

ФИТОХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТЕНИЙ КЫРГЫЗСТАНА РОДА HEDYSARUM

Умралина А.Р., Конурбаева Р.У.

*Институт биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики,
Бишкек, e-mail: rahat-k@list.ru*

В статье приводятся данные по изучению растений рода *Hedysarum*, произрастающих на территории Кыргызстана, по накоплению флавоноидов и антиоксидантной активности (АОА) в нативных растениях и культурах *in vitro* – изолированных и трансформированных корнях (*hairy roots*). В работе были изучены образцы 17 видов растений, собранных на разных территориях Кыргызстана. Из 17 протестированных видов наибольший эффект наблюдался у *H. neglectum*, *H. flavescent* и *H. kirghisorum*. Самые высокие значения АOA были обнаружены у *H. flavescent* как в цветках, так и в листьях. Высокая АOA в цветках отмечена у *H. dmitrievae*. Показано преимущество использования культуры тканей при продуцировании формононетина, что свидетельствует о перспективности применения биотехнологических методов, позволяющих сохранять естественные запасы растений. Содержание формононетина в *hairy roots* превышало его содержание в нативных растениях более чем в 4 раза у *H. denticulatum*, более чем в 7 раз у *H. parvum*, более чем в 22 раза у *H. santalaschii*, а также в нативных корнях *H. daraut-kurganicum* обнаружены следы формононетина.

Ключевые слова: *Hedysarum*, флавоноиды, АOA, *hairy roots*, формононетин

PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDIES OF PLANTS OF KYRGYZSTAN INGENUS HEDYSARUM

Umralina A.R., Konurbaeva R.U.

*Institute of Biotechnology of the National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic,
Bishkek, e-mail: rahat-k@list.ru*

The article provides data on the study of plants of the genus *Hedysarum* growing on the territory of Kyrgyzstan – on the accumulation of flavonoids and antioxidant activity (AOA) in native plants and in vitro cultures – *hairy roots*. In the work, samples of 17 plant species collected in different territories of Kyrgyzstan were studied. Of the 17 species tested, the greatest effect was observed in *H. neglectum*, *H. flavescent*, and *H. kirghisorum*. The highest AOA values were found in *H. flavescent*, both in flowers and leaves. High AOA in flowers was noted in *H. dmitrievae*. The advantage of using tissues in the production of formononetin is shown, which indicates the promising use of biotechnological methods that allow natural reserves of plants. The content of formononetin in the hairy roots exceeded its content in native ones, and was more than 4 times in *H. denticulatum*, more than 7 times in *H. parvum*, more than 22 times in *H. santalaschii*, and in the native roots of *H. daraut -kurganicum*, traces of formononetin are found.

Keywords: *Hedysarum*, flavonoids, AOA, *hairy roots*, formononetin

Всестороннее изучение дикорастущей флоры вызвано наличием ряда существенных проблем как в области сохранения биоразнообразия видов, так и в области фитохимических, фармакологических и биотехнологических исследований [1, 2]. Большое внимание уделяется изучению роли копеечников [3–5], в том числе и в традиционной медицине [6] Монголии, Китая, решаются проблемы таксономии [7] и биохимии рода [8–10]. За последние десятилетия при помощи различных методов хроматографии из растений рода *Hedysarum* стали известны 155 соединений, которые показали предполагаемую активность: антиоксидантную, активность против старения, регулирование активности иммунной системы, противоопухолевую активность [11].

Значительный интерес с этой точки зрения представляет род *Hedysarum* флоры Кыргызстана – один из многочисленных ро-

дов, включает 34 вида [12], что составляет 17% мирового видового разнообразия, среди которых высок процент эндемиков. Особенности климатических и экологических условий в Республике, разнообразие географических зон способствуют биосинтезу и накоплению в растениях физиологически активных соединений. Их видовой состав, ареал, биоморфологические характеристики впервые были представлены в монографии Султановой [13].

При поддержке Королевского ботанического сада, Кью нами созданы при Институте биотехнологии НАН КР семенной банк [14, 15], коллекции культуры тканей и изолированных органов растений дикорастущей флоры, где хранятся коллекции рода *Hedysarum* (www.plant-biotech.kg).

