



# БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



## ИНДУКЦИЯ БОРОДАТЫХ КОРНЕЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА ПРИ ПОМОЩИ ШТАММОВ A4 И 15834 *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

<sup>1</sup>Якупова А.Б., <sup>1</sup>Мусин Х.Г., <sup>1</sup>Баймухаметова Э.А., <sup>1</sup>Таипова Р.М., <sup>1,2</sup>Кулуев Б.Р.

<sup>1</sup>Башкирский государственный университет, ул. Заки Валиди, 32, Уфа, Россия, [alfiram@yandex.ru](mailto:alfiram@yandex.ru)

<sup>2</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, пр. Октября, 71, Уфа, Россия, [kuluev@bk.ru](mailto:kuluev@bk.ru)

### Резюме

Корни подсолнечника *Heliantus annuus* L. применяются при лечении моче- и желчнокаменной болезней. Заготовка корней подсолнечника для медицинских целей сопряжена с рядом проблем, из которых наиболее актуальны невозможность круглогодичного выращивания в условиях России, отсутствие приспособлений и машин для сбора корней и загрязнение корней пестицидами. В связи с этим представляет большой интерес получение культур изолированных генетически трансформированных (бородатых) корней подсолнечника, способных расти на безгормональных питательных средах. Целью нашей работы было создание бородатых корней подсолнечника при помощи штаммов A4 и 15834 *Agrobacterium rhizogenes* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых средах. В результате исследования была выявлена более высокая эффективность штамма A4 *A. rhizogenes*, чем штамма 15834 при агробактериальной трансформации семядольных эксплантов подсолнечника.

**Ключевые слова:** *Heliantus annuus*, подсолнечник, бородатые корни, косматые корни, зеленые корни, *Agrobacterium rhizogenes*, мочекаменная болезнь, желчнокаменная болезнь.

**Цитирование** - Якупова А.Б., Мусин Х.Г., Баймухаметова Э.А., Таипова Р.М., Кулуев Б.Р. Индукция бородатых корней подсолнечника при помощи штаммов A4 и 15834 *Agrobacterium rhizogenes*. *Биомика*. 2018. 10 (1). С. 7-10. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-2

## GENERATION OF SUNFLOWER HAIRY ROOTS WITH STRAINS A4 AND 15834 OF *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

<sup>1</sup>Yakupova A.B., <sup>1</sup>Musin H.G., <sup>1</sup>Baimuhametova E.A., <sup>1</sup>Taipova R.M., <sup>1,2</sup>Kuluev B.R.

<sup>1</sup>Bashkir State University, 32 Zaki Validi str., Ufa, Russia, [alfiram@yandex.ru](mailto:alfiram@yandex.ru)

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, 71 Prospekt Oktyabrya, Ufa, Russia, [kuluev@bk.ru](mailto:kuluev@bk.ru)

### Resume

Roots of sunflower *Heliantus annuus* L. are used in the treatment of urolithiasis and cholelithiasis. Harvesting of sunflower roots for medical purposes is associated with a number of problems, the most urgent of which is the impossibility of year-round cultivation in Russia, the lack of adaptations and machines for harvesting roots and the contamination of roots with pesticides. In this connection, it is of great interest to make cultures of isolated sunflower hairy roots that can grow on hormone-free media. The aim of our work was to generate hairy roots of sunflower with the strains A4 and 15834 of *Agrobacterium rhizogenes* and to evaluate the parameters of their growth on solid and liquid media. As a result of the study, a greater efficacy of the A4 *A. rhizogenes* strain was revealed than strain 15834 in the agrobacterial transformation of sunflower cotyledon explants. The efficiency of transformation of the cotyledons of *H. annuus* was 93% using strain A4 and 78% using strain 15834. On a solid medium, the average root length obtained with A4 strain increased by  $17.6 \pm 0.88$  cm in three weeks. Average the length of the roots obtained with strain 15834 increased by  $17.9 \pm 0.894$  cm in three weeks. Thus, there were no

statistically significant differences between the two strains in this parameter. The cultures of isolated sunflower hairy roots generated after agrobacterial transformation were characterized by the ability to grow unlimitedly on a non-hormone medium. After analyzing the content of alkaline alkaloids and organic acids in them the sunflower hairy roots can be used for biotechnological production.

**Keywords:** *Heliantus annuus*, sunflower, hairy roots, green hairy roots, *Agrobacterium rhizogenes*, urolithiasis, cholelithiasis.

