 отн.ед.

Включение D-триптофана в среду культивирования каллусной ткани *Catharanthus roseus* в концентрации 25 мг/л приводило к уменьшению удельной скорости роста на 17 % по сравнению с контрольным вариантом. Удельная скорость роста в контрольном варианте составила 0,35 сут⁻¹, а при добавлении 25 мг/л D-триптофана 0,29 сут⁻¹.

При изучении времени удвоения биомассы, было выявлено, что включение D-триптофана в среду культивирования каллусной ткани *Catharanthus roseus* приводило к увеличению времени удвоения биомассы (рисунок 3.1) на 21% по сравнению с контролем при добавлении в питательную среду D-триптофана в концентрации 25 мг/л. В контрольном варианте время удвоения биомассы составляло 2,08 сут, а при добавлении 25 мг/л триптофана данный показатель составил 2,52 сут.



А – индекс роста, Б – удельная скорость роста, В – время удвоения биомассы
Рисунок 3.1 – Влияние D-триптофана на ростовые характеристики каллусной ткани *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

3.1.2. *Vinca minor* L.

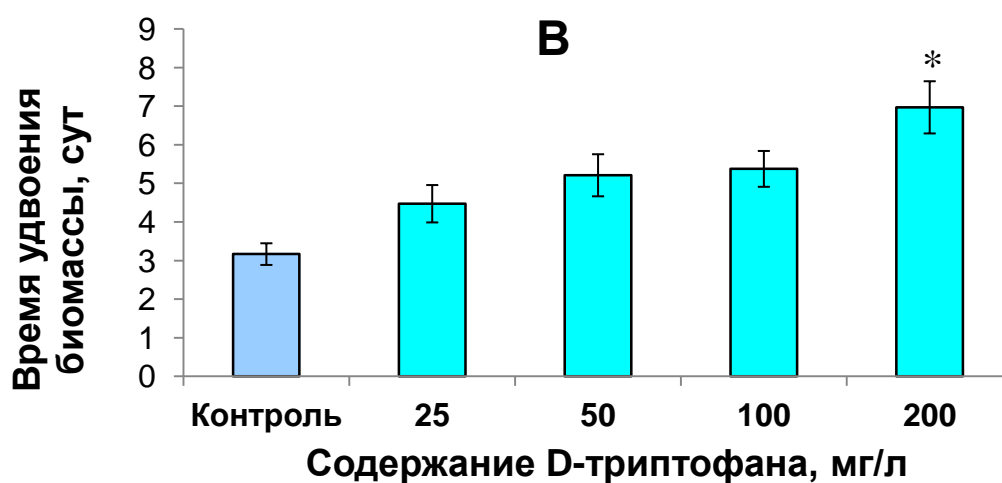
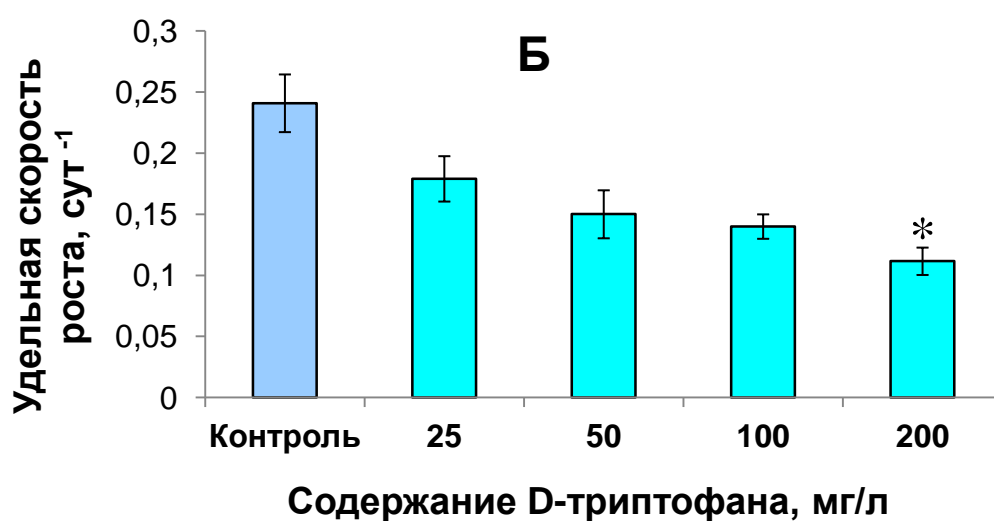
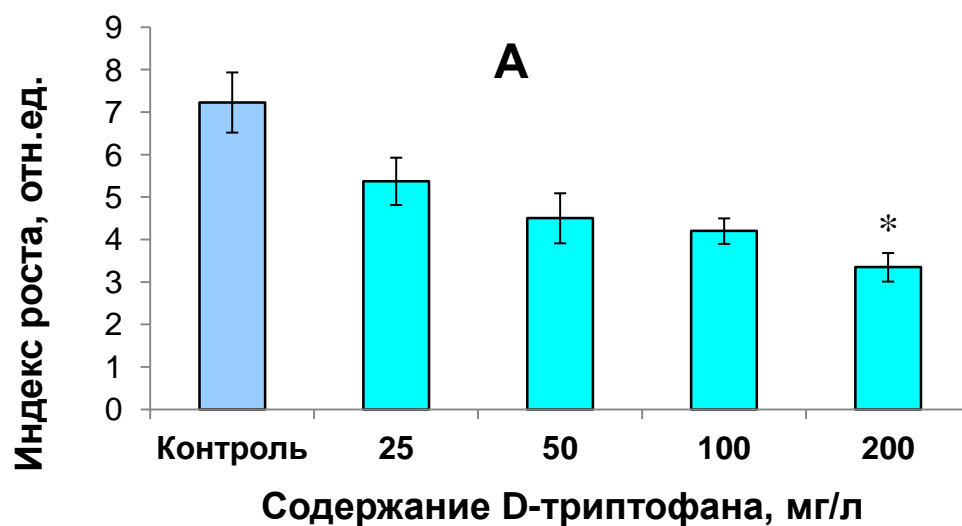
Важнейшей характеристикой, позволяющей оценить активность первичных процессов метаболизма в культурах клеток и тканей, являются ростовые параметры данной культуры. Нами оценивались удельная скорость роста, время удвоения биомассы и индекс роста.

