



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.18

(21) Номер заявки
202092144

(22) Дата подачи заявки
2020.10.08

(51) Int. Cl. **A01H 4/00** (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)
A01H 5/10 (2018.01)
A01H 6/14 (2018.01)

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

(31) 2019131750

(32) 2019.10.09

(33) RU

(43) 2021.04.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

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

(72) Изобретатель:

**Антонова Елена Евгеньевна,
Кучарова Елена Валериевна,
Охлопкова Жанна Михайловна (RU)**

(74) Представитель:

Винокуров А.А. (RU)

(56) KUMAR S. et al. Effect of amino acids and growth regulators on indirect organogenesis in *Artemisia vulgaris* L. ASIAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, 2010, Vol. 2 (1), p. 37-45 с 38-40

BORZABAD R. et al. In vitro plant regeneration from leaf explants of *Artemisia vulgaris*

L. MODERN APPLIED SCIENCE, 2010, Vol. 4, No. 9, p. 130-134 реферат, с. 130, раздел 2.2, с. 131, раздел 3.1

SHARAFIA et al. Tissue culture and regeneration of an antimalarial plant, *Artemisia sieberi* Besser. RESEARCH JOURNAL OF PHARMACOGNOSY, 2014, 1(3), p. 15-20 реферат, с. 16-17

HEDAYATI N. et al. Effect of growth regulators, explants source and light/ dark condition on in vitro callus growth of *Artemisia vulgaris*. 2nd National Congress on Medicinal Plants. 15,16 May 2013 Tehran- Iran. 2013, Vol. 2. p. 673

PANDEY N. Effect of 2,4-D on phenolics production and detection of in-vitro culture-induced variation through inter-simple sequence repeat and RAPD analysis in *Artemisia annua* L. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMA AND BIO SCIENCES, 2014, 5(2), p. 181-193 реферат

GHAREHMATROSSIAN S. et al. In-vitro culture of *Artemisia aucheri* Boiss on four different tissue culture media for comparative cytotoxic effect and growth. ASIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND CLINICAL RESEARCH. Vol.7, p. 27-31. реферат, с. 27-28, раздел Materials and methods, табл. 1.

RASOOL R. et al. Antioxidant potential in callus culture of *Artemisia amygdalina* Decne. NATURAL PRODUCT RESEARCH. November 2012, Vol. 26. No. 22, p. 2103-2106 реферат, с. 2104 KZ-A-10714

(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 полныи обыкновенной, в условиях in vitro, включающий стерилизацию семян полныи 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: NH₄NO₃ - 33000; KNO₃ - 38000; CaCl₂×2H₂O - 8800; MgSO₄×7H₂O - 7400; KH₂PO₄ - 3400; KI - 166; H₃BO₃ - 1240; MnSO₄×4H₂O - 4460; ZnSO₄×7H₂O - 1720; Na₂MoO₄×2H₂O - 50; CuSO₄×5H₂O - 5; CoCl₂×6H₂O - 5; FeSO₄×7H₂O - 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: NH₄NO₃ - 33000; KNO₃ - 38000; CaCl₂×2H₂O - 8800; MgSO₄×7H₂O - 7400; KH₂PO₄ - 3400; KI - 166; H₃BO₃ - 1240; MnSO₄×4H₂O - 4460; ZnSO₄×7H₂O - 1720; Na₂MoO₄×2H₂O - 50;

CuSO₄×5H₂O - 5; CoCl₂×6H₂O - 5; FeSO₄×7H₂O - 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±1°С, влажности помещения 70±5%, цикл субкультивирования составляет 3 недели. Изобретение позволяет получить каллусную культуру полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris* L.) в условиях in vitro.

041652 B1

041652 B1

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, реке 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, невралгии 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 антиоксидантного 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_2BO_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,

нафтилукусная 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 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 мин, 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 табл. 1.

Из полученного проростка получают листовые экспланты, которые помещали в питательную среду с дополнительным добавлением гидролизата казеина, 6-бензиламинопурина, нафтилукусной кислоты. Наиболее интенсивное каллусообразование получили при концентрации фитогормонов 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в 1 мг/л, 6-бензиламинопурина - 1 мг/л, α -нафтилукусной 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 табл. 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 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 табл. 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
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	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
Агар	7000

Таблица 2. Состав питательной среды Мурасиге-Скуга для получения каллусной культуры, мг/л

Компоненты:	Содержание
NH ₄ NO ₃	33000
KNO ₃	38000
CaCl ₂ ×2H ₂ O	8800
MgSO ₄ ×7H ₂ O	7400
KH ₂ PO ₄	3400
KI	166
H ₃ BO ₃	1240
MnSO ₄ ×4H ₂ O	4460
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	1720
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	50
CuSO ₄ ×5H ₂ O	5
CoCl ₂ ×6H ₂ O	5
FeSO ₄ ×7H 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:

- NH₄NO₃ - 33000 мг;
- KNO₃ - 38000 мг;
- CaCl₂×2H₂O - 8800 мг;
- MgSO₄×7H₂O - 7400 мг;
- KH₂PO₄ - 3400 мг;
- KI - 166 мг;
- H₃BO₃ - 1240 мг;
- MnSO₄×4H₂O - 4460 мг;
- ZnSO₄×7H₂O - 1720 мг;
- Na₂MoO₄×2H₂O - 50 мг;
- CuSO₄×5H₂O - 5 мг;
- CoCl₂×6H₂O - 5 мг;
- FeSO₄×7H₂O - 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:

- NH₄NO₃ - 33000 мг;
- KNO₃ - 38000 мг;
- CaCl₂×2H₂O - 8800 мг;
- MgSO₄×7H₂O - 7400 мг;

KH_2PO_4 - 3400 мг;
KI - 166 мг;
 H_2BO_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-бензиламинопурин - 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 1/4 живых каллусных биомасс, полученные каллусные культуры сохраняют пересадкой каждые 21 сутки.

