

**УДК 575:631.147:577.182.72**

## **ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ УТОЧНЕНИЯ ПУТЕЙ БИОСИНТЕЗА МОНОТЕРПЕНОИДОВ У МЯТЫ**

*Бугаенко Л.А.*

*РВУЗ «Крымский инженерно-педагогический университет», Симферополь, Украина  
E-mail: kirubiology@gmail.com*

В статье представлены материалы, показывающие, что у *Mentha canadensis L.* функционируют два пути биосинтеза ментола (пиперитонный и пулегонный), которые подтверждены генетическими исследованиями и экспериментами по биотрансформации монотерпеноидов в культуре клеток *in vitro*.  
**Ключевые слова:** биосинтез, монотерпены, биотрансформация, *in vitro*.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Эфирные масла различных видов мяты включают большое (более 100) разнообразие монотерпеноидов циклического и ациклического строения, однако, как правило, в них преобладает один или несколько компонентов.

Рядом исследователей [1-5] предложены биогенетические схемы, согласно которым компоненты эфирных масел образуются путем последовательных превращений, начиная от геранилпирофосфата (рис. 1).

По существующим представлениям, превращение одного терпенового компонента в другой контролируется одним геном, кодирующим синтез соответствующего фермента. Если необходимый фермент отсутствует, последовательность цепи биосинтеза останавливается и происходит накопление предшественника. Преимущественное накопление того или иного предшественника в эфирном масле видов мяты и определяет разнообразие биохимического состава различных представителей рода *Mentha L.*

Ментол – основной компонент эфирного масла культивируемых видов мяты (*M. piperita L.* и *M. canadensis L.*) является конечным продуктом биосинтеза С-3 окисленных терпеноидов и образуется из его непосредственного предшественника ментона под контролем доминантного аллеля R [6]. Рецессивный аллель этого гена (r) не позволяет активно проходить данной химической реакции и растения, имеющие гомозиготный рецессивный генотип (rr), накапливают преимущественно ментон или его предшественники (С-3 – окисленные соединения – пулегон, пиперитон, пиперитенон и др.). Как правило, такие терпеноиды преимущественно синтезируют дикорастущие виды мяты. Кроме того, дикорастущие виды мяты могут синтезировать С-2 окисленные терпеноиды – карвон и его производные, а также ациклические терпеноиды – линалоол и линалилацетат [5, 7-10].

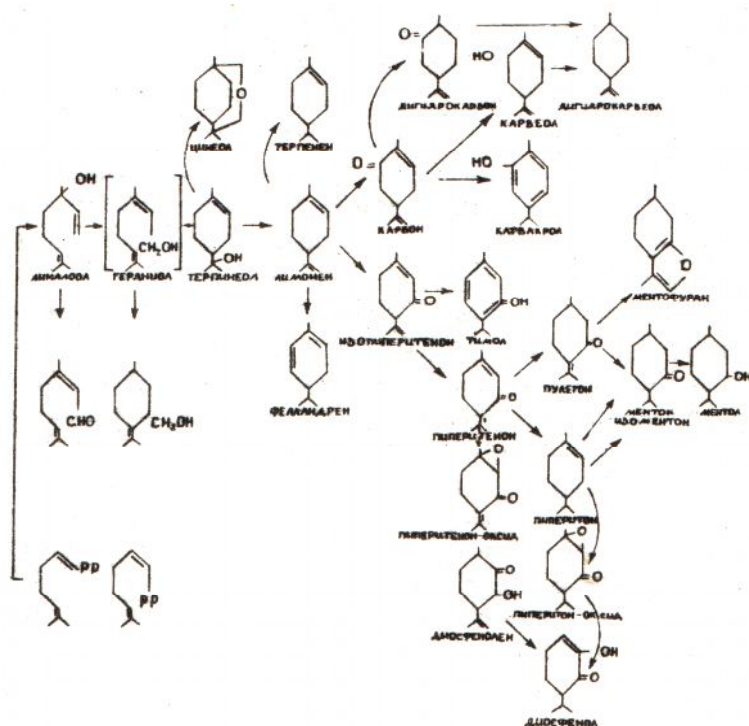


Рис.1. Схема биосинтеза терпеноидов у мяты.

