

УДК 581.143.6:582.739

Особенности получения вторичных метаболитов в культуре клеток, тканей и органов *Hedysarum theinum* (Fabaceae) *in vitro*

Production of secondary metabolites using cell, tissue and organ cultures of *Hedysarum theinum* (Fabaceae) *in vitro*

А. А. Эрст¹, Т. В. Железниченко¹, Т. А. Кукушкина¹, Т. И. Новикова¹,
А. А. Кузовкова², О. В. Копач², Е. В. Банаев¹

A. A. Erst¹, T. V. Zheleznichenko¹, T. A. Kukushkina¹, T. I. Novikova¹,
A. A. Kuzovkova², O. V. Kopach², E. V. Banaev¹

¹ ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ул. Золотодолинская 101, Новосибирск, 630090, Россия
¹ Central Siberian botanical garden of SB RAS, Zolotodolinskaya st., 101, Novosibirsk, 630090, Russia
E-mail: annaerst@yandex.ru

² ГНУ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова 2в, Минск, 220012, Республика Беларусь
² SSI Central botanical garden NAS of Belarus, Sarganova st., 2c, Minsk, 220012, Republic of Belarus
E-mail: floraia@nm.ru

Ключевые слова: *Hedysarum theinum*, культура *in vitro*, «hairy roots», дубильные вещества, катехины, флавонолы, ксантоны.

Key words: *Hedysarum theinum*, *in vitro* culture, “hairy roots”, tannins, catechins, flavonols, xanthonenes.

Аннотация. Получены стабильно растущие каллусные культуры, культура «hairy roots» и растения-регенеранты *Hedysarum theinum*. Подобраны и оптимизированы среды для культивирования различных типов эксплантов. Проведен биохимический анализ образцов на содержание дубильных веществ, флавонолов, катехинов и ксантонов. Показано, что *H. theinum* при разных способах культивирования *in vitro* способен синтезировать биологически активные вещества, содержащиеся как в надземной, так и в подземной частях интактных растений. Содержание катехинов и флавонолов в каллусных культурах, культуре «hairy roots» и растениях-регенерантах *H. theinum* не уступает содержанию этих веществ в интактных растениях в отдельные фазы онтогенеза.

Summary. Callus cultures, “hairy roots” culture and regenerants of *Hedysarum theinum* were obtained. Media for cultivation of different types of explants were selected and optimized. Biochemical analysis of explants for the content of tannins, catechins, flavonols and xanthonenes was performed. It was shown that different types of *H. theinum* explants in *in vitro* culture were able to

synthesize biologically active substances contained in the above-ground and in the underground parts of plants. Content of catechins and flavonols in callus cultures, “hairy roots” culture and regenerants of *H. theinum* was not inferior to the content of these substances in intact plants in certain phases of ontogenesis.

Введение

Культуры клеток, тканей и органов растений являются все более востребованными альтернативными источниками ценных вторичных метаболитов (Yurin et al., 2009). Это обусловлено ограниченностью запасов лекарственного сырья, невозможностью выращивания многих видов с помощью плантационного метода, а также трудностями разработки путей химического синтеза ряда природных соединений (Verpoorte et al., 2002).

Биотехнологический подход имеет ряд преимуществ перед традиционным использованием растительного сырья, благодаря возможно-

сти получения биомассы независимо от сезона, климатических и почвенных условий, а также простоте экстракции и очистки препаратов, усилению биосинтеза нужных веществ с помощью элиситоров, автоматизации процесса и др. Способность изолированных растительных клеток продуцировать *in vitro* широкий спектр вторичных метаболитов, синтезируемых в растениях вида *in vivo*, связана со свойством тотипотентности, т.е. с сохранением полной генетической информации о путях их биосинтеза и возможностью ее реализации (Zhou, Wu, 2006).

В ряде работ показано, что содержание вторичных метаболитов в культивируемых *in vitro* растениях может превышать их концентрацию в интактных растениях (Esam, 2011; Meethale, Subramaniam, 2011). Так, в регенерантах представителей рода *Crotalaria* содержание алкалоидов было выше, чем в растениях, произрастающих на опытном участке (Nakka, Devendra, 2012). Кроме того, микроразмножение в сочетании с другими биотехнологическими методиками позволяет получать генетически трансформированные растения, соматональные варианты и проводить отбор по уровню биосинтеза БАВ, что особенно актуально при создании сортов и линий лекарственных растений.

В настоящее время наиболее разработаны технологии получения ценных вторичных БАВ из неорганизованных каллусов или суспензионных культур. Однако, в ряде случаев, каллусы не аккумулируют интересующие метаболиты. Известно, что пути биосинтеза вторичных метаболитов требуют кооперации между клетками, тканями и органами растений на внутри- и межмолекулярном уровне, поэтому для отдельных этапов биосинтеза дифференциация клеток является критическим фактором. В подобных ситуациях необходимо использовать более дифференцированные ткани или культуры органов, а иногда и микрорастения (Karppinen et al., 2006).

Таким образом, выбор наилучшего способа культивирования *in vitro* (каллусная культура, культура органов или микрорастения) является стратегическим моментом в биотехнологии, требующим особого внимания. При этом, для максимальной эффективности систем *in vitro*, как правило, требуется разработка подходов к усилению биосинтеза вторичных метаболитов.

