

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ САХАРОВ И ФЛАВОНОИДОВ В КУЛЬТУРАХ ВОЛОСОВИДНЫХ КОРНЕЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА *HELİANTUS ANNUUS L.*

А.Б. Якупова

к.б.н., ст. преподаватель,
кафедра биохимии и биотехнологии, Башкирский государственный университет (г. Уфа)
E-mail: alfiram@yandex.ru

Х.Г. Мусин

мл. науч. сотрудник,
лаборатория геномики растений, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» РАН (г. Уфа)
E-mail: khalit.musin@yandex.ru

Б.Р. Кулуев

д.б.н., зав. лабораторией геномики растений,
Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» РАН (г. Уфа)
E-mail: kuluev@bk.ru

Актуальность. Корни подсолнечника *Heliantus annuus L.* применяются при лечении моче- и желчнокаменной болезнью. Заготовка корней подсолнечника для медицинских целей сопряжена с рядом проблем, из которых наиболее актуальны невозможность круглогодичного выращивания, отсутствие приспособлений и машин для сбора корней и загрязнение корней пестицидами. В связи с этим представляет большой интерес получение культур генетически трансформированных (волосовидных) корней подсолнечника, способных расти на безгормональных питательных средах в виде изолированных культур.

Цель работы. Создание волосовидных корней подсолнечника при помощи штаммов A4 и 15834 *Agrobacterium rhizogenes*, оценка параметров их роста при выращивании на твердых средах и анализ содержания в них водорастворимых сахаров и флавоноидов.

Материал и методы. Объектом исследования служили волосовидные корни подсолнечника, полученные агробактериальной трансформацией семядольных эксплантов, выращенных в условиях *in vitro*. Содержание сахаров и флавоноидов измеряли спектрофотометрическим методом на основе спиртовых экстрактов.

Результаты. Выявлена большая эффективность штамма A4 *A. rhizogenes*, чем штамма 15834 при агробактериальной трансформации семядольных эксплантов подсолнечника. Содержание водорастворимых сахаров в культуре волосовидных корней, полученных при помощи штамма 15834 *A. rhizogenes* более чем в 2 раза превысило таковое в волосовидных корнях, полученных при помощи штамма A4 *A. rhizogenes*. Корни подсолнечника, выращенные в естественных условиях, содержали меньше водорастворимых сахаров, чем оба варианта волосовидных корней. Суммарное содержание флавоноидов в культурах волосовидных корней подсолнечника, полученных при помощи штаммов A4 и 15834 *A. rhizogenes* достоверно не различалось, но в среднем было в 2,7 раза больше, чем в нативных корнях подсолнечника.

Выводы. Получены волосовидные корни подсолнечника путем прямой агробактериальной трансформации семядольных эксплантов в условиях *in vitro*. Волосовидные корни характеризуются неограниченным ростом на безгормональной питательной среде и более высоким содержанием водорастворимых сахаров по сравнению с нативными корнями растений.

Ключевые слова: *Heliantus annuus*, подсолнечник, волосовидные корни, генетически трансформированные корни, бородатые корни, *Agrobacterium rhizogenes*, водорастворимые сахара, флавоноиды.

Для цитирования: Якупова А.Б., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Сравнительный анализ содержания сахаров и флавоноидов в культурах волосовидных корней подсолнечника *Heliantus annuus L.* Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(9):9–18. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-09-02>

Helianthus annuus L. – однолетнее травянистое растение высотой от 0,7 до 4 м, имеющее главный стебель и главный корень [1], проникающий в почву на глубину до 4 м, с боковыми корнями, распространяющимися в стороны до 120 см. В настоящее время на территории стран бывшего СССР подсолнечник стал основной масличной

культурой [2]. В пищу и в лечебных целях используют свежие и высушенные семена, листья, краевые цветки, корни [3, 4]. Семена подсолнечника содержат большое количество масла (до 45%), в состав которого входят преимущественно глицериды ненасыщенных жирных кислот (до 47% линолевой, до 39% олеиновой, а также пальмитино-

вой, стеариновой, арахидоновой, лигноцериновой кислот), фосфолипиды, витамин Е, каротиноиды, витаминоподобные вещества: холин, 13–20% белковые вещества, 24–27% углеводов, около 2% фитина, полифенольные соединения: дубильные вещества, фенолокислоты, органические кислоты (лимонная и винная). В листьях обнаружены: витамины (каротиноиды – свыше 100 мг%), флавоноиды (кверциметрин и др.), кумарины (скополлин), стеринны (ситостерин), сапонины (гликозид эхиноцистовой кислоты), органические кислоты (янтарная, фумаровая, лимонная), углеводы (пектиновые вещества и др.), минеральные вещества. В лепестках идентифицированы: витамины (каротиноиды криптоксантин, тараксантин, β-каротин), витаминоподобные соединения (холин, бетаин), полифенольные соединения (гликозид кверциметрин и др., антоцианидины, фенолокислоты (хлорогеновая, неохлорогеновая, кофейная), полисахариды (гемицеллюлоза В и др.), органические кислоты, стеринны, сапонины (гликозид эхиноцистовой кислоты), спирт орнидиол) [5].

Данные о химическом составе корней подсолнечника немногочисленны. Например, в исследовании Карпенко с соавт. [6] из корней подсолнечника выделены полисахариды (общий выход в пределах $10,31 \pm 0,20\%$): водорастворимые полисахариды (ВРПС – 0,81%), пектиновые вещества (ПВ – 2,5%), гемицеллюлозы (ГЦ) – А (5,13%) и Б (1,61%). Содержание инулина в корнях подсолнечника составило от 5,49 до 6,17%. Корни подсолнечника также содержали дубильные веществ в пределах $11,19 \pm 0,22\%$. Результаты анализов минерального состава показали, что в состав корней подсолнечника входит значительное количество минеральных элементов в комплексе с другими биологически активными веществами [6]. Также установлено наличие 19 жизненно необходимых элементов. Преобладали макроэлементы: калий, кальций, магний, фосфор. Среди микроэлементов высоким содержанием отличились барий, марганец, железо, кремний [7].

