



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75967** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A01H 1/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2012 04341</p> <p>(22) Дата подання заявки: 06.04.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.12.2012</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.12.2012, Бюл.№ 24</p>	<p>(72) Винахідник(и): Поліщук Валентин Васильович (UA), Доронін Володимир Аркадійович (UA), Яценко Анатолій Олексійович (UA), Опалко Анатолій Іванович (UA), Адаменко Дмитро Михайлович (UA), Ненька Максим Миколайович (UA), Ненька Олександра Василівна (UA), Майборода Віталій Миколайович (UA), Ковальчук Ігор Васильович (UA), Карпук Леся Михайлівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ІНСТИТУТ КОРЕНЕПЛІДНИХ КУЛЬТУР НААН УКРАЇНИ, вул. Інтернаціональна, 4, м. Умань, Черкаська обл., 20300 (UA)</p>
--	--

(54) СПОСІБ ПРИСКОРЕНОГО РОЗМНОЖЕННЯ СТІЙКИХ ДО ЦВІТУШНОСТІ ЧС-ФОРМ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ТЕХНОЛОГІЙ IN VITRO

(57) Реферат:

Спосіб прискороного розмноження стійких до цвітушності ЧС-форм цукрових буряків включає використання технологій in vitro, зокрема введення експлантів на живильне середовище, приготовлене з макро- і мікроелементами за прописом Гамборга і Евелега (B5), з використанням залізовмісного елемента. Як залізовмісний елемент застосовують залізо сірчаноокисле ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) та антиоксидант Na_2EDTA . Введено Міо-інозитол, фітогормон 6-бензиламінопурин (БАП) та вітаміни: тіамін- HCl (B_1), піродоксин- HCl (B_6), нікотинову кислоту (PP) та аскорбінову кислоту (C).

UA 75967 U

Корисна модель належить до біотехнологічних методів, а саме методів мікроклонального розмноження, що надає широкі можливості для збереження та розмноження вихідного селекційного матеріалу культурних рослин, зокрема чоловічостерильних материнських компонентів гетерозисних гібридів цукрових буряків.

5 Цукрові буряки *Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima* Doell convar. *saccharifera* (Alef.) Krass. належать до роду *Beta* L., секції *Beta* (syn. *Vulgares* Ulbrich) родини *Amaranthaceae* Juss. (колишня *Chenopodiaceae* Vent.). Це одна з основних технічних культур, яка займає провідне місце в структурі сільськогосподарського виробництва Лісостепу України, як і багатьох інших країн з помірним кліматом. Створення та впровадження у виробництво нових високопродуктивних гібридів, придатних для інтенсивних енергозберігаючих технологій, є актуальною селекційною задачею. Цукрові буряки є перехреснозапильною, гетерозиготною та дворічною рослиною і для створення нових сортів та гібридів методами класичної селекції потрібно не менше восьми поворотних схрещувань (бекросів), на що витрачається понад 15 років. Включення у селекційно-насіницький процес біотехнологічної ланки, власне мікроклонального розмноження, дає змогу у два-три рази скоротити час, що зазвичай витрачається на створення і розмноження селекційного матеріалу цукрових буряків. Крім цього, вирощування в контрольованих умовах *in vitro* отриманих з меристематичних тканин мікроклонів надає можливість досягати елімінації вірусів та інших патогенних мікроорганізмів і отримувати оздоровлений матеріал; технологія може застосовуватись для генотипів із чоловічою стерильністю, які не дають життєздатного насіння при інбридингу, а при аутбридингу втрачають ознаки, задля яких вони розмножуються, зокрема стійкість до цвітушності; ріст рослин можна підтримувати протягом багатьох років; можливість вести відбір генотипів, стійких до несприятливих зовнішніх умов (екстремальні температури, засолення та закислення субстрату, пригнічувальна дія гербіцидів тощо), а також відбирати більш продуктивні форми [1-5, 7].