Целью данного исследования было провести скрининг на содержание флавоноидов и АOA в нативных растениях и культурах *in vitro* – *hairy roots*.

Материалы и методы исследования

Было исследовано 17 видов растений рода *Hedysarum* из коллекции семенного банка, половина видов имеет статус эндемиков. Два вида – *H. chaitocarpum* и *H. montanum* – были продублированы в сравнительном изучении и взяты из двух разных географических зон. Местонахождение и природоохранный статус испытуемых растений приведены в табл. 1. Использовались гербарный материал, а также культуры тканей *in vitro* – *hairy roots* для определения количественного содержания флавоноидов для каждого вида и распределения их по частям растения, а также расчета АOA.

В образцах определяли сумму флавоноидов и антиоксидантную активность (АОA). Для расчета суммарного содержания флавоноидов использовали экспресс-методику [16, 17]. АOA определяли двумя методами – в соответствии с описанием патентного изобретения Т.В. Максимовой и иных [18] и с использованием DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом).

На хроматографе Agilent 1260 Infinity методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) определяли содержание изофлавона (формононетина) в экстрактах растений. Для анализа ис-

пользовались нативные корни и *hairy roots* 4 видов растений рода *Hedysarum* из коллекции трансформированных корней копеечников, которые ранее были получены лабораторией Института биотехнологии растений НАН КР. Калибровку хроматографа проводили по стандарту формононетину с использованием колонки Eclipse Plus C18, 5 μm, 4,5 x 250 мм.

Результаты исследования и их обсуждение

Большее накопление флавоноидов отмечали в листьях по сравнению с другими частями растений, исключением был вид *H. flavescentes*, у которого в цветках содержание флавоноидов превышало их содержание в листьях, данные представлены в табл. 1. Из 17 испытуемых видов наибольший эффект отмечен у *H. neglectum*, *H. flavescentes* и *H. kirghisorum*. При сопоставлении одних и тех же видов, произрастающих в разных географических зонах (*H. chaitocarpum* и *H. montanum*), было отмечено, что количество флавоноидов существенно различалось. Это соответствует данным о том, что различия в химическом составе могут иметь место в пределах одного и того же вида в зависимости от географического происхождения [19].

Таблица 1
Содержание флавоноидов и АOA растений рода *Hedysarum*

	Вид	Природоохранный статус*	Местонахождение	Часть растения	Сумма флавоноидов, %	АОA, мг кверцетина/г сухого в-ва
1	<i>Hedysarum chaitocarpum</i> Regel et Schmalh	E,KRB,VU	Чаткальский хребет, Сары-Челекский заповедник, ущелье реки Ходжа-Ата	листья	1,60 ± 0,03	29,09 ± 0,8
				стебли	0,36 ± 0,02	7,15 ± 0,2
				корни	0,05 ± 0,0	9,34 ± 0,3
				листья	3,62 ± 0,04	31,08 ± 0,5
			Ферганский хребет, ущелье р. Кугарт	цветки		2,52 ± 0,07
				стебли	0,21 ± 0,02	7,06 ± 0,03
				корни	0,11 ± 0,01	9,29 ± 0,3
2	<i>Hedysarum cumuschtanicum</i> B. Sultanova	E,VU	Талаский хребет, ущелье реки Кумуштаг	листья	2,52 ± 0,07	29,77 ± 0,4
				цветки	1,12 ± 0,01	21,06 ± 0,5
3	<i>Hedysarum daraut-kurganicum</i> B. Sultanova	E,VU	Хребет Кавак-Тоо, окрестности села Мин-Күш	листья	1,74 ± 0,05	26,32 ± 0,01
				цветки	0,91 ± 0,02	14,39 ± 0,6
				стебли	1,07 ± 0,06	18,41 ± 0,8
				корни	0,09 ± 0,01	7,82 ± 0,3
4	<i>Hedysarum denticulatum</i> Regel	SE	Алайский хребет, ущелье р. Оксу	листья	3,72 ± 0,04	38,76 ± 0,5
				стебли	0,79 ± 0,01	13,49 ± 0,04
				корни	0,53 ± 0,01	26,31 ± 1,5
5	<i>Hedysarum dmitrievae</i> Bajt	SE	Пскемский хребет, ущелье реки Кара-Корум	листья	3,22 ± 0,08	38,03 ± 0,7
				цветки	2,50 ± 0,03	33,79 ± 0,7
				стебли	1,99 ± 0,02	19,25 ± 1,1
				корни	0,24 ± 0,02	11,31 ± 0,1
6	<i>Hedysarum enaffae</i> B. Sultanova	E,VU	Южный макросклон хребта Кунгей Ала-Тоо, бас. р. Тору – Айгыр	листья	1,63 ± 0,02	37,18 ± 1,9
				цветки	0,96 ± 0,02	25,00 ± 1,3

