

**Национальная академия наук Беларуси
Центральный ботанический сад**

**Интродукция, сохранение и использование
биологического разнообразия мировой флоры**

Материалы Международной конференции,
посвященной 80-летию Центрального ботанического сада
Национальной академии наук Беларуси
(19–22 июня 2012 г., Минск, Беларусь)

**В двух частях
Часть 2**

**Assessment, Conservation and Sustainable Use
of Plant Biological Diversity**

Proceedings of the International Conference
dedicated to 80th anniversary of the Central Botanical Garden
of the National Academy of Sciences of Belarus
(June 19–22, 2012, Minsk, Belarus)

**In two parts
Part 2**

Минск
2012

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

И73

Редакционная коллегия:

*Д-р биол. наук В.В. Титок (ответственный редактор);
д-р биол. наук, академик НАН Беларуси В.Н. Решетников;
д-р биол. наук, ч.-кор. НАН Беларуси Ж.А. Рупасова;
д-р биол. наук, чл.-кор. НАН Беларуси Е.А. Сидорович;
канд. биол. наук Ю.Б. Аношенко; канд. биол. наук А.В. Башилов;
канд. биол. наук А.А. Веевник; канд. биол. наук И.К. Володько;
канд. биол. наук И.М. Гаранович; канд. биол. наук Л.В. Гончарова;
канд. биол. наук А.А. Кузовкова; канд. биол. наук Л.В. Кухарева;
канд. биол. наук Н.М. Лунина; канд. биол. наук Е.В. Спиридович;
канд. биол. наук В.И. Торчик; канд. биол. наук О.В. Чижик;
канд. биол. наук А.Г. Шутова; канд. биол. наук А.П. Яковлев.*

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций

И 73 **Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры;** Материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. (19–22 июня 2012, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. Наук Беларуси, Централ. ботан. сад; редкол.: В.В. Титок /и др./, Минск, 2012. – 492 с.

В сборнике представлены материалы Международной конференции «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры», посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси.

В 1-й части публикуются тезисы докладов секций «Теоретические основы и практические результаты интродукции растений» и «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства»

Во 2-й части представлены тезисы докладов секций «Экологическая физиология и биохимия интродуцированных растений», «Генетические и молекулярно-биологические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений» и «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира».

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

Влияние освещения на содержание алкалоидов в каллусной культуре *Vinca minor*

Ромашко С.Н., Янецвич А.В.¹, Червяковский Е.М., Молчан О.В., Юрин В.М.

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь,
e-mail: svetlan_rom@mail.ru

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

Резюме. С помощью хроматографии в тонком слое, а также хромато-масс-спектрометрического анализа был изучен качественный состав алкалоидов индольного ряда в каллусной ткани *Vinca minor*. Основными алкалоидами каллусов *Vinca minor* являлись дегидровинкамайин и дегидровинцин. Показано, что свет и фитогормоны в концентрациях $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кинетин и $0,1\text{--}1,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ НУК являются стимулирующими факторами для накопления дегидрированных метаболитов винкамайина и винцина в каллусной культуре. Основной алкалоид листьев барвинка малого – винкамин в культуре обнаружен не был.

Summary. Terpenoid indole alkaloids of methanolic extracts of *Vinca minor* callus were studied using TLC and HPLC-MS. The major alkaloids of the *Vinca minor* callus were vincamajine and vincine dehydromethabolites. The effects of light and plant growth regulators combinations on accumulation of the dehydrovincamajine and dehydrovincine were investigated. Light treatment were found to be beneficial to the accumulation of vincamajine and vincine methabolites when MS medium was supplemented with 1 mg l^{-1} kinetin and $0,1\text{--}1,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAA. Production of vincamine has not been achieved in callus cultures.

Введение. Применение культуры *in vitro* имеет множество преимуществ перед традиционным культивированием растений в открытом и защищенном грунте, а также химическим синтезом для производства многих биологически активных соединений. Из преимуществ следует отметить: независимость от климатических условий, отсутствие негативного влияния патогенов или других биологических факторов, строго контролируемые условия культивирования, культура клеток и тканей является возобновляемым источником экологически чистых вторичных метаболитов [1]. Однако использование технологии *in vitro* не всегда приводит к сравнимому с нативным растением уровню биосинтеза фармакологически активных метаболитов. Поэтому разработка приемов, позволяющих стимулировать процессы биосинтеза биологически активных веществ в клетках культуры *in vitro* является, несомненно, актуальной задачей биотехнологии растений [2, 3].

