

Введение в культуру *in vitro* *Hedysarum gmelinii* Ledeb.

Е. С. Аврамова[✉], О. Е. Черепанова¹

¹ Ботанический сад УрО РАН, Екатеринбург, Россия

✉ Email: moon.lena96@mail.ru

Аннотация. *Hedysarum gmelinii* (копеечник Гмелина) является перспективным видом для введения в культуру и дальнейшего использования в аграрной и фармакологической промышленности. Цель исследовательской работы заключалась в получении культуры *in vitro* *H. gmelinii*. Данный вид в настоящий момент находится под угрозой исчезновения в нескольких субъектах РФ, что делает поиск новых способов сохранения естественных популяций актуальным. **Материалы и методы:** семена *H. gmelinii* были собраны в Татарстане и Башкортостане, после чего хранились при температуре 4 °С. Предварительно стерилизованные семена добавляли в среду Мурасиге – Скуга, содержащую фитогормоны БАП и ИУК в 4 вариантах концентраций. В период прорастания температуру поддерживали на уровне 20 °С, а длина светового дня составляла 16 часов. **Результаты.** Начало прорастания отметили к 15 дню. Затем наиболее жизнеспособные проростки пересадили на свежую среду, где через 13 дней отметили формирование молодых растений *H. gmelinii*. Наиболее активное образование каллуса идет у представителей из Татарстана. Таким образом, **новизна** данного исследования заключается в том, что была подобрана оптимальная среда для проращивания *in vitro* семян вида *H. gmelinii*, которая обеспечивает жизнеспособность растений и дает возможность получить культуру тканей для изучения состава биологически активных компонентов.

Ключевые слова: 6-бензиламинопури́н (БАП), гетероауксин (ИУК), среда Мурасиге – Скуга; прорастание семян; *Hedysarum gmelinii* Ledeb., *Fabaceae*, введение в культуру, каллус, фармакология, аграрная промышленность, исчезающий вид.

Для цитирования: Аврамова Е. С., Черепанова О. Е. Введение в культуру *in vitro* *Hedysarum gmelinii* Ledeb. // Аграрный вестник Урала. 2020. № 10 (201). С. 35–42. DOI: ...

Дата поступления статьи: 19.05.2020.

Постановка проблемы (Introduction)

H. gmelinii, или копеечник Гмелина, относится к семейству бобовых. Род копеечников (*Hedysarum*) включает в себя около 300 видов [1] однолетних или многолетних трав, произрастающих в Азии, Европе, Северной Африке и Северной Америке [2]. Ареал вида *H. gmelinii* образуется из двух разобщенных частей, где азиатская имеет большую площадь и охватывает в том числе часть Сибири, а меньшая расположена в западном Приуралье (Республика Башкортостан, Республика Татарстан, Пермская и Оренбургская области) и Поволжье (Самарская, Волгоградская, Ульяновская, Саратовская области). Ареал вида является дизъюнктивным, что связано с облигатной кальцефильностью вида, произрастающего на меловых и известняковых субстратах. [3, с. 60]. У *H. gmelinii* простой полный онтогенез, включающий четыре периода и десять возрастных состояний, однотипный во всех исследованных условиях произрастания, продолжительностью около 50 лет [4, с. 72]. В настоящей работе были использованы семена, собранные в западной части ареала, а именно в Башкортостане и Татарстане. Основная цель нашей исследовательской работы заключалась в подборе оптимальной среды на основе широко распространенной питательной среды Мурасиге – Скуга для введения в культуру *in vitro* перспективного вида *H. gmelinii*.

Растения рода *Hedysarum* активно и на протяжении длительного периода используются в качестве лекарственного сырья в китайской народной медицине. Проявляемый интерес к данной группе растений связан с повышенным содержанием различных биологически активных соединений, которые локализованы преимущественно в корневой системе, однако прорабатывается возможность получения удовлетворительного выхода ряда перспективных соединений и из надземной части. В перечень биологически активных веществ входят флавоноиды, тритерпеноиды, кумарины, лигнаны, алкалоиды, аминокислоты, стеролы, высшие жирные кислоты, полисахариды и дубильные вещества. В ранних исследованиях (Г. С. Глызина и Н. Ф. Комиссаренко 1967 г., Г. И. Высочина и др. 2011 г., Yi Liu и др. 2018 г. и 2019 г.) из *H. gmelinii* были получены флавоноиды (2,6 %) 3- α -L-рамнофуранозидквертицина, 3- α -L-арабинофуранозидквертицина; халконы хедизарумин А, хедизарумин В, паратокарпин Е; птерокарпан 3-гидрокси-9-метоксиптерокарпан; тритерпеноиды лупеол, соясапогенол, сквазапогенол; кумарин 3,9-дигидроксикуместан; стерол β -ситостерол; высшая жирная кислота пальмитиновая кислота, а также 2,3-дигидроксипропиловый эфир гексадекановой кислоты [5–8] Также можно выделить сахарозу и моносахара из листьев (1,95 %), цветков (7,16 %), плодов (3,42 %) [9], [10].