Корни подсолнечника часто рассматриваются как лечебное средство от моче- и желчнокаменной болезней. Мочекаменная болезнь – заболевание, проявляющееся образованием камней в почках, мочеточнике или мочевом пузыре. Другие названия: уролитиаз, нефролитиаз, почечнокаменная болезнь [8]. Проблема лечения и профилактики камнеобразования, несмотря на широкое внедрение в клиническую практику новых методов разрушения и удаления мочевых конкрементов, оста-

ется чрезвычайно актуальной. Изучение литолиза (расщепления) мочевых камней является важным, так как может уберечь больных от хирургического вмешательства или уменьшить количество процедур литотрипсии, тем самым предоставляя возможность избежать осложнений, связанных с повреждением тканей почек, рецидива уролитиаза, а также развития острого пиелонефрита. В связи с этим в традиционной медицине нередко прибегают к использованию растительных средств, обладающих литолитической активностью и снижающих частоту рецидивов образования уролитов, не оказывая при этом каких-либо побочных действий.

В отечественной и зарубежной медицинской науке осуществляется активный поиск и подбор растительных средств и компонентов, обладающих такими свойствами. В народной медицине важная роль в качестве лечебного средства как от мочекаменной, так и от желчнокаменной болезни отводится корням подсолнечника однолетнего. Антимикробное, противовоспалительное, болеутоляющее и антиоксидантное свойства разных вегетативных частей, в том числе и корней подсолнечника, неоднократно клинически и фармакологически доказаны [9–11]. Например, имеются сведения, что отвар корней подсолнечника снижает в организме содержание уратов, оксалатов, мочекислого аммония и трипельфосфатов и может применяться для лечения подагры и мочекаменной болезни [12].

Однако при получении сырья корней подсолнечника в лечебных целях имеется ряд проблем. Так, при промышленном возделывании подсолнечника используется много различных пестицидов, поэтому его корни, собранные на поле, могут быть непригодны для лечебного применения. Сбор корней подсолнечника на сегодняшний день в промышленных масштабах не ведется, это в основном ручной труд, что делает данное лекарственное средство относительно труднодоступным, поэтому в продажу часто поступают стебли подсолнечника, не обладающие необходимым терапевтическим эффектом. В связи с этим представляет интерес получение культур волосовидных (бородатых) корней подсолнечника, способных расти на безгормональных питательных средах отдельно от побега в специальных ферментерах или биореакторах [13]. Культуры волосовидных корней подсолнечника, вероятнее всего, не смогут стать экономически более выгодной альтернативой обычным корням этого растения. Од-

нако при выращивании волосовидных корней в биореакторах можно быстро и легко менять условия для увеличения содержания тех или иных хозяйственно-ценных компонентов корней. Также разрабатываемая технология генетической трансформации подсолнечника и получения волосовидных корней может стать основой для протоколов создания трансгенных форм этой культуры.

Цель работы – создание волосовидных корней подсолнечника при помощи штаммов А4 и 15834 *Agrobacterium rhizogenes*, оценка параметров их роста при выращивании на твердых питательных средах и сравнительный анализ содержания в них сахаров и флавоноидов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Волосовидные корни *H. annuus* получали путем агробактериальной трансформации семядольных эксплантов, выращенных в условиях *in vitro*. Для получения культуры *in vitro* неочищенные семянки *H. annuus* перед посевом промывали в проточной воде. Семянки стерилизовали в течение 1 мин в 70%-ном этиловом спирте, затем в течение 10 мин в 5%-ном гипохлорите натрия (NaClO) с добавлением 0,5%-ного Tween 20, далее выдерживали их в 0,3%-ной H_2O_2 в течение 15 мин. После этапа стерилизации семянки пять раз промывали стерильной дистиллированной водой. Высаживали стерильные семянки по 6 штук на чашку Петри с агаризованной средой Мурасиге–Скуга (МС) и проводили стратификацию при 4 °С в течение 2 сут. Подсолнечник выращивали при температуре 25 °С, фотопериоде (освещение/темнота) 16/8 ч и плотности потока фотонов $50 \text{ мкмоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$, обеспечиваемых ростовыми флуоресцентными лампами Fluora.

Трансформацию семядольных эксплантов проводили через 6–7 дней после посева семян на среду МС. Для трансформации использовали штаммы *A. rhizogenes* А4 и 15834, которые предварительно культивировались в жидкой среде LB (Lysogeny Broth) с добавлением 100 мг/л рифампицина в течение суток (штаммы А4 и 15834 *A. rhizogenes* обладают устойчивостью к рифампицину). Затем культуры агробактерий центрифугировали при 4 тыс. об/мин в течение 10 мин при температуре 18 °С, осадок растворяли в 20 мл жидкой среды МС с добавлением 100 мкМ ацетосирингона. Суспензию агробактерий культивировали на орбитальном шейкере в течение получаса, после чего проводили инокуляцию семядольных эксплантов подсолнечника. Для получения эксплантов исполь-

зовали 12 семядолей проростков. Каждую семядолю разрезали поперек на две части. Каждый из эксплантов по центральной жилке несколько раз укалывали иглой инсулинового шприца, обмакиваемой в агробактериальную суспензию (инокулюм). Затем экспланты, нижней стороной листа вверх, погружали в чашку Петри, содержащую 10 мл жидкой среды МС с добавлением 4 мл инокулюма. Чашки Петри с эксплантами аккуратно перемешивали в течение получаса, не допуская попадания агробактерий на нижнюю сторону листа. Экспланты подсушивали на стерильной фильтровальной бумаге и в течение 2 сут сокультивировали с агробактериями на твердой среде МС, без добавления антибиотиков. После этого экспланты пересаживали на среду МС, содержащую дополнительно 200 мг/л аугментина для элиминации агробактерий. После появления волосовидных корней каждый из них (в среднем длиной 1,5 см) пересаживали в отдельную чашку без содержания антибиотика. Для оценки параметров роста волосовидных корней в течение 3–4 недель измеряли длину длинного корня. Чашки содержали при температуре 26 °С и плотности потока фотонов $50 \text{ мкмоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$.

