

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035296**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.26

(51) Int. Cl. *A01H 4/00* (2006.01)

(21) Номер заявки
201892356

(22) Дата подачи заявки
2018.11.15

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ IN VITRO КОРНЕЙ PHLOJODICARPUS SIBIRICUS (STEPH.) K.-POL.**

(31) **2017139949**

**УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.К.
АММОСОВА" (RU)**

(32) **2017.11.17**(33) **RU**(43) **2019.05.31**

(72) Изобретатель:

**Ханды Мария Терентьевна,
Алексеева Саргылана Ильинична
(RU)**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "СЕВЕРО-
ВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ**

(74) Представитель:

Винокуров А.А. (RU)

(56) **RU-C1-2605912
RU-C1-2360964
RU-C1-2111653**

(57) Изобретение относится к биотехнологии, в частности культивированию корней растения вздутоплодника сибирского, и может быть использовано для получения ценных биологически активных соединений - пиранокумаринов. Способ получения *in vitro* корней *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol. включает стерилизацию семян вздутоплодника перекисью водорода в течение 5 мин, ополаскивание, трехкратное отмывание в течение 5 мин в дистиллированной воде, помещение стерильных семян на твердую питательную среду без гормонов, следующего состава: NH_4NO_3 - $1650,000 \pm 2,0000$ мг; KNO_3 - $1900,000 \pm 2,0000$ мг; $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ - $370,000 \pm 1,0000$ мг; KH_2PO_4 - $170,000 \pm 0,1000$ мг; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - $440,000 \pm 0,5000$ мг; H_3BO_3 - $6,200 \pm 0,0100$ мг; $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ - $22,300 \pm 0,0200$ мг; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - $8,600 \pm 0,0100$ мг; KI - $0,830 \pm 0,0010$ мг; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - $0,250 \pm 0,0010$ мг; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ - $0,025 \pm 0,0001$ мг; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - $0,025 \pm 0,0001$ мг; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - $2,785 \pm 0,001$ мг; Na-ЭДТА - $3,725 \pm 0,001$ мг; тиамин - $0,100 \pm 0,0010$ мг; пиридоксин - $0,100 \pm 0,0010$ мг; сахароза - $30000,000 \pm 100,0000$ мг; вода - 1000 мл; агар - 000 мг. Далее, полученные *in vitro* растения помещаются в чашках Петри в аналогичную питательную среду с добавлением ауксина, при этом культивирование растений проводят в темноте, при $26 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности помещения $70 \pm 5\%$, цикл субкультивирования составляет 4 недели. При пересеве используют 1/3 адвентивных корней и полученные адвентивные корни выращивают в течение более тридцати циклов. Получаемые из семян через растения *in vitro* адвентивные корни вздутоплодника сибирского обладают стабильными ростовыми параметрами и морфологическими характеристиками.

B1**035296****035296 B1**

Изобретение относится к биотехнологии, в частности, культивированию корней растения вздутоплодника сибирского, и может быть использовано для получения ценных биологически активных соединений - пиранокумаринов, которые широко используются в фармацевтической промышленности.

Вздутоплодник сибирский зарегистрирован в Государственном Реестре лекарственных средств РФ в качестве лекарственного растительного сырья. Его корневища и корни обладают вазодилатирующими (сосудорасширяющими), гипотензивными, адренолитическими и спазмолитическими свойствами. Используется при производстве препаратов спазмолитического действия "Димидин" и "Фловерин", а также комплексного препарата сердечно-сосудистого действия "Сафинор".

При этом известно, что вздутоплодник сибирский занесен в Красную книгу Якутии. Заготовка растения в природе может привести к уничтожению природных популяций.

Кроме того, корни растения вздутоплодника накапливают тяжелые металлы: цинк, никель, селен и молибден, соответственно использование растений, произрастающих на неконтролируемых участках, несет большой риск для здоровья человека (см. Алексеева С.И. Перспективы получения адвентивных корней вздутоплодника сибирского//Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: Годичное собрание ОФР, науч. конф. и школа для мол. уч., 18-24 сент. 2017 г., Судак: сб. мат. докл./Отв. ред. Вл.В. Кузнецов - М: Изд-во АНО "Центр содействия научной, образовательной и просветительской деятельности "Соцветие", 2017, с. 393).