Окончание табл. 1

	Вид	Природо-охраный статус*	Местонахождение	Часть растения	Сумма флавоноидов, %	АОА, мг кверцетина/г сухого в-ва
7	<i>Hedysarum ferganensis</i> Korsh.	SE	Между хребтом Ак-Шийрак и Ферганским хребтом, перевал Ой-Кайын	листья	2,33 ± 0,06	29,08 ± 0,5
				цветки	1,38 ± 0,02	21,72 ± 0,6
				стебли	1,04 ± 0,02	13,52 ± 0,3
				корни	0,11 ± 0,01	7,94 ± 0,1
8	<i>Hedysarum flavescentia</i> Regel. et Schmalh	SE	Ферганский хребет, перевал Урумбаш	листья	5,86 ± 0,03	40,45 ± 0,3
				цветки	8,19 ± 0,09	48,32 ± 0,9
				стебли	1,64 ± 0,04	17,47 ± 0,5
9	<i>Hedysarum gypsaceum</i> Korotk	SE	Чаткальский хребет, перевал Джеде-Бель	листья	0,97 ± 0,03	34,50 ± 1,9
				стебли	0,10 ± 0,01	7,84 ± 0,4
				корни	0,11 ± 0,01	8,38 ± 0,03
10	<i>Hedysarum issyk-kulensis</i> E. Nikit.	х.ц.	Терской Ала-Тоо, долина реки Конурулен, близ с. Конурулен	листья	1,68 ± 0,04	22,13 ± 1,0
				стебли	1,33 ± 0,04	23,87 ± 1,3
				корни	0,69 ± 0,1	9,68 ± 0,2
11	<i>Hedysarum neglectum</i> Ledeb.	шр	Ферганский хребет, между с. Кош-Дюбэ и перевалом Шордобель	листья	8,04 ± 0,02	46,33 ± 1,6
				цветки	4,11 ± 0,08	31,51 ± 1,1
				стебли	3,35 ± 0,1	20,69 ± 0,2
12	<i>Hedysarum kirghisorum</i> B. Fedtsch.	SE	Долина реки Инылчек близ березовой рощи	листья	4,59 ± 0,07	40,67 ± 2,1
				стебли	1,27 ± 0,1	19,57 ± 0,9
13	<i>Hedysarum montanum</i> B. Fedtsch.	SE	Хребт. Тахталык, близ с. Тахталык	листья	1,85 ± 0,05	27,38 ± 1,9
				цветки	1,42 ± 0,02	24,24 ± 0,9
				стебли	0,56 ± 0,01	11,70 ± 0,5
				корни	0,18 ± 0,04	9,36 ± 0,2
			Чуйская область, северный макросклон, хребет Кыргызского Ала-Тоо Бассейн реки Аламедин	листья	2,28 ± 0,03	29,19 ± 0,8
				стебли	0,63 ± 0,01	
14	<i>Hedysarum songoricum</i> B. Fedtsch.	SE	Хребет Кавак-Тоо, окрестности села Мин-Куш	листья	2,20 ± 0,01	34,08 ± 1,8
				цветки	1,46 ± 0,02	25,95 ± 1,4
				стебли	1,06 ± 0,02	13,67 ± 0,3
15	<i>Hedysarum parvum</i> B. Sultanova	E,EN	Пскемский хребет, ущелье реки Кара-Корум	листья	1,81 ± 0,1	28,52 ± 1,4
				цветки	0,85 ± 0,02	21,94 ± 0,4
				стебли	0,23 ± 0,01	10,83 ± 0,4
				корни	0,21 ± 0,02	16,78 ± 0,1
16	<i>Hedysarum santalaschi</i> B. Fedtsch.	E,VU	Пскемский хребет, ущелье реки Кара-Корум	листья	2,18 ± 0,03	30,04 ± 0,6
				цветки	1,79 ± 0,01	31,47 ± 0,9
				стебли	0,39 ± 0,02	9,29 ± 0,3
				корни	—	7,06 ± 0,03
17	<i>Hedysarum turkestanicum</i> Regel et Schmalh	E,VU	Южные отроги Чаткальского хребта близ пос. Шекафттар	листья	1,40 ± 0,01	28,54 ± 0,3