Целью настоящего исследования явилось уточнение путей биосинтеза С-3 окисленных терпеноидов, конечным этапом которых является синтез циклического спирта – ментола.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили культивируемые полиплоидные формы мяты, полученные в результате обработки колхицином видов *M. canadensis* (K59, K60) и *M. piperita* (A<sub>2</sub>). А также дикорастущие виды мяты *M. spicata* L., *M. aquatica* L., *M. longifolia* L. (Nath.) и др.

Для получения полиплоидных форм мяты проводилась обработка 0,25% водным раствором колхицина в течение 24 часов укорененных стеблевых черенков растений мяты. Для подтверждения полиплоидной природы полученных растений определялся размер устьиц и пыльцевых зерен, а также подсчитывалось соматическое число хромосом.

Массовая доля эфирного масла в воздушно-сухих листьях и соцветиях определялась методом А.С. Гинзберга [11] с последующим пересчетом на абсолютно сухую массу. Состав эфирного масла исследовался методом газожидкостной хроматографии на приборах Хром-3 и Хром-4. Колонка стальная, длина 3,2 м, внутренний диаметр 3 мм. Неподвижная жидкая фаза карбовакс 20М (15%) на хроматоне N-AW- DMCS ), 125-160 мм, P<sub>He</sub> = 2,5 атм. Температура

термостата колонки 130 и 170<sup>0</sup>С. Главные компоненты эфирного масла идентифицировали по времени удерживания с использованием чистых веществ. Для идентификации некоторых компонентов проводили их выделение с помощью препаративной хроматографии на колонке и в тонком слое в системе растворителей гексан- этилацетат (7:3) и исследовали методом ИК- и УФ- спектроскопии.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, полученные при изучении самоопыленных потомств S<sub>1</sub> и S<sub>2</sub> *M. spicata* использованы для уточнения и дополнения схемы генетического контроля превращения терпеноидов на заключительных этапах, связанных с синтезом ментона и ментола.

Согласно биогенетической схеме Рейтсема [11] пиперитенон является общим предшественником для двух биосинтетических последовательностей :



Хефендель с соавторами [11] с помощью изотопных опытов подтвердили схему Рейтсема, однако они не смогли доказать роль пиперитенона как начального члена предполагаемой последовательности. Анализ полученных данных при изучении линий S<sub>1</sub> пиперитонной формы показал, что пиперитон и пулегон действительно могут иметь один предшественник, поскольку в одних растениях накопление большого количества одного из них ведет за собой почти полное отсутствие, второго, тогда как в других – эти компоненты могут находиться практически в равных количествах. Это подтверждается также наличием у растений одной из этих линий пиперитенона как основного компонента эфирного масла при наличии пиперитона. Полученные данные также показывают, что ментон и изоментон в действительности имеют общий предшественник, которым может являться пиперитон.

Биогенетические взаимоотношения отдельных компонентов эфирного масла были уточнены также с помощью опытов, проведенных при культивировании *in vitro* линий *M. spicata*. Были получены каллусные ткани из листьев линий *M. spicata*, синтезирующих в эфирном масле интактных растений преимущественно пулегон (56,5%) и пиперитон (21,8%). Установлено, что в каллусных тканях накапливалось эфирное масло, однако в значительно меньшем количестве, чем в интактном растении, при этом состав терпеновых компонентов был сходным, но по количественному их содержанию наблюдались различия. Содержание пулегона и пиперитона в эфирном масле, полученном из каллусов, составило 10,8 и 7,4 % соответственно. При этом увеличивалось содержание пиперитона, являющегося предшественником указанных компонентов.

Поскольку биосинтез отдельных компонентов эфирного масла контролируется генетически, специфическая биосинтетическая способность исследуемых линий *M.*

*spicata* должна быть отражена и в полученных из них каллусных тканях. Однако при генетически детерминированном синтезе отдельных терпенов, реализация генетической информации зависит также и от внешних факторов. Очевидно, условия, складывающиеся при культивировании данных форм мяты *in vitro*, не позволяют осуществляться этой информации на заключительных этапах биосинтеза терпеноидов.

