

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ГЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА ТЕРПЕНОИДОВ ПРИ СОЗДАНИИ НЕТРАДИЦИОННЫХ ГИБРИДОВ МЯТЫ

Мишнев А. В.

Мяту можно смело отнести к довольно немногочисленной группе растений, любимой всенародно и практически во все времена. Такая популярность объясняется наличием эфирного масла, которое стали применять одновременно в двух важнейших отраслях: медицине и парфюмерии. Извлечение эфирного масла посредством довольно простой водно-паровой дистилляции делало возможным его получение уже в Древнем Египте. А широкое распространение дикой мяты в Старом и Новом свете способствовало отбору наиболее ароматичных клонов и последующую их культивацию уже в промышленных масштабах. Роду *Mentha L.*, посвящено множество публикаций: от популярных брошюр по применению лекарственного сырья до научных монографий по систематике, биохимии, генетике, селекции, агротехнике возделывания и т.д. Нас же будет интересовать довольно узкий, но крайне важный вопрос о генной регуляции биосинтеза компонентов эфирного масла мяты и практический аспект его применения.

В 1958 г. Reitsema предложил первую схему биосинтеза компонентов эфирного масла мяты. К настоящему времени предложено ещё несколько версий, суть которых можно очень упрощенно свести к следующему. Компоненты эфирного мятного масла по своей природе являются терпеноидами и могут трансформироваться друг в друга под контролем определенных генов. В настоящее время считается, что мевалоновая кислота является наиболее вероятным предшественником для монотерпенового синтеза во всех эфиромасличных растениях. Ряд последовательных превращений приводит к следующей важной стадии – формированию ациклических монотерпеноидных пирофосфатов: геранил пирофосфата (ГПФ), нерил пирофосфата (НПФ) и линалил пирофосфата (ЛПФ). Среди исследователей нет единой точки зрения, какой именно из этих пирофосфатов дает начало компонентам эфирного масла рода *Mentha*. Одни отвели эту роль геранил пирофосфату, другие отдали предпочтение нерил пирофосфату. Третьи же полагают, что нерил пирофосфат даёт начало линалил пирофосфату, в результате гидролиза которого и образуется ациклический спирт линалоол. В настоящее время признана точка зрения, что ациклические компоненты мятного эфирного масла (линалоол, гераниол) дают начало цепи циклических компонентов.

При этом главная роль отводится гену I, который возможно является контролирующим механизмом при формировании линалил пирофосфата из нерил пирофосфата, или при образовании линалоола из ЛПФ. Следовательно, ген I, очевидно контролирует синтез линалил пирофосфат синтетазы [1]. Также считается, что доминантный аллель I препятствует реакциям циклизации и

способствует накоплению в эфирном масле компонентов с незамкнутой цепью, главным образом линалоола. Доминанта E в генотипе растения отвечает за образование сложных эфиров соответствующих спиртов, в частности образования линалил ацетата. Таким образом полагают, что все известные линалоольные формы мяты имеют в своём составе доминанту I и наряду с "бергамотными" мятами (содержащими ещё и линалил ацетат, т.е. имеющими состав масла сходный с лавандой, шалфеем мускатным и бергамотом (*Citrus bergamia*)) являются наименее хемо специализированными представителями рода.

Далее считается, что гомозигота ii открывает путь реакциям циклизации и прежде всего разрешает трансформацию линалоол—лимонен. Последний служит переходным звеном между ациклическими компонентами и компонентами с замкнутой цепью и, кроме того, даёт начало двум ветвям биосинтеза - карвонной и ментольной [1,2,3,4].

Присутствие в генотипе доминанты C определяет трансформацию лимонен — карвон или путь C-2 окисленных соединений, куда кроме карвона входят и его производные: дигидрокарвон, карвеол, карвакрол и др. Промышленное производство мяты карвонного направления налажено главным образом в США. В этой стране культивируют колосовую мяту (*M.spicata* L) и шотландскую колосовую мяту (*M.x gentilis* nm. *cardiaca* (Gray) Baker.) преимущественно для ароматизации продукции, в основном жевательной резинки и зубных паст. Наш потребитель может узнать вкус карвонной мяты, отыскав на упаковке наименование *spearmint*.

