

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092144** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.04.30

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

(22) Дата подачи заявки
2020.10.08

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ARTEMISIA VULGARIS L.

(31) **2019131750**

(72) Изобретатель:

(32) **2019.10.09**

Антонова Елена Евгеньевна,

(33) **RU**

Кучарова Елена Валериевна,

(71) Заявитель:

Охлопкова Жанна Михайловна (RU)

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "СЕВЕРО-
ВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.К.
АММОСОВА" (RU)**

(74) Представитель:

Винокуров А.А. (RU)

(57) Изобретение относится к области биотехнологии растений и может быть использовано для пищевой и фармацевтической промышленности как источник сырья для пищевой добавки и биологически активных веществ. Изобретение представляет собой способ получения каллусной культуры клеток *Artemisia vulgaris* L. - дикорастущего растения полыни обыкновенной, в условиях *in vitro*, включающий стерилизацию семян полыни растворами перекиси водорода (3% раствор) в течение 10 мин, этилового спирта (70% раствор) в течение 1 мин, трехкратное ополаскивание в стерильной дистиллированной воде в течение 5 мин, помещение стерильных семян на твердую питательную среду без гормонов, следующего состава, мг: NH_4NO_3 - 33000, KNO_3 - 38000, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 8800, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 7400, KH_2PO_4 - 3400, KI - 166, H_3BO_3 - 1240, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 4460, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1720, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 50, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 5, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5560, Na-ЭДТА - 7460, мезоинозит - 100, тиамин - 100, пиридоксин - 100, никотиновая кислота - 100, сахароза - 2500, вода - 1000 мл, агар - 7000, дальнейшее помещение листовых эксплантов, полученных из проростков, в питательную среду следующего состава, мг: NH_4NO_3 - 33000, KNO_3 - 38000, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 8800, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 7400, KH_2PO_4 - 3400, KI - 166, H_3BO_3 - 1240, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 4460, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1720, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 50, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 5, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5560, Na-ЭДТА - 7460, мезоинозит - 100, гидролизат казеина - 500, тиамин - 100, пиридоксин - 100, никотиновая кислота - 100, сахароза - 30000, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота - 1, 6-бензиламинопурин - 1, нафтилуксусная кислота - 1, вода - 1000 мл, агар - 12000; при этом культивирование растений проводят в темноте, при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности помещения $70 \pm 5\%$, цикл субкультивирования составляет 3 недели. Изобретение позволяет получить каллусную культуру полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris* L.) в условиях *in vitro*.

A2

202092144

202092144

A2

Способ получения каллусной культуры клеток *Artemisia vulgaris* L.

Изобретение относится к области биотехнологии растений и может быть использовано для пищевой и фармацевтической промышленности как источник сырья для пищевой добавки и биологически активных веществ.

Полынь обыкновенная, чернобыльник, *Artemisia vulgaris* L., относится к семейству сложноцветных. Строение корневища крепкое, немного ветвистое. Стебли прямостоячие, красно-бурые, наверху разветвленные, до 1,0-1,5 м высотой. Листья сверху голые или слегка пушистые, темно-зеленые, снизу сероватые, паутинисто-войлочные, перисто-рассеченные на удлиненные зубчатые доли. Цветки очень мелкие, собраны в яйцевидные корзинки 2-4 мм шириной, составляющие широкое, несколько поникающее, метельчатое соцветие; обертка каждой корзинки покрыта густым войлочком; цветки красноватые, реже желтые. Цветет в июле-августе. Места произрастания пустыри, огороды, сорные места, возле жилья, реже луга и берега рек.