**Citation** - Yakupova A.B., Musin H.G., Baimuhametova E.A., Taipova R.M., Kuluev B.R. Generation of sunflower hairy roots with strains A4 and 15834 of *Agrobacterium rhizogenes*. *Biomics*. 2018. 10 (1). P. 7-10. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-2 [In Russian]

### Введение

Подсолнечник *Heliantus annuus* L. — однолетнее травянистое растение высотой от 0,7 до 4 м со стержневым корнем, проникающим в почву на глубину до 4 м и боковыми корнями, распространяющимися в стороны до 120 см. Родина подсолнечника – Америка. В настоящее время на территории стран бывшей СССР подсолнечник стал основной масличной культурой. Семена подсолнечника содержат большое количество масла (до 45%), в листьях обнаружены: витамины, флавоноиды, кумарины, стерины, сапонины, органические кислоты, углеводы, минеральные вещества. В лепестках идентифицированы витаминоподобные соединения (холин, бетаин), фенолокислоты, полисахариды, органические кислоты, стерины, сапонины [Киселева и др. / Kiseleva et al., 2007]. Данные о химическом составе корней подсолнечника немногочисленны. Установлено содержание в корнях подсолнечника флавоноидов, дубильных веществ, органических кислот, инулина (от 5,49 до 6,17%) и прочих полисахаридов (общий выход в пределах 10,31±0,20%). Результаты анализов минерального состава показали, что корни подсолнечника содержат значительное количество минеральных элементов в комплексе с другими биологически активными веществами. Что касается элементного состава корней подсолнечника, то было установлено наличие 19 жизненно необходимых элементов в допустимой концентрации, при этом преобладают макроэлементы: калий, кальций, магний, фосфор [Мелик-Гусейнов, Герасименко / Melik-Guseynov, Gerasimenko, 2013; Пшукова и др. / Pshukova et al., 2014].

Корни подсолнечника применяются в народной медицине для лечения мочекаменной и желчнокаменной болезней. Мочекаменная болезнь (МКБ) – это заболевание, проявляющееся в виде образования камней в почках, мочеточнике или мочевом пузыре [Журунова, Даутова / Zhurunova, Dautova, 2016]. Проблема лечения и профилактики камнеобразования, несмотря на широкое внедрение в клиническую практику новых методов разрушения и удаления мочевых конкрементов, остается

чрезвычайно актуальной. В традиционной медицине нередко прибегают к использованию растительных средств, обладающих литолитической активностью и снижающих частоту рецидивов образования уrolитов, не оказывая при этом каких-либо побочных действий. Сегодня исследователями ведется активный поиск и подбор растительных средств и компонентов, обладающих такими свойствами. В народной медицине важная роль в качестве лечебного средства как от МКБ, так и от желчнокаменной болезни отводится подсолнечнику однолетнему, антимикробное, противовоспалительное, болеутоляющее и антиоксидантное свойства разных вегетативных частей которого уже неоднократно клинически и фармакологически доказаны [Мелик-Гусейнов и др. / Melik-Guseynov et al., 2014; Пшукова и др. / Pshukova et al., 2014].

Для лечения моче- и желчнокаменной болезней используют лишь корни полностью созревших подсолнечников, однако на большей части территории России подсолнечник не успевает созреть. К сожалению, при промышленном возделывании подсолнечника используется много различных пестицидов, поэтому его корни, собранные на поле, чаще всего непригодны для лечебного применения. Более того, сбор корней подсолнечника это полностью 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 большой интерес получение культур бородатых (косматых) корней подсолнечника, способных расти на безгормональных питательных средах отдельно от побега в специальных ферментерах или биореакторах. Мы полагаем, что культуры бородатых корней подсолнечника могут стать экономически более выгодной альтернативой обычным корням этого растения. Поэтому целью нашей работы было создание бородатых корней подсолнечника при помощи штаммов A4 и 15834 *Agrobacterium rhizogenes* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых и жидких питательных средах.

### Материалы и методы

Бородатые корни *H. annuus* получали путем агробактериальной трансформации семядольных эксплантов подсолнечника, выращенных в условиях *in vitro*. Трансформацию семядольных эксплантов проводили через 8-9 дней после стерильного посева семян подсолнечника на среду МС. Для стерилизации семян использовали последовательную обработку в 70% спирте (2 мин) и 20% белизне (15 мин). 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. После появления бородатых корней, каждый корень (в среднем, длиной 1,5 см) пересаживали в отдельную чашку Петри со средой МС без содержания фитогормонов. Для оценки параметров роста бородатых корней в течение трех недель измерялась их длина. Чашки Петри инкубировали при температуре +26°C и плотности потока фотонов 20 мкмоль м<sup>-2</sup> сек<sup>-1</sup>.