Различные экстракты растений рода *Hedysarum* обладают антиоксидантными, антивозрастными, противоопухолевыми, антидиабетическими свойствами [5–11], участвуют в регуляции процессов иммунной системы.

Фармакологическим потенциалом обладают не только взрослые и полностью сформированные растения. В работе группы ученых (Jon Krakauer, Ying Long, Andrew Kolbert и др., 2015 г.) было установлено, что в семенах *H. alpinum* в достаточной концентрации содержится L-канаванин, который способен спровоцировать смерть человека [12]. Подобный случай произошел в 1992 г. на Аляске, когда Кристофер Маккэндлесс, зная о том, что корни *H. alpinum* съедобны, употребил в пищу семена этого растения, после чего скончался. Этот факт акцентирует внимание на необходимости изучения состава биологически активных веществ, содержащихся во всех частях растения.

Также определенный интерес вызывают симбиотические отношения между *H. gmelinii* и клубеньковыми бактериями. В исследовании 2017 г. (А. Л. Сазанова, И. Г. Кузнецова, В. И. Сафронова и др.) было установлено, что среди микросимбионтов этого растения встречаются штаммы симбиотических видов клубеньковых бактерий (*Rhizobium sp.*), а также атипичные виды, представители которых не образуют симбиоз (*Phyllobacterium endophyticum*, *Ph. Loti* и *Boseasp.*) [13]. Штаммы не симбиотических видов ризобий могут присутствовать в клубеньках как носители генов, которые не участвуют непосредственно в формировании симбиоза, но могут влиять на его эффективность. Дальнейшее фенотипическое и генетическое изучение изолированных микроорганизмов может внести существенный вклад в понимание путей эволюции и развития растительно-микробных взаимодействий в бобово-ризобияльной системе. Симбиотические взаимоотношения являются жизненно необходимыми для растения и в изменяющихся условиях окружающей среды важно установить, как загрязнение почвы влияет на самих микросимбионтов. В исследовании 2015 г. (Hui Yan, Zhao Jun Ji, Yin Shan Jiao и др.) было установлено, что *H. polybotrys* связывался с *Mesorhizobium septentrionale* [14]. Результаты показали, что плодородие почвы может выступать ведущим фактором, определяющим распределение ризобий, связанных с этим культивируемым растением.

Обладая высоким фармакологическим потенциалом, избирательностью к условиям своего произрастания, а также являясь, наряду с другими представителями сем. *Fabaceae* прекрасным кормовым растением *H. gmelinii*, является перспективным объектом изучения, сохранения путем введения в культуру *in vitro*, а также разработки стратегии по его использованию [15].

Методология и методы исследования (Methods)

Семенной материал *H. gmelinii* был собран в Татарстане и Башкортостане и хранился до момента использования при 4 °С.

Компонентный состав среды Мурасиге – Скуга, используемый нами для введения в культуру *H. gmelinii*, представлен в таблице.

После приготовления питательную среду разливали в объеме 25 мл в стеклянную посуду и автоклавировали.

Перед стерилизацией все семена очищали от сухих оболочек. Из каждой популяции нами было отобрано по 100 штук зрелых семян. Далее материал переносили в отдельные стаканы и подвергали стерилизации. В процессе следили, чтобы все семена были равномерно смочены и полностью находились в растворе.

На первом этапе стерилизации семенной материал погружали в 75-процентный спирт на 3 минуты. Далее переносили в гипохлорид 3 % (раствор Белизны) на 10 минут, после чего семена отмывали в стерильной дистиллированной воде по 10 минут 3 раза, активно перемешивая, после каждого раза вода менялась.

Семена помещали на питательную среду так, чтобы избежать загущения и снизить риск возможной контаминации. При высаживании каждое семя после окончания стерилизации накальвали предварительно обожженной иглой. Семена проращивались при температуре 20 °С и 16-часовом световом дне.

Далее при проведении пересаживания проростков, а затем и взрослых растений на новую питательную среду повторная стерилизация не проводилась, оставался неизменным и ее состав.

Результаты (Results)

Изучая доступные источники литературы, заключили, что *H. gmelinii* является перспективным видом для интродукции, а также данный вид нуждается в защите для восстановления численности природных популяций.

H. gmelinii относится к секции *Multicaulia* [16–18]. В исследовании Yi Liu с соавторами в 2019 г. была подтверждена более тесная генетическая связь между данной секциями *Multicaulia* и *Subacaulia*. Также было обнаружено, что изофлавоноиды и птерокарпаны являются общими составляющими рода *Hedysarum*, особенно среди трех травянистых секций (*Obscura*, *Multicaulia* и *Subacaulia*), в то время как халконы (особенно пренилированные халконы) могут быть характерными составляющими секций *Multicaulia* и *Subacaulia*. Характерными составляющими секции *Fruticosa* (*H. polybotrys*) являются птерокарпаны, бензофураны и куместаны [19]. Таким образом, при недостатке теоретических данных о содержании какого-либо вещества в *H. gmelinii* можно сделать предположение о его наличии, основываясь на результатах близкородственных видов данного рода, и далее уже в лабораторных условиях попытаться получить искомое вещество, используя культуру ткани.