Одним из объектов, востребованных для биотехнологического получения природных веществ, обладающих противовоспалительным, бактерицидным, спазмолитическим, иммуно-

протекторным и другими свойствами является копеечник чайный (*Hedysarum theinum* Krasnob.) из семейства бобовых (Neretina et al., 2004). В последнее время копеечник чайный активно применяется при изготовлении различных биодобавок, большие объемы заготовки и медленная скорость возобновления ставит этот вид на грань исчезновения (Flora of Siberia, 1994).

Целью настоящего исследования является введение *H. theinum* в культуру *in vitro* и разработка технологии размножения этого вида: получение растений-регенерантов, каллусной культуры, культуры «hairy roots» и их первичная оценка по содержанию вторичных метаболитов.

Материалы и методы

В работе прослежена динамика роста и биосинтез вторичных метаболитов в каллусной культуре, культуре «hairy roots» и растениях-регенерантах *H. theinum*. Использованы растения перспективной по продуктивности биомассы природной ценопопуляции из Республики Алтай (Усть-Коксинский район, хребет Холзун, г. Красная) (Dorogina et al., 2009). Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* служили семена. Технологии введения в культуру и клонального микроразмножения *H. theinum* описаны нами ранее (Erst et al., 2014). Для получения каллусной культуры проростки с первой парой настоящих листьев делили на два типа эксплантов – побег и корень, и культивировали двумя способами – правильное положение экспланта и перевернутое (рис. 1). В работе использованы питательные среды Мурасиге и Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962), Гамборга и Эвелега (B₅) (Gamborg, Eveleigh, 1968), Данстена и Шорта (BDS) (Dunstan, Short, 1977), Стрита (S) (Street, 1954), дополненные регуляторами роста: 6-бензиламинопурином (БАП) 1, 5 и 20 мкМ, α-нафтилуксусной кислотой (НУК) 7, 10 и 20 мкМ, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) 5 и 10 мкМ, β-индолилмасляной кислотой (ИМК) 7 мкМ. Все среды были дополнены гидролизатом казеина – 1 г/л., сахарозой – 30 г/л., агаром – 6 г/л. pH = 5,6–5,8. Каллусные культуры культивировали в колбах в темноте при температуре 24 ± 2 °С с интервалом 28 дней. Отбор линий *H. theinum* проводили по признаку «темпа роста», культивируя наиболее быстрорастущие каллусы.

Культуру «hairy roots» получали по методике, описанной М. Ю. Вдовитченко с соавт. (Vdovitchenko et al., 2007). Генетическую трансфор-

