

**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

Активность триптофан декарбоксилазы в растениях и культурах *in vitro* *Vinca minor* L.

Молчан О.В., Ромашко С.Н., Юрин В.М.

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

Резюме. L-триптофан декарбоксилаза (ТДК, ЕС 4.1.1.28), катализирующая реакцию образования триптамина, является ключевым ферментом биосинтеза терпеновых индольных алкалоидов (ТИА). В данной работе исследовали активность ТДК и эндогенное содержание триптамина в листьях и стеблях нативных растений, а также в каллусной и суспензионной культурах *Vinca minor* L. Активность ТДК составляла 1,8–2,5 и 0,3–0,7 нмоль триптамина · мг⁻¹ белка · мин.⁻¹ в листьях и культурах *in vitro*, соответственно. Показано, что активность фермента и накопление триптамина в тканях изменяются в ходе ростового цикла. Максимальной была активность фермента в интенсивно растущих тканях.

Summary. L-tryptophan decarboxylase (TDC, EC 4.1.1.28) catalyzes the formation of tryptamine and therefore plays a role in terpenoid indole alkaloids (TIA) biosynthesis. TDC activity and tryptamine accumulation were observed in leaves as well as in callus and suspension cultures of *Vinca minor* L. Basal enzyme activities were 1,8–2,5 and 0,3–0,7 nmol tryptamine · mg⁻¹ protein · min.⁻¹ in leaves and cultures *in vitro* correspondently. The TDC activity and tryptamine accumulation was shown to depend on leaves and cultures age. An increase in the TDC activity was found in the biomass at the active growing tissues.

Vinca minor L. (барвинок малый) является одним из представителей рода *Vinca* L., семейства *Aposynaceae* (кутровые). В Беларуси дикорастущие представители рода отсутствуют, в культуре отмечены 3 вида: *V. minor*, *V. major* и *V. herbacea* [1, 2]. Таким образом, на территории нашей республики *Vinca minor* является интродуцентом и в качестве растительного сырья не заготавливается. Между тем барвинок малый – фармакологически ценное растение. Лекарственные препараты, содержащие сумму терпеновых индольных алкалоидов (ТИА) барвинка (напр. винкатон («Гедеон Рихтер», Венгрия)), применяют при спазмах сосудов головного мозга, I и II стадиях гипертонической болезни, неврогенной тахикардии, головных болях различного происхождения, в отоларингологической и офтальмологической практике. Препараты барвинка эффективны для лечения детей с невритами лицевого нерва, полиневритами, остаточными явлениями менингоэнцефалита [3].

L-триптофан декарбоксилаза (ТДК, ЕС 4.1.1.28) – фермент, катализирующий реакцию образования триптамина, является ключевым элементом биосинтеза ТИА [4]. Впервые ген, кодирующий ТДК, был обнаружен в *Catharanthus roseus* [5], затем было показано, что в растениях *Camptotheca acuminata* и *Ophiorhiza pumila* функционируют белки, аминокислотные последовательности которых на 67 и 71% схожи с ТДК катарантуса [6]. Впоследствии было установлено, что ТДК может вовлекаться в биосинтез серотонина (5-гидрокситриптамина), простых β-карболиновых алкалоидов, а также ТИА в ряде других растений [6]. Триптамин и его производные представляют собой в соответствии с общепринятым определением про-тоалкалоиды.

Процессы биосинтеза ТИА в клетках барвинка малого остаются практически не изученными в отличие от, например, раувольфии змеиной и в особенности катарантуса розового, также принадлежащих к семейству *Aposynaceae* [6, 7]. Культуры *in vitro* позволяют не только получать экологически чистые препараты растительного происхождения, но и могут служить модельными объектами при изучении механизмов биосинтеза вторичных метаболитов [8]. Поэтому в данной работе были исследованы активность L-триптофан декарбоксилазы и эндогенное содержание триптамина в растениях и культурах *in vitro* барвинка малого.