Из-за эколого-биологических особенностей и частого использования человеком некоторые виды рода *Hedysarum* находятся в положении резкого сокращения численности популяции. *H. gmelinii* состоит в данный момент в Красной книге Республики Татарстан [20]. Был отмечен и в Красных книгах других регионов (Республика Башкортостан – 2001 г., Курганская область – 2012 г., Омская область – 2015 г., Оренбургская область – 2014 г., Самарская область – 2017 г., Республика Саха (Якутия) – 2017 г., Ульяновская область – 2015 г., Челябинская область – 2017 г.) [21], [22, с.88], [23], [24, с.112]

Таблица
Состав среды Мурасиге – Скуга

Компоненты		Количество, мг (если не указано иное)
NH ₄ NO ₃		1650
KNO ₃		1900
CaCl ₂ _{плав}		310
MgSO ₄ × 7H ₂ O		370
KH ₂ PO ₄		170
Микроэлементы по Мурасиге – Скуга		1 мл
Fe-хелат		5 мл
Мезоинозит		100
Витамины по Мурасиге – Скуга		1 мл
Сахароза		30 г
Агар		8 г
Вода		1 л
Гормоны (варианты)	6-бензиламинопурин (БАП), мг	Гетероауксин (ИУК), мг
1	–	–
2	1,0	0,1
3	0,1	1,0
4	1,0	1,0

Table
The composition of the Murashige and Skoog medium

Ingredients		Amount of substance, mg (unless otherwise stated)
NH ₄ NO ₃		1650
KNO ₃		1900
CaCl ₂		310
MgSO ₄ × 7H ₂ O		370
KH ₂ PO ₄		170
Micronutrients of MS		1 ml
Fe-chelate		5 ml
Mesoinositol		100
Vitamins of MS		1 ml
Saccharose		30 g
Agar		8 g
Water		1 l
Hormones (versions)	6-benzylaminopurine (BAP), mg	Indole-3-acetic acid (IAA), mg
1	–	–
2	1,0	0,1
3	0,1	1,0
4	1,0	1,0

При этом растения рода *Hedysarum* могут использоваться не только непосредственно в фармакологической промышленности, но и как кормовое сырье. Растение способно давать высокие приросты показателей биомассы в летний период, но его продуктивность варьирует в зависимости от условий произрастания (тип субстрата, уровень освещенности, влажность и температура воздуха). Копеечники, произрастающее в кустарниково-разнотравно-злаковых степях на террасах горных рек, на остепненных лугах без пастбищной нагрузки, а также в поймах горных рек, имеют высокие значения основных биолого-морфологических характеристик, таких как диаметр каудекса, число побегов, число листьев и соцветий, биомасса надземной части особи. Наименьшие показатели биомассы представлены у растений ценопопуляций, про-

израстающих в условиях остепненного луга с пастбищной дигрессией и полынно-мелкодерновинно-злаковой степи. Также копеечники привлекают внимание исследователей, являясь прекрасным сырьем для биотоплива. Стебли *H. coronarium* содержат значительное количество общих растворимых сахаров и полисахаридов в клеточной стенке, в отличие от листьев, которые богаты белками и лучше всего подойдут в качестве кормового вида для скота. Таким образом, использование этого растения в аграрной промышленности может решать одновременно несколько разнонаправленных задач [25], [26].

Интересны исследования, изучающие влияние копеечника на рост шерсти скота [27], противогельминтное действие растения [28], [29].



a)



б)

Рис. Взрослое растение *H. gmelinii*, выращенное в условиях *in vitro*:

а) Башкирия, б) Татарстан

Fig. Adult *H.gmelinii* plant grown *in vitro*:

a) Bashkortostan, b) Tatarstan

На всхожесть семян в условиях *in vitro* влияет множество факторов (от качества питательной среды и частоты пересевания до условий экспозиции), и поиск подходящих условий для культивирования является актуальной проблемой. После посева на питательную среду семена активно начали прорастать к 15 дню. Далее мы провели пересадку наиболее перспективных и жизнеспособных проростков на свежую питательную среду, на которой еще через 13 дней были сформированы молодые растения с хорошо развитой вегетативной частью (см. рис.).

Одним из объектов изучения может стать активная форма кислорода (АФК), которая оказывает благоприятное воздействие на процессы прорастания семян. В работе 2016 г. (Liqiang Su, Qinying Lan, Hugh W. Pritchard, Hua Xue, Xiaofeng Wang) было установлено, что АФК, применяемая вместе с фитогормонами, увеличивает всхожесть семян, а также сокращает время прорастания *H. scoparium* [30].

Корневая система запаздывала в росте. Вероятно, для успешного развития корневой системы у молодых растений необходима соответствующая дополнительная гормональная стимуляция. И в естественных условиях у копечников существуют особенности в онтогенетическом развитии. По результатам проведенных исследований (С. А. Сенатор, 2017 г.) определены онтогенетические (возрастные) спектры ценопопуляций плейстоценового реликта *H. gmelinii* в европейской части ареала. Семь ценопопуляций Средней Волги и Приуралья отличаются довольно высокой плотностью. Онтогенетический спектр в большинстве случаев неполночленный, что связано с быстрым отмиранием растений после завершения генератив-

ного состояния, а также тем, что *H. gmelinii* произрастает в сообществах с развитой дерниной, препятствующей прорастанию семян и развитию молодых растений. В случае когда вид произрастает на меловых отложениях, в сообществах с разреженным травостоем, семена часто смываются осадками или сдуваются ветром с поверхности субстрата, а образовавшиеся проростки испытывают значительный недостаток влаги и элиминируются. Существенное влияние на молодые растения здесь оказывают эрозионные процессы на склонах [31], [32, с. 47].