Используемые органы полыни обыкновенной: верхушки цветущих растений. Для заготовки сырья собирают листовые цветоносные верхушки в период цветения. Установлено, что в траве содержится эфирное масло (до 0,61%), аскорбиновая кислота (175 мг %), каротин, немного дубильных веществ. В состав эфирного масла входят туйон, цинеол, борнеол. Известно, что в условиях произрастания в Якутии листья полыни обыкновенной содержат на сырой вес до 130 мг% аскорбиновой кислоты и 11 мг% каротина, при этом в траве содержится 0,04-0,05% эфирного масла (см. Макаров А.А. Лекарственные растения Якутии и перспективы их освоения. - Новосибирск: Издательство СО РАН, 2002. - 264 с.). Масло характеризуется как жидкое, светло-желтое, со слабым запахом. Анализы образцов различного сбора на алкалоиды дали противоречивые показатели.

Растение широко применяется в народной медицине многих стран при различных заболеваниях женской половой сферы (аменорея, дисменорея), как обезболивающее и ускоряющее роды средство, а также в качестве успокаивающего, противосудорожного средства при эпилепсии, неврастении и других нервных заболеваниях. Помимо этого, отвар всего растения применяют при гастритах, как мочегонное; порошком из сухих веток засыпают раны. В китайской медицине листья применяют в качестве кровоостанавливающего, жаропонижающего, общеукрепляющего, а также антитоксического средства. Назначают при токсикозах, пиодермии, невралгиях. При бронхиальной астме назначают вдыхание дыма, получаемого от сжигания сухих стеблей и листьев. Наружно применяют ванны из отвара надземных частей растения при почечнокаменной болезни, при кожных заболеваниях. В якутской народной медицине отвар рекомендуют пить при головной боли, боли под лопаткой, при глистах, параличах и проказе. Известно, что трава входит в состав микстуры М.Н. Здренко (см. SU №115587, кл. А61К 35/78, опубл. 1958). Кроме того, растение употребляется в пищу: в дореволюционное время служило в иные периоды основным источником поддержания жизни.

Известны способы культивирования *Artemisia annua* L., например, по патенту CN №102487823 (кл. G01D 3/043, опубл 23.07.2008) молодые стебли растения дезинфицируют и поперечно режут на сегменты и культивируют в среде для укоренения. Далее пересаживают для укоренения в почву.

Ближайшим аналогом заявленного решения является разработка состава питательной среды для культивирования каллусной ткани *Artemisia annua* L. для ускорения роста каллусной ткани и высокого выхода биомассы (см. RU №2393217, кл. C12N 5/04, опубл. 27.06.2010), при этом, питательная среда содержит агаризованную среду с макро- и микросолями по Мурасиге и Скугу, фитогормоны, витамины, сахарозу, а в качестве гормона - бензиламинопурина (6-БАП).

При этом используется гормональный состав питательной среды, содержащий в качестве гормона роста только фитогормон 6-бензиламинопурина, что недостаточно для ускорения роста каллусной ткани и высокого выхода биомассы.

Задачей настоящего изобретения является получение каллусной культуры полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris* L.) для использования в качестве источника биомассы для пищевой добавки и для получения биологически активных веществ.

Для решения поставленной задачи способ получения каллусной культуры полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris* L.) включает стерилизацию семян интактных растений полыни раствором перекиси водорода (3 % раствор) в течение 10 мин и этилового спирта (70 % раствор) в течение 1 мин, ополаскивание, трехкратное отмывание в течение 5 мин в стерильной дистиллированной воде, помещение стерильных семян на твердую питательную среду без гормонов, следующего состава, мг: NH_4NO_3 – 33000, KNO_3 – 38000, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 8800, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 7400, KH_2PO_4 – 3400, KI – 166, H_3BO_3 – 1240, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 4460, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1720, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 50, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 5, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 5, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 5560, Na-ЭДТА – 7460, мезоинозит – 100, тиамин – 100, пиридоксин – 100, никотиновая кислота – 100, сахароза – 2500, вода – 1000 мл, агар – 7000, дальнейшее помещение листовых эксплантов растений, полученных в лабораторных условиях, в питательную среду следующего состава, мг: NH_4NO_3 – 33000, KNO_3 – 38000, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 8800, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 7400, KH_2PO_4 – 3400, KI – 166, H_3BO_3 – 1240, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 4460, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1720, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 50, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 5, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 5, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 5560, Na-ЭДТА – 7460, мезоинозит – 100, гидролизат казеина – 500, тиамин – 100, пиридоксин – 100, никотиновая кислота – 100, сахароза – 30000, 2,4 дихлорфеноксиуксусная кислота – 1, цитокинин (6-бензиламинопурина) – 1, нафтилуксусная кислота – 1, вода - 1000 мл, агар – 12000, при этом