При изучении влияния D-триптофана на ростовые характеристики каллусной ткани барвинка малого (рисунок 3.2), было установлено, что внесение данной аминокислоты в концентрациях 25 мг/л, 50 мг/л и 100 мг/л не оказало статистически достоверного влияния на ростовые параметры каллусной культуры *Vinca minor* по сравнению с контрольным вариантом.

При исследовании индекса роста каллусной культуры *Vinca minor*, культивируемой на среде содержащей D-триптофан в концентрации 200 мг/л, было выявлено, что данная концентрация оказывала минимальное ингибирующее действие и составило 16% по сравнению с контролем. В контрольном варианте индекс роста составил 7,23 отн. ед. При добавлении в питательную среду 25 мг/л D-триптофана индекс роста составлял 5,37 отн.ед., а при добавлении 200мг/л D-триптофана 3,35 отн. ед.

При анализе удельной скорости роста, было установлено, что максимальное ингибирование данного ростового параметра наблюдается при добавлении в питательную среду 200 мг/л D-триптофана и составляет 51,7% по сравнению с контролем. В контрольном варианте удельная скорость роста составляла $0,24 \text{ сут}^{-1}$, а при добавлении 200 мг/л D-триптофана – $0,11 \text{ сут}^{-1}$.

При изучении времени удвоения биомассы, было выявлено, что включение D-триптофана в среду культивирования каллусной ткани *Vinca minor*, максимальное увеличение времени удвоения биомассы наблюдалось при концентрации 200 мг/л D-триптофана и составляло 120% по отношению к контрольному образцу. В контроле время удвоения биомассы составляло 3,17 сут, а при добавлении 200 мг/л триптофана 6,97 сут.



А – индекс роста, Б – удельная скорость роста, В – время удвоения биомассы
Рисунок 3.2 – Влияние D-триптофана на ростовые характеристики каллусной ткани *Vinca minor* L.

Согласно результатам исследований других авторов, включение L-триптофана в среду культивирования, либо обработка листьев растений приводила, напротив, к стимуляции ростовых процессов. Так, например, триптофан в высоких концентрациях повышал формирование эмбрионного каллуса в некоторых сортах риса [90], а обработка листьев *Valencia orange* раствором L-триптофана в концентрации 100 мг/л приводила к стимуляции ростовых параметров [91]. При этом, стимулирующее действие протеиногенной аминокислоты – L-триптофана на ростовые процессы может быть объяснено превращением экзогенного триптофана в индолилуксусную кислоту [91,102].

