



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 5519

(13) U

(51) 7 C12N5/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ КАЛУСНОЇ ТКАНИНИ ПЛЮЩА *HEDERA HELIX L.*

1

(21) 20040605126

(22) 29.06.2004

(24) 15.03.2005

(46) 15.03.2005, Бюл. № 3, 2005 р.

(72) Юркова Ірина Миколаївна, Бугара Олександр Михайлович, Теплицька Людмила Михайлівна, Скляренко Дмитро Олександрович

(73) ТАВРІЙСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. В.І. ВЕРНАДСЬКОГО

(57) Спосіб культивування калусної тканини плюща, що включає виділення експланту, стерилізацію і культивування його на живильному середовищі, що містить мінеральні солі, мікроелементи,

2

інозит, тіамін, піридоксин, нікотинову кислоту, сахарозу, агар і фітогормони, знімання біомаси, збереження частини її для подальшого культивування, який відрізняється тим, що як експланти використовують зародки насіння плюща, а культивування здійснюють на середовищі Мурасіге і Скуга, що містить, мг/л: мінеральні солі, мікроелементи, сахарозу та інозит за прописом Мурасіге і Скуга, агар - 6000-7000, тіамін - 1-2, піридоксин - 0,5-1,0, нікотинова кислота - 0,8-1,2; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота - 0,5-2,0 і 6-бензиламінопурін - 0,2-1,0, протягом 20-30 діб у темряві.

Корисна модель відноситься до біотехнології, а саме до способу культивування калусної тканини плюща звичайного (кучерявого) (*Hedera helix L.*), що є сировиною для одержання біологічно активних речовин (БАР), і може бути використаний у фармацевтичній, харчовій і косметичній промисловості.

У біотехнології відомі способи одержання біомаси калусних тканин деяких лікарських рослин - продуцентів БАР: женьшеню, солодки голої, полину гладкого, стевії та ін.

Відомі способи культивування калусної тканини женьшеню шляхом посадки інокулюму на агарізоване живильне середовище Мурасіге і Скуга, культивування в стандартних умовах і добору частини вирослої біомаси для культивування на модифікованому живильному середовищі із якого потім одержують біологічно активні речовини, а частину біомаси, що залишилася, використовують на стадії вирощування інокулятного матеріалу (А с. СРСР №1036053, Кл.С12N5/00, 1982); культивування калусної тканини женьшеню на живильному, середовищі у який додатково вводять крохмаль (Патент РФ, №2010857, МПК⁶ С12N5/04. Спосіб культивирования калусной ткани женьшеня / Е.К. Альшеевская, В.П. Булгаков, Ю.Н. Журавлев, А.А. Артюков. - Заявл.20.05.91. - Опубл.15.04.94. Бюл.7).

Найбільш близьким за технічною сутністю є спосіб вирощування калусної тканини, отриманої зі

зрілих зародків борця північного, котрий включає виділення експланту (зародки насіння), стерилізацію і культивування його на живильному середовищі Мурасіге і Скуга, модифікованому для ініціації калусоутворення 2,4-д при t=25-26°C у темряві (Лукичева І.А., Мигранова І.Г. Калусная ткань, полученная из зрелых зародышей *Aconitum septentrionale* Koelle. - перспективный источник алкалоида лаптаконитин // Вестник Башкирского университета. - 2001 - №2 (П). - С.92-95)

Задачею корисної моделі є створення способу культивування калусної тканини плющу (*Hedera helix L.*).

Поставлена задача вирішується завдяки тому, що у пропонованому способі культивування калусної тканини плющу (*Hedera helix L.*) попередньо виділяють експланти, стерилізують їх відомими методами і культивують на живильному середовищі Мурасіге і Скуга, модифікованому фітогормонами. Відповідно до корисної моделі, в якості експлантів використовують зародки насіння плющу, стерилізацію проводять відомими методами, а культивування здійснюють на середовищі Мурасіге і Скуга, що містить, мг/л: мінеральні солі, мікроелементи, сахарозу і інозит за прописом Мурасіге і Скуга, агар - 6000-7000, тіамін - 1-2, піридоксин - 0,5-1,0, нікотинова кислота - 0,8-1,2; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота - 0,5-2,0 мг/л і 6-бензиламінопурін - 0,2-1,0 мг/л протягом 20-30 діб у темряві.