Рецессивный аллель c даёт начало переходу лимонен — изопиперитон, тем самым открывая ментольную ветвь биосинтеза (или C-3 путь), наиболее специализированную в пределах рода *Mentha*. Под контролем определенных генов здесь происходит накопление или дальнейшая трансформация пиперитенона, пулегона, пиперитона, ментофурана и, конечно, ментона, ментола и их изомеров, результат высшей хемо специализации у рода [2,5].

Ментольная ветвь биосинтеза ассоциируется главным образом с мятой перечной (*M.piperita* L.), которая содержит около 50% ментола и благодаря сбалансированности минорных компонентов используется не только в медицине, но и в парфюмерии, пищевой промышленности и т.д. Чуть в меньшей степени культивируется другой вид *M.arvensis* L., var. *piperascens* Holm., мята японская. Она практически не имеет парфюмерного значения, содержит до 90% ментола и служит для его технического получения.

С 1991 г. в Институте лекарственных и эфиромасличных растений начата программа по уточнению некоторых аспектов биосинтеза терпеноидов и практическому получению высокопродуктивных образцов с нетрадиционным составом эфирного масла. В настоящее время наиболее перспективным путем создания любых высокопродуктивных образцов мяты считается межвидовая гибридизация, нередко в сочетании с искусственной полиплоидией и мутагенезом [5].

Одним из направлений гибридизации являлись скрещивания с формой К 59. Она относится к *M.canadensis* (один из синонимов *M.arvensis*, var. *piperascens*) мяты японской и была получена в более раннее время Л.А.Бугаенко, путем колхицинирования стерильной дикорастущей мяты с Дальнего Востока. В результате удвоения числа хромосом нормализовались процессы мейотического деления, что и проявилось в восстановлении женской фертильности. При этом мужская стерильность сохранилась, что, очевидно, связано с факторами ЦМС. Форма К 59 содержит около 80% ментола, высокомаслична (5...6%), и в разные годы широко привлекалась в качестве материнской формы для создания высокопродуктивных ментольных гибридов. С её участием получены высокоментольные районированные сорта Симферопольская 200, и Заграва [5]. В наших исследованиях мы попытались использовать эту форму как донора высокой масличности при создании нетрадиционных образцов мяты.

В настоящее время в Украине, как и в б.СССР, нет районированных сортов карвонной мяты. Хотя есть данные, что такая мята выращивалась в царской России и в б.СССР до Второй мировой войны [6]. Для получения перспективных карвонных образцов для формы К 59 в качестве опылителя была выбрана дикорастущая карвонная форма *M.longifolia* L..N 22 из коллекции института. У ментолсинтезирующего образца К 59 генотип по интересующим нас генам может быть только *iiсс* (здесь и далее для простоты показан без учета полиплоидной природы), иначе синтез ментола был бы невозможен, исходя из приведенных выше представлений о роли генов I и C. Генотип формы N22 по интересующим нас генам был определен как *iiСС*, с учетом того, что в изученном инцухт потомстве этой формы не было отклонений от карвонного хемотипа. В соответствии с генетическими закономерностями мы рассчитывали получить в потомстве 100% карвонсинтезирующих гибридов. Анализ потомства методом ГЖХ подтвердил наши расчеты. Все потомки от комбинации К59хN22 содержали карвон (52...56%) в сочетании с лимоненом (9...18%).

Параллельно с этими исследованиями проводились работы по получению высокопродуктивных линалоольных образцов для нужд парфюмерии и пищевой промышленности. Для этой цели в качестве отцовских форм были выбраны 4 линалоольных образца: две коллекционные дикорастущие формы *M.longifolia* 2 и 18 (содержание линалоола соответственно 69...75% и 70...78%) и два образца *M.longifolia* X и M были получены при колхицинировании полностью.

Таблица 1

Характеристика комбинаций скрещивания и распределение полученных гибридов по хемотипам

Комбинация скрещивания и генотип род. форм по некоторым генам. (ж)	Кол-во проанализированных гибридов, шт	Теоретич. выход среди потомков	Фактический выход		
			линалоольные и линалил ацетатные гибриды, шт.	ментолсинтезирующие гибриды, шт.	карвонсинтезирующие гибриды, шт.
К 59 (4n) x №22 iicc iicc	70	100% карвонных гибридов	-	-	70
К 59 (4n) x №2 iicc II	65	100% линалоольных гибридов	-	39	26
К 59 (4n) x №18 iicc IIcc	41	50% линалоольных гибридов	-	23	18
К 59 (4n) x X iicc II	124	100% линалоольных гибридов	-	124	-
К 59 (4n) x M iicc II	17	100% линалоольных гибридов	-	17	-
K59(4n) x 94.15.9 iicc II	21	100% лавандовых гибридов	19	2	-
K59(4n) x 94.18.8 iicc II или Ii	21	100 или 50% лавандовых гибридов	11	10	-

(ж) для удобства полиплоидные формы показаны без учета полиплоидной природы.