Культивирование *Vinca minor* L. в открытом грунте проводили на территории Ботанического сада биологического факультета БГУ. Для исследований использовали листья и стебли вертикальных побегов растения в период цветения. Каллусная и суспензионная культуры были получены из листовых эксплантов с использованием стандартных подходов [9]. Культуры выращивали в темноте при температуре 25–26°С на питательной среде Мурасиге и Скуга [10], содержащей 0,1 мг/л кинетин и 2 мг/л НУК. Пересадку осуществляли каждые 35 (каллус) и 20 (суспензионная культура) суток. Определение активности ТДК проводили по методу Sangwan с соавт. [11]. Ткань гомогенизировали при 4°С в среде, содержащей 100 мМ натрий фосфатный буфер (рН 7,5), 5 мМ тиомочевину, 5 мМ меркаптоэтанол и 5% (вес/объем) поливинилпирролидон и центрифугировали при 10000 g. Супернатант использовали для определения активности. Содержание белка в пробе определяли методом Bradford [12]. Супернатант вносили в среду, содержащую 100 мМ натрий фосфатный буфер (рН 7,5), 1 мМ

пиридоксальфосфат, 1 мМ L-триптофан, 3,5 мМ меркаптоэтанол, инкубировали в течение 50 мин. при 35° С, затем добавляли 4М NaOH и экстрагировали этилацетатом. Триптамин детектировали с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse при $\lambda_{\text{возб}}=280$ нм и $\lambda_{\text{эм}}=340$ нм. Содержание триптамина определяли по соответствующей калибровочной кривой. Базовый уровень флуоресценции регистрировали при 0 времени. Для определения содержания триптамина ткань гомогенизировали при 4° С в среде, содержащей 100 мМ натрий фосфатный буфер (рН 7.5), 5 мМ β -меркаптоэтанол, 100 мг/г поливинилпирролидон. Среда определения содержала 100мМ натрий фосфатный буфер (рН 8,5), 3,5 мМ меркаптоэтанол. Триптамин экстрагировали и детектировали, как описано выше.

На первом этапе работы были определены активность ТДК и содержание эндогенного триптамина в листьях и стеблях вертикальных побегов барвинка малого (рис. 1). В результате было установлено, что активность ТДК достигает максимального значения ($2,3 \pm 0,2$ нмоль триптамина \cdot мг⁻¹ белка \cdot мин.⁻¹) в активно растущих ювенильных листьях. В листьях, закончивших рост, активность фермента была значительно меньше. В стеблях и активность ТДК, и содержание эндогенного триптамина были минимальными. Содержание триптамина в листьях разного возраста было примерно одинаковым и варьировало в пределах 1,1–1,7 мкмоль/г сырой ткани.

Возможно, отсутствие корреляции между активностью ТДК и накоплением триптамина в листьях объясняется тем, что стимуляция фермента связана с активацией ростовых процессов, в то время как содержание триптамина, скорее всего, определяется, как активностью его синтеза, так и скоростью включения в процессы биосинтеза алкалоидов.

Культуры клеток и тканей, характеризующиеся по сравнению с нативным растением менее длительным ростовым циклом, являются удобной моделью для исследования взаимосвязи между активностью ТДК, накоплением триптамина и ростовыми процессами барвинка малого. В связи с этим было также проведено определение активности ТДК на различных стадиях ростового цикла каллусной культуры (рис. 2). Продолжительность ростового цикла каллуса составляла 35–40 суток. На ростовой кривой можно выделить характерные лаг-(0–10 суток) лог-(10–30 суток) и стационарную (30–40 суток) фазы [13].

Как видно на рис. 2А, максимальная активность ТДК в каллусе (в среднем 0,65 нмоль триптамина \cdot мг⁻¹ белка \cdot мин.⁻¹) наблюдалась на 30-е сутки культивирования. На стационарной фазе роста (40 суток) активность ТДК снижалась. Минимальной являлась активность ТДК в 10-дневном каллусе, т.е. в конце лаг-фазы ростового цикла. Определение содержания триптамина в каллусной ткани на различных этапах ростового цикла показало, что уровень накопления протоалкалоида, в принципе, согласуется с активностью ТДК. Как видно на рис. 2Б, содержание эндогенного триптамина в каллусе варьирует в диапазоне значений от 0,15 до 0,55 мкмоль/г сырой массы ткани. Максимальный уровень накопления триптамина (30 суток) согласуется с повышенной активностью ТДК. К 40-м суткам культивирования каллусной ткани и активность ТДК, и содержание эндогенного триптамина снижаются на 30–40% по сравнению с 30-ми сутками. Минимальный уровень содержания триптамина в ткани был зарегистрирован на 20-е сутки ростового цикла – в период наибольшей ростовой и мета-