П р и м е ч а н и е . *Е – эндемичный вид; SE – субэндемичный вид; VU – вид находится под рискованной статьей вымирающим; EN – вымирающий вид; х.ц. – хозяйствственно-ценный вид; шир – широко распространенный вид; KRB – вид, находящийся в Красной книге.

Результаты определения АОА двумя методами представлены в табл. 1 и на рис. 1. Следует отметить, что наблюдалась определенная корреляция между данными, полученными в обоих экспериментах. Наивысшие показатели АОА были выявлены у *H. flavescentia*, как в цветках, так и в листьях. Высокая АОА в цветках была отмечена у *H. dmitrievae*.

Определенный интерес представляют изучение компонентов флавоноидной природы не только в нативных растениях, но и в тканях растений *Hedysarum* и проведение сравнительного анализа гербарного материала и культур тканей. В работе были использованы культуры *hairy roots* из коллекции банка семян Института биотехнологии [20].

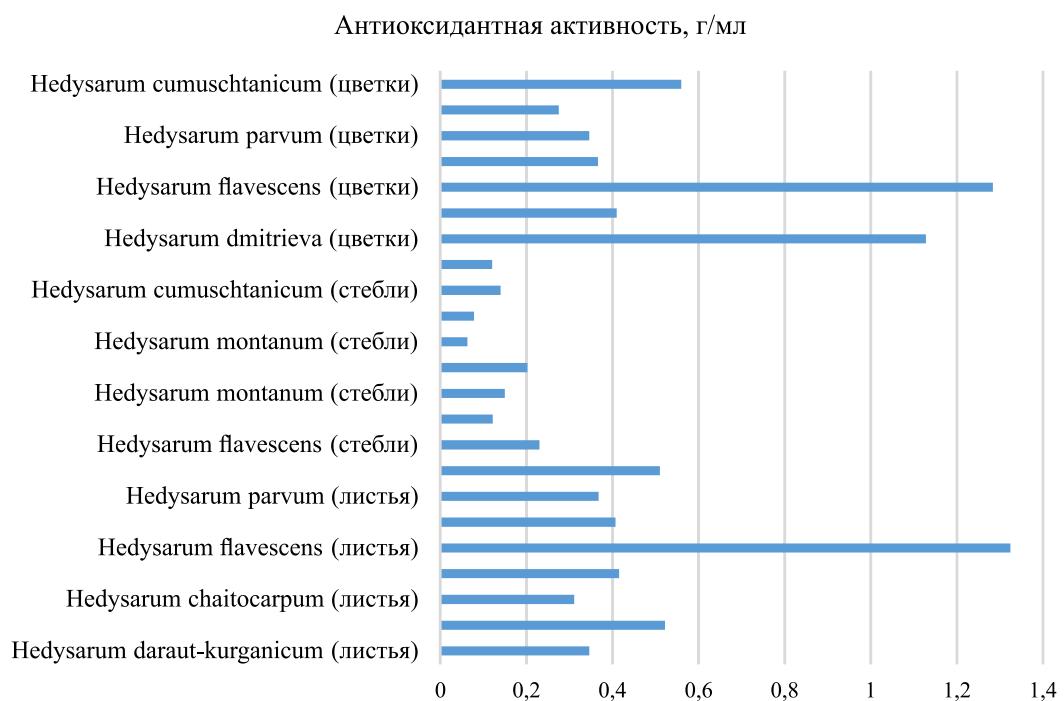


Рис. 1. Сравнительный анализ АОА в разных частях растений видов копеекника с использованием DPPH