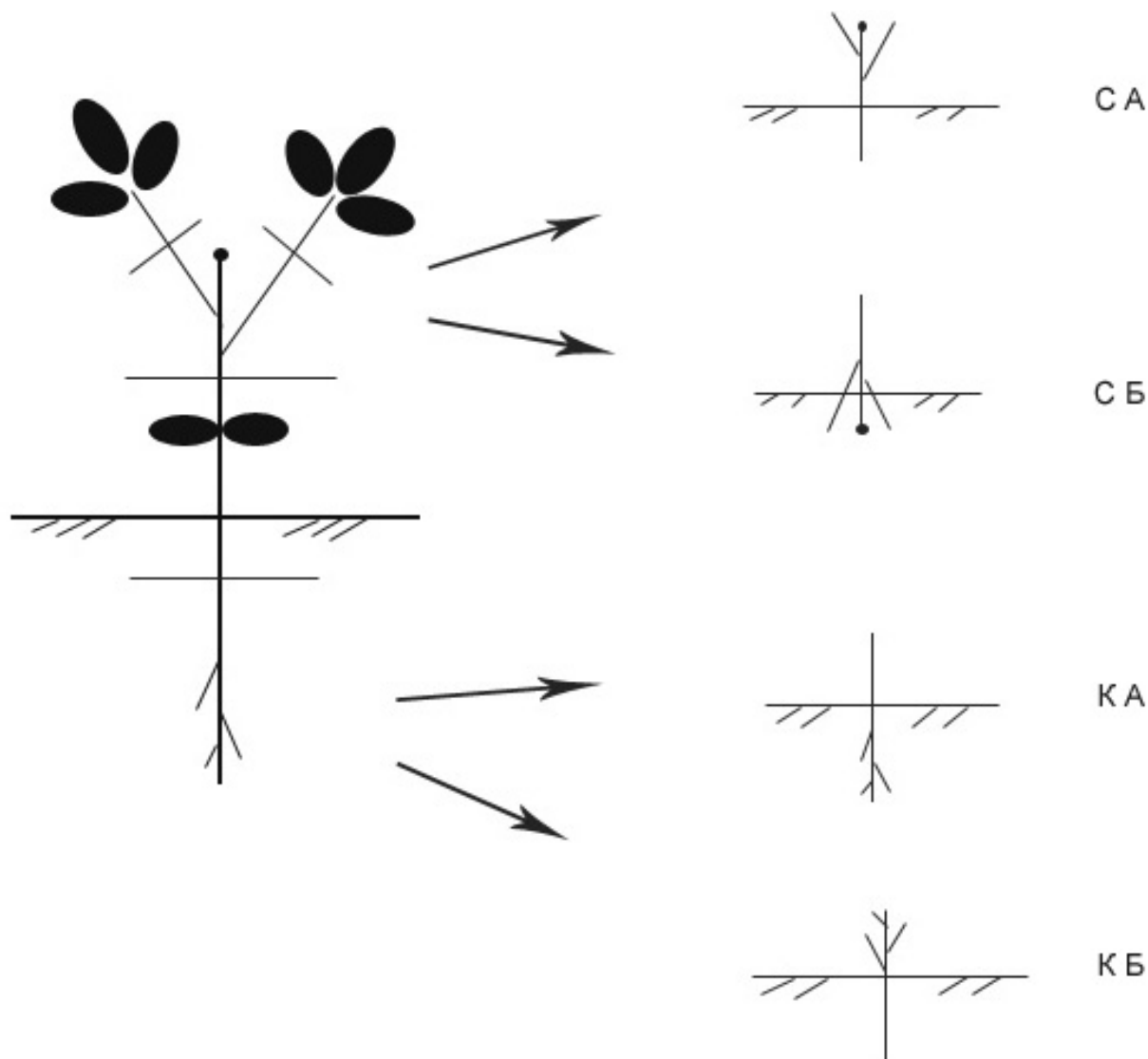


Рис. 1. Схема эксперимента по получению каллусных культур *Hedysarum theinum*: С – стебель; К – корень; А – правильное положение экспланта; Б – перевернутое положение экспланта.

мацию проводили с использованием *Agrobacterium rhizogenes* штамм 15834 Swiss.

Установленный ранее уровень вторичных метаболитов, синтезируемых растениями исследуемой популяции (Kukushkina et al., 2011; Vysochina, Kukushkina, 2011), позволяет осуществлять их контроль в культуре клеток, тканей и органов.

Содержание флавонолов, катехинов и дубильных веществ определяли спектрофотометрическим, ксантонов – хроматоспектрометрическим методом. Количественное определение флавонолов проводили по методике В. В. Беликова и М. С. Шрайбер (Belikov, Shrayber, 1970), в которой использована реакция комплексобразования флавонолов с хлоридом алюминия. Плотность раствора измеряли при длине волны 415 нм. Концентрацию флавонолов находили по калибровочной кривой, построенной по рутину.

Содержание катехинов определяли методом, основанным на способности катехинов давать малиновое окрашивание с раствором ванилина в концентрированной соляной кислоте. Плотность раствора измеряли при длине волны 504 нм. Удельный коэффициент поглощения рассчитан по (+)-катехину «Sigma» (Kukushkina et al., 2003).

Количественное содержание танинов (дубильные вещества) определяли по методике, основанной на способности танинов давать желтое окрашивание с раствором аммония молибденовокислого. Интенсивность образовавшейся окраски измеряли при длине волны 420 нм. Расчет танинов производили по стандартному образцу ГСО танина (Fedoseyeva, 2005).

Определение содержания ксантонов проводили по методикам Krivut et al. (1976), С. В. Русако-

вой, Е. Л. Нухимовского (Rusakova, Nukhimovskiy, 1977). Оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 319 нм.

При проведении экспериментов оценивались следующие параметры: структура каллуса, прирост сырой и сухой биомассы (г). Для определения сырой и сухой биомассы каллусов и культуры «hairly roots» их отделяли от питательной среды и взвешивали до и после высушивания при температуре 110 °С до постоянной массы. Анализ прироста биомассы проводили через каждые три дня в течение 28 дней. Индекс роста рассчитывали по формуле: $I = (m_{\max} - m_0) / m_0$, где m_0 и m_{\max} – масса экспланта в начале и конце цикла выращивания.

Количественное определение дубильных веществ, флавонолов, катехинов и ксантонов проводили на стадии замедления роста. Содержание биологически активных веществ указано в % от абсолютно сухой массы сырья. Анализ прово-

дился на свежем, отмытом от питательной среды, материале и затем сделан перерасчет на абсолютно сухую массу сырья.

Результаты и обсуждение

Основные направления исследования по получению вторичных метаболитов в культуре клеток, тканей и органов *H. theinum* представлены на рисунке 2. Начальный этап работы заключается в отборе наиболее перспективных генотипов для введения в культуру *in vitro*. На следующих этапах работы проводят отбор линий по продуктивности биомассы и вторичных метаболитов в культуре *in vitro* и выявляют наиболее оптимальные типы эксплантов и способы культивирования.

Введение в культуру *in vitro*

Семена *H. theinum* стерилизовали 20 %-м раствором дезинфицирующего средства «Domes-