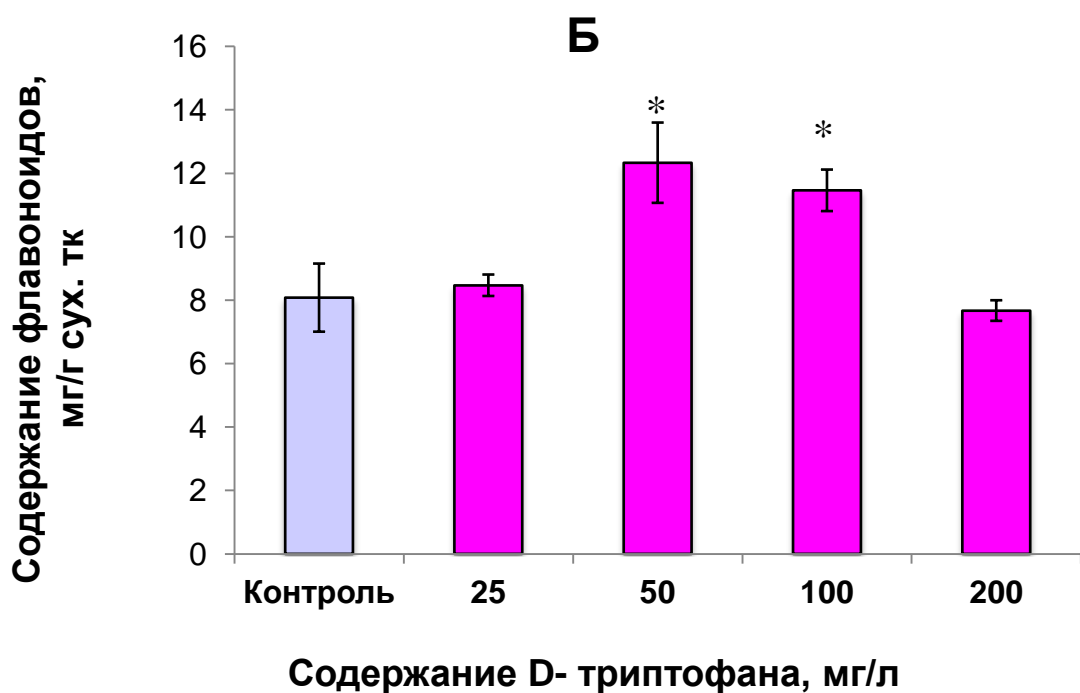
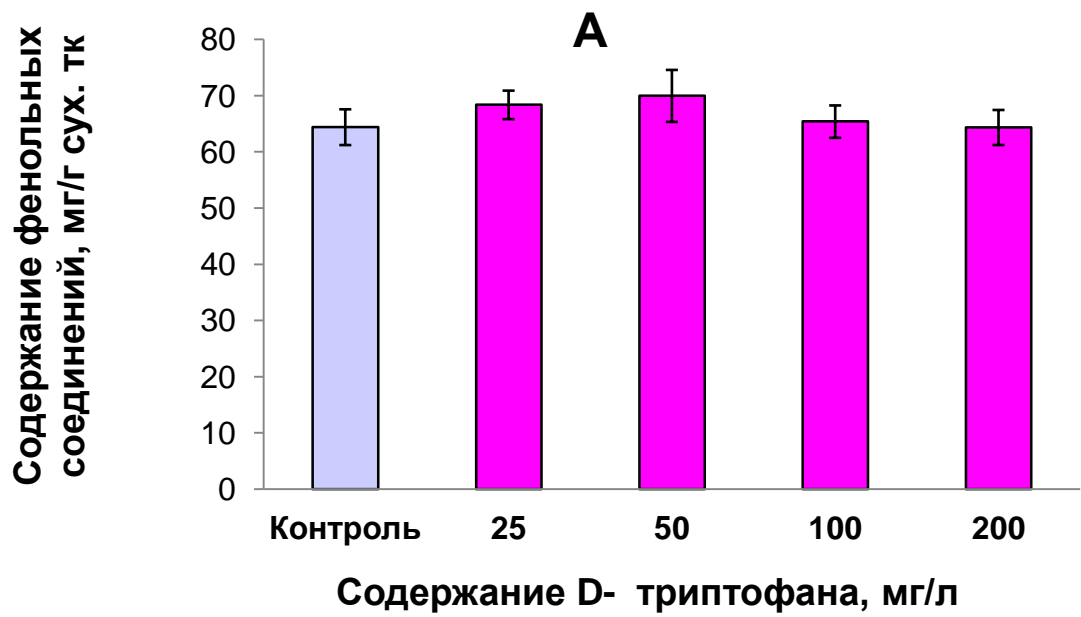
3.2. Влияние D-триптофана на накопление суммы фенольных соединений и флавоноидов

3.2.1. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

На следующем этапе исследования нами было проанализировано влияние D-триптофана на накопление таких вторичных метаболитов как фенольные соединения. В данной работе исследовалось как содержание суммы фенольных соединений, так и содержание подкласса фенольных соединений – флавоноидов.

При изучении влияния D-триптофана на накопление суммы фенольных соединений (рисунок 3.3) в каллусной культуре *Catharanthus roseus*, было выявлено, что добавление данной аминокислоты в концентрациях 25 мг/л, 50 мг/л, 100 мг/л и 200 мг/л не оказало статистически достоверного влияния на накопление суммы фенольных соединений каллусной культуры по сравнению с контрольным вариантом. В контрольном варианте содержание фенольных соединений составило 64,4 мг/г сухой ткани.

При изучении влияния D-триптофана на накопление суммы флавоноидов (рисунок 3.3) в каллусной ткани *Catharanthus roseus*, было установлено, что в контрольном варианте содержание флавоноидов составляло 8,08 мг/г сухой ткани, а при добавлении данной аминокислоты в концентрации 50 мг/л – 12,33 мг/г. Добавление D-триптофана в питательную среду в концентрациях 25 мг/л и 200 мг/л не оказало статистически достоверного влияния на накопление флавоноидов в каллусной культуре *Catharanthus roseus*. При добавлении в питательную среду D-триптофана в концентрациях 50 мг/л и 100 мг/л происходило увеличение содержания флавоноидов на 53% и 42% соответственно по сравнению с контрольным вариантом.



А – сумма фенольных соединений, Б – сумма флавоноидов

Рисунок 3.3 – Влияние D-триптофана на накопление фенольных соединений и флавоноидов в каллусной ткани *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

3.2.2. *Vinca minor* L.