### Результаты и обсуждение

На семядольных эксплантах подсолнечника бородатые корни начинали появляться через 11 дней после инокуляции (рис. 1а). Эффективность трансформации семядольных листьев *H. annuus* составила 93% при использовании штамма А4 и 78% при использовании штамма 15834. Таким образом, успешность получения бородатых корней зависела от используемого для трансформации штамма агробактерий, причем корни, полученные с помощью *A. rhizogenes* штамма А4 были более разветвленные (косматые) и новые бородатые корни на семядольных эксплантах продолжали формироваться в течение как минимум 3-4 месяцев, тогда как после трансформации штаммом 15834 новые корни продолжали образовываться только в течение первого месяца (рис. 1б). Нами было выявлено 2 основных морфотипа бородатых корней подсолнечника, полученных в эксперименте со штаммами А4 и 15834. Первый морфотип, чаще встречающийся у линий, полученных при помощи штамма А4, характеризовался более толстыми и темными корнями с большим количеством коротких, растущих вертикально вверх косматых корешков, имеющих потемневший кончик и иногда останавливающихся в росте уже через один месяц культивирования на жидкой среде МС. Второй морфотип образовывался чаще на эксплантах, трансформированных штаммом 15834, и отличался от первого меньшей толщиной корней, отсутствием заметного потемнения кончиков корней и замедления их роста не фиксировалось ни у одной линии через один месяц после отделения от материнского экспланта. На твердой среде средняя длина корней, полученных при помощи штамма А4

за три недели увеличивалась на 17,6±0,88 см. Средняя длина корней, полученных при помощи штамма 15834, за три недели увеличивалась на 17,9±0,894 см. Таким образом, статистически достоверных различий между двумя штаммами по скорости роста не наблюдалось. Тем не менее, в случае со штаммом 15834 у отдельных корней наблюдался более интенсивный рост и более того, в случае использования этого штамма не фиксировалось замедление роста бородатых корней, по крайней мере, в течение одного месяца культивирования на жидкой среде МС (рис. 1в). Также были проведены исследования по выявлению естественного ризогенеза на семядольных эксплантах подсолнечника. Было показано, что адвентивные корни на семядолях подсолнечника образуются спонтанно даже без использования агробактерий. Эти адвентивные корни нами также выращивались изолированно на жидкой среде МС, однако полученные без агробактерий культуры адвентивных корней подсолнечника темнели и полностью прекращали свой рост уже через две недели культивирования. То есть культуры нетрансформированных корней подсолнечника не обладали способностью к неограниченному росту на безгормональной среде, в отличие от бородатых корней. Таким образом, подсолнечник относится к культурам с повышенной частотой ризогенеза на листовых эксплантах, поэтому фенотипический отбор hairy roots среди всех адвентивных корней у этого растения представляет определенные трудности. Поэтому нами был проведен ПЦР-анализ отобранных нами линий корней, который показал наличие в них гена *rolC*, что говорит об успешности проведенной нами агробактериальной трансформации.

Таким образом, нам удалось получить стерильные проростки подсолнечника и трансформировать *A. rhizogenes* их семядольные листья с эффективностью 93% при помощи штамма А4 и 78% при помощи штамма 15834. Полученные после агробактериальной трансформации культуры изолированных корней характеризовались способностью неограниченно расти на безгормональной среде.

Особого внимания заслуживают линии корней А4, характеризовавшиеся наиболее быстрым ростом на твердой питательной среде, а также линия 15834(1), показавшая наиболее стремительный рост среди всех проанализированных корней. Интересно отметить, что некоторые линии бородатых корней подсолнечника в результате длительного культивирования приобретали зеленую окраску (рис. 1г). Возможно, это было связано с увеличением содержания в корнях хлорофилла и хлоропластов, что

в свою очередь, может говорить об активации фотосинтеза в этих корнях. Следует отметить, что зеленые бородатые корни являются перспективной системой для биотехнологии растений, поэтому нами планируется продолжение исследований механизмов индуцирования в корнях подсолнечника повышения содержания хлоропластов.