Полученные линии культуры волосовидных корней подсолнечника однолетнего измельчали в ступке до получения сухого порошка. Для выделения ДНК использовали стандартный метод СТАВ. Для подтверждения успешной агробактериальной трансформации семядольных эксплантов подсолнечника проводили ПЦР-анализ на наличие гена *rolB*. Для этого буфер Таq-полимеразы, dNTP и растворы праймеров предварительно размораживали и ресуспендировали на вортексе; ПЦР-анализ проводили в 30 мкл. В эппендорфы на 0,6 мл добавляли следующие компоненты: буфер Таq-полимеразы (10×) – 3 мкл; dNTP (10×) – 3 мкл; прямой праймер (10 ое/мл) – 1 мкл; обратный праймер (10 ое/мл) – 1 мкл; образец ДНК – 1 мкл; Таq-полимераза – 1 мкл; вода mQ – 20 мкл. В качестве положительного контроля амплификации (К+) использовали тотальную ДНК *A. rhizogenes*, а отрицательный контроль (К–) содержал все компоненты реакционного раствора, кроме исследуемой ДНК.

Полимеразную цепную реакцию проводили со специфическими к участкам гена *rolB* праймерами 5'-AGGTCTGGCTCCGGTGA-3', 5'-GTTCATTCA-CCTGCTGGAGT-3 и 5'-GCGACAACGATTCA-ACCATATCG-3', 5'-TTTACTGCAGCAGGCTTCA-TGAC-3' [19]. После завершения ПЦР продукты

реакции детектировали с помощью агарозного геле-электрофореза.

Содержание водорастворимых сахаров (ВРС) и флавоноидов определяли спектрофотометрическим методом [15, 16]. Полученные корни высушивали до постоянной массы при 80 °С. Растирали 10 мг растительного материала и помещали в эпепендорф, добавляли 1 мл 80%-ного этилового спирта и нагревали при 80 °С 45 мин. Затем проводили центрифугирование при 13,5 тыс. об/мин 10 мин. После центрифугирования 800 мкл супернатанта переносили в чистый эпепендорф. Далее выпаривали спирт при 80 °С на твердотельном термостате «Термит», после чего добавляли 1 мл дистиллированной воды и оставляли на одни сутки при комнатной температуре. По истечении суток центрифугировали при 13,5 тыс. об/мин 10 мин. Затем отбирали 100 мкл экстракта в пробирки для дальнейшего определения сахаров. В каждую пробирку добавляли 0,5 мл фенола (4%) + 2,5 мл H₂SO₄ (конц.). Пробирки погружали на 5 мин в холодную воду и измеряли оптическую плотность анализируемого образца на спектрофотометре при длине волны 490±2 нм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, содержащий 0,5 мл фенола (4%) + 2,5 мл H₂SO₄ (конц.) (без воды). Чтобы построить калибровочный график брали раствор сахарозы (1 мг/мл): 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 мкл.

Для анализа содержания флавоноидов полученные линии культур волосовидных корней подсолнечника также высушивали и измельчали в ступке до порошкообразного состояния; 50 мг сухого растительного материала заливали 2 мл 80%-ного этанола, далее проводили экстракцию на ультразвуковой бане в течение 20 мин. Затем отбирали 2 мл экстракта и центрифугировали 5 мин при 14 тыс. об/мин. К 300 мкл экстракта или стандартного раствора кверцетина (20, 40, 60, 80, 100 мг/л) добавляли 1500 мкл дистиллированной воды, затем 100 мкл 5%-ного NaNO₂, а через 5 мин – 100 мкл 10%-ного AlCl₃ и через 6 мин – 650 мкл 1 М NaOH. Доводили объем дистиллированной водой до 3 мл и перемешивали. Оптическую плотность анализируемого образца измеряли на спектрофотометре при длине волны 510±2 нм. В качестве раствора сравнения использовали смесь без добавления экстракта. Результаты выражали в миллиграммах эквивалента кверцетина (СЕ) на 100 г сухой массы. Статистическую обработку результатов измерений осуществляли в программе Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На семядольных эксплантах подсолнечника волосовидные корни начинали появляться через 11 дней после инокуляции агробактериями (рис. 1).

Эффективность трансформации семядольных эксплантов *H. annuus* составила 93% при использовании штамма А4 и 78% – при использовании штамма 15834. Известно, что наблюдения за интенсивностью роста корней, появившихся на различных эксплантах, позволяют отбирать наиболее интенсивно растущие линии корневой культуры для их последующего культивирования [14]. Таким образом, успешность получения волосовидных корней зависела от используемого для трансформации штамма агробактерий, причем корни, полученные после трансформации *A. rhizogenes* штаммом А4, были более разветвленные («косматые») и новые волосовидные корни на семядольных эксплантах продолжали формироваться в течение как минимум двух-трех месяцев, тогда как после трансформации штаммом 15834 новые корни продолжали образовываться только в течение первого месяца.

Для корневых культур, полученных обоими типами штаммов, помимо плагиотропного роста корней, было характерно их быстрое ветвление на фоне не столь хорошо выраженного апикального роста кончиков корней, что приводило к очень плотному переплетению образующихся боковых корней. В результате к концу четвертой недели культуры волосовидных корней представляли собой переплетенные между собой разветвленные корни (рис. 1, 3–4).

Выявлено два основных морфотипа волосовидных корней подсолнечника, полученных в экспериментах со штаммами А4 и 15834 (рис. 2).