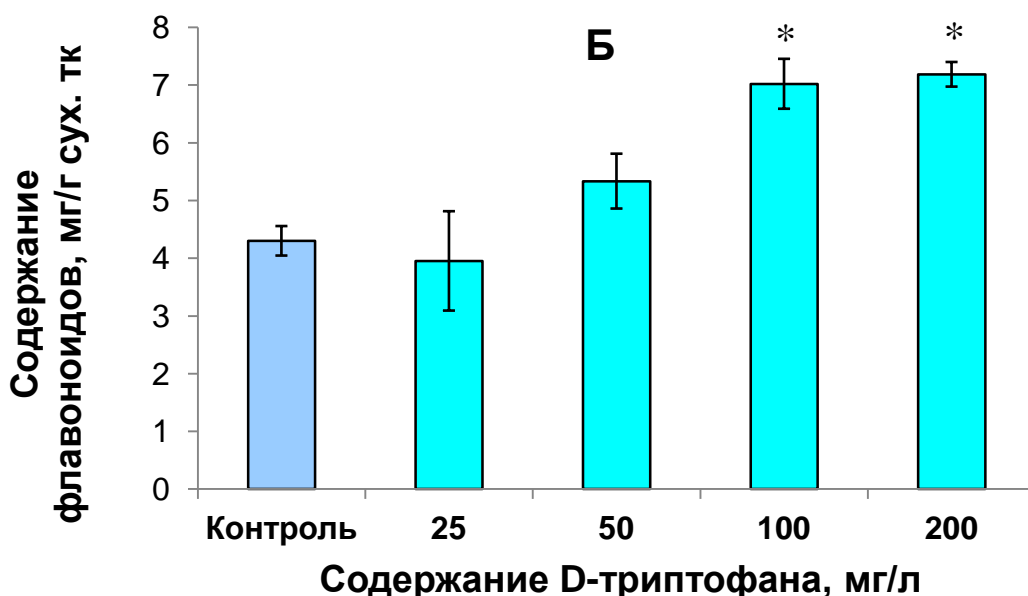
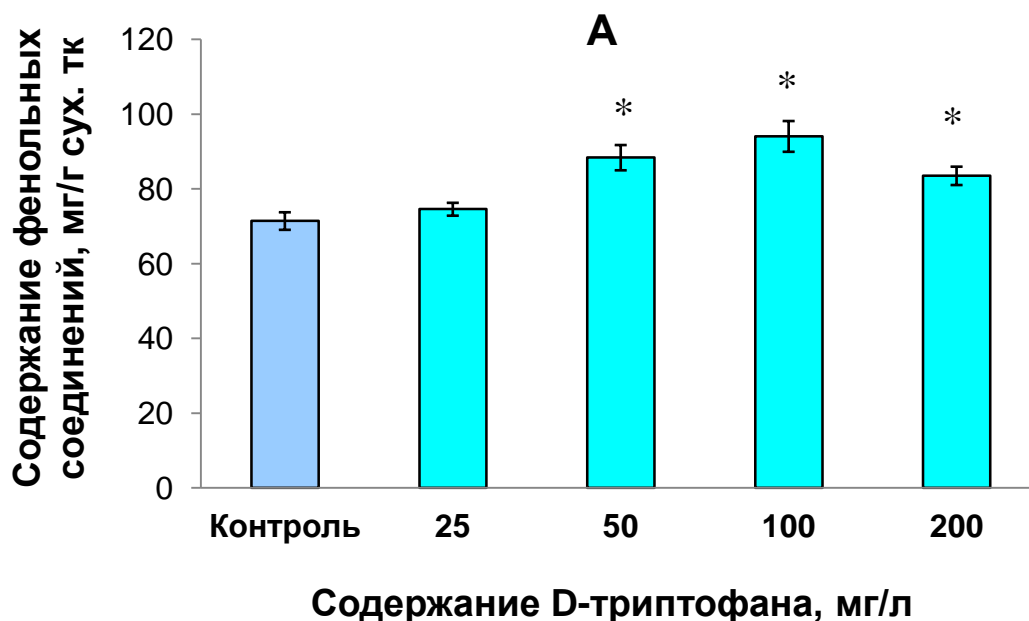
Анализ влияния D-триптофана на накопление фенольных соединений (рисунок 3.4) в каллусной ткани *Vinca minor*, показал, что добавление в питательную среду триптофана концентрации 25 мг/л не оказывало статистически достоверного влияния на каллусную культуру по сравнению с контролем.

При включении D-триптофана в среду культивирования каллусной ткани *Vinca minor*, в концентрациях 50 мг/л, 100 мг/л и 200 мг/л наблюдалось увеличение содержания фенольных соединений на 24%, 32% и 17% соответственно. Содержание фенольных соединений в контрольном образце составило 7,14 мг/г сухих тканей, а при добавлении 100 мг/л D-триптофана – 9,41 мг/г сухих тканей.

При изучении влияния D-триптофана на накопление флавоноидов (рисунок 3.4) в каллусной ткани *Vinca minor*, было выявлено, что при добавлении в среду культивирования данной аминокислоты в концентрации 25 мг/л не оказала статистически достоверного влияния на накопление флавоноидов по сравнению с контрольным вариантом.