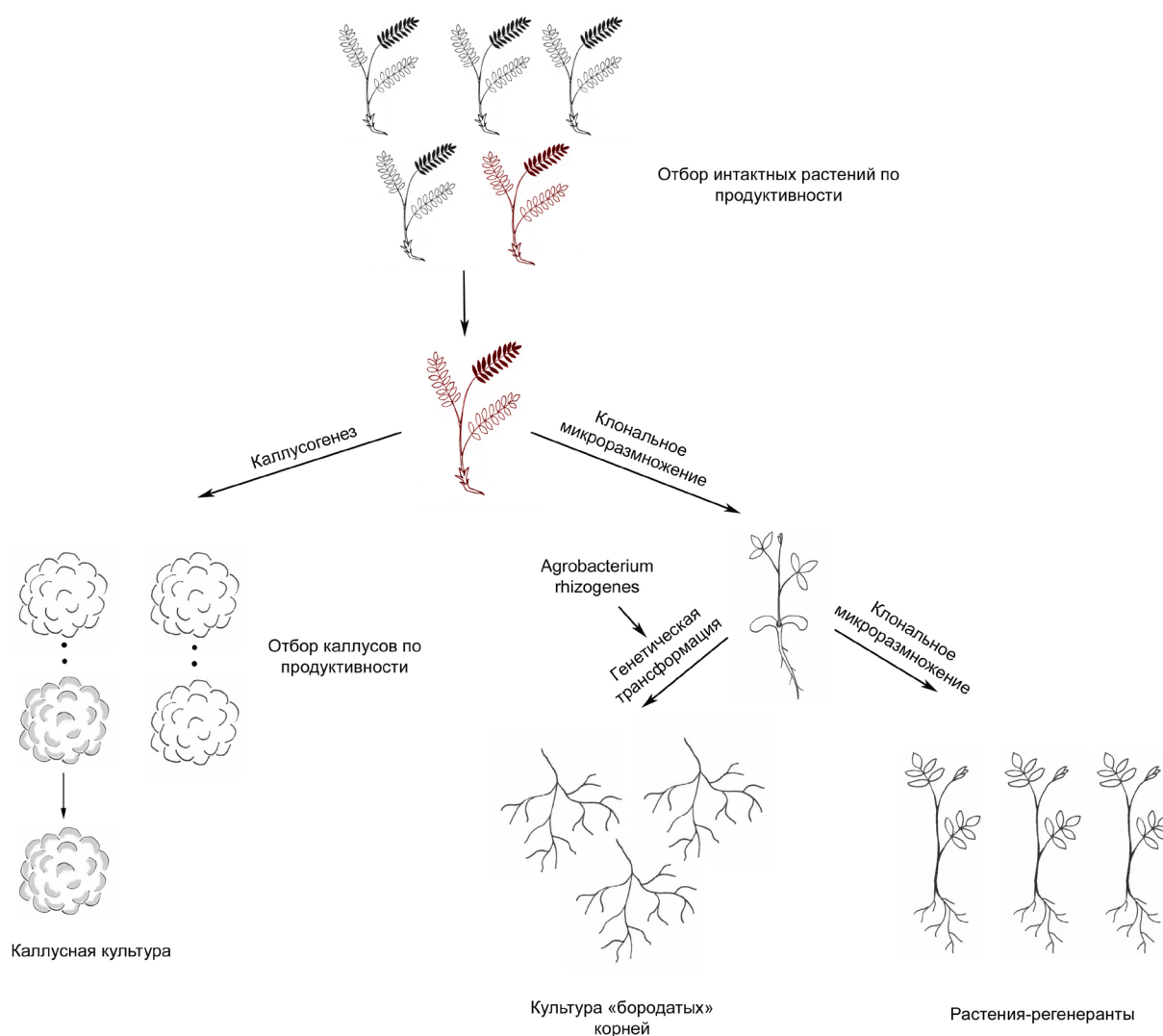


Рис. 2. Схема получения клеточных линий, культуры «hairly roots» и растений-регенерантов *H. theinum*.

tos», содержащего гипохлорит натрия (> 5 %), с последующим трехкратным промыванием стерильной дистиллированной водой, и помещали на 0,6 % агар для проращивания. Условия культивирования семян – температура 24 ± 2 °С, темнота.

Процент прорастания семян в культуре *in vitro* оказался высоким и составил 81 % через 30 дней культивирования. После появления пары настоящих листьев проростки делили на части и помещали на среды для микроразмножения, каллусообразования и для получения культуры «hairly roots».

Микроразмножение

Для клонального микроразмножения применяли среду MS, дополненную 5 мкМ БАП, глутатионом 200 мг/л, гидролизатом казеина 200 мг/л. Для культивирования эксплантов были подобраны следующие условия: фотопериод – 16 / 8 часов свет/темнота, освещенность – 2–3 клк, температура – 24 ± 1 °С. Через месяц культивирования развивалось 3–4 побега на эксплант, высотой 7–10 см с 4–5 узлами. Массовое размножение копеечника чайного проводили путем черен-

кования пробирочных растений на одноузловые сегменты.

Хорошо развитые побеги переносили на среду для укоренения – $\frac{1}{2}$ MS, дополненную 7 мкМ НУК или 7 мкМ ИМК. На средах с ауксинами побеги *H. theinum* укоренялись только через 3 недели культивирования. Лучшие показатели ризогенеза были получены на средах с НУК – 5–7 корней на эксплант (рис. 3А).

Каллусная культура

В результате исследований показано, что каллусообразование *H. theinum* зависит от следующих факторов: состав питательной среды, тип экспланта и его положение на питательной среде (табл. 1, рис. 3). Стабильно растущую каллусную культуру удалось получить от эксплантов корневого происхождения при перевернутом положении на питательной среде BDS + НУК 20 мкМ (рис. 3Г). Использование других питательных сред (MS и В₂) с такой же концентрацией НУК вызывает только рост апекса корня и его утолщение.

Прием культивирования эксплантов в перевернутом положении оказался эффективным и



Рис. 3. *Hedysarum theinum* на различных этапах культивирования: А. Растение-регенерант на среде $\frac{1}{2}$ MS + НУК 7 мкМ. Б. Каллусная культура стеблевого происхождения на среде В5 + 2,4-Д 10 мкМ + гидролизат казеина 1 г/л. В. Первые признаки генетической трансформации на обработанных *A. rhizogenes* (штамм 15834 Swiss) эксплантах (каллусообразование). Г. Каллусная культура корневого происхождения на среде В5 + 2,4-Д 10 мкМ + гидролизат казеина 1 г/л. Д. Культура «hairly roots» на безгормональной жидкой среде S.