Ранее нами совместно с И.Н. Кузовиной (ИФР РАН) был проведен анализ корней эндемика *H. enaffae* (*hairy root* and *isolated root*) на базе Института фармакогенезии Университета им. Семмельвайса (Будапешт, Венгрия) [21]. Результаты ВЭЖХ анализа корней *H. enaffae* показали, что доминирующим компонентом культивируемых *in vitro* корней *hairy roots* являются изофлавоны – производные формононетина. Обнаруженные четко выраженные пики веществ соответствуют двум изофлавонам, которые были идентифицированы на основании данных ВЭЖХ и UV-спектроскопии и подтверждены данными ¹Н- и ¹³С ЯМР-спектрометрии, проведенной в Институте химической экологии им. Макса Планка в Йене (Германия). Результаты хроматографии показали, что доминирующим флавонидом *hairy roots* and *isolated roots* копеекника является изофлавон ононин.

Изофлавон ононин является гликозидом агликона формононетина, который в свободном виде не обнаружен в корневых культурах *H. enaffae* (в отличие от *hairy roots* of *H. theinum*). Поскольку основным компонентом культивируемых корней *H. enaffae* является ононин, было определено количественное содержание этого изофлавона в *hairy roots*. На основании данных ВЭЖХ

по площади пиков была вычислена концентрация ононина в этих двух культурах. Результаты показали, что концентрация ононина в *hairy roots* составляет 10,91 мг/г сухого веса корней (или 1,1%), в то время как в изолированных корнях концентрация изофлавона – 0,945 мг/г сухого веса (или 0,095%), т.е. на один порядок ниже.

Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2
Содержание формононетина в нативных (NR) и трансформированных корнях (HR) растений рода *Hedysarum*, мг/г сухого вещества

Вид	Нативные корни	<i>Hairy roots</i>
<i>H. daraut-kurganicum</i>	0	0,663
<i>H. denticulatum</i>	0,271	1,212
<i>H. parvum</i>	0,070	0,539
<i>H. santalaschii</i>	0,056	1,247

Содержание формононетина в *hairy roots* превышало его содержание в нативных растениях более чем в 4 раза у *H. denticulatum*, более чем в 7 раз у *H. parvum*, более чем в 22 раза у *H. santalaschii*, а в нативных корнях *H. daraut-kurganicum* обнаружаются следы формононетина.