При добавлении в питательную среду D-триптофана в концентрации 50 мг/л наблюдалось незначительное увеличение накопления флавоноидов в каллусной культуре *Vinca minor*.

Максимальное накопление флавоноидов в каллусной культуре *Vinca minor* происходило при добавлении в питательную среду D-триптофана в концентрациях 100 мг/л и 200 мг/л и составляло 63% и 67% соответственно по сравнению с контролем. В контрольном варианте содержание флавоноидов составило 4,3 мг/г сухой ткани, при добавлении в питательную среду 200 мг/л и 100 мг/л D-триптофана – 7,19 мг/г и 7,02 мг/г сух.тк. соответственно.



А – сумма фенольных соединений, Б – сумма флавоноидов

Рисунок 3.4 – Влияние D-триптофана на накопление фенольных соединений и флавоноидов в каллусной ткани *Vinca minor* (L.) G. Don

Согласно результатам других исследователей, включение в среду культивирования L-триптофана в концентрации 150 мг/л также приводило к стимуляции накопления соединений фенольного ряда, в частности – тимола на 390% по сравнению с контролем в каллусной культуре *Verbascum thapsus* L. [101].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Добавление D-триптофана в среду культивирования каллусной ткани *Catharanthus roseus* в концентрации 25 мг/л приводило к ингибированию ростовых показателей (за исключением времени удвоения биомассы) на 17-21%. Влияние данной аминокислоты на время удвоения биомассы приводило к увеличению данного ростового параметра на 21% по сравнению с контрольным вариантом. Также следует отметить, что включение D-триптофана в среду культивирования в концентрациях 50 мг/л, 100 мг/л и 200 мг/л не оказало статистически достоверного влияния на ростовые показатели исследуемой каллусной ткани.

2. Включение D-триптофана в среду культивирования каллусной ткани *Vinca minor* L. приводило к снижению ростовых параметров на 16-51,7% по сравнению с контрольным вариантом. Причем максимальное ингибирование роста наблюдалось в каллусной ткани *Vinca minor* L., культивируемого на среде в состав которой был включен D-триптофан в концентрации 200 мг/л. Данная аминокислота, при ее включении в среду культивирования, в концентрациях 25 мг/л, 50 мг/л и 100 мг/л не оказала статистически достоверного влияния на ростовые показатели каллусной культуры *Vinca minor* L. по сравнению с контролем.

3. Внесение D-триптофана в среду культивирования каллусной ткани *Catharanthus roseus* в концентрациях 25 мг/л, 50 мг/л, 100 мг/л и 200 мг/л не оказало статистически достоверного влияния на накопление суммы фенольных соединений каллусной культуры по сравнению с контрольным вариантом. Добавление D-триптофана в среду культивирования в концентрациях 50 мг/л и 100 мг/л приводило к увеличению содержания флавоноидов в каллусной культуре *Catharanthus roseus* на 53% и 42% соответственно по сравнению с контрольным вариантом.

4. Включение D-триптофана в среду культивирования каллусной ткани *Vinca minor* L. в концентрациях 50 мг/л, 100 мг/л и 200 мг/л приводило к увеличению содержания фенольных соединений на 24%, 32% и 17% соответственно по сравнению с контрольным вариантом. Максимальное накопление флавоноидов в каллусной культуре *Vinca minor* L. происходило при добавлении D-триптофана в среду культивирования в концентрациях 100 мг/л и 200 мг/л и составляло 63% и 67% соответственно по сравнению с контрольным вариантом.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Основы биотехнологии растений. Культура растительных клеток и тканей: учебное пособие / Т.Б. Решетникова [и др.]; под общ. Ред. И.К.Сорокиной; УМК биологического факультета СГУ им. Н.Г.Чернышевского. – М., 2002.
2. Носов, А.М. – Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений. 1999. Т. 46. №6. – С. 837-844.
3. Алёхина, Н.Д. – Физиология растений / Н.Д. Алёхина, Ю.В.Балконин, В.Ф. Гавриленко. – М.: Академия, 2005. – С. 416-498, 588-593.
4. Бутенко, Р.Г. – Клеточная инженерия / Р.Г. Бутенко, М.В. Гусев, А.Ф. Киркин. – М.: Высшая школа, 1987.
5. Бутенко, Р.Г. – Биология культивируемых клеток и биотехнология растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1991.
6. Валиханова, Г.Ж. – Культура клеток и биотехнология растений. Учебное пособие / Г.Ж. Валиханова, И.Р.Рахимбаев. – Алма-Ата: изд.КазГУ, 1989.–80 с.
7. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза / В.М. Юрин [и др.]; под общ.ред. В.М. Юрина. – Минск: БГУ, 2010. – 4 т, выпуск 2.
8. Кьосьев, П.А. – Полный справочник лекарственных растений / П.А. Кьосьев. – Москва: Эксмо, 2007 г. – С. 881-882.
9. Verma, A. Simplified Procedure for Indole Alkaloid Extraction from *Catharanthus roseus* combined with a Semi-synthetic Production Process for Vinblastine / A. Verma, I. Laakso // *Molecules*. – 2007. – Vol. 12. – P. 1307-1315.
10. Лекарственные растения / А.Ф. Гаммерман [и др.]; под общ.ред. А.Ф. Гаммермана. – М.: Высшая школа, 1975. – С.375-376.
11. Мазнев, Н.И. Энциклопедия лекарственных растений / Н.И. Мазнев – 3-е изд., испр. и доп. - М.: Мартин, 2004. – 496 с.
12. Лекарственные препараты в России: справочник / редкол.: сост. Исаков Ф.Ю. [и др.]. – М.: АстраФармСервис, 2001. – 1536 с.
13. Facchini, P.J. Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering application. *Phytochemistry*, 2000. – v. 54. – p. 121-138.
14. Kang, K. Enzymatic features of serotonin biosynthetic enzymes and serotonin biosynthesis in plants. *Plant signaling&behavior*, 2008, v. 6, p. 389-390.
15. Bartel, B. Auxin biosynthesis. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 1997, v. 48, p. 51–66.
16. Березов, Т.Т. Биологическая химия: Учебник / Т.Т.Березов, Б.Ф. Коровкин. – 3-е изд., перераб. и доп.– М.: Медицина, 1998.– 704 с.