Барвинок малый (*Vinca minor* L.) – многолетний вечнозеленый стелющийся полукустарник семейства кутровых (*Aposynaceae*) – является одним из высокоценных лекарственных растений. В барвинке малом содержится около 45 алкалоидов, близких по природе к резерпину, в том числе: винкамин (минорин), винцин, винкаминин (винкарейн), миновинцин, винкамайин, винканорин, винкаминорин, винкамидин, резерпин и другие [4, 5, 6, 7]. Содержание суммы алкалоидов в данном растении может варьировать в пределах 0,15–1%. Основными являются винкамин (0,05–0,13%), 1,2-дегидроаспидоспермидин (0,06%) и винкаминореин (0,028%) [8, 9]. Препараты, содержащие сумму алкалоидов барвинка, используются для лечения гипертонической болезни I и II стадии, церебральных форм гипертонии, гипертонических кризов, неврогенной тахикардии и т. д.

Исследований, касающихся определения накопления алкалоидов индольного ряда в культуре клеток и тканей *Vinca minor*, крайне мало. На данный момент известно только, что в культуре побегов (multiple shoot culture) может синтезироваться винкамин, содержание которого составляло 0,42% (в пересчете на сухой вес), что в 2 раза превышало накопление указанного вещества в нативном растении [10]. Однако присутствие винкамина ни в каллусной, ни и в суспензионной культурах до настоящего времени установлено не было, несмотря на то, что предпринимались отдельные попытки [11].

В литературе также отсутствуют данные, касающиеся влияния экзогенных фитогормонов, а также света на накопление алкалоидов индольного ряда, в каллусной и суспензионной культурах барвинка малого. Таким образом, представилось целесообразным изучить влияние света и синтетического аналога ИУК – НУК на содержание алкалоидов в каллусной культуре *Vinca minor*.

Материалы и методы. Объектом исследования являлась 3-летняя каллусная ткань растения семейства *Aposynaceae* – *Vinca minor*. Культивирование каллуса проводили на среде Murashige and Skoog's (MS) [12], содержащей $30 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ сахарозы, $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ пиридоксина, $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ тиамина хлорида и $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ глицина, фитогормоны (кинетин – $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, НУК – $0,1\text{--}1,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$), при 25°C в термостате в темноте либо на свету. Пересадку осуществляли каждые 30 дней.

Экстракцию и очистку алкалоидов индольного ряда проводили согласно методике, описанной ранее [13] с небольшими изменениями. Качественный анализ полученных экстрактов осуществляли методом ТСХ на пластинках Silica gel 60 F_{254} (Merck, Германия). В качестве подвижной фазы использовали систему хлороформ:метанол в соотношении 9:1. В качестве стандарта использовали винкамина гидрохлорид (Sigma, США). На пластину наносили 2 мкл 2 мМ раствора стандартного соединения. Объем вносимой пробы экстракта составлял 5 мкл. При УФ облучении пластин фиксировали специфическую бриллиантово-синюю флуоресценцию пятен, соответствующую индивидуальным алкалоидам.

Идентификацию и количественный анализ алкалоидов проводили с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричной детекцией (Agilent 1100, США), и масс-спектрометрической детекцией (Accela LCQ Fleet, Thermo Sci., USA). Для разделения использовали хроматографическую колонку Nucleodur C18 Isis (4,6 x 50 мм; 1,8 мкм). Образец (25 мкл) элюировали с колонки со скоростью 0,4 мл/мин. линейным градиентом растворителя В (ацетонитрил) в растворителе А (25 мМ раствор ацетата аммония, рН 6,8): 0–17 мин. 20–46% В, 17–22 мин. 46–50% В; 22–25 мин. 50–53% В; 25–28 мин. 53–100% В; 28–35 мин. 100% В.