Таблица 1

Характеристика роста каллусных культур *Hedysarum theinum* на начальных этапах культивирования

Питательная среда	Тип и положение экспланта	Ответ экспланта
MS + НУК 20 мкМ + БАП 1 мкМ	С А	Нет
	С Б	Нет
	К А	Утолщение корня
	К Б	Рост апекса корня и утолщение корня
MS + 2,4-Д 5 мкМ + БАП 1 мкМ	С А	Рост побега
	С Б	Каллусообразование в области пазушной почки
	К А	Нет
	К Б	Рост апекса корня и утолщение корня
V ₅ + НУК 20 мкМ+ БАП 1 мкМ	С А	Рост побега, каллусообразование у основания побега
	С Б	Рост побега, каллусообразование в области пазушной почки и в месте среза побега
	К А	Каллусообразование
	К Б	Рост апекса корня, каллусообразование
V ₅ + 2,4-Д 5 мкМ+ БАП 1 мкМ	С А	Рост побега, каллусообразование у основания побега
	С Б	Рост побега, каллусообразование в области пазушной почки и в месте среза побега
	К А	Утолщение корня
	К Б	Рост апекса корня, каллусообразование
BDS + НУК 20 мкМ	С А	Каллусогенез и ризогенез
	С Б	Каллусогенез и ризогенез
	К А	Каллусогенез
	К Б	Каллусогенез
BDS + БАП 20 мкМ	С А	Рост побега
	С Б	Нет
	К А	Роста корня
	К Б	Роста корня

Примечание: С – стебель; К – корень; А – правильное положение экспланта; Б – перевернутое положение экспланта.

для эксплантов стеблевого происхождения. Так, активный каллусогенез, который всегда сопровождается ризогенезом, наблюдали в месте среза побега и области пазушной почки на среде BDS + НУК 20 мкМ (рис. 3Б). Большая эффективность действия ауксинов в эксплантах при перевернутом положении (каллусообразование и ризогенез) возможно объясняется полярным транспортом ауксинов, который осуществляется только в одном направлении (от верхушки стебля к кончику корня). Подобные приемы культивирования помогают, например, эффективно укоренять побеги *in vitro* (Fratini, Ruiz, 2003).

В дальнейших экспериментах мы использовали каллусные культуры стеблевого и корневого происхождения, полученные при культивировании в перевернутом положении, и оптимизировали среды для культивирования. Стабильные

параметры роста каллусных культур были получены при использовании сред: V₅ + 2,4-Д 10 мкМ и V₅ + НУК 10 мкМ. Индексы роста по сухой биомассе составили 2,5–2,7 для эксплантов корневого и 2,5–4,8 для эксплантов стеблевого происхождения (табл. 2). На рисунке 4 показана динамика роста каллусных культур *H. theinum*. В экспоненциальную фазу роста клетки вступали на 9-й день культивирования, в стационарную – на 24–27-е сутки.

Таким образом, подобранные культуральные среды, типы эксплантов, отслеженная динамика роста обеспечили возможность получения из первичных эксплантов стабильно растущие каллусные культуры, которые в дальнейшем могут быть использованы в работе по получению высокопродуктивных штаммов суспензионной культуры копеечника чайного *in vitro*, и позволят

Таблица 2

Показатели роста каллусных культур *Hedysarum theinum*

Питательная среда	Тип экспланта	Индекс роста	
		Сырая биомасса	Сухая биомасса
В ₅ + 2,4-Д 10 мкМ	Стебель, перев. пол.	2,5	2,5
	Корень, перев. пол.	2,6	2,7
В ₅ + НУК 10 мкМ	Стебель, перев. пол.	3,7	4,8
	Корень, перев. пол.	2,2	2,5

проследить динамику накопления БАВ в различные фазы роста клеточных культур.

Культура «hairy roots»

Генетическую трансформацию эксплантов *H. theinum* наблюдали на черешках настоящих листьев через 4 недели культивирования. Сначала развивался каллус, который в последующем давал быстро и хаотично растущие корни. У части эксплантов развивался только каллус, который в течение двух пассажей проявил себя как гормонезависимая клеточная культура. Дальнейшие пересадки такого каллуса на безгормональные среды приводили к его гибели.

Хорошо ветвящиеся «бородатые» корни, после нескольких пассажей на средах, содержащих антибиотики, переводили в жидкую среду S без регуляторов роста (рис. 3В, Д). Индекс роста по сухой биомассе «hairy roots» составил 2,5.

Культура «hairy roots» генетически более стабильна, чем каллусная культура в связи с большей дифференциацией тканей и клеток и, как правило, характеризуется большими темпами роста в культуре *in vitro* без использования регуляторов роста (Pistelli et al., 2010; Vdovitchenko et al., 2007). Таким образом, введение в культуру *in vitro* генетически трансформированных кор-

ней копеечника, которые выращиваются в контролируемых условиях, сохраняя при этом высокую интенсивность роста, можно рассматривать как потенциальный биотехнологический источник экологически чистого сырья.

