



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **20753** (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 ПЛЮЩА (HEDERA HELIX L.)**

1

2

(21) u200608189

(22) 21.07.2006

(24) 15.02.2007

(46) 15.02.2007, Бюл. № 2, 2007 р.

(72) Бугара Олександр Михайлович, Юркова Ірина
Миколаївна, Фазілов Альберт Рузальович(73) ТАВРІЙСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИ-
ТЕТ ІМ. В.І. ВЕРНАДСЬКОГО(57) Спосіб культивування калусної тканини плю-
ща, що включає виділення експланту, стериліза-
цію і культивування його на живильному середо-

вищі Мурасиге і Скуга, що містить фітогормони
2,4-дихлорфеноксіцтова кислота і 6-
бензиламінопурин, знімання біомаси, збереження
частини її для подальшого субкультивування, який
відрізняється тим, що подальше субкультивуван-
ня здійснюють на середовищі Мурасиге і Скуга, що
містить фітогормони, мг/л: 2,4-
дихлорфеноксіцтова кислота 0,01-0,1 і 6-
бензиламінопурин 0,01-0,2 протягом 30-80 діб у
темряві.

Корисна модель відноситься до біотехнології і
стосується культивування калусної тканини плюща
(*Hedera helix* L.) - джерела біологічно активних
метаболітів і може бути використана у
фармацевтичній, харчовій і косметичній
промисловості. Спосіб культивування калусної ткани-
ни женьшеню шляхом посадки інокулюму на
агаризоване живильне середовище Мурасиге і
Скуга, культивування в стандартних умовах і
відбору частини вирослої біомаси для
культивування на модифікованому живильному
середовищі із якого потім одержують біологічно
активні речовини, а частину біомаси, що за-
лишилася, використовують на стадії вирощування
інокулятного матеріалу [Патент РФ, №2010857,
МПК C12N5/04. Спосіб культивирования
калусной ткани женьшеня / Е.К. Альшевская, В.П.
Булгаков, Ю.Н. Журавльов, А.А. Артюков. - Заявл.
20.05.91. - Оpubл. 15.04.94. Бюл.7].

Найбільш близьким за технічною суттю є спо-
сіб культивування калусної тканини плющу
(*Hedera helix* L.), що включає виділення експланту
(зародки насіння), стерилізацію і культивування
його на живильному середовищі Мурасиге і Скуга,
модифікованому для ініціації калусоутворення
фітогормонами 2,4-Д і 6-БАП, протягом 20-30 діб в
темряві, знімання біомаси і збереження частини її
для подальшого культивування [Деклараційний
патент на корисну модель №5519, МПК⁵ C12N5/04.
Спосіб культивування калусної тканини плющу
Hedera helix L. / І.М. Юркова, О.М. Бугара, Л.М. Те-
плицька, Д.О. Складенко. - Заявл. 29.06.2004. -

Оpubл. 15.03.2005, Бюл. №3].

Основним недоліком цього способу є низький
приріст біомаси при подальшому субкультивуванні
калусної тканини на живильному середовищі того
ж складу.

Задачею корисної моделі є підвищення виходу
біомаси калусної тканини плющу після переносу
інокуляту на свіже живильне середовище.

Для вирішення поставленої задачі в пропоно-
ваному способі культивування калусної тканини
плюща (*Hedera helix* L.), що включає попереднє
виділення експланту (зародки насіння), стериліза-
цію його відомими методами, культивування на
живильному середовищі Мурасиге і Скуга, модифі-
кованому фітогормонами, знімання біомаси і збе-
реження частини її для подальшого культивуван-
ня, відповідно до винаходу подальше
субкультивування здійснюють на живильному се-
редовищі Мурасиге і Скуга, що містить фітогормо-
ни, мг/л: 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота 0,01-
1,0мг/л і 6-бензиламінопурин - 0,01-0,2мг/л протя-
гом 30-80 діб в темряві.

Спосіб здійснюється таким чином. Наприкінці
циклу культивування калусної культури плющу
біомасу в стерильних умовах перемішують і час-
тину її як інокулят переносять для субкультиву-
вання в культуральні судини на свіже живильне
середовище Мурасиге і Скуга, що містить фітогор-
мони, мг/л: 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота -
0,01-0,1мг/л і 6-бензиламінопурин - 0,01-0,2мг/л.
На живильне середовище висаджують інокулюм
масою 2,0-2,5г/50мл. Культивують у стандартних

(13) **U**
(11) **20753**
(19) **UA**

умовах протягом 30-80 діб в темряві, наприкінці циклу культивування біомасу перемішують, одну частину використовують для відтворення інкуляту, а іншу - для одержання цільового продукту.

Приклад 1 (прототип)

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить, мг/л: мінеральні солі, мікроелементи, сахарозу й інозит за прописом Мурасіге і Скуга [Murashige T., Skoog F. // *Physiol. Plant.* - 1962. - Bd.15. - №13. - P.473-497], агар - 6000, тіамін - 1,0, піродоксин - 0,5, нікотинова кислота - 0,8; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота - 4,0 і 6-бензиламінопурін - 0,5, розливають у культуральні судини по 50мл у кожний. Закупорені ватно-марлевими пробками судини стерилізують в автоклаві при 118°C протягом 30 хвилин, рН середовища до стерилізації 5,5-5,8. У застигле живильне середовище у стерильних умовах висаджують 30-добову біомасу калусу плюща. Інокулюм відбирають від біомаси в стерильних умовах у кількості 2,0-2,5г/50мл і культивують у темряві при температурі 18°C протягом 40 діб, після чого калус витягають із судини і зважують. Приріст біомаси (у % від вихідної біомаси) при п'ятикратній повторності дослідів склав 20%.