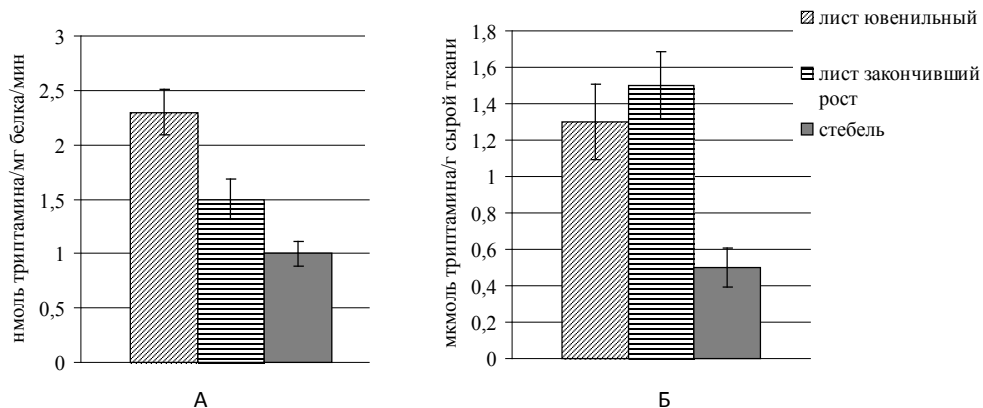


Рисунок 1. Активность ТДК (А) и содержание триптамина (Б) в различных органах барвинка малого.

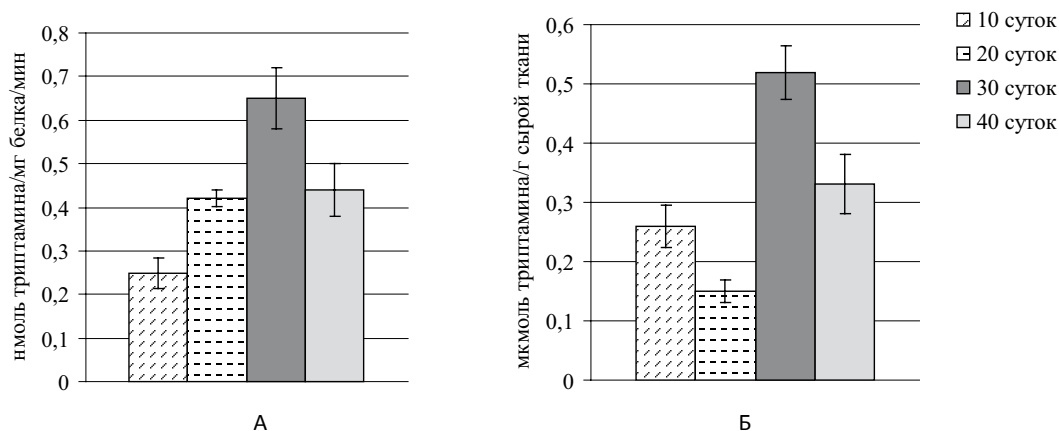


Рисунок 2. Активность ТДК (А) и содержание триптамина (Б) на различных стадиях ростового цикла каллусной культуры барвинка малого.

болической активности клеток. Таким образом, возможно, в исследуемой каллусной ткани уровень накопления триптамина на 10-е, 30-е и 40-е сутки культивирования определяется в основном активностью его синтеза. В то время как на 20-е сутки культивирования, вероятно, активируются также системы, способствующие включению триптамина в дальнейшие процессы биосинтеза, например, индольных алкалоидов.