Первый морфотип, чаще встречающийся у линий, полученных при помощи штамма А4, характеризовался более толстыми и темными корнями с большим количеством коротких, растущих вертикально вверх «пушистых» корешков, имеющих потемневший кончик и иногда останавливающихся в росте через месяц культивирования на жидкой среде МС (рис. 2, 2). Вторым морфотипом образовывался чаще на эксплантах, трансформированных штаммом 15834; он отличался от первого меньшей толщиной корней, отсутствием потемнения кончиков корней, замедление их роста не фиксировалось ни у одной линии, по крайней мере, через один месяц после отделения от материнского экспланта (рис. 2, 1).

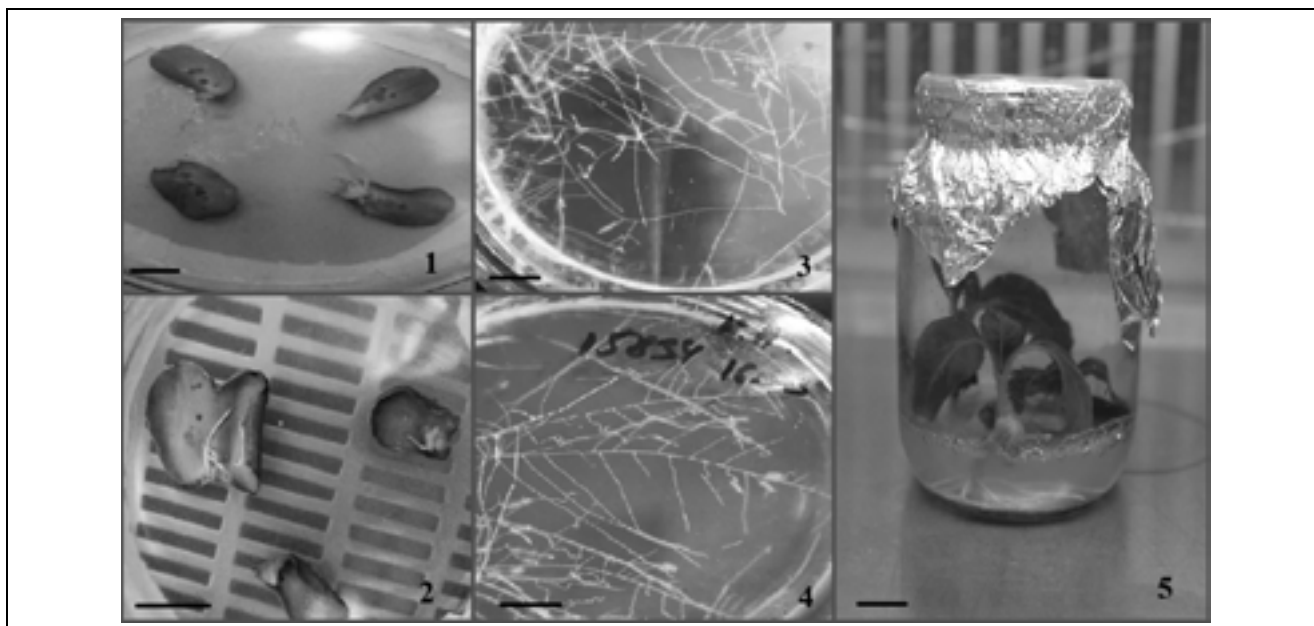


Рис. 1. Получение волосовидных корней *H. annuus*: 1 и 2 – экспланты семядольных листьев через 11 дней после трансформации штаммами А4 *A. rhizogenes* и 15834 *A. Rhizogenes* соответственно; 3 и 4 – волосовидные корни через три недели после трансформации штаммами А4 *A. rhizogenes* и 15834 *A. rhizogenes* соответственно; 5 – регенеранты подсолнечника, выращенные из культур волосовидных корней *in vitro* (длина отрезков 1 см)

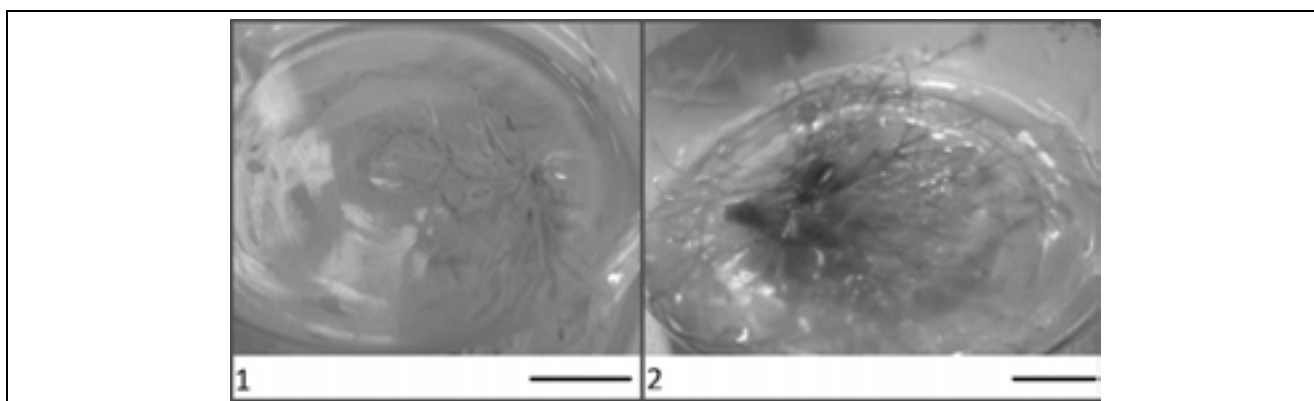


Рис. 2. Культуры волосовидных корней *H. annuus*: 1 – волосовидные корни, образованные после трансформации штаммом 15834; 2 – волосовидные корни, образованные после трансформации штаммом А4 (длина отрезков 1 см)

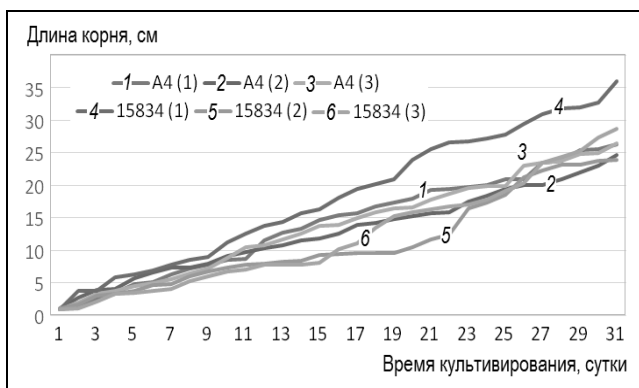


Рис. 3. Темпы роста в длину волосовидных корней *H. annuus* на твердой питательной среде МС

За три недели на твердой среде длина корней, полученных при помощи штамма А4, в среднем увеличивалась на $17,6 \pm 0,88$ см, длина корней, полученных при помощи штамма 15834, – на $17,9 \pm 0,894$ см. Таким образом, статистически достоверных различий между двумя штаммами по данному параметру не наблюдалось (рис. 3).