Приклад 2

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить, мг/л: мінеральні солі, мікроелементи, сахарозу й інозит за прописом Мурасіге і Скуга [Murashige T., Skoog F. // *Physiol. Plant.* - 1962. - Bd.15. - №13. - P.473-497], агар - 6000, тіамін - 1,0, піродоксин - 0,5, нікотинова кислота - 0,8; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота - 2,0 і 6-бензиламінопурін - 0,3, розливають у культуральні судини по 50мл у кожний. Закупорені ватно-марлевими пробками судини стерилізують в автоклаві при 118°C протягом 30 хвилин, рН середовища до стерилізації 5,5-5,8. У застигле живильне середовище у стерильних умовах висаджують 30-добову біомасу калусу плюща. Інокулюм відбирають від біомаси в стерильних умовах у кількості 2,0-2,5г/50мл і культивують у темряві при температурі 18°C протягом 30 діб, після чого калус витягають із судини і зважують. Приріст біомаси (у % від вихідної біомаси) при п'ятикратній повторності дослідів склав 50%.

Приклад 3

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить, мг/л: мінеральні солі, мікроелементи, сахарозу й інозит за прописом Мурасіге і Скуга [Murashige T., Skoog F. // *Physiol. Plant.* - 1962. - Bd.15. - №13. - P.473-497], агар - 6000, тіамін - 1,0, піродоксин - 0,5, нікотинова кислота - 0,8; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота - 1,0 і 6-бензиламінопурін - 0,2, розливають у культуральні судини по 50мл у кожний. Закупорені ватно-марлевими пробками судини стерилізують в автоклаві при 118°C протягом 30 хвилин, рН середовища до стерилізації 5,5-5,8. У застигле живильне середовище у стерильних умовах висаджують 30-добову біомасу калусу плюща. Інокулюм відбирають від біомаси в стерильних умовах у кількості

2,0-2,5г/50мл і культивують у темряві при температурі 18°C протягом 55 діб, після чого калус витягають із судини і зважують. Приріст біомаси (у % від вихідної біомаси) при п'ятикратній повторності дослідів склав 200%.

Приклад 4

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить, мг/л: мінеральні солі, мікроелементи, сахарозу й інозит за прописом Мурасіге і Скуга [Murashige T., Skoog F. // *Physiol. Plant.* - 1962. - Bd.15. - №13. - P.473-497], агар - 6000, тіамін - 1,0, піродоксин - 0,5, нікотинова кислота - 0,8; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота - 0,1 і 6-бензиламінопурін - 0,2, розливають у культуральні судини по 50мл у кожний. Закупорені ватно-марлевими пробками судини стерилізують в автоклаві при 118°C протягом 30 хвилин, рН середовища до стерилізації 5,5-5,8. У застигле живильне середовище у стерильних умовах висаджують 30-добову біомасу калусу плюща, інокулюм відбирають від біомаси в стерильних умовах у кількості 2,0-2,5г/50мл і культивують у темряві при температурі 18°C протягом 65 діб, після чого калус витягають із судини і зважують. Приріст біомаси (у % від вихідної біомаси) при п'ятикратній повторності дослідів склав 400%.

Приклад 5

Готують живильне середовище Мурасіге і Скуга, що містить, мг/л: мінеральні солі, мікроелементи, сахарозу й інозит за прописом Мурасіге і Скуга [Murashige T., Skoog F. // *Physiol. Plant.* - 1962. - Bd.15. - №13. - P.473-497], агар - 6000, тіамін - 1,0, піродоксин - 0,5, нікотинова кислота - 0,8; фітогормони: 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота - 0,01 і 6-бензиламінопурін - 0,01, розливають у культивацийні судини по 50мл у кожний. Закупорені ватно-марлевими пробками судини стерилізують в автоклаві при 118°C протягом 30 хвилин, рН середовища до стерилізації 5,5-5,8. У застиглу живильне у середовище стерильних умовах висаджують 30-добову біомасу калусу плюща. Інокулюм відбирають від біомаси в стерильних умовах у кількості 2,0-2,5г/50мл і культивують у темряві при температурі 18°C протягом 80 діб, після чого калус витягають із судини і зважують. Приріст біомаси (у % від вихідної біомаси) при п'ятикратній повторності дослідів склав 300%.

Запропонований спосіб культивування калусної тканини плюща (*Hedera helix* L.) може бути використаний для біотехнологічного виробництва його біомаси, що може бути сировиною для одержання лікарських препаратів. Використання замість інтактних рослин плюща їхніх клітинних культур, отриманих біотехнологічним методом, зменшує антропогенний вплив на дику природу (плющ відрізняється повільним ростом, ця єдина рослина родини аралієвих, що зустрічається в дикому виді у Європі), дає можливість одержання фітомаси, цілком вільної від полютантів (гербіцидів, пестицидів, важких металів і ін.), не залежно від періоду вегетації і дозволяє керувати процесом біосинтезу цільових продуктів.

Таблиця

Вплив концентрації фітогормонів на приріст біомаси
пасажних калусних культур *Hedera helix* L.

Приклади	Фітогормони, мг/л		Приріст біомаси, %
	2,4-Д	6-БАП	
1 (прототип)	4,0	0,5	20
2	2,0	0,3	50
3	1,0	0,2	200
4	0,1	0,2	400
5	0,01	0,01	300