15 Для мікроклонального розмноження цукрових буряків використовують різні базові живильні середовища за прописами Doley W.P., Saunders J.W., 1989; Freytag A.H. et al., 1988; Gamborg OL, Eveleigh DE., 1968; Murashige T., Skoog F., 1962; Редько В.І. та ін., 1997, а також численні модифікації згаданих та інших середовищ [3, 4, 6, 8-10]. Незважаючи на те, що особливості мікроклонального розмноження рослин цукрових буряків вивчені досить ґрунтовно, у вітчизняній та зарубіжній літературі недостатньо інформації, використання якої б забезпечувало успішне культивування цієї культури на всіх послідовних етапах мікроклонування. Наразі зовсім відсутня інформація про склад живильних середовищ для якісного розмноження насіннєвими зачатками чоловічостерильних простих гібридів між спорідненими інбредними лініями, а пропонувані методи лише фрагментарно описують окремі етапи мікроклонального розмноження цукрових буряків, досить часто невідтворні і не можуть бути використані для позасезонного насінництва чоловічостерильних форм, які слугують вихідним матеріалом для материнських компонентів гетерозисних гібридів цукрових буряків, зокрема стійких до цвітушності.

25 Задачею корисної моделі є розробка способу позасезонного масового вегетативного розмноження чоловічостерильних форм цукрових буряків у лабораторії мікроклонального розмноження, а саме підбір фітогормонального складу живильного середовища для введення і проліферації стерильних генотипів *in vitro* з наступним індукуванням морфогенезу традиційними для культури рослинних тканин способами.

30 Відомий найбільш перспективний найближчий аналог «Спосіб розмноження рослин селекційного матеріалу цукрових та кормових буряків в культурі *in vitro*» [3], в якому використано модифіковано базове живильне середовище за прописом Гамборга і Евелега (B5) [9]. Суть модифікації полягає у використанні янтарної кислоти у концентрації 3,3-98,3 мг/л як підсилювача дії фітогормону БАП, який вводили у концентрації 0,1 мг/л. У кращих варіантах на модифікованому середовищі при мікроклональному розмноженні раніше районowanego гібриду цукрових буряків - Білоцерківський ЧС 57 отримано в середньому відповідно 5,2 бруньки на пасаж (контроль - 4,8), а раніше районowanego сорту-популяції кормових буряків - Уманський напівцукровий - 5,9 бруньки на пасаж (контроль - 5,2). Тобто розмножували «фабричне» насіння.

35 Задача вирішується розробкою способу з використанням живильного середовища (спеціально підбраного за складом), на якому здійснюється більш ефективно введення і проліферація стійких до цвітушності чоловічостерильних форм цукрових буряків. Найближчий аналог та пропонувані способи мають спільні ознаки, що стосуються базового середовища за прописом Гамборга і Евелега (B5) [9] та культуральних умов (температури, вологості, освітлення). Пропонувані способи відрізняються від базового середовища за прописом заміщенням джерела заліза секвестрену 330-Fe - 28,0 мг/л на залізо сірчанокисле (FeSO₄×7H₂O) - 27,8 мг/л з антиоксидантом Na₂EDTA - 37,3 мг/л, а також додатково введеним

Міо-інозитолом - 100 мг/л та збільшенням вмісту джерела вуглеводів до 30 г/л сахарози. Від найближчого аналога пропонується спосіб відрізняється введенням до складу середовища вітамінів у відповідних концентраціях, а саме тіамін-НСІ (В₁) - 0,4 мг/л; піродоксин-НСІ (В₆) - 0,1 мг/л; нікотинової кислоти (РР) та аскорбінової кислоти (С) - 1,0 мг/л, а також Міо-інозиту - 100 мг/л, 10-кратно збільшеною концентрацією 6-бензиламінопурину (БАП) - 1,0 мг/л та 30 г/л сахарози.