Тем не менее в случае со штаммом 15834 у отдельных корней наблюдался более интенсивный рост. И к тому же, в случае использования этого штамма не фиксировалось замедление роста волосовидных корней, по крайней мере, в течение одного месяца культивирования на твердой среде МС.

Нельзя исключать того, что на семядольных эксплантах подсолнечника образуются не генетически трансформированные, а адвентивные корни. Поэтому были проведены исследования по выявлению естественного ризогенеза на семядольных эксплантах подсолнечника в условиях *in vitro*. Показано, что адвентивные корни на семядолях подсолнечника образуются спонтанно даже без использования агробактерий. Эти адвентивные корни также выращивались изолированно на жидкой среде МС, однако полученные без агробактерий культуры адвентивных корней подсолнечника темнели и полностью прекращали свой рост уже через 2–3 недели культивирования. То есть культуры нетрансформированных корней подсолнечника не обладали способностью к неограниченному росту на безгормональной среде, в отличие от волосовидных корней.

В связи с тем, что подсолнечник однолетний характеризуется повышенной частотой спонтанного ризогенеза на семядольных эксплантах, адвентивные корни могут образовываться и без применения метода агробактериальной трансформации. Вследствие этого фенотипическое определение истинных культур волосовидных корней среди адвентивных становится затруднительным [17]. Для подтверждения успешной агробактериальной трансформации корневых культур подсолнечника однолетнего проведен ПЦР-анализ на наличие гена *rolB* *A. rhizogenes*. При этом было использовано три линии предположительно волосовидных корней подсолнечника однолетнего, трансформированных штаммом 15834, и три линии, трансформированных штаммом А4. В результате ПЦР ген *rolB* обнаружен у линий 15834(1) и 15834(3), а также в линиях А4(4) и А4(5), что свидетельствует о том, что полученные корневые культуры подсолнечника однолетнего являются генетически трансформированными, то есть волосовидными (рис. 4).

В дальнейшем линии культур волосовидных корней подсолнечника однолетнего, полученные в эксперименте со штаммами 15834 и А4 *A. rhizogenes*, высушивали и измельчали для оценки их биохимических показателей по содержанию ВРС и флавоноидов.

Внимание исследователей к вопросу изучения структуры, химического состава и свойств растительных полисахаридов в первую очередь вызвано широким спектром биологической активности данных соединений. Полисахариды растений оказывают положительное влияние на эндокринную и иммунную системы, снижают риски заболеваний

сердечно-сосудистой системы, проявляют антикоагулянтные свойства, препятствуя образованию тромбов, выводят из организма соли тяжелых металлов и способствуют нормализации кишечной микрофлоры. Все это обуславливает немалый интерес к изучению полисахаридного состава лекарственных растений [7].

Данные о химическом составе корней подсолнечника однолетнего (*H. annuus*) весьма немногочисленны. В работе Пшуковой с соавт. [7] определен общий выход полисахаридов в корнях подсолнечника однолетнего (10,31±0,20% от воздушно-сухого сырья), содержание водорастворимых полисахаридов составило 0,81%. Содержание инулина, известного своей выраженной биологической активностью, в корнях подсолнечника однолетнего составило 5,49–6,17%.

В исследовании, проведенном фенол-серно-кислотным методом [15] определено общее содержание ВРС в 10 изолированных культурах волосовидных корней подсолнечника однолетнего, трансформированного с помощью штаммов 15834 и А4, а также в нативных корнях подсолнечника, выращенных в естественных условиях (табл. 1).

Волосовидные корни подсолнечника однолетнего, трансформированные агробактериальным штаммом 15834, характеризовались наиболее высоким содержанием ВРС (табл. 1). Так, содержание ВРС в линиях штамма 15834 в среднем составило 91,5±0,8 мкг/мг сух. массы (рис. 5), что значительно превысило таковые в других исследованных корневых культурах.

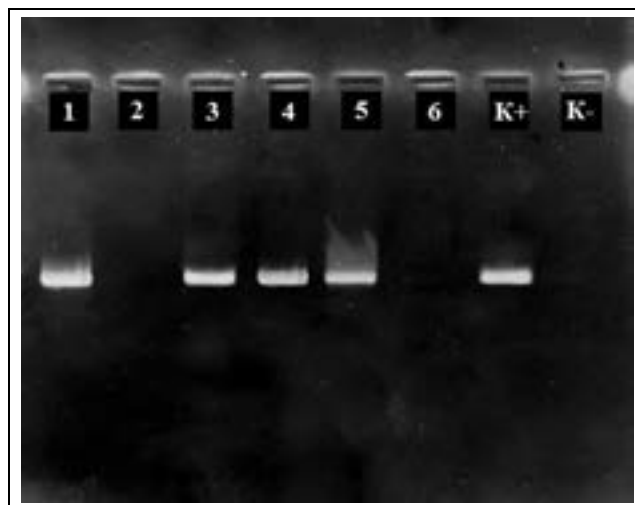


Рис. 4. Результаты ПЦР-анализа волосовидных корней подсолнечника на ген *rolB*: 1–3 – линии волосовидных корней 15834 (1–3); 4–6 – линии волосовидных корней А4 (1–3); К+ – ДНК *A. rhizogenes*; К- – отрицательный контроль ПЦР