Биохимический анализ

Биохимический анализ вторичных метаболитов показал, что различные типы эксплантов *H. theinum* в культуре *in vitro* способны синтезировать биологически активные вещества, характерные как для надземной, так и для подземной частей (табл. 3). Максимальное содержание катехинов в корнях растений-регенерантов (0,27 %) и «hairy roots» (0,28 %) меньше, чем в интактных растениях *H. theinum* (0,6–5,9 %), но в среднем больше, чем в *H. alpinum* (0,05–1,07 %) (Zinner et al., 2010). Содержание флавонолов в растениях, полученных в культуре *in vitro* (2,3 %), соответствует минимальному количеству флавонолов в интактных растениях (2,30–5,63 %). При этом следует отметить, что максимальное содержание катехинов у копеечника наблюдается у 4–7-летних растений (Zinner et al., 2010), в то время как в культуре *in vitro* экспланты постоянно поддерживаются в ювенильном состоянии, что, вероятно, влияет на уровень биосинтеза вторичных метаболитов.

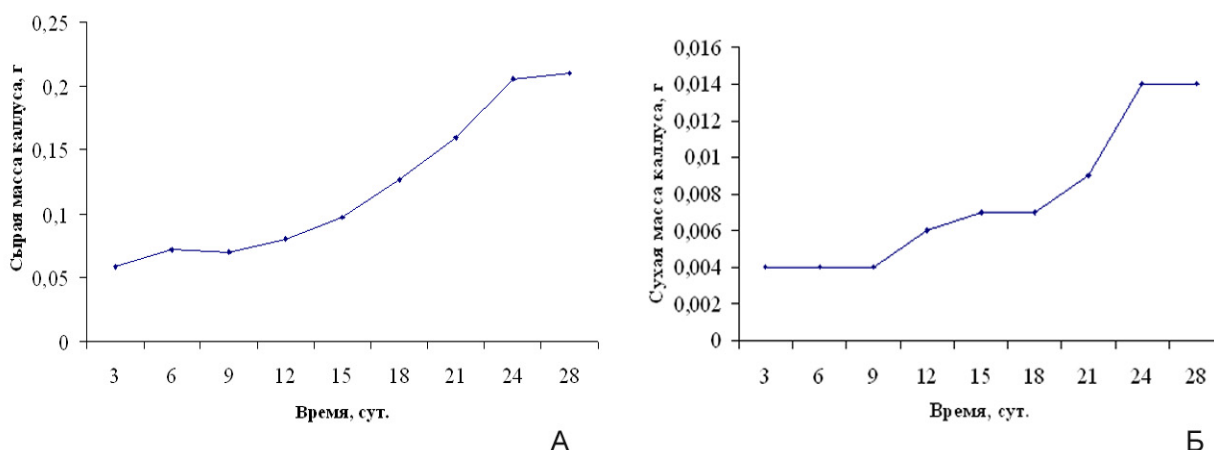


Рис. 4. Динамика роста биомассы каллуса стеблевого происхождения *Hedysarum theinum* на среде В₅ + НУК 10 мкМ: А. Сырая биомасса. Б. Сухая биомасса.

Таблица 3

Содержание биологически активных веществ *Hedysarum theinum* при различных способах культивирования *in vitro* (% от абсолютно сухой массы сырья)

Тип экспланта	Питательная среда	Влажность	Дубильные вещества	Флавонолы	Катехины	Ксантоны
Растение-регенерант (лист)	MS + БАП 5 мкМ + гидролизат казеина 200 мг/л	83,27	9,32 ± 0,24	2,00 ± 0,02	0,205 ± 0,028	0,168 ± 0,017
Растение-регенерант (корень)	MS + БАП 5 мкМ + гидролизат казеина 200 мг/л	84,79	5,65 ± 0,15	Нет	0,270 ± 0,020	Нет
Культура «hairy roots»	S	92,81	1,81 ± 0,04	Нет	0,250 ± 0,001	Нет
Каллусная культура	B5 + 2,4-Д 10мкМ + гидролизат казеина 1000 мг/л	94,59	0,69 ± 0,01	Нет	0,14 ± 0	Нет

В работах М. Ю. Вдовитченко с соавт. (Vdovitchenko et al., 2007) и И. В. Нечепуренко с соавт. (Nechepurenko et al., 2009) показано, что генетически трансформированные корни («hairy roots») сохраняют способность к синтезу вторичных метаболитов, специфичных для корней целого растения. При этом авторы отмечают, что культура «бородатых» корней не обладает признаками вторичного роста и сравнивать ее нужно с корнями ювенильных растений. В полученных нами каллусных культурах, культурах «hairy roots» и растениях-регенерантах *H. theinum* содержание вторичных метаболитов приближено к их концентрации в интактных растениях, а содержание флавонолов соответствует их количеству во взрослых растениях. При этом в дифференцированных тканях и органах копеечника чайного *in vitro* наблюдали более высокий уровень биосинтеза вторичных метаболитов, чем в каллусных культурах. Особенно наглядно это прослеживается на примере дубильных веществ, содержание которых в каллусной культуре менее 1 %, тогда как в дифференцированных тканях оно достигает 9,3 %.

