



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **18328** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C12N 5/04МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ КАЛУСНОЇ ТКАНИНИ ЛОМИНОСА ВИНОГРАДОЛИСТОГО (CLEMATIS VITALBA L.)**

1

2

(21) u200603423

(22) 29.03.2006

(24) 15.11.2006

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

(72) Чмельова Світлана Іванівна, Бугара Олександр Михайлович, Сідякин Андрій Іванович, Юркова Ірина Миколаївна

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

(57) Спосіб культивування калусної тканини ломиносо виноградолистого, що включає виділення експланту, стерилізацію і культивування його на живильному середовищі Мурасіге і Скуга, модифі-

кованому фітогормонами, зняття біомаси, збереження частини її для подальшого культивування, який **відрізняється** тим, що як експланти використовують вегетативні апекси стебла, ювенільне листя, сегменти зрілої листової пластинки, насінні зачатки, вузли і сегменти стебел, зародки насіння ломиносо виноградолистого (*Clematis vitalba* L.), а культивування здійснюють на модифікованому середовищі Мурасіге і Скуга, що містить фітогормони: 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота - 2,0-3,0 мг/л, 6-бензиламінопурин - 0,3-0,4 мг/л, індоліл-3-оцтової кислоти - 1,0-1,5 мг/л, протягом 70-90 діб в темряві.

Корисна модель відноситься до області біотехнології, а саме до способу культивування калусної тканини ломиносу виноградолистого (*Clematis vitalba* L.) який може бути використаний як сировина для одержання біологічно активних речовин (тритерпенових сапонінів) з перспективою використання їх у фармацевтичній і медичній промисловості.

У біотехнології відомі способи одержання біомаси калусних тканин деяких лікарських рослин - продуцентів БАВ терпенової природи: женьшеню, діоскореї, юки, княжика сибірського, гінкго двохлопасного, плюща.

Відомі способи культивування калусних тканин женьшеню, шляхом культивування клітинної маси на живильному середовищі з додатковим опроміненням світлом [Патент № 2101934 РФ, МПК⁶ A01W/00, 312N5/00. Спосіб вирощування біомаси женьшеню / Кольцов Ю.В., Корольов В.Н., Кусякин С.А., Золотарьов В.Г. - № 95119784/13 - Заявл. 21.11.95 - Опубл. 20.01.98. - Бюл. №25], на живильному середовищі, яке містить крохмаль [Патент № 2010857 РФ, МПК⁵ C12N5/04. Спосіб культивування калусної тканини женьшеню / Е.К. Альшевская, В.П. Булгаков, Ю.Н. Журавльов, А.А. Артюков. - Заявл. 20.05.91. - Опубл. 15.04.94. - Бюл. №7], приклади культивування женьшеню японського з аналізом вмісту сапонінів у калусних і суспензійних культурах [Чайко А.Л., Решетаяк О.В., Куличенко

І.Е. Культура клітин женьшеню японського Ралах *japonicus* (var. *perens*): одержання калусної і суспензійної культур, оптимізація росту й аналіз паннакосидів // Біотехнологія. - 1999. - № 6. - С. 51-55.].

Найбільш близьким за технічною суттю є спосіб одержання і культивування калусної тканини плюща звичайного, що включає виділення експланту, стерилізацію і культивування його на живильному середовищі Мурасіге і Скуга, модифікованому для ініціації калусоутворення фітогормонами у концентраціях: 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота - 0,5-2,0 мг/л і 6-бензиламінопурин - 0,2-1,0 мг/л протягом 20-30 діб в темряві, знімання біомаси, збереження частини її для подальшого культивування [Патент №5519 UA, МПК⁵ C12N5/04. Спосіб культивування калусної культури плюща *Hedera helix* L. / Юркова І.М., Бугара О.М., Теплицька Л.М., Склярєнко Д.О. - Заявл. 29.06.04 - Опубл. - 15.03.05. - Бюл. № 3].

Задачею корисної моделі є створення способу одержання і культивування калусної тканини ломиносу виноградолистого (*Clematis vitalba* L.).

Поставлена задача вирішується завдяки тому, що в запропонованому способі культивування калусної тканини ломиносу попередньо виділяють експланти, стерилізують їх відомими способами і культивують на живильних середовищах модифікованих фітогормонами, відповідно до отриманої

(13) **U**(11) **18328**(19) **UA**

моделі як експланти використовували вегетативні апекси стебла, ювенільне листя, сегменти зрілої листової пластинки, насінні зачатки, вузли і сегменти стебла, зародки насіння, стерилізацію проводять відомими способами, а культивування проводять на модифікованому живильному середовищі Мурасіге і Скуга, що містить фітогормони в наступних концентраціях: 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота (2,4-Д) - 2,0-3,0 мг/л, 6-бензиламінопурин (6-БАП) - 0,3-0,4 мг/л, індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) - 1,0-1,5 мг/л, протягом 70-90 діб в темряві.