Таблица 1. Содержание водорастворимых сахаров в культуре волосовидных корней, полученных разными штаммами *A. rhizogenes* (мкг/мг сух. массы)

Число проб	Нативные корни подсолнечника	Волосовидные корни линии А4	Волосовидные корни линии 15834
1	29	43	95
2	32,2	35,1	93
3	15,3	69,1	92
4	24	45	88
5	24,3	33,6	91
6	14	43,3	95,3
7	19,2	51,2	91,2
8	32,3	53,2	94
9	27,3	36	93,4
10	31	47,1	82
Среднее	24,86±3,9	45,66±0,93	91,5±0,8

Наибольшим содержанием сахаров характеризовались линии 15834(1), 15834(6) и 15834(8), в то время как линия 15834(10) уступала в данном параметре (82 мкг/мг сух. массы).

В целом содержание сахаров в остальных линиях волосовидных корней, трансформированных при помощи штамма 15834, варьировало незначительно. Содержание ВРС в линиях штамма А4 в среднем составило 45,66±0,93 мкг/мг сухой массы. Содержание ВРС в разных линиях штамма А4 было подтверждено значительной динамикой (табл. 1).

Полученные данные свидетельствуют о том, что накопление ВРС в культуре волосовидных корней штамма 15834 происходило наиболее интенсивно: среднее содержание ВРС сахаров линий штамма 15834 (91,5±0,8 мкг/мг сух. массы) в более чем в 2 раза превысило содержание ВРС в культурах волосовидных корней штамма *A. rhizogenes* А4 (45,66±4,2 мкг/мг сух. массы).

Согласно полученным данным, содержание ВРС в нативных корнях подсолнечника составило в среднем 24,86±3,9 мкг/мг сух. массы, из чего следует, что общее содержание ВРС в культурах волосовидных корней, выращенных в лабораторных условиях, значительно превысило таковое в

корнях интактного подсолнечника, полученного в естественных условиях.

Особый интерес в данной работе представляло определение суммы флавоноидов в корнях подсолнечника однолетнего, полученного разными способами. Наблюдаемый всплеск интереса к терапевтическому потенциалу лекарственных растений может быть обусловлен фенольными соединениями, в частности, флавоноидами [18], обладающими широким спектром биологической активности [19].

В подсолнечнике однолетнем, согласно литературным данным, идентифицировано порядка 10 фенольных соединений, среди которых мажорными соединениями явились высокомолекулярные полифенолы (23,58% от общего содержания фенольных соединений). В связи с тем, что корни подсолнечника однолетнего обладают высокой биологической активностью, данное растение перспективно в качестве исходного лекарственного сырья [17].

В результате исследований определена сумма флавоноидов в культуре волосовидных корней подсолнечника однолетнего, полученного при помощи штаммов *A. rhizogenes* 15834 и А4, а также в корнях нативного растения (табл. 2).

Таблица 2. Сумма флавоноидов в культуре волосовидных корней, полученных разными штаммами *A. rhizogenes* (мг экв. кверцетина СЕ/100 г сух. массы)

Число проб	Нативные корни подсолнечника	Волосовидные корни линии А4	Волосовидные корни линии 15834
1	10,8	32,5	52,8
2	13,6	53,1	43,6
3	14,9	30,9	50,4
4	12,9	41,3	36
5	8,92	54,1	34,8
6	15	29	35,6
7	13,6	36,3	29,6
8	12,8	35,8	37,6
Среднее	12,8±1,4	40,05±1,9	39,1 мг±2,7

Согласно полученным данным, культуры волосовидных корней подсолнечника однолетнего, полученные с помощью *A. rhizogenes* штамма А4, характеризовались наибольшим содержанием флавоноидов. Так, суммарное содержание флавоноидов в пересчете на кверцетин составило в среднем 40,05±1,9 мг/100 г сух. массы (табл. 2). Содержание флавоноидов в культурах волосовидных корней подсолнечника однолетнего, полученных при помощи штамма 15834 *A. rhizogenes*, в пересчете на кверцетин составило 39,1±2,7 мг/100 г сух. массы. Таким образом, статистически достоверных различий между двумя штаммами по данному параметру не выявлялось. В результате проведенных исследований установлено суммарное содержание флавоноидов в корнях подсолнечника однолетнего, выращенного в диких условиях. Оно составило 12,8±1,4 мг экв. кверцетина на 100 г сух. массы, что значительно ниже суммы флавоноидов в культурах волосовидных корней подсолнечника.

Полученные культуры волосовидных корней подсолнечника однолетнего характеризовались более высоким содержанием флавоноидов, чем нативные корни подсолнечника. Предполагается, что подобный эффект усиления биосинтеза веществ вторичного метаболизма в трансформированных волосовидных корнях обусловлен экспрессией *rol*-генов *A. rhizogenes*. Продукты генов *rolB* и *rolC* способны оказывать значительное вли-

яние на биосинтез вторичных метаболитов, что позволяет получать культуры волосовидных корней с высоким уровнем синтеза того или иного соединения [20]. Результаты исследования свидетельствуют о том, что волосовидные корни, полученные с помощью *A. rhizogenes*, являются устойчивыми системами, способными не только сохранять биосинтез вторичных метаболитов, но и поддерживать его на более высоком уровне, чем при выращивании подсолнечника в культуре.

ВЫВОДЫ

1. Получены стерильные проростки подсолнечника и трансформированы их семядольные листья двумя разными штаммами *A. rhizogenes* с эффективностью 93% при использовании штамма А4 и 78% – при использовании штамма 15834. Полученные после агробактериальной трансформации культуры изолированных корней характеризовались способностью к неограниченному росту на безгормональной среде.
2. Особого внимания заслуживают линии корней А4, характеризовавшиеся наиболее быстрым ростом на твердой питательной среде, а также линия 15834(1), отличавшаяся наиболее стремительным ростом среди всех проанализированных культур корней. Однако для практического применения представленной

разработки необходимо провести анализ качественного состава ВРС и флавоноидов в полученных линиях корней при выращивании в питательных средах различного состава, поскольку изменение концентрации других компонентов среды, помимо сахарозы, также может влиять на рост корней и продукцию вторичных метаболитов.