культивирование растений проводят в темноте, при температуре $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, влажности помещения $70\pm 5\%$, цикл субкультивирования составляет 3 недели, при пересеве используют $\frac{1}{4}$ живых каллусных биомасс, полученные каллусные культуры сохраняют пересадкой каждые 21 суток.

Анализ признаков заявленного решения свидетельствует о соответствии заявленного решения критерию «новизна».

Совокупность существенных признаков обеспечивает решение заявленной технической задачи, а именно, получение каллусной культуры полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris* L.).

Предлагаемое решение состоит в том, что за основу взяты стерильные свежие проростки, культивируемые в контролируемых условиях климатической камеры из семян интактного растения, фитомасса которого собрана на территории Амгинского района (с. Болугур) Республики Саха (Якутия) в фенофазах «конец цветения, начало плодоношения».

При этом семена стерилизовали раствором 3% перекиси водорода в течение 10 минут, затем 70% спиртовым раствором в течение 1 мин. После стерилизации материал трехкратно ополаскивали стерильной дистиллированной водой. Стерильные семена помещали на твердую питательную среду без гормонов. Культивирование проростков проводили до третьего-пятого настоящих листьев в течение трех недель.

Питательная среда Мурасиге-Скуга для культивирования свежих проростков растения содержит компоненты в количественном соотношении, представленном в таблице 1.

Из полученного проростка получают листовые экспланты, которые помещали в питательную среду с дополнительным добавлением гидролизата казеина, 6-бензиламинопурина, нафтилуксусной кислоты. Наиболее интенсивное каллусообразование получили при концентрации фитогормонов 2,4-дихлорфеноксисуксусной кислоты в 1 мг/л, 6-бензиламинопурина - 1 мг/л, α -нафтилуксусной кислоты - 1 мг/л. После образования каллусной ткани

проводили его отделение и рассадку в культуральные сосуды (чашки Петри, конические колбы на 100 и 250 мл) со свежей питательной средой, того же состава.

Питательная среда Мурасиге-Скуга для получения каллусной ткани содержит компоненты в количественном соотношении, представленном в таблице 2.

Культивирование проводят в темноте, при $26\pm 1^\circ\text{C}$, влажности помещения $70\pm 5\%$, в чашках Петри с диаметром 90 мм. Цикл субкультивирования составляет 3 недели. При пересеве используют $\frac{1}{4}$ живой каллусной культуры. Полученные каллусные культуры пересаживали каждые 21 день, таким образом, сохраняя полученную ткань. В процессе культивирования определяют морфологические, цитологические характеристики, также отбирали для молекулярных исследований и химических анализов.

Технический результат - получение каллусной культуры полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris* L.).

Полученный каллус характеризуется следующими признаками.

Культуральные признаки: каллусные культуры плотные, оформленные, имеют светло-серую окраску. Для определения веса сырой биомассы каллусные культуры отделяют от среды культивирования на бумажные фильтры и взвешивают. При анализе представленных кривых роста следует отметить замедление роста на 18-ые сутки культивирования, что позволяет использовать 3 недельный цикл выращивания. Ростовые параметры рассчитывали по сырому весу биомассы. Результаты представлены в таблице 3 и свидетельствуют о наличии стабильных ростовых характеристик.