Многочисленные новые вегетативные почки появились на поверхности каллуса. Каллус формировался в большинстве случаев плотным по структуре, но слабо окрашенным. При последующих делениях рост каллуса и образование почек не замедлялись, то есть развитие происходило не волнообразно, что указывает на оптимально подобранную концентрацию гормонов. Способность к ускоренной дифференциации клеток каллуса возможно использовать на этапах увеличения общей массы культуры.

Для стимуляции ростовых процессов при успешном вегетативном делении провели пересадку растений и частей кустов на свежую питательную среду еще через месяц. При частой смене среды растения *H. gmelinii* не показывают увядания листьев, что было отмечено нами в большей степени на материале из Башкирии, где при сохранении оптимальных условий наблюдали увядание развитых листьев.

Наиболее активный рост показали проростки из Татарстана. При делении отдельных молодых кустов активное образование каллусной ткани наблюдали у представите-

лей *H. gmelinii* из Татарстана, тогда как растения, произрастающие в Башкирии, показывают спад ростовой активности.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Предложенный нами состав среды можно считать подходящим для проращивания семян *H. gmelinii*, а также для формирования культуры тканей. Наиболее перспективными для формирования культуры *H. gmelinii* можно считать семенной материал растений, произрастающих в Татарстане. Растения демонстрируют хорошие рост и ветвление. Таким образом, нами была получена культура,

которая успешно культивируется в условиях *in vitro*. Данную культуру планируется использовать для сравнительного изучения биологически активных веществ, входящих в состав разнообразных экстрактов *H. gmelinii*, а также для формирования коллекции открытого грунта на территории Ботанического сада УрО РАН.

Благодарности (Acknowledgements)

Авторский коллектив выражает благодарность за предоставленный семенной материал доктору биологических наук М. С. Князеву и кандидату биологических наук Е. Г. Филиппову.

Библиографический список

1. The Plant List: A working list of all plant species [Электронный ресурс]. URL: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Leguminosae/Hedysarum> (дата обращения: 13.04.2020).
2. GBIF – The Global Biodiversity Facility [Электронный ресурс]. URL: <https://www.gbif.org/species/2960767> (дата обращения: 13.04.2020).
3. Ильина В. Н. О распространении копеечников Разумовского и Гмелина в бассейне Средней Волги // Теоретические проблемы экологии и эволюции. Теория ареалов: виды, сообщества, экосистемы (V Любичевские чтения): сборник трудов конференции. Тольятти, 2010. С. 58–62.
4. Жмудь Е. В. Активность ингибиторов трипсина у представителей родов *Hedysarum* L. и *Astragalus* L. (Fabaceae Lindl.) в Южной Сибири: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, 03.02.01. Новосибирск, 2016. 406 с.
5. Glyzina G. S., Komissarenko N. F. The Flavonoids of *Hedysarum gmelinii* // Chemistry of Natural Compounds. 1967. Vol. 3. No. 2. Pp. 138–139. DOI: 10.1007/BF00567183.
6. Vysochina G. I., Kukushkina T. A., Karnaukhova N. A., Selyutina I. Yu. Flavonoids of Wild and Introduced Plants of Several Species of the *Hedysarum* L. Genus // Chemistry for Sustainable Development. 2011. No. 19. Pp. 327–333.
7. Dong Y., Tang D., Zhang N., Li Y., Zhang C., Li L., Li M. Phytochemicals and biological studies of plants in genus *Hedysarum* [Электронный ресурс] // Chemistry Central Journal. 2013. Vol. 7. No. 124. Pp. 1–13. DOI: 10.1186/1752-153X-7-124. URL: <http://journal.chemistrycentral.com/content/7/1/124> (дата обращения: 17.04.2020).
8. Liu Y., Zhang J., Wen R., Tu G.-Z., Chen H.-B., Liang H., Zhao Y.-Y. Anti-inflammatory and antiproliferative prenylated chalcones from *Hedysarum gmelinii* // Journal of Asian Natural Products Research. 2018. No. 20 (11). Pp. 1009–1018. DOI: 10.1080/10286020.2018.1450390.
9. Беленовская Л. М., Лесиовская Е. Е. Растительные ресурсы России: дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 3. Семейства Fabaceae–Ariaceae. Санкт-Петербург; Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2010. 601 с.
10. Соколов П. Д. Растительные ресурсы СССР: цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Hydrangeaceae – Haloragaceae. Ленинград: Наука, 1987. 326 с.
11. Hu F., Li X., Zhao L., Feng S., Wang C. Antidiabetic properties of purified polysaccharide from *Hedysarum polybotrys* // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2010. No. 88 (1). Pp. 64–72. DOI: 10.1139/Y09-098.
12. Krakauer J., Long Y., Kolbert A., Thanedar S., Southard J. Presence of L-Canavanine in *Hedysarum alpinum* Seeds and Its Potential Role in the Death of Chris McCandless // Wilderness and Environmental Medicine. 2015. No. 26 (1). Pp. 36–42. DOI: 10.1016/j.wem.2014.08.014.
13. Sazanova A. L., Kuznetsova I. G., Safronova V. I., Belimov A. A., Popova Zh. P., Tikhomirova N. Yu., Osledkin Yu. S. Study of the genetic diversity of microsymbionts isolated from *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*, growing in the Baikal lake region // Agricultural biology. 2017. Vol. 52. No. 5. Pp. 1004–1011. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.5.1004eng.
14. Yan H., Ji Z. J., Jiao Y. S., Wang E. T., Chen W. F., Guo B. L., Chen W. X. Genetic diversity and distribution of rhizobia associated with the medicinal legumes *Astragalus* spp. and *Hedysarum polybotrys* in agricultural soils // Systematic and Applied Microbiology. 2016. Vol. 39. Iss. 2. Pp. 141–149. DOI: 10.1016/j.syapm.2016.01.004.
15. Попова И. А., Плаксина Т. И., Куркин В. А., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В. Рациональное использование видов рода *Hedysarum* L., произрастающих в Самарской области // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т. 14. № 1-9. С. 2279–2281.
16. Liu Y., Yanga Y., Liua Y., Wanga W., Zhaoa Y., Chend H., Lianga H., Zhanga Q. Chemotaxonomy studies on the genus *Hedysarum* // Biochemical Systematics and Ecology. 2019. Vol. 86. No. 103902. Pp. 1–4. DOI: 10.1016/j.bse.2019.05.010.
17. Duan L., Wen J., Yang X., Liu P.-L., Arslan E., Ertugrul 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. Pp. 49–64. DOI: 10.12705/64.1.26.
18. Zvyagina N. S., Dorogina O. V., Catalan P. Genetic relatedness and taxonomy in closely related species of *Hedysarum* (Fabaceae) // Biochemical Systematics and Ecology. 2016. No. 69. Pp. 176–187. DOI: 10.1016/j.bse.2016.10.001.