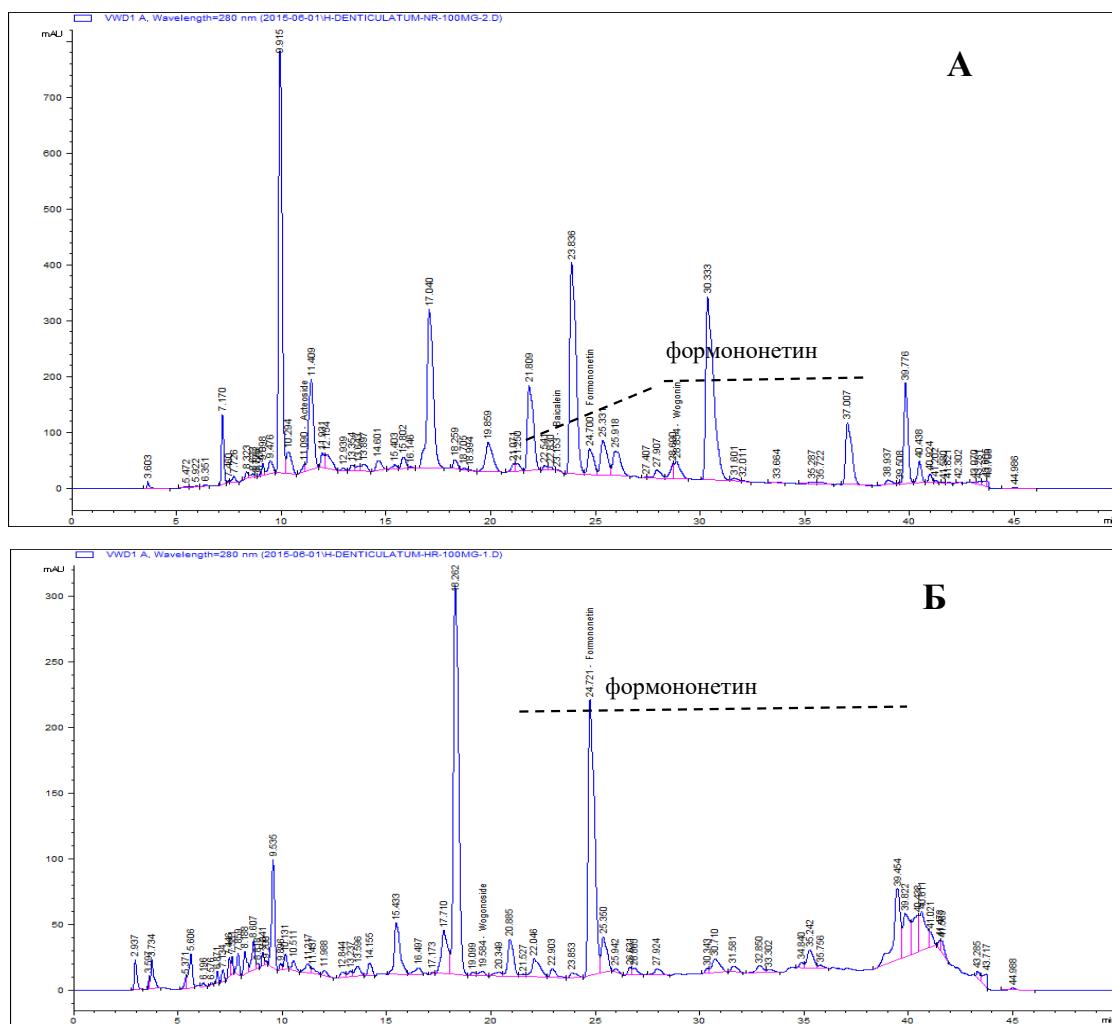


Рис. 2. Хроматограмма нативных (А) и hairy roots *H. denticulatum* (Б) по определению формононетина

Выводы

Исследованы 17 видов рода *Hedysarum* флоры Кыргызстана, большинство из которых имеют природоохранный статус «эндемики» и «субэндемики». В нативных растениях выявлено высокое содержание флавоноидов и АОА у *H. neglectum*, *H. kirghisorum* и *H. flavescentes*. Сравнительное изучение содержания формононетина в нативных растениях и в hairy roots показало превышение его концентрации в несколько раз в hairy roots по сравнению с нативными растениями, что говорит о преимуществе использования методов биотехнологии.

Список литературы

- Dong Y., Tang D., Zhang N., Li Y., Zhang C., Li L., Li M. Phytochemicals and biological studies of plants in genus *Hedysarum*. Chemistry Central Journal. 2013. Vol. 7. No. 1. P. 1–13.
- Zengin G., Guler G.O., Aktumsek A., Ceylan R., Picot C.M.N., Mahomoodally M.F. Enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of three medicinal plants from Turkey. Advances in pharmacological sciences. 2015. [Electronic resource]. URL: <https://www.hindawi.com/journals/aps/2015/410675/27861> (date of access: 17.09.2021).
- Yurkevich O.Y., Samatadze T.E., Selyutina I.Y., Romashkina S.I., Zoshchuk S.A., Amosova A.V., Muravenko O.V. Molecular Cytogenetics of Eurasian Species of the Genus *Hedysarum* L. (Fabaceae). Plants. 2021. Vol. 10. No. 1. P. 89.
- Duan L., Wen J., Yang X., Liu P., L., Arslan E., Ertuğrul K., Chang Z., Y. Phylogeny of *Hedysarum* and tribe *Hedysareae* (Leguminosae: Papilionoideae) inferred from sequence data of ITS, matK, trnL-F and psbA-trnH. Taxon. 2015. Vol. 64. No. 1. P. 49–64.
- Nafisi H., Kazempour-Osaloo S., Mozaffarian V., Schneeweiss G.M. Molecular phylogeny and divergence times of the genus *Hedysarum* (Fabaceae) with special reference to section *Multicaulia* in Southwest Asia. Plant Systematics and Evolution. 2019. Vol. 305. No. 10. P. 1001–1017.
- Xu J.F., Bo A., Xiao H., Zhang M.X., Zhang C.H., Li M.H. Variety textual research of Mongolian medicine of «saradma». Zhongguo Zhong yao za zhi, Zhongguo Zhongyao Zazhi. Chi-