Таким образом, выявлен способ получения каллусных культур полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris* L.) из листовых эксплантов проростков, полученных в лабораторных условиях.

Таблица 1

Состав питательной среды Мурасиге-Скуга для культивирования проростков
к получению стерильных эксплантов, мг/л

Компоненты:	Содержание
NH_4NO_3	33000
KNO_3	38000
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8800
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	7400
KH_2PO_4	3400
KI	166
H_3BO_3	1240
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	4460
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1720
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	50
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	5
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	5
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5560
Na-ЭДТА	7460
Мезоинозит	100
Тиамин	100
Пиридоксин	100
Никотиновая кислота	100
Сахароза	2500
Вода	1000
Агар	7000

Таблица 2

Состав питательной среды Мурасиге-Скуга для получения каллусной
культуры, мг/л

Компоненты:	Содержание
NH_4NO_3	33000
KNO_3	38000
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8800
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	7400
KH_2PO_4	3400
KI	166
H_3BO_3	1240
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	4460

ZnSO ₄ x7H ₂ O	1720
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	50
CuSO ₄ x5H ₂ O	5
CoCl ₂ x6H ₂ O	5
FeSO ₄ x7H ₂ O	5560
Na-ЭДТА	7460
Мезоинозит	100
Гидролизат казеина	500
Тиамин	100
Пиридоксин	100
Никотиновая кислота	100
Сахароза	30000
2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота	1
6- бензиламинопурин	1
Нафтилуксусная кислота	1
Вода	1000 мл
Агар	12000

Таблица 3

Ростовые параметры каллусных культур полыни обыкновенной

Показатели	Значения, в г
Индексы роста по весу сырой биомассы	0,1678
Удельный рост по весу сырой биомассы, сут -1	0,0084

Формула изобретения

Способ получения каллусной культуры клеток *Artemisia vulgaris* L., включающий стерилизацию семян интактных растений *Artemisia vulgaris* L. растворами перекиси водорода в течение 10 мин и этилового спирта в течение 1 мин, ополаскивание, отмывание в течение 5 мин в стерильной дистиллированной воде, помещение стерильных семян на твердую питательную среду без гормонов, следующего состава:

NH_4NO_3	33000 мг,
KNO_3	38000 мг,
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8800 мг,
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	7400 мг,
KH_2PO_4	3400 мг,
KI	166 мг,
H_3BO_3	1240 мг,
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	4460 мг,
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1720 мг,
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	50 мг,
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	5 мг,
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	5 мг,
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5560 мг,
Na-ЭДТА	7460 мг,
Мезоинозит	100 мг,
Тиамин	100 мг,
Пиридоксин	100 мг,
Никотиновая кислота	100 мг,
Сахароза	2500 мг,
Вода	1000 мл
Агар	7000 мг,

дальнейшее помещение эксплантов растений, полученных в лабораторных условиях, в питательную среду следующего состава:

NH_4NO_3	33000 мг,
KNO_3	38000 мг,
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8800 мг,
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	7400 мг,

KH_2PO_4	3400 мг,
KI	166 мг,
H_3BO_3	1240 мг,
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	4460 мг,
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1720 мг,
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	50 мг,
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	5 мг,
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	5 мг,
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5560 мг,
Na-ЭДТА	7460 мг,
Мезоинозит	100 мг,
Гидролизат казеина	500 мг,
Тиамин	100 мг,
Пиридоксин	100 мг,
Никотиновая кислота	100 мг,
Сахароза	30000 мг,
2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота	1 мг,
6-бензиламинопури(н)	1 мг,
Нафтилуксусная кислота	1 мг,
Вода	1000 мл
Агар	12000 мг,

при этом культивирование растений проводят в темноте, при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности помещения $70 \pm 5\%$, цикл субкультивирования составляет 3 недели, при пересеве используют $\frac{1}{4}$ живых каллусных биомасс, полученные каллусные культуры сохраняют пересадкой каждые 21 сутки.