Пропонується спосіб перевірено при мікроклональному розмноженні 49-ти генотипів чоловічостерильних простих гібридів між спорідненими інбредними лініями, що по суті є ЧС-лініями, які можна використовувати як материнські компоненти гетерозисних гібридів цукрових буряків. При цьому отримано в середньому 6,1-6,9 бруньки на пасаж (контроль - 4,2), тоді як за даними найближчого аналога 5,9 бруньки на пасаж (контроль - 4,8-5,2) було лише у кращих варіантах розмноження сорту-популяції кормових буряків Уманський напівцукровий. Впродовж року проводили здебільшого до 6 пасажів за 285-295 діб, зважаючи на зменшення коефіцієнтів розмноження при наступних (після 6) пасажів. Етап вкорінення і адаптації регенерантів залежно від розмножуваного генотипу в середньому по досліді тривав близько 80-90 діб. Розроблена технологія дає змогу отримувати до 60-100 тис. рослин-регенерантів за рік з кожного введеного експланта.

Література:

1. Головка А.Э., Довженко А.А., Глеба Ю.Ю. Генетическая трансформация сахарной свеклы: эволюция взглядов и методических подходов // Цитология и генетика. - 2005. - Т. 39, № 3. - С. 30-36.

2. Колодяжная Я.С., Дейнеко Е.В. Получение регенерантов сахарной свеклы // Онтогенез. - 2002. - Т. 33. - № 3. - С. 170-175.

3. Патент на корисну модель № 24323 від 25.06. 2007 р. (Україна). Спосіб підвищення виходу гаплоїдних рослин цукрових буряків; Заявл. 21.02.2007; Опубл. 25.06. 2007, Бюл. № 9. - 2 с.

4. Редько В.І. Ільєнко І.І., Павловська Л.Л., Білоус В.О. Методичні рекомендації по клональному мікророзмноженню цукрових буряків. - К.: ІЦБ, 1997. - 10 с.

5. Мишуткина Я.В., Гапоненко А.К., Скрябин К. Г. Микроклональное размножение сахарной свёклы in vitro II Сахарная свёкла. - 2007. - № 7. - С. 28-30.

6. Doley W.P., Saunders J.W. Hormone-free medium will support callus production and subsequent shoot regeneration from whole plant leaf explants in some sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) populations // Plant Cell Reports. - 1989. - Vol. 8, № 4. - P. 222-225.

7. Dovzhenko A. Koop HU. Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.): shoot regeneration from callus and callus protoplasts // Planta. - 2003. - Vol. 217. - P. 374-381.

8. Freytag A.H, Anand S.C., Rao-Arelli A.P., Owens L.D. An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. in vitro II Plant Cell Reports. - 1988. - Vol. 7. - P. 30-34.

9. Gamborg OL, Eveleigh DE. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // Canadian Journal of Biochemistry. - 1968. - Vol. 46. - № 5. - P. 417-421.

10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. - 1962. - Vol. 15. - P. 473-497.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прискороного розмноження стійких до цвітущості ЧС-форм цукрових буряків, що включає використання технологій in vitro, зокрема введення експлантів на живильне середовище, приготовлене з макро- і мікроелементами за прописом Гамборга і Евелега (В5), з використанням залізовмісного елемента, який відрізняється тим, що як залізовмісний елемент застосовують залізо сірчанокисле ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) - 27,8 мг/л та антиоксидант Na_2EDTA - 37,3 мг/л, при цьому додатково введено Міо-інозитол - 100 мг/л та збільшено вміст джерела вуглеводів до 30 г/л сахарози, містить фітогормон 6-бензиламінопурин (БАП) - 1,0 мг/л та вітаміни: тіамін-НСІ (В₁) - 0,4 мг/л, піродоксин-НСІ (В₆) - 0,1 мг/л; нікотинову кислоту (РР) та аскорбінову кислоту (С) - 1,0 мг/л.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601