17. Солдатенков, А.Т. Основы органической химии лекарственных веществ / А.Т.Солдатенков, Н.М. Колядина, И. В. Шендрик. – Москва, «Химия», 2001 г.
18. Fabro, S. Toxicity and teratogenicity of optical isomers of thalidomide / S. Fabro, R.L.Smith, R.T.Williams. – Nature, 1967, v. 215, p. 296.
19. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV / M.W. Chase [and etc]. – Botanical Journal of the Linnean Society, 2016. Т. 181. № 1. С. 1–20.
20. Жизнь растений: в 6 т. / Под редакцией А.Л. Тахтаджяна, главный редактор чл.-кор. АН СССР, проф. А.А. Федоров. – М.: Просвещение, 1974.
21. Лебедев, С.И. Физиология растений / С.И. Лебедев. – М.: Колос, 2008. – 544 с.
22. Григорьева, Н.М. География растений: учебное пособие / Н.М. Григорьева – М.: Т-во науч. изданий КМК, 2014. – 400 с.
23. Березина, Н.А. Экология растений: учеб.пособие для студ. высш. учеб. заведений / Н.А. Березина, Н.Б. Афанасьева. – М.: Издательский центр «Академия», 2009. – 400 с.
24. Жмылев, П.Ю. Биоморфология растений: иллюстрированный словарь / П.Ю. Жмылев; под общ. ред . П.Ю. Жмылева. – М., 2002.
25. Родман, Л.С. Ботаника с основами географии растений / Л.С Родман. – М.: Колос, 2006. – 397 с.
26. Баландин, С.А. Общая ботаника с основами геоботаники: учебное пособие для вузов / С.А. Баландин, Л.И. Абрамова, Н.А. Березина. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – 293 с.
27. Еленевский, А.Г. Ботаника. Систематика высших, или наземных, растений: учеб.для студ. высш. пед. учеб. заведений / А.Г. Еленевский, М.П. Соловьева, В.Н.Тихомиров. – 4-е изд., испр. – М. Издательский центр «Академия», 2006. – 464 с.
28. Рейвн, П. Современная ботаника: в 2 т. / П. Рейвн, Р. Эверт, С. Айкхорн. – М.: Мир, 1990.
29. Бавтуто, Т.А. Атлас по анатомии растений / Т.А. Бавтуто, В.М. Ерёмин, М.П. Жигар. – Минск :Ураджай, 2001. – 146 с.
30. Лотова, Л.И. Ботаника: Морфология и анатомия высших растений : учеб. / Л.И. Лотова. – Изд. 3-е, испр. – М.: КомКнига, 2007. – 512 с.
31. Ботаника с основами фитоценологии: Анатомия и морфология растений: учеб.пособие для вузов / Т.И. Серебрякова [и др.]. – М.: Академкнига, 2006. – 543 с.
32. Ямских, И.Е. Ботаника: Анатомия и морфология растений: учеб.пособие / И.Е. Ямских, И.П. Филиппова. – Красноярск: Изд-во Краснояр. ун-та, 2004. – 86 с.
33. Бавтуто, Т.А. Ботаника: Морфология и анатомия растений / Т.А. Бавтуто, В.М. Еремин. – Минск: Вышэйш. шк., 1997.