Вздутоплодник сибирский растет по склонам сопок, в танацетовых степях и среди разнотравья лесостепей, в моховолишайниковой тундре и в сухих руслах рек (см. Макаров А.А. Лекарственные растения Якутии: 4-е изд./А.А.Макаров. - Якутск: Бичик, 2001, с. 128). Ареал произрастания вздутоплодника сибирского делят на три фрагмента: Селенгинский, Даурский и Забайкальский. Также существуют отдельные очаги произрастания растения в Красноярском крае, Читинской и Иркутской области, в Якутии и на западе Амурской области. Основные запасы лекарственного сырья вздутоплодника сибирского находятся в Читинской области.

Корни и корневища вздутоплодника сибирского содержат кумарины и пиранокумарины (винсадин и дигидросамидин, изофлоридикарпин, скополетин, умбеллиферон), эфирные масла, гликозиды (мениантин и мелиатин), флавоновые гликозиды (рутин, гиперозид), уксусная и изовалериановая кислота, крахмал. Эфирное масло вздутоплодника сибирского в качестве основных компонентов содержит: лимонен, у-терпинен, терпинолен, спатуленол, гермакрен D, вирицифлорол, β -барбатен, 5-кадинен и β -акорадиен. Растение концентрирует железо, цинк, никель, селен и молибден (см. Макаров А.А. Лекарственные растения Якутии: 4-е изд./А.А.Макаров. - Якутск: Бичик, 2001, с. 128).

Культивирование в условиях *in vitro* адвентивных корней растений может стать одним из биотехнологических приемов получения больших масс экологически чистого лекарственного сырья, особенно в тех случаях, когда физиологически активные вещества, представляющие интерес для медицинской промышленности, синтезируются в корневой системе растения.

Задачей настоящего изобретения является получение адвентивных корней вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.) в условиях *in vitro* с характерными морфологическими параметрами и отсутствием сезонной зависимости их получения.

Поставленная задача решена тем, что способ получения *in vitro* корней *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol. включает стерилизацию семян вздутоплодника перекисью водорода в течение 5 мин, ополаскивание, трехкратное отмывание в течение 5 мин в дистиллированной воде, помещение стерильных семян на твердую питательную среду без гормонов, следующего состава: NH_4NO_3 - $1650,000 \pm 2,0000$ мг; KNO_3 - $1900,000 \pm 2,0000$ мг; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - $370,000 \pm 1,0000$ мг; KH_2PO_4 - $170,000 \pm 0,1000$ мг; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - $440,000 \pm 0,5000$ мг; H_3BO_3 - $6,200 \pm 0,0100$ мг; $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ - $22,300 \pm 0,0200$ мг; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - $8,600 \pm 0,0100$ мг; KI - $0,830 \pm 0,0010$ мг; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - $0,250 \pm 0,0010$ мг; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ - $0,025 \pm 0,0001$ мг; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - $0,025 \pm 0,0001$ мг; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - $2,785 \pm 0,001$ мг; Na-ЭДТА - $3,725 \pm 0,001$ мг; тиамин - $0,100 \pm 0,0010$ мг; пиридоксин - $0,100 \pm 0,0010$ мг; сахароза - $30000,000 \pm 100,0000$ мг; вода - 1000 мл; агар - 5000 мг. Далее полученные *in vitro* растения помещаются в чашках Петри в аналогичную питательную среду с добавлением ауксина, при этом культивирование растений проводят в темноте, при $26 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности помещения $70 \pm 5\%$, цикл субкультивирования составляет 4 недели. При пересеве используют 1/3 адвентивных корней и полученные адвентивные корни выращивают в течение более тридцати циклов.

Анализ признаков заявленного решения свидетельствует о соответствии заявленного решения критерию "новизна", адвентивные корни вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.) впервые получены в условиях *in vitro*.

Совокупность существенных признаков обеспечивает решение заявленной технической задачи, а именно стабилизацию ростовых параметров и морфологических характеристик адвентивных корней.

Предлагаемое решение состоит в том, что за основу взяты растения *in vitro* вздутоплодника сибирского, которые помещают в агаризованную питательную среду соответствующего гормонального состава в качестве экспланта. В результате были получены адвентивные корни.

Причем для получения растения *in vitro* в качестве эксплантов использовали зрелые семена вздуто-

плодника. Семена стерилизовали перекисью водорода (H_2O_2) в течение 5 мин. После стерилизации материал ополаскивали, а затем трехкратно отмывали в течение 5 мин в дистиллированной воде. Стерильные семена помещали на твердую питательную среду без гормонов.