19. Sa R., Su D., Debreczy Z. Taxonomic notes on the *Hedysarum gmelinii* complex (Fabaceae) // *Annales Botanici Fennici*. 2010. No. 47 (1). Pp. 51–58. DOI: 10.5735/085.047.0106.
20. Особо охраняемые природные территории России [Электронный ресурс]. URL: <http://oopt.aari.ru/rbdata/1105/bio/44968> (дата обращения: 13.04.2020).
21. Плантариум: определитель растений онлайн [Электронный ресурс] URL: <https://www.plantarium.ru/page/view/item/18170.html> (дата обращения: 13.04.2020).
22. Письмаркина Е. В., Силаева Т. Б. Флористические материалы для ведения Красной книги Ульяновской области за 2015 год // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2016. № 1. С. 87–91.
23. Абрамова Л. М., Мустафина А. Н., Каримова О. А. Онтогенетическая структура и состояние ценопопуляций реликтового вида *Hedysarum gmelinii* Ledeb. в Предуралье Республики Башкортостан // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология*. 2019. Т. 19. № 3. С. 350–356. DOI: 10.18500/1816-9775-2019-19-3-350-356.
24. Ямалов С. М., Лебедева М. В., Голованов Я. М., Петрова М. В. Редкие и нуждающиеся в охране виды растений каменистых степей Южного и Среднего Урала // *Самарский научный вестник*. 2019. Т. 8. № 4 (29). С. 107–115. DOI: 10.24411/2309-4370-2019-14119.
25. Карнаухова Н. А., Сыева С. Я. Биолого-морфологические характеристики *Hedysarum gmelinii* Lebed. (Fabaceae) в Горном Алтае // *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. 2017. № 12 (158). С. 86–89.
26. Amato G., Giambalvo D., Frenda A. S., Mazza F., Ruisi P., Saia S., Di Miceli G. Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) as Potential Feedstock for Biofuel and Protein // *BioEnergy Research*. 2016. Vol. 9. Pp. 711–719. DOI: 10.1007/s12155-016-9715-5.
27. Terrill T. H., Douglas G. B., Foote A. G., Purchas R. W., Wilson G. F., Barry T. N. Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture // *Journal of Agricultural Science*. 1992. No. 119. Pp. 265–273. DOI: 10.1017/S0021859600014192.
28. Niezena J. H., Charleston W. A. G., Robertson H. A., Shelton D., Waghorna G. C., Green R. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes // *Veterinary Parasitology*. 2002. No. 105 (3). Pp. 229–245. DOI: 10.1016/S0304-4017(02)00014-6.
29. Molan A.-L., Rebecca A., Bbookes I. M., McNabb W. C. Effects of Sulla Condensed Tannins on the Degradation of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) and on the Viability of Three Sheep Gastrointestinal Nematodes In vitro // *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2004. No. 3 (3). Pp. 165–174. URL: <http://medwelljournals.com/abstract/?doi=javaa.2004.165.174>.
30. Su L., Lan Q., Pritchard H. W., Xue H., Wang X. Reactive oxygen species induced by cold stratification promote germination of *Hedysarum scoparium* seeds // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2016. Vol. 109. Pp. 406–415. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.10.025.
31. Senator S. A. Flora Diversity of Physical-Geographical Regions and a Scheme of Floristic Zoning of Middle Povolzh'e // *Povolzhskiy Journal of Ecology*. 2016. No. 1. Pp. 94–105. DOI: 10.18500/1684-7318-2016-1-94-105.
32. Ильина В. Н., Абрамова Л. М., Мустафина А. Н. Структура и состояние ценопопуляций редкого вида *Hedysarum gmelinii* Ledeb. (Fabaceae) в различных частях ареала // *Самарский научный вестник*. 2020. Т. 9. № 1 (30). С. 42–49. DOI: 10.24411/2309-4370-2020-11106.