стерильных дикорастущих линалоольных образцов 13 и 37. В результате этого выделены X и M образцы с полностью восстановленной фертильностью, имеющие достоверные отличия от исходных

форм в размерах листовой пластины и чашечки, с более поздними сроками цветения, что служит косвенными доказательствами их полиплоидной природы. Содержание линалоола у этих образцов соответствует исходным формам и составляет 70...80%. Проведенный анализ компонентного состава масла инцухт потомков отобранных для гибридизации форм позволил установить их генотип по гену I : форма N2 –II, N 18 – IiCc, X - II, M - II. Таким образом, исходя из представления о решающей роли гена I в накоплении линалоола, ожидалось получить в гибридном потомстве до 50% линалоольных потомков в комбинации K 59xN18 и до 100% от других комбинаций. Анализ компонентного состава масла потомства выявил полное "игнорирование" доминанты I во всех 4-х комбинациях. В комбинации K59xN18 были получены ментолсинтезирующие и карвонсинтезирующие гибриды соотношении 1,3 : 1 (см. табл.1). При этом и те и другие содержали лимонен (3...51%). Сходная картина наблюдалась и в комбинации K 59 x N 2. Здесь соотношение ментольных и карвонных гибридов составило 1,5 : 1. Карвон варьировал в пределах 40...58%, а лимонен 12...37%. Из этой комбинации был выделен высокоурожайный образец с содержанием лимонена в масле 36%. В комбинациях K 59 x M и K 59 x X - все потомки относились к ментольной ветви биосинтеза терпеноидов. Детальный анализ последней комбинации показал, что у 84% гибридов в эфирном масле преобладал изоментон (28...40%) и ментол (24...31%); у 5% - повышенный изоментон (54...59%); у 9% - ментол (31...42%) и ментон (19...25%). Из последней группы выделены высокомасличные гибриды по содержанию общего ментола (41...53%) и соотношению других основных компонентов, аналогичные сортам мяты перечной советской и болгарской селекции. Представляют также интерес и два отобранных высокопродуктивных образца изоментонного направления (40...56%) с приятной "конфетной" гаммой эфирного масла. Однако ожидаемых линалоольных гибридов во всех случаях получено не было, что явно расходится с постулированной ролью гена I в биосинтезе. Наши дальнейшие исследования были направлены на некоторое уточнение этого механизма.

Коллекция института располагает полиплоидным образцом "бергамотной" мяты *M.citrata* K 66, который был получен ранее Л.А.Бугаенко методом колхицинирования стерильного образца из Болгарии. В результате произошло восстановление только женской фертильности, что позволило широко использовать эту форму в гибридизации для создания перспективных гибридов так называемого лавандового направления. K 66 содержит в составе масла 26,0 + 2,6% линалоола и 37,8 + 4,5% линалил ацетата и при скрещивании с изоментонным, ментофурановым и перечными образцами мяты, а также при свободном её опылении поведение гена I полностью соответствовало литературным данным. Все гибриды на основе K 66 не содержали в своем составе C-2 или C-3 окисленных компонентов, а накапливали преимущественно линалоол и линалил ацетат. Это дало основание предположить гомозиготную природу этой формы по доминантному гену I.

Представлялось заманчивым получить гибриды от комбинации К 59 х К 66, но поскольку эти формы стерильны по мужской линии, объединить эти генотипы представлялось возможным путем создания трехвидовых гибридов.