34. Хржановский В.Г. Курс общей ботаники: учеб. для вузов. – 2-е изд. – М.: Высшая школа, 1982. Т.1, 2.
35. Андреева, И.И. Ботаника: учеб. для вузов / И.И. Андреева, Л.С. Родман. – М.: Колос, 2009. – 528 с.
36. Суворов, В.В. Ботаника с основами геоботаники / В.В. Суворов, И.Н. Воронов. – Л.: Колос, 2007. – 560 с.
37. Тутаюк, В.Х. Анатомия и морфология растений / В.Х. Тутаюк. – М.: Высш. шк., 2007. – 317 с.
38. Тихомиров, Ф.К. Ботаника / Ф.К. Тихомиров. – М.: Высш. шк., 2008. – 439 с.
39. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – 4 издание – Москва: Медицина, 2002. – С. 444.
40. Алексагин, Ю.В. Общая химия: учебное пособие / Ю.В. Алексагин, И.Е. Шпак. – М.: Дашков и К, 2012. – 256 с.
41. Гаршин, А.П. Общая и неорганическая химия в схемах, рисунках, таблицах, химических реакциях: учебное пособие / А.П. Гаршин. – СПб.: Питер, 2013. – 288 с.
42. Зезеров, Е.Г. Биохимия (общая, медицинская и фармакологическая): курс лекций / Е.Г. Зезеров. – Ереван: МИА, 2014. – 456 с.
43. Новиков, Н.Н. Биохимия растений / Н.Н. Новиков. – М.: Ленанд, 2014. – 680 с.
44. Рогожин, В.В. Биохимия растений: учебник / В.В. Рогожин. – СПб.: ГИОРД, 2012. – 432 с.
45. Маршалл, В.Дж. Клиническая биохимия / В.Дж. Маршалл. – М.: Бином, 2011. – 408 с.
46. Марри, Р. Биохимия человека в 2-х томах: т.1 и т.2 / Р. Марри. – М.: Мир, 2009. – 795 с.
47. Ершов, Ю.А. Биохимия человека: учебник для академического бакалавриата / Ю.А. Ершов. – Люберцы: Юрайт, 2016. – 374 с.
48. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с.
49. Гидранович, В.И. Биохимия: учебное пособие / В.И. Гидранович, А.В. Гидранович. – Мн.: ТетраСистемс, 2012. – 528 с.
50. Бородин, А.П. Биохимия животных: учебное пособие / А.П. Бородин. – СПб.: Лань, 2015. – 384 с.
51. Бокуть, С.Б. Биохимия филогенеза и онтогенеза: учебное пособие / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко, С.Б. Бокуть; Под общ. ред. А.А. Чиркин. – М.: Нов. знание, 2012. – 288 с.
52. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: ИЦ Академия, 2013. – 320 с.

53. Березов, Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина +, 2008. – 704 с.
54. Жуковский, П.М. Ботаника / П.М. Жуковский. – М.: Колос, 2007. – 623 с.
55. Лотова, Л.И. Морфология и анатомия высших растений. / Л.И. Лотова. – М.: КомКнига, 2007. – 510 с.
56. Блукет, Н.А. Ботаника с основами физиологии растений и микробиологии / Н.А. Блукет, В.Т. Емцев. – М. Колос, 2007. – 560 с.
57. Ботаническая география с основами экологии растений / В.Г. Хржановский [и др]. – М.: Колос, 2008. – 239 с.
58. Работнов, Т.А. Фитоценология / Т.А. Работнов. – М.: МГУ, 2007. – 292 с.
59. Бавтуто, Г.А. Практикум по анатомии и морфологии растений: учеб. пособие / Г.А. Бавтуто, Л.М. Ерей. – Мн.: Новое знание, 2002. – 464 с.
60. Белая, Г.А. Учебная практика по ботанике: Методическое пособие по систематике высших растений. Г.А. Белая, В.Г. Морозов. – Оренбург: ГОУ ВПО ОГУ, 2003. – 27 с.
61. Лекарственное сырьё растительного и животного происхождения. Фармакогнозия: учебное пособие / под ред. Г.П. Яковлева. – СПб.: СпецЛит, 2006. – 845 с.
62. Богданов, А.А. Химические основы генетической инженерии / А. А. Богданов, З.А. Шабарова, А.С. Золотухин. – М.: Изд-во МГУ, 2004, - 224 с.
63. Молчан, О.В. Идентификация фармакологически активных веществ в экстрактах листьев барвинка малого (*Vinca minor* L.) / О.В. Молчан [и др.]. – Минск: БГУ, 2008. – т. 3, ч. 1.
64. Кретович, В.Л. Биохимия растений / В.Л. Кретович. – М.: Высшая школа, 2000. – 445 с.
65. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия / Д.Г. Кнорре. – М.: Высшая школа, 2003. – 479 с.
66. Кухта, В.К. Биологическая химия: учебник / В.К. Кухта. – М.: Бином, 2008. – 688 с.
67. Бертини, И. Биологическая неорганическая химия: структура и реакционная способность. В 2 т. / И. Бертини. – М.: Бином, 2014. – 1079 с.
68. Данченко, Е.О. Биохимия. Медицинская литература / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – Москва, 2010. – 608 с.
69. Цыганов, А.Р. Биохимия. Практикум / А.Р. Цыганов, И.В. Сучкова, И.В. Ковалева. – Москва, 2007. – 152 с.
70. Дитченко, Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений: курс лекций / Т.И. Дитченко. – Минск: БГУ, 2007. – 114 с.
71. Бутенко, Р.Г. Изолированные протопласты растений – объект и модель для физиологических исследований // Культура клеток растений – М.: Наука, 1981. – С. 69-84.