Суспензионная культура клеток растений является наиболее востребованным объектом при изучении синтеза продуктов вторичного метаболизма [9]. В результате проведенных исследований было показано, что максимальная активность ТДК в клетках суспензионной культуры барвинка малого наблюдалась в течение лог-фазы ростового цикла, на 14-е сутки инкубации составляла $(0,53 \pm 0,11 \text{ нмоль триптамина} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ белка} \cdot \text{мин.}^{-1})$ и до 21-х суток сохранялась на прежнем уровне (рис. 3). Как было установлено, прирост биомассы в этот период продолжал повышаться, т.е. 21-е сутки культивирования также относятся к лог-фазе ростового цикла (данные не показаны).

Таким образом, активность ТДК составляла 1,8–2,5 и 0,3–0,7 нмоль триптамина $\cdot \text{мг}^{-1} \text{ белка} \cdot \text{мин.}^{-1}$ в листьях нативных растений и культурах *in vitro*, соответственно, и согласуется с некоторыми уже известными данными по изучению этого фермента в высших растениях. Так, активность ТДК (нмоль триптамина / (мг белка $\cdot \text{мин.}$)) была равна: 0,8 – в суспензионной культуре катарантуса розового, 0,3 – в суспензионной культуре камптотеки остроконечной, 0,6 – в листьях тополя [14–16]. В то же время в ряде других объектов активность ТДК отличалась от полученного нами значения в 10–100 раз. Например, в листьях риса и в суспензионной культуре цинхоны аптечной она составляла 0,0015 и 0,018–0,024 нмоль триптамина $\cdot \text{мг}^{-1} \text{ белка} \cdot \text{мин.}^{-1}$, соответственно [17, 18]. Содержание эндогенного триптамина, определенное нами в листьях и культурах *in vitro* барвинка малого, также совпадало по порядку величины с данными, полученными ранее в некоторых работах. Так, содержание триптамина в листьях тополя и листьях риса составляло 1 и 0,5 мкмоль/г сырой массы, соответственно [16, 17].

Обнаруженное нами снижение активности ТДК и накопления триптамина в тканях культур *in vitro* по сравнению с листьями барвинка малого, в принципе, не является удивительным, поскольку в культурах уровень биосинтеза вторичных метаболитов часто находится на более низком уровне. Это, например, характерно и для биосинтеза ТИА в клетках культур *in vitro Catharanthus roseus* [7]. Стимуляция активности ТДК, наблюдаемая в фазе интенсивного роста листьев и культур *in vitro*, также согласуется с известными результатами, согласно которым в некоторых растениях и культурах ТДК регулируется на уровне транскрипции факторами развития, а максимальная активность фермента проявляется в интенсивно растущих тканях и клетках [4, 7]. Так, например, в клетках суспензионных культур *Tabernaemontana elegans* активность ТДК максимальна на лог-фазе ростового цикла [19]. В проростках *Catharanthus roseus* максимум активности и уровня мРНК ТДК детектируется через 3–5 дней после прорастания и значительно снижается к 10-м суткам, коррелируя при этом со стимуляцией активности других ферментов, вовлеченных в биосинтез ТИА [4].