Ломиніс є одним з перспективних лікарських рослин для використання його в медичній практиці. У деяких країнах дана рослина є традиційним джерелом лікарських препаратів і широко використовується в народній медицині. В основі високої біологічної активності ломиносу лежить наявність у біомасі сапонінових глікозидів, серед яких зустрічаються аналогічні таким багатьох рослин, що широко використовуються в сучасній медицині і фармакології. Значимість глікозидів як біологічно активних сполук із широким спектром фармакологічної дії викликає інтерес до їх вивчення в клітинних культурах рослин.

Використання замість інтактних рослин їх клітинних культур, отриманих біотехнологічними методами, має ряд переваг: зменшення антропогенного впливу на дику природу, можливість одержання фітомаси, що не містить полютантів (гербіцидів, пестицидів, важких металів і ін.), можливість керування процесом біосинтезу цільових продуктів і т.д.

Приклад 1.

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить мінеральні солі, мікроелементи, і сахарозу за прописом Мурасіге і Скуга [Murashige T., Skoog F., // *Physiol. Plant.* - 1962. - Bd. 15. - №13 - Р. 473-497], агар - 8000, тіамін - 1,0, піридоксин - 0,5, нікотинова кислота - 1,0, аскорбінова кислота - 5,0; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота - 2,0 мг/л, 6-бензиламінопурин - 0,3 мг/л, індоліл-3-оцтової кислоти - 1,0, розливають у культуральні судини (пробірки 2x20 см), по 10 мл живильного середовища, закривають металевими ковпачками з фольги, стерилізують в автоклаві при 121°C протягом 40 хвилин, рН середовища до автоклавування 5,5-5,8. На поверхню агаризованого середовища в стерильних умовах уводять експланти (вегетативні апекси стебла ломиносу (*Clematis vitalba* L.), попередньо простерилізовані 50% розчином препарату «брадофен» (2 хвилини), а потім 5% розчином перекису водню (1 хвилину), культивують у темряві при 25°C протягом 70 діб, після чого калус виймають із судин, відокремлюють від експланту, і пересаджують на живильне середовище такого ж складу. Дані про частоту калусоутворення приведені в таблиці.

Приклад 2.

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить мінеральні солі, мікроелементи, і сахарозу за прописом Мурасіге і Скуга, агар - 8000, тіамін - 1,0, піридоксин - 0,5, нікотинова кислота - 1,0, аскорбінова кислота - 5,0; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота - 2,5 мг/л, 6-бензиламінопурин - 0,4 мг/л, індоліл-3-оцтової кислоти - 1,0 мг/л, розливають у культуральні судини

(пробірки 2x20 см), по 10 мл живильного середовища, закривають металевими ковпачками з фольги, стерилізують в автоклаві при 121°C протягом 40 хвилин, рН середовища до автоклавування 5,5-5,8. На поверхню агаризованого середовища в стерильних умовах уводять експланти (ювенільне листя ломиносу (*Clematis vitalba* L.), попередньо простерилізовані 50% розчином препарату «брадофен» (2 хвилини), а потім 5% розчином перекису водню (1 хвилину), культивують у темряві при 20° С протягом 75 доби, після чого калус виймають із судин, відокремлюють від експланту, і висаджують для подальшого культивування за таких же умов. Дані про частоту калусоутворення надані в таблиці.

Приклад 3.

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить мінеральні солі, мікроелементи, і сахарозу за прописом Мурасіге і Скуга, агар - 8000, тіамін - 1,0, піридоксин - 0,5, нікотинова кислота - 1,0, аскорбінова кислота - 5,0; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота - 3,0 мг/л, 6-бензиламінопурин - 0,4 мг/л, індоліл-3-оцтової кислоти - 1,0 мг/л, розливають у культуральні судини (пробірки 2x20 см), по 10 мл живильного середовища, закривають металевими ковпачками з фольги, стерилізують в автоклаві при 121°C протягом 40 хвилин, рН середовища до автоклавування 5,5-5,8. На поверхню агаризованого середовища в стерильних умовах уводять експланти (сегменти зрілої листової пластинки ломиносу (*Clematis vitalba* L.), попередньо простерилізовані 50% розчином препарату «брадофен» (2 хвилини), а потім 5% розчином перекису водню (1 хвилину), культивують у темряві при 25°C, протягом 80 діб, після чого калус виймають із судин, відокремлюють від експланту, і висаджують для подальшого культивування за таких же умов. Дані про частоту калусоутворення надані в таблиці.

Приклад 4.