- na Journal of Chinese Materia Medica. 2020. Vol. 45. No. 16. P. 3981–3987. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20200527.108.
7. Nafisi H., Osaloo S.K., Kaveh A., Mahmoodi M. Ak Taxonomic Revision of the Genus *Hedysarum* L. (Fabaceae-Hedysareae) in Iran. Phytotaxa. 2021. Vol. 511. No. 2. P. 79–110.
 8. Bushman B.S., Larson S.R., Peel M.D., Pfrender M.E. Population structure and genetic diversity in North American *Hedysarum boreale* Nutt. Crop Science. 2007. Vol. 47. No. 3. P. 1281–1288.
 9. Duan L., Wen J., Yang X., Liu P.L., Arslan E., Ertuğrul K., Chang Z.Y. Phylogeny of *Hedysarum* and tribe Hedysareae (Leguminosae: Papilionoideae) inferred from sequence data of ITS, matK, trnL-F and psbA-trnH. Taxon. 2015. Vol. 64. No. 1. P. 49–64.
 10. Zvyagina N. S., Dorogina O. V., Catalan P. Genetic relatedness and taxonomy in closely related species of *Hedysarum* (Fabaceae). Biochemical Systematics and Ecology. 2016. Vol. 69. P. 176–187. DOI: 10.1016/j.bse.2016.10.001.
 11. Appaji M Ashwini. Quantification of phytochemical contents and in vitro antioxidant activity of *Exacum bicolor* (roxb.), an endemic medicinal plant. International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. 2015. Vol. 7. No. 6. P. 225–230.
 12. Лазьков Г.А., Султанова Б.А. Кадастр флоры Кыргызстана. Сосудистые растения. 2014. 126 с.
 13. Султанова Б.А. Копеечники Киргизии. Ф.: Илим, 1976. 123 с.
 14. Umralina A. Building seed collections for pharmacological research in Kyrgyzstan. Samara, 2014. Is. 26. P. 9.
 15. Umralina A., Hegay S. Putting seeds to good use Kyrgyzstan explores the pharmacological potential of its native flora. Samara. 2018. Is. 34. P. 1–2.
 16. Алимбаева П.К., Гончарова А.В. Дикорастущие лекарственные растения. Фрунзе, 1971. 99 с.
 17. Беликов В.В. Аналитические исследования природных фенольных соединений и разработка методов их количественного определения: автореф. дис. ... док. фарм. наук. Харьков, 1990. 36 с.
 18. Максимова Т.В., Никулина И.Н., Пахомов В.П., Шкарина Е.И., Чумакова З.В., Арзамасцев А.П. Способ определения антиоксидантной активности // Патент РФ № 2170930. Патентообладатель Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова. 2001.
 19. Tava A., Biazz E., Ronga D., Mella M., Doria F., D'Addabbo T., Candido V., Avato P. Chemical Identification of Specialized Metabolites from *Sulla (Hedysarum coronarium L.)* Collected in Southern Italy. Molecules. 2021. Vol. 26. No. 15. P. 1–15. DOI: 10.3390/molecules26154606.
 20. Конурбаева Р.У., Чернышева Т.П., Умралина А.Р. Получение культур генетически трансформированных корней растений рода *Hedysarum* // Вестник Кыргызского Национального университета имени Жусупа Баласагына. Спец. выпуск. 2014. С. 90–94.
 21. Умралина А.Р., Банайя П., Секе Е., Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н. Флавоноиды культивируемых *in vitro* корней копеечника энаффа (*Hedysarum enaffae*) // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: материалы IX Международной конференции (Звенигород, 8–12 сентября 2008 г.). М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. С. 414–415.