(19) UA (11) 5519 (13) U

Плющ є однією із самих древніх лікарських рослин. В останні роки його використовують у ряді країн (Німеччина, Франція та ін.) як сировину для одержання ефективних лікарських препаратів. Основні фармакологічні властивості плюща визначаються сапоніновими глікозидами, що містяться у різних органах рослини, яких у даний час знайдено більш 50 видів і визначена їхня структура. Сапонінові глікозиди плюща виявляють високу антибактеріальну, антитоксичну, протизапальну (Balansard і соавт., 1980), протикашлеву, протипаразитарну, протилейшманіозну (В. Majester-Savomin і соавт., 1991) активність. Сапоніни плющу таврійського *Hedera taurica* Carr. (різновид плющу звичайного) містять таурозиди H2 і St-K, що розглядаються як перспективні ад'юванти для посилення імунногенності вакцин, зокрема проти СНІДу (Ю.Л. Криворученко і соавт., 1997). Експериментальне доведення антімутагенна дія деяких сапонінів плющу.

Використання замість інтактних рослин їхніх клітинних культур, отриманих біотехнологічним методом, має ряд переваг: зменшення антропогенного впливу на дику природу (плющ відрізняється повільним ростом, це єдина рослина сімейства аралієвих, що зустрічається у дикому виді у Європі), можливість одержання фітомаси, цілком вільної від полютантів (гербіцидів, пестицидів, важких металів і ін.), можливість керування процесом біосинтезу цільових продуктів і ін.

Приклад 1.

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить, мг/л: мінеральні солі, мікроелементи, сахарозу та за прописом Мурасіге і Скуга (Murashige T., Skoog F. // *Physiol. Plant.* - 1962 - Bd.15. - №13. - Р 473-497), агар - 6000, тіамін - 1, пірідоксин - 0,5, нікотинова кислота - 0,8; фітогормони: 2,4-діхлорфеноксіцтова кислота - 0,5 і 6-бензиламінопурін - 0,2, розливають у культивувальні судини ємністю по 50мл кожний. Закупорені ватно-марлевими пробками судини стерилізують у автоклаві при 118°C протягом 30 хвилин, рН середовища до автоклавирування 5,5-5,8. У застигле живильне середовище у стерильних умовах вводять експланти (зародки насіння плющу (*Hedera helix* L.), попередньо простерилізовані 70%-ним розчином етилового спирту протягом 1 хвилини, культивують у темряві при температурі 18°C протягом 20 діб, після чого калус витягають із судини, відокремлюють від експланту і зважують. Вихід на суху біомасу при п'ятикратній повторності дослідів склав 200мг.

Приклад 2. Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить, мг/л: мінеральні солі, мікроелементи, сахарозу та інозит за прописом Мурасіге і Скуга, агар - 6500, тіамін - 1,5, пірідоксин - 0,75, нікотинова кислота - 1,0; фітогормони: 2,4-діхлорфеноксіцтова кислота - 1,0 і 6-бензиламінопурін - 0,5, розливають у культивувальні судини ємністю по 50 мл кожний. Закупорені ватно-марлевими пробками судини стерилізують у автоклаві при 118°C протягом 30 хвилин, рН середовища до автоклавирування 5,5-5,8. У застигле живильне середовище у стерильних умовах вводять експланти (зародки насіння плющу (*Hedera helix* L.), попередньо простерилізовані 50%-ним розчином брадофена 10 Н протягом 10 хвилин, культивують у темряві при температурі 22°C протягом 25 діб, після чого калус витягають із судини, відокремлюють від експланту і зважують. Вихід на суху біомасу при п'ятикратній повторності дослідів склав 260мг.

Приклад 3.

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить, мг/л: мінеральні солі, мікроелементи, сахарозу та інозит за прописом Мурасіге і Скуга, агар - 7000, тіамін - 2, пірідоксин - 1,0, нікотинова кислота - 1,2; фітогормони: 2,4-діхлорфеноксіцтова кислота - 2,0 і 6-бензиламінопурін - 1,0, розливають у культивувальні судини ємністю по 50мл кожний. Закупорені ватно-марлевими пробками судини стерилізують у автоклаві при 118°C протягом 30 хвилин, рН середовища до автоклавирування 5,5-5,8. У застигле живильне середовище у стерильних умовах вводять експланти (зародки насіння плющу (*Hedera helix* L.), попередньо простерилізовані 0,1%-ним розчином діациду протягом 15 хвилин, культивують у темряві при температурі 25°C протягом 30 діб, після чого калус витягають із судини, відокремлюють від експланту і зважують. Вихід на суху біомасу при п'ятикратній повторності дослідів склав 273мг.

Пропонований спосіб культивування калусної тканини плющу (*Hedera helix* L.) може бути використаний для біотехнологічного виробництва його біомаси із метою виділення біологічно активних речовин, що є основою для одержання лікарських препаратів. Перевагою даного способу є зниження антропогенного впливу на навколишнє середовище, одержання екологічно чистої сировини незалежно від періоду вегетації.