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить мінеральні солі, мікроелементи, і сахарозу за прописом Мурасіге і Скуга, агар - 8000, тіамін - 1,0, піридоксин - 0,5, нікотинова кислота - 1,0, аскорбінова кислота - 5,0; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота - 2,5 мг/л, 6-бензиламінопурин - 0,3 мг/л, індоліл-3-оцтової кислоти - 1,0 мг/л, розливають у культуральні судини (пробірки 2x20 см), по 10 мл живильного середовища, закривають металевими ковпачками з фольги, стерилізують в автоклаві при 121°C протягом 40 хвилин, рН середовища до автоклавування 5,5-5,8. На поверхню агаризованого середовища в стерильних умовах уводять експланти (насінні зачатки ломиносу (*Clematis vitalba* L.), попередньо простерилізовані 50% розчином препарату «брадофен» (2 хвилини), а потім 5% розчином перекису водню (1 хвилину), культивують у темряві при 20°C протягом 80 діб, після чого калус виймають із судин, відокремлюють від експланту, і висаджують для подальшого культивування. Дані про частоту калусоутворення надані в таблиці.

Приклад 5.

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить мінеральні солі, мікроелементи, і сахарозу за прописом Мурасіге і Скуга, агар -

8000, тіамін - 1,0, піридоксин - 0,5, нікотинова кислота - 1,0, аскорбінова кислота - 5,0; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота - 2,0 мг/л, 6-бензиламінопурін - 0,4 мг/л, індоліл-3-оцтової кислоти - 1,0 мг/л, розливають у культуральні судини (пробірки 2x20 см), по 10 мл живильного середовища, закривають металевими ковпачками з фольги, стерилізують в автоклаві при 121°C протягом 40 хвилин, рН середовища до автоклавування 5,5-5,8. На поверхню агаризованного середовища в стерильних умовах уводять експланти (вузли стебел ломиносу (*Clematis vitalba* L.), попередньо простерилізовані 50% розчином препарату «брадофен» (2 хвилини), а потім 5% розчином перекису водню (1 хвилини), культивують у темряві при 25°C протягом 85 діб, після чого калус виймають із судин, відокремлюють від експланту, і висаджують для подальшого культивування. Дані про частоту калусоутворення надані в таблиці.

Приклад 6.

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить мінеральні солі, мікроелементи, і сахарозу за прописом Мурасіге і Скуга, агар - 8000, тіамін - 1,0, піридоксин - 0,5, нікотинова кислота - 1,0, аскорбінова кислота - 5,0; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота - 2,5 мг/л, 6-бензиламінопурін - 0,3 мг/л, індоліл-3-оцтової кислоти - 1,5 мг/л, розливають у культуральні судини (пробірки 2x20 см), по 10 мл живильного середовища, закривають металевими ковпачками з фольги, стерилізують в автоклаві при 121°C протягом 40 хвилин, рН середовища до автоклавування 5,5-5,8. На поверхню агаризованного середовища в стерильних умовах уводять експланти (сегменти стебел ломиносу (*Clematis vitalba* L.), попередньо простерилізовані 50% розчином препарату «брадофен» (2 хвилини), а потім 5% розчином перекису водню (1 хвилини), культивують у темряві при 20°C протягом 90 діб, після чого калус виймають із судин, відокремлюють від експланту і висаджують для подальшого культивування. Дані про частоту калусоутворення надані в таблиці.

Приклад 7.

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить мінеральні солі, мікроелементи, і сахарозу по прописі Мурасіге і Скуга, агар - 8000, тіамін - 1,0, піридоксин - 0,5, нікотинова кислота - 1,0, аскорбінова кислота - 5,0; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота - 2,0 мг/л, 6- бензи-

ламінопурін - 0,4 мг/л, індоліл-3-оцтової кислоти - 1,5 мг/л, розливають у культуральні судини (пробірки 2x20 см), по 10 мл живильного середовища, закривають металевими ковпачками з фольги, стерилізують в автоклаві при 121°C протягом 40 хвилин, рН середовища до автоклавування 5,5-5,8. На поверхню агаризованного середовища в стерильних умовах уводять експланти (зародки насіння ломиносу (*Clematis vitalba* L.), попередньо простерилізовані 50% розчином препарату «брадофен» (2 хвилини), а потім 5% розчином перекису водню (1 хвилини), культивують в темряві при 25°C протягом 80 діб, після чого калус виймають із судин, відокремлюють від експланту і висаджують на живильне середовище для подальшого культивування. Дані про частоту калусоутворення надані в таблиці.

Таблиця.

Частота калусоутворення в культурі тканин ломиносу виноградолистного в залежності від типу експланту і складу живильного середовища

№ при- кладу	Тип і концен- трація фіто- гормонів в живильному середовищі			Тип експланту	Частота калусо- утворення, %
	ІО К	2,4 -Д	6- БАП		
1.	1,0	2,0	0,3	Вегетативні апекси стебла	40,5±1,6
2.	1,0	2,5	0,4	Ювенільне листя	57,5±1,58
3.	1,0	3,0	0,4	Сегменти зрілої лис- тової плас- тинки	46,4±1,9
4.	1,0	2,5	0,3	Насінні за- чатки	76,6±3,2
5.	1,0	2,0	0,4	Вузли сте- бла	32,4±1,5
6.	1,5	2,5	0,3	Сегменти стебла	33,6±1,6
7.	1,5	2,0	0,4	Зародки насіння	64,7±2,1