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с использованием химической ионизации в режиме регистрации положительных ионов. Параметры источника ионизации: напряжение на конусе – 22 В, скорость потока осушающего газа (азот) – 30 А.У.; скорость потока вспомогательного газа (азот) – 5 А.У.; температура капилляра – 275° С; напряжение на капилляре – 22 В; температура десольватации – 350° С; диапазон сканирования, 50–1500 Да.

Результаты. На рис. 1 представлены хроматограммы очищенных алкалоид-содержащих экстрактов гетеротрофных и фотомиксотрофных каллусов *Vinca minor*. Как видно на рис. 1А, в экстрактах каллусных тканей, культивируемых в темноте, содержание алкалоидов низкое (рис. 1). В экстрактах фотомиксотрофных каллусов (рис. 1Б) присутствовали соединения, Rf которых составляли: 0,03, 0,05, 0,15, 0,52 и 0,63. Причем величина Rf одного из соединений совпала с величиной Rf винкамина (0,52) – основного алкалоида листьев *Vinca minor*. Таким образом, возможно, свет существенно стимулирует синтез или накопление терпеновых алкалоидов индольного ряда в каллусной культуре барвинка малого. Эти данные согласуются с результатами, полученными другими исследователями, при изучении биосинтеза алкалоидов катарантуса розового. Так, например, было установлено, что облучение светом стимулировало синтез отдельных алкалоидов индольного ряда в каллусной культуре *Catharanthus roseus* [2].

Известно, что экзогенно вносимые в среду инкубации культур клеток и тканей фитогормоны играют важнейшую роль в биосинтезе вторичных метаболитов, в частности, алкалоидов [3].

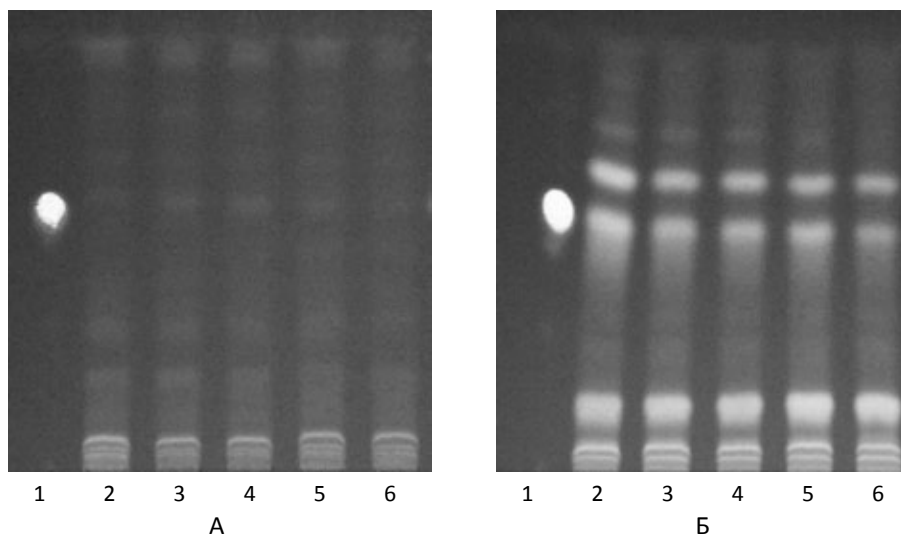


Рисунок 1. Хроматограммы экстрактов каллусов *Vinca minor*, культивируемых в темноте (А) и на свету (Б) при различной концентрации НУК в среде инкубации (1 – винкамин, 2 – 0,1; 3 – 0,25; 4 – 0,5; 5 – 1; 6 – 1,5 мг · л⁻¹ НУК в среде культивирования).

Например, показано, что ауксины репрессируют биосинтез указанных соединений в культуре *in vitro Catharanthus roseus*, в то время как жасмонат, цитокинины, а также этилен – активируют [2, 14, 15]. Согласно результатам ТСХ, НУК в низких концентрациях ($0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) в среде культивирования стимулировала накопление соединений, Rf которых составляло 0,52 и 0,63 (рис. 1Б).