Об авторах:

Елена Степановна Аврамова¹, лаборант-исследователь лаборатории популяционной биологии древесных растений и динамики леса, ORCID 0000-0003-3341-4456, AuthorID 1078942; +7 999 565-18-84, moon.lena96@mail.ru

Ольга Евгеньевна Черепанова¹, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории популяционной биологии древесных растений и динамики леса, ORCID 0000-0001-7775-6488, AuthorID 736817; +7 922 145-98-79, botgarden.olga@gmail.com

¹ Ботанический сад УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Establishment of in vitro culture of *Hedysarum gmelinii* Ledeb.

E. S. Avramova¹✉, O. E. Cherepanova¹

¹ Botanical Garden of Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia

✉ E-mail: moon.lena96@mail.ru

Abstract. *Hedysarum gmelinii* is a perspective species for the introduction into the culture and further use in the agricultural industry and pharmacology. **The purpose** of this research is to find suitable medium for seed germination. At present, this species is under the threat of extinction in several subjects of the Russian Federation. That is why research of the optimal nutrient medium for the seeds of *H. gmelinii* is very relevant. **Materials and methods:** 100 pcs of mature seeds were selected from the populations of Tatarstan and Bashkortostan. The seed material had been stored at the 4 °C before it was used. The Murashige and Skoog (MS) medium was prepared under the protocol with adding of such plant hormones like 6-benzylaminopurine (BAP)

and Indole-3-acetic acid (IAA) in four types of concentrations. After that the sterilized seeds were planted. The germination was occurred at 20 °C and the daylight was 16 hours. **The results:** seeds started to grow up to 15th day of an experiment. Then the plants were transferred on the fresh medium. Young plants were formed after 13 days. Plants which seeds had been taken in Tatarstan showed the most active callus formation. Thus, **the originality** of this research is that the optimal medium for growing seeds of *Hedysarum gmelinii* in vitro was found. This medium ensures good viability and gives the opportunity to get the tissues culture for the further studies of the biologically active substances.

Keywords: 6-benzylaminopurine (BAP), Indole-3-acetic acid (IAA), Murashige and Skoog medium, seeds germination, *Hedysarum gmelinii* Ledeb., *Fabaceae*, establishment in vitro, callus, pharmacology, agricultural industry, threat under extinction.

For citation: Avramova E. S., Cherepanova O. E. Vvedenie v kul'turu in vitro *Hedysarum gmelinii* Ledeb. [Establishment of in vitro culture of *Hedysarum gmelinii* Ledeb.] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. No. 10 (201). Pp. 35–42. DOI: ... (In Russian.)

Paper submitted: 19.05.2020.