Обычно потомство на основе К 66 стерильно по мужской линии и почти стерильно по женской. Однако при анализе образцов от скрещивания К66 с линалоольными образцами *M. longifolia* X и М с восстановленной фертильностью, были выделены два полностью фертильных гибрида. По сравнению с материнской формой у них увеличилось содержание линалоола и уменьшилось линалил ацетата. Образец 94.15.9 содержит 49...64% линалоола и 18...23% линалил ацетата; 94.18.8 – линалоола 73...79% и линалил ацетата 5...10%. От свободного опыления образца 94.15.9 анализировалось методом ГЖХ 18 инцухт потомков, все из которых оказались линалоольно-линалил ацетатными. Из этого можно предположить, что по содержанию гена I образец 94.15.9 является доминантной гомозиготой. Серия скрещиваний К 59 с формами 95.15.9 и 94.18.8 позволила получить трехвидовые гибриды, анализ которых продолжается в настоящее время. Но уже сейчас получены предварительные результаты, в основном совпадающие с литературными данными. Так, от комбинации К 59 х 94.15.9 по составу масла проанализирован 21 гибрид, из которых 19 имеют линалоольно-линалил ацетатное направление, а остальные 2, вероятно, относятся к ментолсинтезирующим. У комбинации К 59 х 94.18.8 соотношение ментолсинтезирующих и лавандовых гибридов составляет 1 : 1 (10 : 11 шт), что, возможно, указывает на гетерогенность отцовской формы по гену I (генотип Ii).

Результаты исследований гибридного потомства по принадлежности к той или иной ветви биосинтеза терпеноидов у всех выше перечисленных комбинаций, представлены в таблице 1.

Таким образом, на основе высокоментольной высокомасличной формы *M. canadensis* К 59 получены межвидовые гибриды, относящиеся к различным ветвям биосинтеза терпеноидов эфирного мятного масла с сохранением морфологических черт материнского растения. Среди гибридов по комплексу признаков выделены наиболее перспективные с продуктивностью на уровне и выше высокоментольных сортов Симферопольская 200, Заграва и значительно выше сортов мяты перечной, иммунные и практически устойчивые к ржавчине. В их числе : 3 карвонных образца со сбором масла 50...58 кг/га, содержанием карвона 50...51%; 2 гибрида перечного направления со сбором эфирного масла 52...55 кг/га; 2 гибрида с содержанием изоментона 40...56% с приятной "конфетной" гаммой эфирного масла и его сбором в 49...56 кг/га; оригинальный лимоненный образец (36% лимонена) с приятным ароматом и сбором масла 34 кг/га. Продолжаются исследования трехвидовых гибридов линалоольно-линалил ацетатного направления с перспективой выделения хозяйственно-ценных образцов.

Вместе с тем, полученные данные не всегда соответствуют литературным сведениям о роли гена I в биосинтезе компонентов эфирного масла мяты. Возможно, ген I в линалоольных образцах не идентичен гену в составе мят лавандового направления. Возможно также, что этот механизм несколько сложнее постулированных взглядов (множественное действие генов, механизм блокады и т.д.) и требует дальнейших исследований. Как бы там ни было, наши результаты не подтвердили доминантной роли гена I при скрещивании конкретного высокоментольного образца с конкретными линалоольными формами. Вместе с тем, постулированный механизм подтверждается при гибридизации с карвонной формой, а также при использовании гена I, источником которого служит *M.citrata*.

Литература.

1. Hefendehl F.W.,Murray M.J.,Changes in monoterpene composition in *Mentha aquatica* produced by gene substitution from a high limonen strain of *M.citrata* // *Phytochemistry*,1973,12,p.1875-1880.
2. Lawrence B.M.,A study of monoterpene in terrelationships in the genus *Mentha* with special reference to the origin of pulegon and menthofuran: Doctor dis. Hamilton,Ontario,Canada:1978,p.302.
3. Murray M.J. The genetic basis for a third ketone group in *Mentha spicata* // *Genetics*,1960. vol.45, 7,p 931-937.
- 4..Murray M.J.,Lincoln D.E. The genetic basis of acyclic oil constituents in *Mentha citrata* Ehrh. // *Genetics*,1970,65 p457-471.
5. Бугаенко Л.А.Генетические закономерности биосинтеза терпенов и перспективы регуляции содержания и качества эфирного масла при межвидовой гибридизации у мяты . Дис. на соиск. уч. степени док. биол. наук. Симферополь:1985, 440 с.
6. Сааков С.Г. , Крейзер Г.К., Мята кудрявая : Эфирно-масличные растения, их культура и эф. масла. Л.:1937,т.5,стр 278-280.