Для идентификации алкалоидов индольного ряда каллусных тканей использовали ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией. Установлено, что в хроматограмме экстракта каллусной ткани, культивируемой на свету, наиболее интенсивные пики соответствуют соединениям, предположительно, являющимся дегидрированными метаболитами винцина (383 m/z , 382,5 а.е.м.) и винкамайина (365 m/z , 364,2 а.е.м.) (данные не приведены). Винцин и винкамайин, в свою очередь, вероятно, являются метаболитами основного алкалоида листьев барвинка малого – винкамина. Молекулярный ион, соответствующий винкамину (355,5 m/z), отсутствовал в масс-спектрах образцов.

Масс-спектры предполагаемых дегидрированных метаболитов винцина и винкамайина представлены на рис. 2. Химическая ионизация молекулы дегидрированного винцина, выделенного из каллусной ткани барвинка малого, приводит к образованию основного молекулярного иона со значением массового числа – 383 m/z (100%), а также осколочного иона 341 m/z (5%). В то время как фрагментация молекулы дегидрированного винкамайина приводит к образованию молекулярного иона 365 m/z .

Далее был проведен анализ относительного содержания дегидрированных метаболитов винкамайина и винцина в гетеротрофных и фотомиксотрофных каллусных тканях в присутствии в среде культивирования фитогормонов в различных концентрациях путем сравнения площадей хроматографических пиков соответствующих соединений. Проведение количественного анализа было невозможно из-за отсутствия стандартных образцов.

В экстракте гетеротрофной каллусной культуры *Vinca minor* не удалось обнаружить дегидрированного винкамайина. Возможно, это связано с отсутствием или низким уровнем экспрессии генов, кодирующих синтез ферментов, вовлеченных в биосинтез данного алкалоида в отсутствие освещения, как, например, это было показано для накопления отдельных алкалоидов катарантуса розового [2]. Однако в клетках гетеротрофной каллусной культуры присутствовал в незначительном количестве дегидрированный винцин (рис. 3Б).

В фотомиксотрофной каллусной культуре барвинка малого наблюдалось повышение накопления дегидрированных метаболитов винкамайина и винцина при всех исследуемых концентрациях ауксина в среде культивирования (рис. 3). Данные результаты согласуются с результатами, полученными при использовании метода ТСХ (рис. 1). Причем НУК в низких концентрациях в среде инкубации ($0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) приводила к более высокому накоплению дегидрированного винкамайина в клетках культуры. В то время как существенных различий в накоплении дегидрированного винцина при различных концентрациях фитогормона в среде инкубации установлено не было (рис. 3).

Таким образом, впервые показано, что в клетках фотомиксотрофной каллусной культуры *Vinca minor* содержатся дегидрированные формы винкамайина и винцина.

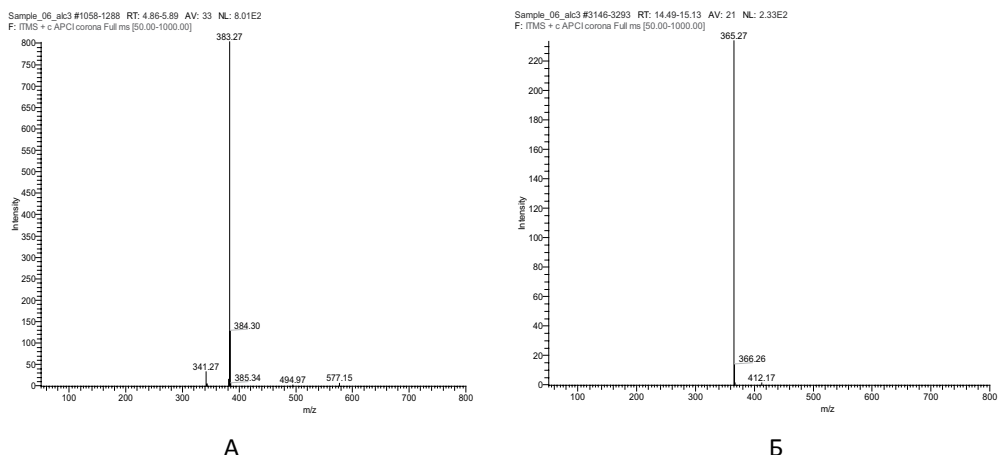


Рисунок 2. Масс-спектры дегидрированных метаболитов винцина (А) и винкамайина (Б).