Заключение

Разработанная схема получения клеточной культуры, культуры «hairy roots» и растений-регенерантов *H. theinum* позволила четко обозначить основные направления исследований по получению линий-гиперпродуцентов этого ценного лекарственного растения. В результате работы нами получены растения-регенеранты, каллусные культуры стеблевого и корневого

происхождения и культура «hairy roots» копеечника чайного. Подобраны условия для массового размножения копеечника чайного. Оптимальной на этапе собственно размножения является среда MS, дополненная 5 мкМ БАП, глутатионом 200 мг/л, гидролизатом казеина 200 мг/л; на этапе укоренения – ½ MS, дополненная 7 мкМ НУК. Показано, что состав питательной среды, тип экспланта и его положение на питательной среде играют важную роль в процессе каллусообразования. Оптимальные условия для каллусообразования – перевернутое положение экспланта, среда B₅ + 2,4-Д 10 мкМ или B₅ + НУК 10 мкМ. Индекс роста по сухой биомассе для эксплантов стеблевого происхождения составил 4,8, для эксплантов корневого происхождения – 2,7. Проведенный биохимический анализ вторичных метаболитов свидетельствует о возможности использования культуры клеток, тканей и органов *H. theinum* как потенциального источника лекарственного сырья и о перспективности дальнейших исследований с целью получения линий копеечника чайного с высоким уровнем биосинтеза БАВ в культуре *in vitro*.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность Инне Николаевне Кузовкиной за предоставленный для исследований материал – штаммы *Agrobacterium rhizogenes* и постоянные профессиональные советы. Работа выполнена при финансовой поддержке: Совместного конкурса проектов фундаментальных исследований НАН Беларуси и СО РАН. Проект № 13.

ЛИТЕРАТУРА

- Belikov V. V., Shrayber M. S.** Methods of analysis of flavonoid compounds // Pharmacy [Farmaciya], 1970. – No. 1. – P. 66–72 [In Russian] (**Беликов В. В., Шрайбер М. С.** Методы анализа флавоноидных соединений // Фармация, 1970. – № 1. – С. 66–72).
- Dorogina O. V., Karnaukhova N. A., Agafonova M. A.** Relationships between the variability of electrophoretic profiles of seed polypeptides and ecological-geographic conditions of the habitats of populations of *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae) // Contemp. Probl. Ecol., 2009. – Vol. 2, No. 6. – P. 506–509. DOI: 10.1134/S1995425509060022
- Dunstan D. J., Short K. C.** Improved growth of tissue culture of the onion *Allium cepa* // Physiol. Plantarum, 1977. – Vol. 1, No. 1. – P. 70–72.
- Erst A. A., Zheleznicenko T. V., Novikova T. I., Dorogina O. V., Banaev E. V.** Ecological and geographic variability of *Hedysarum theinum* and features of its propagation *in vitro* // Contemp. Probl. Ecol., 2014. – Vol. 7, iss. 1. – P. 67–71. DOI: 10.1134/S1995425514010053
- Esam A. H.** *In vitro* versus *in vivo*: A comparative study of *Solanum villosum* (Mill.) plant leaves // Int. J. Integrat. Biol., 2011. – Vol. 11, No. 3. – P. 140–144.
- Fedoseyeva L. M.** The study of tannins underground and aboveground organs *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch., grows in the Altai // Chemistry of Plant Raw Materials [Khimiya rastitelnogo syrya]. – Barnaul, 2005. – No. 2. – P. 45–50 [In Russian] (**Федосеева Л. М.** Изучение дубильных веществ подземных и надземных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.), произрастающего на Алтае // Химия растительного сырья. – Барнаул, 2005. – № 2. – С. 45–50).
- Flora of Siberia. Vol. 9 (Fabaceae). // Ed. by A. V. Polozhij and L. I. Malyshev. – Novosibirsk: CRC Press, 2006. – 286 p.
- Fratini R. Ruiz, M. L.** A rooting procedure for lentil (*Lens culinaris* Medik.) and other hypogeous legumes (pea, chickpea and Lathurus) based on explant polarity // Plant. Cell. Rep., 2003. – Vol. 21. – P. 726–732. DOI 10.1007/s00299-003-0603-z
- Gamborg O. L., Eveleigh D. E.** Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem., 1968. – Vol. 46, No. 5. – P. 417–421.
- Karppinen K., Hohtola A., Tolonen A., Jalonen J., György Z., Neubauer P.** Comparison of growth and secondary metabolite accumulation in cultures of compact callus aggregates and shoots of *Hypericum perforatum* L. in shake flasks and in a bubble column bioreactor. Proceedings of the Fifth International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding // Acta Hort., 2006. – Vol. 725. – P. 605–612.
- Krivut B. A., Fedyunina N. A., Kocherga S. I., Rusakova S. V.** Spectrophotometric determination of magniferin // Chem. Nat. Compd., 1976. – Vol. 12, iss. 1. – P. 36–38.
- Kukushkina T. A., Vysochina G. I., Karnaukhova N. A., Selutina I. Yu.** Content of mangiferin and the amount of xanthenes in some wild plants and introduced species *Hedysarum* L. // Plant Resources [Rastitelnye resursy], 2011. – Iss. 1. – P. 99–106 [In Russian] (**Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Карнаухова Н. А., Селютина И. Ю.** Содержание мангиферина и суммы ксантонов в растениях некоторых дикорастущих и интродуцированных видов *Hedysarum* L. // Растительные ресурсы, 2011. – Вып. 1. – С. 99–106).
- Kukushkina T. A., Zyкова A. A., Obuchova L. A.** *Alchemilla vulgaris* L. as a source of medicinal products // Actual problems of creating new drugs of natural origin: Proceedings of the International Congress [Aktualnye problemy sozdaniya novykh lekarstvennykh preparatov prirodnoho proishozhdeniya: Materialy VII Mezhdunarodnogo Sezda]. – St. Peterburg, 2003. – P. 64–69 [In Russian] (**Кукушкина Т. А., Зыков А. А., Обухова Л. А.** Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.) как источник лекарственных средств // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: Материалы VII Междунар. съезда. – СПб, 2003. – С. 64–69).
- Meethaley V. J., Subramaniam P.** Evaluation of certain flavonoids of medicinal importance in the wild and micropropagated plants of the endangered medicina species, *Exacum bicolor* Roxb. // J. Appl. Pharm. Sci., 2011. – Vol. 1.1, No. 5. – P. 99–102.
- Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plantarum, 1962. – Vol. 15, No. 2. – P. 473–497.
- Nakka S., Devendra B. N.** A rapid *in vitro* propagation and estimation of secondary metabolites for *in vivo* and *in vitro* propagated *Crotalaria* species, a Fabaceae member // J. Microbiol. Biotech. Food. Sci., 2012. – No. 2(3). – P. 897–916.
- Nechepurenko I. V., Komarova N. I., Kuzovkina I. N., Vdovitchenko M. Yu., Polovinka M. P., Salakhutdinov N. F.** Isolation and identification of 4',6-dimethoxy-7-hydroxy-isoflavone from roots *Hedysarum theinum* cultivated *in vitro* // Chem. Nat. Compd., 2009. – Vol. 45, No. 3. – P. 420–421. DOI:10.1007/s10600-009-9327-9
- Neretina O. V., Gromov A. S., Lutskiy I. V.** Component composition of species of the genus *Hedysarum* (Fabaceae) // Plant Resources [Rastitelnye resursy], 2004. – Vol. 40, iss. 4. – P. 111–137 [In Russian] (**Неретина О. В.,**