72. Биотехнология. / Под ред. А.А. Баева. М.: Наука, 1984. – 309 с.
73. Атанасов, А. Биотехнология в растениеводстве / А.Атанасов. – Новосибирск: ИЦ и Г СО РАН, 1993. – 241 с.
74. Валиханова, Г.Ж. Биотехнология растений / Г.Ж. Валиханова. – Алматы: Конжык, 1996. – 272 с.
75. Глеба Ю.Ю. Гибридизация соматических клеток растений. // Культура клеток растений. – М.: Наука, 1981. – С. 85-91.
76. Елдышев, Ю.Н. Современная биотехнология/Ю.Н. Елдышев. – М: Тайдекс Ко, 2004.
77. Бутенко, Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р. Г.Бутенко. – М.: Наука, 1964. –272 с.
78. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Глик Б., Пастернак Дж.. — М.: Мир, 2002.
79. Егорова Т. А., Клунова С. М., Живухин Е. А. Основы биотехнологии. — М., 2003.
80. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2nd ed. – Wash., 1999.
81. Сассон, А. Биотехнология: свершения и надежды / Сассон А. – М.: Мир, 1987.
82. Камкин, А.Г. Физиология и молекулярная биология мембран клеток / А.Г. Камкин, И.С. Киселева. – Москва: Академия, 2008. – 592 с.
83. Катаева, Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – д 96 с.
84. Носов А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений. // Биология культивируемых клеток и биотехнология. М.: Наука, 1991. – С. 5-19.
85. Милов Д., Изворска Н. Состояние и дальнейшее развитие работы с культурами *in vitro*. // Международный агропромышленный журнал. № 2. 1990. – С. 72-78.
86. Бекер, М.Е. Биотехнология / М.Е. Бекер, Г.К. Лиепиньш, Е.П. Райпулис. – М.: Агропромиздат, 1990. – 334 с.
87. Бутенко, Р.Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения. // Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – С. 3-20.
88. Калинин, Ф.Л. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: Науковадумка, 1980. – 488 с.
89. Дмитриева, Н.Н. Проблема регуляции морфогенеза и дифференциации в культуре клеток и тканей растений. // Культура клеток растений. – М.: Наука, 1981. – С.113-123.
90. Siriwardana S., Nabors W. Tryptophan enhancement of somatic embryogenesis in Rice. *Plant Physiology*, 1983, v. 73, p. 142-146.

91. Hanafy Ahmed A.H., Khalil M.K., Abd El-Rahman A.M. Effect of zinc, tryptophan and indole acetic acid on growth, yield and chemical composition of *Valencia orange* trees. *Journal of applied sciences research*, 2012, v. 8, iss. 2, p. 901-914.
92. Семенов, А.А. Очерк химии природных соединений. – Новосибирск: Наука. Сибирская издательская фирма РАН, 2000. – 664 с.
93. Авдеева, Л.В. Биохимия: учебник / Л.В. Авдеева, Т.Л. Алейникова, Л.Е. Андрианова; Под ред. Е.С. Северин. – М.: Геотар-мед, 2013. – 768 с.
94. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 томах. / В.С. Камышников. – Мн.: Беларусь, 2012. – 958 с.
95. Рогожин, В.В. Биохимия растений: учебник / В.В. Рогожин. – СПб.: ГИОРД, 2012. – 432 с.
96. Копылова, Н.А. Химия и биология в таблицах и схемах / Н.А. Копылова. – Рн/Д: Феникс, 2013. – 250 с.
97. Рогожин, В.В. Практикум по физиологии и биохимии растений: учебное пособие / В.В. Рогожин, Т.В. Рогожина. – СПб.: ГИОРД, 2013. – 352 с.
98. Ауэрман, Т.Л. Основы биохимии: учебное пособие / Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Сусянок. – М.: НИЦ ИНФРА-М, 2013. – 400 с.
99. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – М.: Высш. школа, 1978. – 312 с.
100. Медицинский сайт MedBe.ru: биотехнологии и биоматериалы [Электронный ресурс] / Условия и методы культивирования тканей *in vitro* – Режим доступа: <http://medbe.ru/materials/problemu-i-metody-biotekhnologii/usloviya-i-metody-kultivirovaniya-tkaney-in-vitro/>. – Дата доступа: 23.05.2018.
101. Al-Jibouri A.M.J. Abed A.S., Ali A.-J. A., Majeed D.M. Improvement of phenols production by amino acids in callus cultures of *Verbascum thapsus* L. *American Journal of Plant Science*, 2016, v. 7, p. 84-91.
102. Филиппова, С.Н. Влияние D-триптофана на ростовые характеристики и накопление фенольных соединений в каллусной культуре *Vinca minor* L. / С.Н. Филиппова, А.А. Семененкова, В.М. Юрин. – Минск: БГУ.
103. Рекославская, Н.И. Образование и физиологическая роль D-триптофана при прорастании у пшеницы / Н.И. Рекославская [и др.] // Физиология Растений. – 1997. – Т.44, № 2. – С.262-267.
104. Zhao Y. Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants // *Mol. Plant*. 2012 V. 5 No. 2 P. 334–338.