Вопрос о соотношении путей биосинтеза различных предшественников ментола в конкретном растительном материале имеет большое значение в решении задач практической селекции при создании высокоментольных сортов. При гибридизации *M. canadensis* (4n)- генотип RRRR с линиями *M. spicata* генотип rr, синтезирующими в качестве основного компонента различные терпеновые соединения, окисленные при третьем углеродном атоме, – ментон, изоментон, пулегон и оксиперитон, вскрыты генетические механизмы, обуславливающие повышенное накопление ментола у *M. canadensis*, и показана способность данного вида образовывать высокоментольные гибриды с широким набором дикорастущих видов и форм мяты. Самое большое число высокоментольных гибридов – 89,1 и 86,1 % получено при опылении К60 ментонной и оксиперитонной линиями, Довольно большое количество (39,1%) таких гибридов получено и при скрещивании К60 с изоментонной линией, тогда как опыление пулегонной линией приводит к получению незначительного (6,8%) количества высокоментольных гибридов (>60% ментола). Полученные данные позволяют сделать заключение о том, что в самом материнском растении *M. canadensis* К60 преимущественно действует путь синтеза ментона из пиперитона, тогда как пулегонный путь является менее эффективным. Исходя из данных, полученных при анализе потомства F<sub>1</sub> от скрещивания К60 с изоментонной линией, следует, что у К60 и ее гибридов существует генетический механизм, допускающий изомеризацию изоментона в ментон.

Касаясь непосредственного предшественника изоментона следует отдать предпочтение пиперитону, поскольку дальнейшие превращения пулегона у К60 и ее гибридов происходит менее активно. Обнаружение М. Мареем с соавторами [12] формы, синтезирующей (-) – пиперитон, а также наши собственные данные о наличии в эфирном масле растений, полученных при самоопылении *M. spicata* К65, обоих изомеров пиперитона позволяет считать, что в качестве основного предшественника изоментона у изучаемой группы растений функционирует (-) – пиперитон.

Наличие двух путей биосинтеза ментона и ментола у *M. canadensis* было подтверждено в прямых экспериментах, проведенных нами совместно с С.А. Резниковой и В.С. Родовым [13] по биотрансформации монотерпенов в культуре клеток *in vitro* этого вида. При инкубации ментона происходило его активное восстановление с образованием ментола и неоментола, что подтверждает роль ментона как непосредственного предшественника обоих стереоизомерных спиртов. Клетки *M. canadensis* К60 были способны к восстановлению пулегона и пиперитона с образованием ментона и изоментона и соответствующих им спиртов. При этом максимальный выход продуктов восстановления, среди которых преобладал ментол, был получен при трансформации пиперитона. Пулегон менее активно вовлекался в процесс восстановления. При введении в клеточную суспензию изоментона значительная часть его восстанавливалась и накапливалась

преимущественно ментол. У *M. piperita*, для которой характерен более низкий уровень накопления ментола, напротив, пулегонный путь является основным источником образования этого компонента, тогда как роль пиперитона и изоментона незначительна.

Составление результатов биотрансформации ментона, изоментона, пулегона и пиперитона суспензионной культурой *M. canadensis* с результатами скрещивания этой формы с формами *M. spicata*, накапливающими те же монотерпены, позволяет уточнить присущие ей пути биосинтеза ментола.

Полученные данные хорошо согласуются друг с другом и указывают на преобладание у *M. canadensis* и ее гибридов пиперитонного пути синтеза предшественников ментола. При этом (-)-ментон, по-видимому, синтезируется из (+)-пиперитона, а (+)-изоментон из (-)-пиперитона. В дальнейшем осуществляется ферментативная изомеризация (+)-изоментона в (-)-ментон, превращаемый под влиянием аллеля R в (-)-ментол. Пулегонный путь синтеза ментона также функционирует у *M. canadensis* K60 и ее гибридов, однако его вклад в биосинтез ментола меньше, чем может быть обусловлено гетерозиготностью данной формы по гену Ps, контролирующему перевод пулегона в ментон.



Рис.2. Уточненная схема генетического контроля биосинтеза ментола и его предшественников

Таким образом проведенные эксперименты позволили уточнить схему генетического контроля биосинтеза ментола, в том числе и на этапе превращения пиперитона в ментон и пиперитона в изоментон, обозначенного символами  $P_t$  и  $I_m$  соответственно. Такая схема представлена на Рис. 2.

## ВЫВОД

1. В результате проведенных генетических и биотехнологических исследований установлено, что *M. canadensis* обладает расширенным по сравнению с *M. piperita* возможностями взаимопревращения терпеновых компонентов, обусловленными генетически, что объясняет высокий уровень (до 85%) накопления ментола у этой формы и гибридов, полученных с ее участием.
2. Наличие двух путей (через пиперитон и пулегон) биосинтеза ментона и ментола у *M. canadensis* подтверждено в прямых экспериментах по биотрансформации монотерпенов в культуре клеток *in vitro*.
3. Показано, что у *M. canadensis* и ее гибридов преобладает пиперитонный путь синтеза ментола и его предшественников.