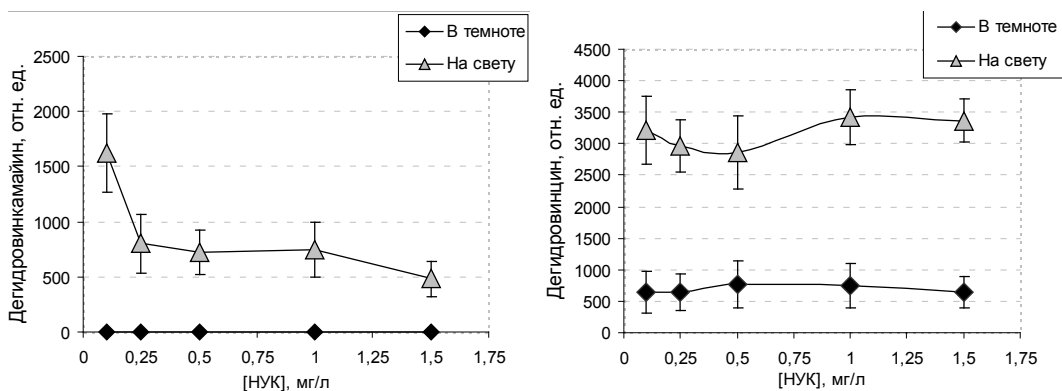


Рисунок 3. Влияние НУК и освещения на относительное содержание дегидрированных метаболитов винкамина и винцина в каллусных культурах *Vinca minor*.

Список литературы:

1. Zhao J. Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering / J. Zhao [et al.] // *Phytochemistry Reviews*. – 2007. – Vol. 6, p. 435–457.
2. Zhao J. Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures / J. Zhao [et al.] // *Plant Growth Regulation*. – 2001. – Vol. 33, p. 43–49.
3. El-Sayed M. *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation / M. El-Sayed [et al.] // *Phytochemistry Reviews*. – 2007. – Vol. 6, p. 277–305.
4. Scheindlin S. Isolation of an alkaloid from *Vinca Minor* / S. Scheindlin [et al.] // *Jour. Amer. Pharm. Assoc. Sci.* – 1955. – Vol. 44, p. 330–332.
5. Holubek J. The structure of vincamine and vincinine (*Vinca minor*) / J. Holubek [et al.] // *Tetrahedron Lett.* – 1963. – Vol. 14, p. 897–900.
6. Bela Z. Quantitative determination with inst paper chromatography of some alkaloids of periwinkle *Vinca minor* inst spectrophotometry / Z. Bela [et al.] // *Herba Hungarica*. – 1967. – Vol. 6, p. 209–220.
7. Opke W. Alkaloids from *Vinca minor* / W. Opke [et al.] // *Tetrahedron Letters*. – 1968. – Vol. 58, p. 6065–6066.
8. Wagner H. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas* / H. Wagner, S. Bladt. – 2nd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. – 1996, p. 379.
9. Proksa B. High performance liquid chromatographic determination of alkaloids from *Vinca minor* / B. Proksa [et al.] // *Phytochemical Analysis*. – 1991. – Vol. 2, p. 74–76.
10. Tanaka N. Vincamine production in multiple shoot culture derived from hairy roots of *Vinca minor* / N. Tanaka [et al.] // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 1995. – Vol. 41, p. 61–64.
11. Petiard V. Presence of glucosides and alkaloids in plant tissue cultures / V. Petiard [et al.] // *Annales de l'Amelioration des Plantes (Paris)*. – 1972. – Vol. 22, p. 361–374.
12. Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. 1962. – V. 15. – № 3, p. 473–482.
13. Niyal, G.C. Symmetry C_{18} column: a better choice for the analysis of indole alkaloids of *Catharanthus roseus* / G.C. Niyal // *Phytochemical Analysis*. – 2001. – Vol. 12, p. 206–210.
14. Moreno-Valenzuela O.A. Effect of differentiation on the regulation of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy roots. / O.A. Moreno-Valenzuela [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 1998. – Vol. 18, p. 99–104.
15. Xing S. Effect of plant growth regulator combinations on the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* / S. Xing // *Journal of Medicinal Plants Research*. – 2011. – Vol. 4, p. 1692–1700.