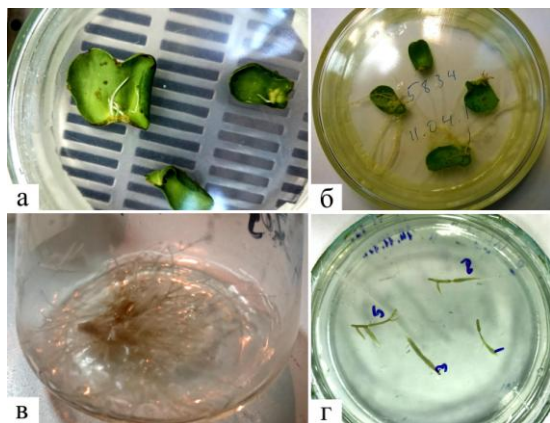


Рис. 1. Получение бородатых корней подсолнечника: а – индукция бородатых корней на семядольных листьях через 11 дней после инокуляции агробактериями; б – образование бородатых корней на семядольных листьях подсолнечника обработанных штаммом 15834 *A. rhizogenes*; в – культивирование бородатых корней полученных при помощи штамма 15834 *A. rhizogenes* на жидкой среде МС; г – зеленые бородатые корни подсолнечника.

Fig. 1. Generation of sunflower hairy roots: а) an induction of hairy roots on the cotyledons after 11 days after inoculation with *Agrobacterium*; б) the formation of hairy roots on the cotyledons of sunflower treated with *A. rhizogenes* strain 15834; в) cultivation of hairy roots generated by *A. rhizogenes* 15834 strain on liquid medium MS; г) green hairy roots of sunflower.

Полученные нами бородатые корни подсолнечника могут иметь практическое применение, однако необходимо провести анализ содержания биологически активных веществ 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. В литературе имеются сведения, что лечебным эффектом в корнях подсолнечника обладают, прежде всего, щелочные алкалоиды и органические кислоты. Пока точно неизвестно, насколько будет изменяться состав этих соединений в бородатых корнях, по сравнению с обычными корнями. В связи с этим, необходимо отметить, что полученные нами бородатые корни

подсолнечника могут быть использованы для биотехнологического производства только после сравнительного анализа содержания в них щелочных алкалоидов и органических кислот с обычными корнями подсолнечника и обеспечения рентабельности процесса.

### Литература / References

1. Kiseleva T.L., Karpeev A.A., Smirnova Yu.A., Amalitskiy V.V., Safonov V.P., Tsvetaeva E.V., Blinkov I.L., Kogan L.I., Chepkov V.N., Dronova M.A. *Lechebnye svoystva pishchevykh rasteniy*. Pod obshch. Red. T.L. Kiselevoy. M.: Izd-vo FNKETs TMDL Roszdruva. 2007. 533 s. [*Therapeutic properties of food plants*. Ed. Kiseleva T.L. Moscow: Publishing house FNKEC of TMDL of Roszdruv. 2007. 533 p.] (In Russian - Киселева Т.Л., Карпеев А.А., Смирнова Ю.А., Амалитский 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. Т.Л. Киселевой. М.: Изд-во ФНКЭЦ ТМДЛ Росздрува. 2007. 533 с.)
2. Melik-Guseynov V.V., Gerasimenko S.V. *Biologicheski aktivnyye veshchestva i elementnyy sostav korney podsolnechnika odnoletnego*. *Voprosy obespecheniya kachestva lekarstvennykh sredstv*. Izd.: Regional'naya obshchestvennaya organizatsiya invalidov «Zdorov'ye cheloveka». Moskva. 2013. V. 1. P. 24–26. [Biologically active substances and elemental composition of annual sunflower roots] (In Russian - Мелик-Гусейнов В.В., Герасименко С.В. Биологически активные вещества и элементный состав корней подсолнечника однолетнего. *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств*. Изд.: Региональная общественная организация инвалидов «Здоровье человека». Москва. 2013. Т. 1. С. 24–26)
3. Pushkova I.V., Kononov D.A., Karpenko V.A., Ligay L.V., Kuleshova S.A. *Fitokhimicheskoye i farmakologicheskoye izucheniye korney podsolnechnika odnoletnego*. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2014. No.2. P. 189–194. [Phytochemical and pharmacological study of roots of sunflower] Пушкова 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. С. 189–194)
4. Zhurunova M.S., Dautova M.B. *Mochekamennaya bolezni*. *Zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. Izd.: Izdatel'skiy Dom «Akademiya Yestestvoznaniya». Penza. No 5-6. P. 977. [Urolithiasis] (In Russian - Журунова М.С., Даутова М.Б. Мочекаменная болезнь. *Журнал прикладных и фундаментальных исследований*. Изд.: Издательский Дом «Академия Естествознания». Пенза. №5-6. С. 977.)