3. В литературе имеются сведения, что лечебным эффектом при моче- и желчнокаменных болезнях в корнях подсолнечника обладают, прежде всего, алкалоиды и органические кислоты. Пока точно неизвестно, насколько будет изменяться состав этих соединений в волосовидных корнях, по сравнению с обычными (нативными) корнями. В связи с этим необходимо отметить, что полученные волосовидные корни подсолнечника могут быть предложены для биотехнологического производства только после анализа содержания в них алкалоидов и органических кислот.

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А19-119021190011-0, а также при финансовой поддержке гранта Президента РФ для молодых российских ученых – докторов наук МД-2304.2020.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилова В.А., Анисимова И.Н. Генетика культурных растений. Подсолнечник. СПб.: ВИР. 2003. 209 с.
2. Дьяков А.Б. Физиология подсолнечника. Краснодар: ВНИИМК. 2004. 76 с.
3. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям (Фитотерапия). 3-е издание, стереотипное. М.: Медицина. 1990. 464 с.
4. Никитина Т.И. Лекарственные растения. Применение. Противопоказания. Сборы: Справочник фитотерапевта. Уфа: Изд-е Башкирск. ун-та. 2000. 236 с.
5. Киселева Т.Л., Карпеев А.А., Смирнова Ю.А., Амалицкий В.В., Сафонов В.П., Цветаева Е.В., Блинков И.Л., Коган Л.И., Чепков В.Н., Дронова М.А. Лечебные свойства пищевых растений. Под общ. ред. проф. Т.Л. Киселевой. М.: Изд-во ФНКЭЦ ТМДЛ Росздрава. 2007. 533 с.
6. Карпенко В.А., Лигай Л.В., Пищукова И.В. Определение содержания инулина в корнях подсолнечника. Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. Под ред. М.В. Гаврилина. Пятигорск: Пятигорская ГФА. 2011; 66: 106–107.
7. Пищукова И.В., Коновалов Д.А., Карпенко В.А., Лигай Л.В., Кулешова С.А. Фитохимическое и фармакологическое изучение корней подсолнечника однолетнего. Химия растительного сырья. 2014; 2: 189–194.
8. Журунова М.С., Даутова М.Б. Мочекаменная болезнь. Журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016; 5–6: 977.
9. Мелик-Гусейнов В.В., Герасименко С.В. Биологически активные вещества и элементный состав корней подсолнечника однолетнего. Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. Москва. 2013; 1: 24–26.
10. Мелик-Гусейнов В.В., Герасименко С.В. Идентификация фенольных соединений в подземных органах подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*). Вестник Московского государственного областного университета. 2013; 3: 34–36.
11. Мелик-Гусейнов В.В., Герасименко С.В., Тимченко Л.Д., Писков С.И. Изучение литолитической и идиуретической активности экстрактов корня подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*). Современные проблемы науки и образования. 2014; 4: 517.
12. Таова М.Р. Исследование противовоспалительной активности извлечений листьев и корней подсолнечника масличного. Научное обозрение. 2010;1: 24–26.
13. Мусин Х.Г., Якупова А.Б., Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Особенности роста культур генетически трансформированных (бородатых) корней табака и витании при изменении объема питательной среды. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017; 13(2): 46–50.
14. Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю. Генетически трансформированные корни как модель изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целого растения. Физиология растений. 2011;58(5): 787–796.
15. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Roberts P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analyt. Chem.* 1956; 28: 350–356.
16. Marinova D., Ribarova F., Atanassova M. Total phenolic and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy.* 2005; 40(3): 255–260.
17. Якупова А.Б., Мусин Х.Г., Баймухаметова Э.А., Таупова Р.М., Кулуев Б.Р. Индукция бородатых корней подсолнечника при помощи штаммов А4 и 15834 *Agrobacterium rhizogenes*. Биомика. 2018; 10(1): 7–10.
18. Shashank K., Pandey A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Scientific World Journal [Electronic]*. 2013; doi: 10.1155/2013/162750.
19. Макаренко О.А., Левицкий О.А. Физиологические функции флавоноидов в растениях. Физиология и биохимия культурных растений. 2013; 45(2): 100–112.
20. Павлова О.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Rol-гены *Agrobacterium rhizogenes*. Экологическая генетика. 2013; 11(1): 59–68.

Поступила после доработки 18 июня 2020 г.

A COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONTENT OF SUGARS AND FLAVONOIDS IN THE HAIRY ROOTS OF SUNFLOWER *HELIANTUS ANNUUS* L.

© Authors, 2020

A.B. Yakupova

Ph.D. (Biol.), Bashkir State University (Ufa)

E-mail: alfirmam@yandex.ru

K.G. Musin

Junior Research Scientist, Laboratory of Plant Genomics,

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Centre of RAS (Ufa)

E-mail: khalit.musin@yandex.ru

B.R. Kuluev

Dr.Sc. (Biol.), Head of the Laboratory of Plant Genomics, Laboratory of Plant Genomics,

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Centre of RAS (Ufa)

E-mail: kuluev@bk.ru

Relevance. Sunflower *Heliantus annuus* L. roots are used in the treatment of urolithiasis and cholelithiasis. Harvesting of sunflower roots for medical purposes is fraught with a number of problems, of which the impossibility of year-round cultivation, the absence of devices and machines for collecting roots, and contamination of roots with pesticides are most relevant. In this regard, it is of great interest to obtain hairy roots of sunflower that can grow on hormone-free nutrient media in isolated cultures.

The aim of our work was to create hairy roots of sunflower using strains A4 and 15834 of *Agrobacterium rhizogenes*, evaluate their growth parameters when grown on solid media, and analyze their content of water-soluble sugars and flavonoids.