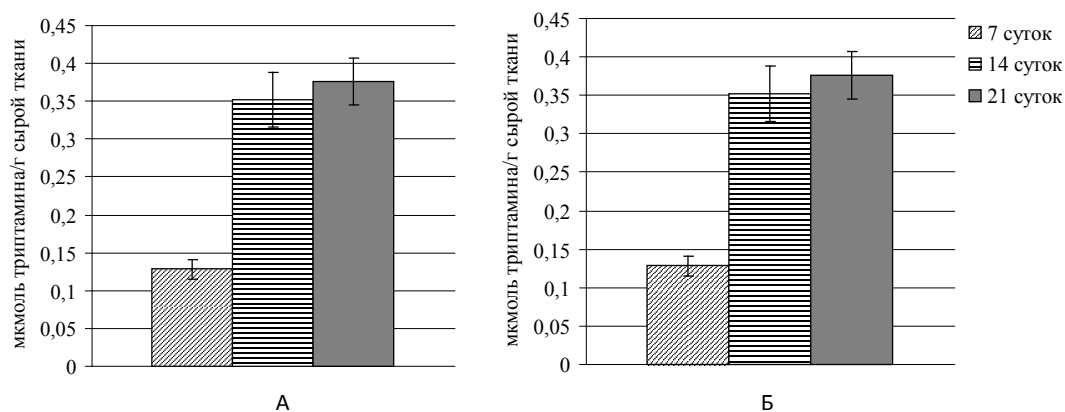


Рисунок 3. Активность ТДК (А) и содержание триптамина (Б) на различных стадиях ростового цикла суспензионной культуры барвинка малого.

Таким образом, обнаруженные нами изменения активности ТДК и содержания эндогенного триптамина, позволяют предположить активное участие этого фермента в реакциях как вторичного, так и первичного метаболизма в клетках барвинка малого.

Список литературы:

1. Кухарева Л.В., Пашина Г.В. Полезные травянистые растения природной флоры: Справочник по итогам интродукции в Белоруссии. Минск: Наука и техника, 1986, с. 215.
2. Джус М.А., Молчан О.В., Кухарева Л.В., Спиридович Е.В., Юрин В.М. Род *Vinca* L. (Аросунасеae) во флоре Беларуси. Украинский ботанический журнал, 2009, Т. 66, № 6, с. 783–793.
3. Лекарственные препараты и их применение. Справочник под ред. Судакова С.К. М. 1998, с. 211.
4. Facchini PJ, Huber-Allanach KL, Tari LW. Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry*, 2000. V. 54, p. 121–138.
5. De Luca V, Marineau C, Brisson N. Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal dopa decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989. V. 86, p. 2582–2586.
6. S.B. Rech, C.V.F. Batista, J. Schripsema, R. Verpoorte, A.T. Henriques. Cell cultures of *Rauwolfia sellowii*: growth and alkaloid production. *Plant Cell Tiss and Org Cult*, 1998. V. 54, p. 61–63.
7. El-Sayed M., Verpoorte R. *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. *Phytochem. Rev.*, 2007. V. 6, p. 277–305.
8. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2009, V. 3, № 13, P. 1222–1239.
9. Method in molecular biology. *Plant Cell and Tissue Culture*. 1990. V. 6, p. 597. Edited by J.W. Pollard and J.M. Walker.
10. Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 1962. V. 48, p. 473–497.
11. Sangwan RS, Mishra S, Kumar S. Direct fluorometry of phase-extracted tryptamine-based fast quantitative assay of L-tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* leaf. *Anal Biochem.*, 1998. V. 255, p. 39–46.
12. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 1976, V. 72, P. 248–254.
13. Molchan O., Romashko S., Yurin V. L-tryptophan decarboxylase activity and tryptamine accumulation in callus cultures of *Vinca minor* L. *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 2012. V. 108, p. 535–539.
14. Canel C., Cardozo I.L., Whitmer S., Fits L., Pasquali G., Heijden R., Hoge J., Verpoorte R. Effect of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta*, 1998. V. 205, p. 414–419.
15. Silvestrini A., Pasqua G., Botta B., Monacelli B., van der Heijden R., Verpoorte R. Effects of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. *Plant Physiol. Biochem.*, 2002. V. 40, p. 749–753.
16. Gill R., Ellis B. Over-expression of tryptophan decarboxylase gene in poplar and its possible role in resistance against *Malacosoma disstria*. *New Forests*, 2006. V. 31, p. 195–209.
17. Kang S., Kang K., Lee K., Back K. Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice. *Planta*, 2007. V. 227, p. 263–272.
18. Skinner N.J., Robins R.J., Rhodes M.J.C. Tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase and alkaloid production by *Cinchona ledgeriana* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 1987. V. 26, p. 721–725.
19. Lucumi E., Vera A., Hallard D., van der Heijden R., Verpoorte R. Alkaloid formation in cell suspension cultures of *Tabernaemontana elegans* after feeding of tryptamine and loganin or secologanin. *Plant Cell Tiss and Org Cult.*, 2002. V. 68, p. 293–299.