Громова А.С., Луцкий И.В., Семенов А.А. Компонентный состав видов рода *Hedysarum* (Fabaceae) // Растительные ресурсы, 2004. – Т. 40, вып. 4. – С. 111–137).

Pistelli L., Giovannini A., Ruffoni B., Bertoli A. Hairy root cultures for secondary metabolites production // Bio-Farms for nutraceuticals: functional food and safety control by biosensors / Ed. by M. T. Giardi, G. Rea and B. Berra. – 2010. – P. 168–184.

Rusakova S. V., Nukhimovskiy E. L. Some biological characteristics of *Hedysarum neglectum* Ledeb. and the content of magniferin // Plant Resources [Rastitelnye resursy], 1997. – Vol. 13, iss. 3. – P. 478–480 [In Russian] (**Русакова С. В., Нухимовский Е. Л.** Некоторые биологические особенности *Hedysarum neglectum* Ledeb. и содержание в нем магниферина // Растительные ресурсы, 1977. – Т. 13, вып. 3. – С. 478–480).

Street H. E. Growing roots without plant // Discovery, 1954. – No. 15. – P. 286–292.

Vdovitchenko M. Yu., Kuzovkina I. N., Paetz Ch., Schneider B. Formation of phenolic compounds in the roots of *Hedysarum theinum* cultured *in vitro* // Russ. J. Plant Physiol., 2007. – Vol. 54, No. 4. – P. 536–544. DOI: 10.1134/S1021443707040164

Verpoorte R., Contin A., Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites // Phytochem Rev, 2002. – Vol. 1. – P. 13–25. DOI: 10.1023/A:1015871916833

Vysochina G. I., Kukushkina T. A. Biologically active substances of some species of the genus *Hedysarum* L. // Chemistry of plant raw materials [Khimiya Rastitelnogo syrya]. – Barnaul, 2011. – No. 4. – P. 251–258 [In Russian] (**Высочина Г. И., Кукушкина Т. А.** Биологически активные вещества некоторых видов рода *Hedysarum* L. // Химия растительного сырья. – Барнаул, 2011. – № 4. – С. 251–258).

Yurin V. M., Ditchenko T. I., Molchan O. V., Shapchits M. P., Romashko S. N., Bulatova A. A., Logvinova A. O. The culture of plant cells and tissues: preparation technology, a variety of pharmacologically active metabolites and methods regulation of it synthesis // Proceedings of the Belarusian State University [Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta]. – Minsk, 2009. – Vol. 4, iss. 2. – P. 168–182 [In Russian] (**Юрин В. М., Дитченко Т. И., Молчан О. В., Шапчиц М. П., Ромашко С. Н., Булатова А. А., Логвина А. О.** Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза // Труды БГУ. – Минск, 2009. – Т. 4, вып. 2. – С. 168–182).

Zhou L. G., Wu J. Y. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China // Nat. Prod. Rep., 2006. – Vol. 23. – P. 789–810. DOI: 10.1039/B610767B

Zinner N. S., Vysochina G. I., Kukushkina T. A., Sviridova T. P. Biologically active substances of *Hedysarum alpinum* L. and *H. theinum* Krasnob. (Fabaceae), introduced in Tomsk oblast // Tomsk State University. Journal of Biology [Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya], 2010. . – No. 4(12). – P. 116–122 [In Russian] (**Зиннер Н. С., Высочина Г. И., Кукушкина Т. А., Свиридова Т. П.** Биологически активные вещества *Hedysarum alpinum* L. и *H. theinum* Krasnob. (Fabaceae), интродуцируемых в Томскую область // Вестник ТГУ. Биология, 2010. – № 4(12). – С. 116–122).