References

1. The Plant List: A working list of all plant species [e-resource]. URL: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Leguminosae/Hedysarum> (appeal date: 13.04.2020).
2. GBIF – The Global Biodiversity Facility [e-resource]. URL: <https://www.gbif.org/species/2960767> (appeal date: 13.04.2020).
3. Il'ina V. N. O rasprostraneni kopechnikov Razumovskogo i Gmelina v bassejne Sredney Volgi [About the distribution of *Hedysarum razumovianum* and *Hedysarum gmelinii* in the Middle Volga basin] // Teoreticheskie problem ekologii I evolyutsii. Teoriya arealov: vidy, soobshchestva, ekosistemy (V Liubishchevskie chteniia): sbornik trudov konferentsii. Tol'yatti, 2010. Pp. 58–62 (in Russian)
4. Zhmud' E.V. Aktivnost' ingibitorovtripsina u predstaviteley rodov *Hedysarum* L. i *Astragalus* L. (*Fabaceae* Lindl.) v Yuzhnoy Sibiri: dissertatsiya na soiskanie uchenoy stepeni doktora biologicheskikh nauk [Activity of trypsin inhibitors in representatives of the genera *Hedysarum* L. and *Astragalus* L. (*Fabaceae* Lindl.) in Southern Siberia: the dissertation for the degree of doctor of biological sciences]. Novosibirsk, 2016. 406 p. (In Russian.)
5. Glyzina G. S., Komissarenko N. F. The Flavonoids of *Hedysarum gmelinii* // Chemistry of Natural Compounds. 1967. Vol. 3. No. 2. Pp. 138–139. DOI: 10.1007/BF00567183.
6. Vysochina G. I., Kukushkina T. A., Karnaukhova N. A., Selyutina I. Yu. Flavonoids of Wild and Introduced Plants of Several Species of the *Hedysarum* L. Genus // Chemistry for Sustainable Development. 2011. No. 19. Pp. 327–333.
7. Dong Y., Tang D., Zhang N., Li Y., Zhang C., Li L., Li M. Phytochemicals and biological studies of plants in genus *Hedysarum* [e-resource] // Chemistry Central Journal. 2013. Vol. 7. No. 124. Pp. 1–13. DOI: 10.1186/1752-153X-7-124. URL: <http://journal.chemistrycentral.com/content/7/1/124> (appeal date: 17.04.2020).
8. Liu Y., Zhang J., Wen R., Tu G.-Z., Chen H.-B., Liang H., Zhao Y.-Y. Anti-inflammatory and antiproliferative prenylated chalcones from *Hedysarum gmelinii* // Journal of Asian Natural Products Research. 2018. No. 20 (11). Pp. 1009–1018. DOI: 10.1080/10286020.2018.1450390.
9. Belenovskaya L. M., Lesiovskaya E. E. Rastitel'nye resursy Rossii: dikorastushchie tsvetkovye rasteniya, ikh komponentnyy sostav i biologicheskaya aktivnost'. Tom. 3. Semeystva *Fabaceae*-*Apiaceae* [Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their component composition and biological activity. Vol. 3. Families *Fabaceae*-*Apiaceae*]. Saint Petersburg ; Moscow : Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2010. 601 p. (In Russian.)
10. Sokolov P. D. Rastitel'nye resursy SSSR: Tsvetkovye rasteniya, ikh khimicheskiiy sostav, ispol'zovanie. Semeystva *Hydrangeaceae* – *Haloragaceae* [Plant resources of the USSR: Flowering plants, their chemical composition, use. Families *Hydrangeaceae* – *Haloragaceae*]. Leningrad : Nauka, 1987. 326 p. (In Russian.)
11. Hu F., Li X., Zhao L., Feng S., Wang C. Antidiabetic properties of purified polysaccharide from *Hedysarum polybotrys* // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2010. No. 88 (1). Pp. 64–72. DOI: 10.1139/Y09-098.
12. Krakauer J., Long Y., Kolbert A., Thanedar S., Southard J. Presence of L-Canavanine in *Hedysarum alpinum* Seeds and Its Potential Role in the Death of Chris McCandless // Wilderness and Environmental Medicine. 2015. No. 26 (1). Pp. 36–42. DOI: 10.1016/j.wem.2014.08.014.
13. Sazanova A. L., Kuznetsova I. G., Safronova V. I., Belimov A. A., Popova Zh. P., Tikhomirova N. Yu., Osledkin Yu. S. Study of the genetic diversity of microsymbionts isolated from *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*, growing in the Baikal lake region // Agricultural biology. 2017. Vol. 52. No. 5. Pp. 1004–1011. DOI: 10.15389/agrobiol.2017.5.1004eng.
14. Yan H., Ji Z. J., Jiao Y. S., Wang E. T., Chen W. F., Guo B. L., Chen W. X. Genetic diversity and distribution of rhizobia associated with the medicinal legumes *Astragalus* spp. and *Hedysarum polybotrys* in agricultural soils // Systematic and Applied Microbiology. 2016. Vol. 39. Iss. 2. Pp. 141–149. DOI: 10.1016/j.syapm.2016.01.004.
15. Popova I. A., Plaksina T. I., Kurkin V. A., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V. Ratsional'noe ispol'zovanie vidov roda *Hedysarum* L., proizrastayushchikh v Samarskoy oblasti [Rational use of *Hedysarum* L., growing in Samara region] // Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. 2012. Vol. 14. No. 1–9. Pp. 2279–2281. (In Russian.)
16. Liu Y., Yanga Y., Liua Y., Wanga W., Zhaoa Y., Chend H., Lianga H., Zhanga Q. Chemotaxonomy studies on the genus *Hedysarum* // Biochemical Systematics and Ecology. 2019. Vol. 86. No. 103902. Pp. 1–4. DOI: 10.1016/j.bse.2019.05.010.