Material and methods. The study revealed greater efficiency of strain A4 than strain 15834 for *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower cotyledon explants. The content of sugars and flavonoids was measured spectrophotometrically using alcohol extracts.

Results. The content of water-soluble sugars in the hairy root culture obtained using strain 15834 of *A. rhizogenes* was more than 2 times higher than that in the hairy roots obtained using strain A4 of *A. rhizogenes*. Naturally grown sunflower roots contained fewer water-soluble sugars than hairy roots. The total content of flavonoids in sunflower hairy root cultures obtained using strains A4 and 15834 of *A. rhizogenes* did not differ significantly, but on average it was 2.7 times higher than in native sunflower roots.

Conclusion. The hairy roots of sunflower were obtained by *agrobacterial* transformation of cotyledon explants *in vitro*. The resulting hairy roots are characterized by unrestricted growth on hormone-free media and a higher water-soluble sugar content than native plant roots.

Key words: *Heliantus annuus*, sunflower, hairy roots, *Agrobacterium rhizogenes*, water-soluble sugars, flavonoids.

For citation: Yakupova A.B., Musin K.G., Kuluev B.R. A comparative analysis of the content of sugars and flavonoids in the hairy roots of sunflower *Heliantus annuus* L. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(9):9-18. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-09-02>

REFERENCES

- Gavrilova V.A., Anisimova I.N. Genetika kul'turnykh rastenij. Podsolnechnik. SPb.: VIR. 2003. 209 s.
- D'jakov A.B. Fiziologija podsolnechnika. Krasnodar: VNIIMK. 2004. 76 s.
- Sokolov S.Ja., Zamotaev I.P. Spravochnik po lekarstvennym rastenijam (Fitoterapija). 3-e izdanie, stereotipnoe. M.: Medicina. 1990. 464 s.
- Nikitina T.I. Lekarstvennye rastenija. Primenenie. Protivopokazanija. Sborny: Spravochnik fitoterapevta. Ufa: Izd-e Bashkirsk. un-ta. 2000. 236 s.
- Kiseleva T.L., Karpeev A.A., Smirnova Ju.A., Amalickij V.V., Safonov V.P., Cvetaeva E.V., Blinkov I.L., Kogan L.I., Chepkov V.N., Dronova M.A. Lechebnye svojstva pishhevnykh rastenij. Pod obshh. red. prof. T.L. Kiselevoj. M.: Izd-vo FNKJeC TMDL Roszdrava. 2007. 533 s.
- Karpenko V.A., Ligaj L.V., Pshukova I.V. Opredelenie soderzhanija inulina v kornjah podsolnechnika. Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoj produkcii: sb. nauch. tr. Pod red. M.V. Gavrilina. Pjatigorsk: Pjatigorskaja GFA. 2011; 66: 106-107.
- Pshukova I.V., Konovalov D.A., Karpenko V.A., Ligaj L.V., Kuleshova S.A. Fitohimicheskoe i farmakologicheskoe izuchenie kornej podsolnechnika odnoletnego. Himija rastitel'nogo syr'ja. 2014; 2: 189-194.
- Zhurunova M.S., Dautova M.B. Mochekamennaja bolezn'. Zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij. 2016; 5-6: 977.
- Melik-Gusejnov V.V., Gerasimenko S.V. Biologicheski aktivnye veshhestva i jelementnyj sostav kornej podsolnechnika odnoletnego. Voprosy obespechenija kachestva lekarstvennykh sredstv. Moskva. 2013; 1: 24-26.
- Melik-Gusejnov V.V., Gerasimenko S.V. Identifikacija fenol'nyh soedinenij v podzemnykh organah podsolnechnika odnoletnego (*Heliantus annuus*). Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo oblastnogo universiteta. 2013; 3: 34-36.
- Melik-Gusejnov V.V., Gerasimenko S.V., Timchenko L.D., Piskov S.I. Izuchenie litoliticheskoj i idiureticheskoj aktivnosti jekstraktov kornja podsolnechnika odnoletnego (*Heliantus annuus*). Sovremennye problemy nauki i obrazovanija. 2014; 4: 517.
- Taova M.R. Issledovanie protivovospalitel'noj aktivnosti izvlechenij list'ev i kornej podsolnechnika maslichnogo. Nauchnoe obozrenie. 2010;1: 24-26.
- Musin H.G., Jakupova A.B., Mihajlova E.V., Kuluev B.R. Osobennosti rosta kul'tur genetičeski transformirovannyh (borodatyh) kornej tabaka i vitanii pri izmenenii ob#ema pitatel'noj sredy. Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskij biologii im. Ju.A. Ovchinnikova. 2017; 13(2): 46-50.
- Kuzovkina I.N., Vdovitchenko M.Ju. Genetičeski transformirovannye korni kak model' izuchenija fiziologičeskij i biohimicheskijh processov kornevoj sistemy celogo rastenija. Fiziologija rastenij. 2011;58(5): 787-796.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem. 1956; 28: 350-356.
- Marinova D., Ribarova F., Atanassova M. Total phenolic and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. 2005; 40(3): 255-260.
- Jakupova A.B., Musin H.G., Bajmuhametova Je.A., Taipova R.M., Kuluev B.R. Indukcija borodatyh kornej podsolnechnika pri pomoshhi shtammov A4 i 15834 *Agrobacterium rhizogenes*. Biomika. 2018; 10(1): 7-10.
- Shashank K., Pandey A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. Scientific World Journal [Electronic]. 2013; doi: 10.1155/2013/162750.
- Makarenko O.A., Levickij O.A. Fiziologičeskie funkcii flavonoidov v rastenijah. Fiziologija i biohimija kul'turnykh rastenij. 2013; 45(2): 100-112.
- Pavlova O.A., Matveeva T.V., Lutova L.A. Rol-geny *Agrobacterium rhizogenes*. Jekologičeskaja genetika. 2013; 11(1): 59-68.