Список литературы

1. Reitsema R.N. A biogenetic arrangement of mint species / R.N.Reitsema // J. Am. Pharmacol. Assoc. – 1958. – V. 47.– P. 267–269.
2. Fujita Y. Problems in the genus *Mentha* (111) / Y. Fujita // Koryp. – 1960. – Vol. 59. – P. 41–42.
3. Battaile J. Biosynthesis of terpenes 11. The site and sequence of terpene formation in peppermint / J. Battaile, W.D. Loomis // Biochim. Biophys. Acta.–1961. Vol. 51.– P.545–552.
4. Loomis W.D. Biosynthesis and metabolism of monoterpenes / W.D. Loomis // In: Terpenoids in plants. – Acad. Press, New York. – 1967. – P. 59–82.
5. Loomis W.D. Biochemistry and physiology of lower terpenoids / W.D. Loomis, R. Croteau // In: Structure, biogenesis, and distribution. Recent advances in Phytochemistry. – Acad. Press, New York and London.– 1973. – Vol. 6. – P. 147–185.
6. Murray M.J. The genetic basis for the conversion of menthon to menthol in Japanese mint / M.J. Murray // Genetics. –1960. – Vol. 45, № 7. – P. 925–929.
7. Hefendehl F.W. Monoterpene composition of a chemotype of *Mentha piperita* having high limonene / F.W. Hefendehl, M.J.Murray // *Planta medica*. – 1973b. – № 2. – P. 101–109.
8. Murray M.J. The genetic basis of acyclic oil constituents in *Mentha citrate* Ehrh. / M.J. Murray, D.E. Lincoln // Genetics. – 1970. – № 65. – P. 457–471.
9. Murray M.J. Genetic observation on *Mentha* oil biogenesis / M.J. Murray // An. Acad. Bras. Science. – 1972. –Vol. 44. – P. 24–33.
10. Lawrence B.M. A study of monoterpene interrelationships in the genus *Mentha* with special reference to the origin of pulegone and menthofuran / Lawrence B.M. // Doctoral thesis universiteit the Groningen, Netherlands. – 1978. – 302 p.
11. Hefendehl F.W. The biosynthesis of the originated monoterpenes in mint / F.W. Hefendehl, R.W. Underhill, F. Rudlof // *Phytochemistry*. – 1967. – № 6.– P. 823–835.
12. Murray M.J. Chemogenetic evidence supporting multiple allelic control of the biosynthesis of (-) – menthone and (+) – isomenthone stereoisomers in *Mentha* species / M.J. Murray, D.E. Lincoln, F.W. Hefendehl // *Phytochemistry*. – 1980. – Vol. 19, №10. – P. 2103–2110.
13. Резникова С.А. Генетический контроль биосинтеза терпеноидов у мяты. Сообщение 111. Особенности генетической регуляции биосинтеза ментола у *Mentha canadensis* L. / С.А. Резникова., Л.А. Бугаенко, В.С. Родов // Генетика. – 1985. – Т. XX1, № 1.–С. 95–102.

**Бугаенко Л.А. Генетичні і біотехнологічні аспекти уточнення шляхів біосинтезу монотерпеноїдів у м'яги / Л.А. Бугаенко // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62), № 4. – С. 66-71.**

У статті представлені матеріали, які показують, що у *Mentha caladensis* L. функціонують два шляхи біосинтезу ментола (піпертонний і пулегінний), які підтверджені генетичними дослідженнями і експериментами по біотрансформації монотерпенів в культурі клітин in vitro.

**Ключові слова:** біосинтез, монотерпени, біотрансформація, in vitro.

**Bugaenko L.A. Genetic and biotechnological aspects of specification of ways biosynthesis of monoterpenoids in mint / L.A. Bugaenko // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – Vol. 23 (62), No 4. – P. 66-71.**

The article shows two ways of biosynthesis of menthol in *Mentha canadensis* L. (piperitonic and pulegonic), which have been confirmed by genetic research and experiments on biotransformation of monoterpenes in culture of cells in vitro.

**Keywords:** biosynthesis, monoterpenes, biotransformation, in vitro.

Поступила в редакцію 12.11.2010 г.