Для экспериментов использовали твердую питательную среду следующего состава:

NH_4NO_3	1650,000 \pm 2,0000 мг
KNO_3	1900,000 \pm 2,0000 мг
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370,000 \pm 1,0000 мг
KH_2PO_4	170,000 \pm 0,1000 мг
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440,000 \pm 0,5000 мг
H_3BO_3	6,200 \pm 0,0100 мг
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,300 \pm 0,0200 мг
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,600 \pm 0,0100 мг
KI	0,830 \pm 0,0010 мг
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,250 \pm 0,0010 мг
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025 \pm 0,0001 мг
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025 \pm 0,0001 мг
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2,785 \pm 0,001 мг
Na-ЭДТА	3,725 \pm 0,001 мг
Тиамин	0,100 \pm 0,0010 мг
Пиридоксин	0,100 \pm 0,0010 мг
Сахароза	30000,000 \pm 100,0000 мг
Вода	1000 мл
Агар	5000 мг

Полученную в результате растение *in vitro* поместили в аналогичную питательную среду с добавлением любого вида ауксина.

Культивирование проводили в темноте, при $26 \pm 1^\circ C$, влажности помещения $70 \pm 5\%$, в чашках Петри с диаметром 90 мм. При этом цикл субкультивирования составлял 4 недели. При пересеве использовали 1/3 адвентивных корней.

Полученные адвентивные корни выращивали в течение более тридцати циклов. В процессе культивирования определяли морфологические характеристики.

Полученные адвентивные корни характеризуются следующими признаками.

Культуральные признаки: корни имеют одинаковые ответвления, темно-оранжевой окраски.

Индекс роста (кратность прироста биомассы за одно субкультивирование) определяют по сырому и сухому весу биомассы. Для определения веса сырой биомассы корней отделяют от среды культивирования на бумажных фильтрах на вакуумном насосе, промывают водой и взвешивают. Сухую биомассу корней получают после лиофильной сушки.

При анализе представленных кривых роста следует отметить замедление роста на 25 сутки культивирования, что позволяет использовать 4-недельный цикл выращивания. Ростовые параметры (кроме индекса роста) рассчитывали по сухому весу биомассы. Результаты представлены в таблице и свидетельствуют о наличии стабильных ростовых характеристик.

Таким образом, выявлен способ получения адвентивных корней вздутоплодника сибирского (*Phlajodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.) из семян через растения *in vitro*, обладающие стабильными ростовыми параметрами и морфологическими характеристиками, причем, получение соединений может быть выполнено вне сезонной зависимости производства.

Ростовые параметры адвентивных корней вздутоплодника сибирского

Показатели	Значения
Индексы роста по:	
весу сухой биомассы	5 \pm 0,5
весу сырой биомассы	5 \pm 0,5
Удельная скорость роста, сут ⁻¹	0,12 \pm 0,05
Время удвоения, сут.	12 \pm 2

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения *in vitro* корней *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol., включающий стерилизацию семян вздутоплодника перекисью водорода в течение 5 мин, ополаскивание, трехкратное отмывание в течение 5 мин в дистиллированной воде, помещение стерильных семян на твердую питательную среду без гормонов, следующего состава: NH_4NO_3 - $1650,000 \pm 2,0000$ мг, KNO_3 - $1900,000 \pm 2,0000$ мг, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - $370,000 \pm 1,0000$ мг, KH_2PO_4 - $170,000 \pm 0,1000$ мг, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - $440,000 \pm 0,5000$ мг, H_3BO_3 - $6,200 \pm 0,0100$ мг, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ - $22,300 \pm 0,0200$ мг, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - $8,600 \pm 0,0100$ мг, KI - $0,830 \pm 0,0010$ мг, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - $0,250 \pm 0,0010$ мг, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ - $0,025 \pm 0,0001$ мг, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - $0,025 \pm 0,0001$ мг, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - $2,785 \pm 0,001$ мг, Na-ЭДТА - $3,725 \pm 0,001$ мг, тиамин - $0,100 \pm 0,0010$ мг, пиридоксин - $0,100 \pm 0,0010$ мг, сахараза - $30000,000 \pm 100,0000$ мг, вода - 1000 мл, агар - 5000 мг,

дальнейшее помещение растений, полученных *in vitro*, в аналогичную питательную среду с добавлением ауксина, при этом культивирование растений проводят в темноте, при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности помещения $70 \pm 5\%$, цикл субкультивирования составляет 4 недели, при пересеве используют 1/3 адвентивных корней, полученные адвентивные корни выращивают в течение более тридцати циклов.