17. 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. Pp. 49–64. DOI: 10.12705/641.26.
18. Zvyagina N. S., Dorogina O. V., Catalan P. Genetic relatedness and taxonomy in closely related species of *Hedysarum* (Fabaceae) // *Biochemical Systematics and Ecology*. 2016. No. 69. Pp. 176–187. DOI: 10.1016/j.bse.2016.10.001.
19. Sa R., Su D., Debreczy Z. Taxonomic notes on the *Hedysarum gmelinii* complex (Fabaceae) // *Annales Botanici Fennici*. 2010. No. 47 (1). Pp. 51–58. DOI: 10.5735/085.047.0106.
20. Osobo okhranyaemye prirodnye territorii Rossii [Specially Protected Natural Territories of Russia] [e-resource]. URL: <http://oopt.aari.ru/rbdata/1105/bio/44968> (appeal date: 13.04.2020). (In Russian.)
21. Plantarium: opredelitel' rasteniy onlayn [Plantarium: online plant guide] [e-resource]. URL: <https://www.plantarium.ru/page/view/item/18170.html> (appeal date: 13.04.2020). (In Russian.)
22. Pis'markina E. V., Silaeva T. B. Floristicheskie materialy dlya vedeniya Krasnoy knigi Ul'yanovskoy oblasti za 2015 god [Floral materials for the Red Data Book of the Ulyanovsk region over 2015] // *Proceedings of the RAS Ufa Scientific Centre*. 2016. No. 1. Pp. 87–91. (In Russian.)
23. Abramova L. M., Mustafina A. N., Karimova O. A. Ontogeneticheskaya struktura i sostoyanie tsenopopulyatsiy relikto-vogo vida *Hedysarum gmelinii* Ledeb. v Predural'e Respubliki Bashkortostan [Ontogenetic structure and population status of the relict species of *Hedysarum gmelinii* Ledeb. in the Cis-Urals republic of Bashkortostan] // *Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology*. 2019. Vol. 19. No. 3. Pp. 350–356. DOI: 10.18500/1816-9775-2019-19-3-350-356. (In Russian.)
24. Yamalov S. M., Lebedeva M. V., Golovanov Ya. M., Petrova M. V. Redkie i nuzhdayushchiesya v okhrane vidy rasteniy kamenistyykh stepey Yuzhnogo i Srednego Urala [Rare plant species in need of protection in the rocky steppes of the Southern and Middle Urals] // *Samara Journal of Science*. 2019. Vol. 8. No. 4 (29). Pp. 107–115. DOI: 10.24411/2309-4370-2019-14119 2019. (In Russian.)
25. Karnaukhova N. A., Syeva S. Ya. Biologo-morfologicheskie kharakteristiki *Hedysarum gmelinii* Ledeb. (Fabaceae) v Gornom Altae [Biological and morphological characteristics of *Hedysarum gmelinii* Ledeb. (Fabaceae) in the Altai mountains] // *Bulletin of Altai State Agricultural University*. 2017. No. 12 (158). Pp. 86–89. (In Russian.)
26. Amato G., Giambalvo D., Frenda A. S., Mazza F., Ruisi P., Saia S., Di Miceli G. Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) as Potential Feedstock for Biofuel and Protein // *BioEnergy Research*. 2016. Vol. 9. Pp. 711–719. DOI: 10.1007/s12155-016-9715-5.
27. Terrill T. H., Douglas G. B., Foote A. G., Purchas R. W., Wilson G. F., Barry T. N. Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture // *Journal of Agricultural Science*. 1992. No. 119. Pp. 265–273. DOI: 10.1017/S0021859600014192.
28. Niezena J. H., Charleston W. A. G., Robertson H. A., Shelton D., Waghorna G. C., Green R. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes // *Veterinary Parasitology*. 2002. No. 105 (3). Pp. 229–245. DOI: 10.1016/S0304-4017(02)00014-6.
29. Molan A.-L., Rebecca A., Bbookes I. M., McNabb W. C. Effects of Sulla Condensed Tannins on the Degradation of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) and on the Viability of Three Sheep Gastrointestinal Nematodes In vitro // *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2004. No. 3 (3). Pp. 165–174. URL: <http://medwelljournals.com/abstract/?doi=javaa.2004.165.174>.
30. Su L., Lan Q., Pritchard H. W., Xue H., Wang X. Reactive oxygen species induced by cold stratification promote germination of *Hedysarum scoparium* seeds // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2016. Vol. 109. Pp. 406–415. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.10.025.
31. Senator S. A. Flora Diversity of Physical-Geographical Regions and a Scheme of Floristic Zoning of Middle Povolzh'e // *Povolzhskiy Journal of Ecology*. 2016. No. 1. Pp. 94–105. DOI: 10.18500/1684-7318-2016-1-94-105.
32. Il'ina V. N., Abramova L. M., Mustafina A. N. Struktura i sostoyanie tsenopopulyatsiy redkogo vida *Hedysarum gmelinii* Ledeb. (Fabaceae) v razlichnykh chastyakh areala [The structure and state of coenopopulations of the rare species *Hedysarum gmelinii* Ledeb. (Fabaceae) in different parts of the range] // *Samara Journal of Science*. 2020. Vol. 9. No 1 (30). Pp. 42–49. DOI: 10.24411/2309-4370-2020-11106. (In Russian.)

Authors' information:

Elena S. Avramova¹, research assistant of the laboratory of population biology of woody plants and forest dynamics, ORCID 0000-0003-3341-4456, AuthorID 1078942; +7 999 565-18-84, moon.lena96@mail.ru

Olga E. Cherepanova¹, candidate of biological sciences, researcher of the laboratory of population biology of woody plants and forest dynamics, ORCID 0000-0001-7775-6488, AuthorID 736817; +7 922 145-98-79, botgarden.olga@gmail.com

¹ Botanical Garden of Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia