



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **149405** (13) **U**
(51) МПК (2021.01)
A01H 4/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2021 01698</p> <p>(22) Дата подання заявки: 01.04.2021</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 18.11.2021</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 17.11.2021, Бюл.№ 46</p>	<p>(72) Винахідник(и): Роїк Микола Володимирович (UA), Ковальчук Наталія Степанівна (UA), Кукош Олена Юріївна (UA), Бех Наталія Степанівна (UA), Гумерова Наїля Рашитівна (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): ІНСТИТУТ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ КУЛЬТУР І ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ НААН, вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03110 (UA)</p>
---	--

(54) СПОСІБ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ПАВЛОВНІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ ДЛЯ ВВЕДЕННЯ В СТЕРИЛЬНУ КУЛЬТУРУ АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ І ЗАРОДКОВИХ ЛИСТОЧКІВ ІЗ ПРОРОСТКІВ НАСІННЯ

(57) Реферат:

Спосіб мікроклонального розмноження павловнії з використанням як експлантів апікальних меристем із проростків насіння для створення колекції вихідних матеріалів *in vitro* видів роду *Paulownia*, що включає використання насіння і штучних живильних середовищ в системі *in vitro*, стерилізуючих речовин гіпохлориду натрію для отримання культуральної розсади, макро- і мікросолей на основі Мурасіге-Скуга, згідно з корисною моделлю, пророщування насіння відбувається в умовах *in vivo* впродовж 14 діб, стерилізація зародкових листочків і апікальних меристем проводиться 20 % розчином гіпохлориду натрію із терміном експозиції 5 хвилин, додаткові пагони отримують на живильному середовищі Мурасіге-Скуга з включенням гормональних речовин БАП 1,5 мг/л і кінетину 1,5 мг/л, цукрози 30 000 мг/л, мезоінозиду 100 мг/л з переведенням на безгормональне середовище для відновлення росту осьового пагона, а для досягнення максимальної кількості міжвузлів і вкорінення культуральної розсади здійснюється з додаванням БАП - 0,3 мг/л, кінетину - 0,15 мг/л.

UA 149405 U

Корисна модель належить до галузі сільського господарства, а саме впровадження і розмноження нових інтродукованих видів роду *Paulownia* для розвитку біоенергетики в Україні з метою отримання колекції вихідних матеріалів для селекції і тиражування високоякісного садивного матеріалу.

5 В зв'язку з інтродукцією видів роду *Paulownia* походження із Східної Азії необхідно розробити нові високоефективні способи отримання адаптивної до природно-кліматичних умов України розсади з використанням культури *in vitro*. В останні десятиліття декілька видів і гібридів Павловнії були завезені до Східної Європи, оскільки географічний регіон є придатним для вирощування дерева для декоративних цілей і розмноження в розсадниках. Рід *Paulownia* нараховує 9 видів дерев родом із Китаю та Східної Азії. Більшість видів павловнії швидко
10 ростуть, збирання врожаю починається через 8-10 років і може продовжуватися щорічно протягом необхідного часу (Shtereva L., Vassilevska-Ivanova R., Karceva T., Kraptchev B., 2014). Деревина легка, м'яка, має чудові деревообробні та декоративні властивості (Akyildiz, M.H., Sahin, H., 2010).

15 Важливим для виробників з економічної точки зору є те, що *Paulownia* не потребує повторної посадки, оскільки відростає поросль з пнів після зрізання і цикл можна повторити кілька разів. Ці рослини також використовували для лісонасадження, для рекультивації гірничих майданчиків і вони є хорошим акумулятором цинку (Zhu, Z.H.; Chao, C.J.; Lu, X.Y.; Xiong, Y.G., 1986).

20 Крім декоративної цінності дерево ідеально підходить для виробництва біомаси. Є джерелом отримання високоякісної деревини. Через 6 років рослина може досягати 20 метрів (Pozoga M., Olewnicki D. and Jabłońska L., 2019).

Розмножувати *Paulownia* можна традиційними методами, з насіння або кореневими живцями. Насіння проростає повільно в ґрунті і має низький темп росту порівняно з кореневими живцями або здерев'янілими живцями, отриманими в культурі *in vitro* (Bergmann, B.A., Moon, H.K., 1997). Тому це головна причина того, чому пошук ефективного методу вегетативного
25 розмноження важливий з використанням як експлантів - насіння.

Культура *in vitro* пропонує багато можливостей: від простого розмноження меристемної культури до прямого соматичного ембріогенезу з міжвузлів вегетуючих рослин і листових експлантів (Ipekci, Z.; Gozukirmizi, N., 2003). Є також дані про опосередкований спосіб
30 розмноження з калусу (Radojevic, L. 1979).

Метою даних досліджень було розробити високоефективний спосіб розмноження інтродукованих видів і гібридів *Paulownia* з насіння *in vitro* для використання в селекції нових гібридів, адаптованих до природно-кліматичних умов України.

35 Загальновідомо, що успіх регенерації *in vitro* залежить від контролю морфогенезу, на який впливає кілька факторів, а саме генетичне походження, види тканин та експлантів, компоненти живильного середовища, регулятори росту та власне культурне середовище (Giri S.C., Shyamkumar B., Anjaneyulu C, 2004, Ozaslan, M., Can, C, Aytekin, T., 2005). Через дуже малу кількість інформації про використання методів депонування з насіння *in vitro* дослідження має інноваційний характер.

40 Відомий спосіб розмноження *in vitro* гібридів *Paulownia tomentosa* x *Paulownia fortunei* як сировини для виробництва відновлюваної енергії (Po'zoga M., Olewnicki D. and Jabłońska L., (2019). *In vitro* propagation protocols and variable cost comparison in commercial production for *Paulownia tomentosa* x *Paulownia fortunei* hybrid as a renewable energy source). У відомому способі регенерація рослин-гібридів *Paulownia tomentosa* x *Paulownia fortunei* відбувається
45 шляхом органогенезу експлантів міжвузлів. Експлантами для ініціації культури *in vitro* були меристеми вирізані із сегментів вузлів і верхівок пагонів однорічних рослин.

1. Досліджено різні концентрації 6-БАП, 0,2, 0,5, 1,0 мг/л і світлові умови. Найкращі результати були отримані з використанням агаризованого MS середовища з 0,5 мг/л БАП.

2. Дезінфекцію експлантів проводили в 10 % розчині NaOCl впродовж 10 хвилин, а потім промивку в стерильній воді.
50

3. В стандартних умовах освітлення вирощували два пагони з трьома вузлами на кожному, а при 70 % зменшенні освітлення вирощували 2 пагони з шістьма вузлами на кожному.

4. Укорінення було успішним з ефективністю 95 % при використанні безгормонального агаризованого середовища MS, вмістом вітамінів B1, B6, PP і 2 % цукрози

55 5. Відсоток виживання після акліматизації 90 %.

Використання агаризованих живильних середовищ, склад макро- і мікросолей за Мурасіге-Скуга і фітогормонів 6-БАП є спільними суттєвими ознаками заявленої корисної моделі і близького способу. Спільними ознаками є також:

- рН середовища = 5,8,

60 - температура - 23 °С,

- освітлення люмінесцентними лампами - 3100 Лк,
- вміст агару - 7 %,
- час субкультури становив 4 тижні;

5 додаткових пагонів і більше вузлів, придатних для культивування використана концентрація БАП і кінетину в першому пасажі, що змінювалась надалі 1,5 мг/л і змінювалась надалі до 0,3 мг/л БАП і 0,15 мг/л гібереліну, а при відомому способі зменшувалась інтенсивність освітлення до 70 %. Відмінною суттєвою ознакою, за якою досягається збільшення кількості вузлів, є не зменшення освітлення, а зміна вагової частки БАП і кінетину. Спільною суттєвою ознакою є також процес вкорінення на середовищі з вітамінами, макро- і мікросолями за Мурасіге-Скуга без застосування гормональних речовин. Умови вирощування характеризувалися 16-годинним фотоперіодом. Збільшення кількості вузлів досягалось за рахунок модифікації середовища, а саме змінювали вагову частку БАП 0,3 мг/л і кінетину 0,15 мг/л.

15 Проте даний спосіб може бути використаний для тиражування і збільшення коефіцієнта розмноження окремих зразків павловнії, але не може бути використаний для отримання культуральної розсади з насіння.

20 Як найближчий аналог обрано спосіб мікророзмноження генотипів *Paulownia* методом культури тканин з використанням в якості експлантів насіння (Shtereva L., Vassilevska-Ivanova R., Karceva T., Kraptchev B., (2014) Micropropagation of six *Paulownia* genotypes through tissue culture). Даний спосіб базується на тому, що проростання насіння відбувається на середовищі при додаванні до складу 50 мг/л гіберелінової кислоти. На середовищі з тидіазуроном гібридні лінії *P. elongata* x *P. fortunei* виявляли найвищу частоту проліферації брунькових пагонів.

25 Відмінною суттєвою ознакою є те, що дозріле насіння 6 генотипів *Paulownia*-*P. tomentosa*, гібридних ліній *P. tomentosa* x *P. fortunei*, *P. elongata* і гібридної лінії *P. elongata* x *P. fortunei* піддавали дезінфекції за трьома різними методиками *in vitro*:

- замочування в 70 % етиловому спирті на 6 хв;
- замочування в 70 % етиловому спирті на 1 хв з подальшим обертанням у 0,1 % (мас/об.) хлориду ртуті (HgCl_2) протягом 3 хв;

30 - занурення у 30 % розчин гіпохлориду натрію на 15 хвилин. Для знезараження, в розчин додавали краплі Twin-20. Після поверхневої дезінфекції насіння споліскували у стерильній дистильованій воді 3 рази по 15 хв.

Три живильні середовища для пророщування насіння було досліджено на предмет їх ефективності у сприянні проростанню та подальшому розвитку рослин павловнії. Базове живильне середовище (ЖС) (Murashige і Scoog, 1962) модифікували додаванням 30 г/л сахарози, 7 г/л бактоагару Difco і GA_3 у концентрації (20 і 50 мг/л). рН середовищ корегували до 5,6 перед автоклавуванням (20 хв при тиску 1,1 кг/см² і температурі 121 °С).

1. Працювали з чотирма повторами по 25 насінням на кожен генотип.

2. Пробірки з культурою інкубували в камері росту при 25 ± 1 °С і 60-70 % вологості у темряві протягом 4 тижнів.

40 3. Проростання оцінювали візуально, у відсотках, на 10-й, 20-й та 30-й дні після посіву.

4. Для регенерації пагонів, в якості вихідного матеріалу, використовувались сегменти з міжвузлів і верхівок пагонів, отримані з асептичних 30-денних рослин.

5. Склад ростового середовища: 3 % цукрози, 0,6 % агар-агару і з додаванням регуляторів росту в різних концентраціях BAP, TDZ та IAA (табл. 1). рН середовищ регулювали до 5,6.

45 6. Тривалість культивування 8 тижнів.

7. Інкубували в камері росту в режимі освітлення 16/8 год. при інтенсивності світла 40 мкм⁻²с⁻¹, з використанням люмінесцентних ламп холодного білого світла при температурі 22-25 °С і вологості 65-70 %.

50 Забруднення насіння є постійною проблемою, яка може поставити під сумнів розробку всіх *in vitro* методів (Cassells, A.C., 1991, Enjalric, F., Carron, M.P., Lardet, L., 1988, Leifert, C, Ritchie, J.Y., Waites, W.M., 1991). У ході цього дослідження було встановлено, що поверхнева стерилізація насіння павловнії шляхом безпосередньої обробки 30 % розчином гіпохлориту натрію (15 хв) видаляє поверхневі мікроорганізми, внаслідок чого можна отримати 98 % стерильне насіння. Проростання насіння павловнії є складним завданням, оскільки необхідні конкретні умови живлення і навколишнього середовища (Bergmann, B.A., Moon, H.K., 1997). За близького способу попередня обробка насіння стерилізуючими речовинами, такими як гіпохлорит натрію, є найбільш ефективною для попередження поверхневого забруднення стиглого насіння павловнії.

60 Відсоток проростання насіння різнився серед генотипів. Найвищий відсоток проростання для всіх генотипів був отриманий для насіння, посіяного на середовищі з додаванням 50 мг/л

GA₃ (MSG₂). Відсоток проростання у цих варіантах варіював від 4,2 % для лінії Ganter гібриду *P. tomentosa* x *P. fortunei* до 40,0 % (*P. tomentosa*). Успішне проростання насіння павлової безпосередньо пов'язане з розвитком і виживанням рослини, а тому розробка методики пророщування насіння різних видів павлової та її гібридів була важливим аспектом корисної моделі. Найбільш близький спосіб і корисна модель має спільні ознаки:

1. Використання розчину гіпохлориду для стерилізації.
2. Склад агаризованого живильного середовища включає макро- і мікросоли Мурасіге-Скуга.
3. Регенерація пагонів проводиться впродовж 30-денного терміну.
4. Для тиражування павлової в системі *in vitro* застосовані сегменти з міжвузлів і верхівок пагонів.

Найбільш близький до корисної моделі спосіб (Shtereva L., Vassilevska-Ivanova R., Karceva T., Kraptchev B., (2014) Micropropagation of six *Paulownia* genotypes through tissue culture) характеризується тим, що мікроклональне розмноження вихідних матеріалів павлової проводять завдяки поверхневій стерилізації насіння, шляхом безпосередньої обробки 30 % розчину гіпохлориду впродовж 15 хвилин, а саме проростання насіння відбувається на культуральних середовищах з додаванням 50 мг/л гіберелінова кислота. Відсоток проростання змінюється від 40,0 % до 73,0 %. При цьому вплив гіпохлориду на насіння впродовж 15 хвилин викликає негативні наслідки, що впливають на показники проростання і життєздатність культуральних пагонів. Термін проростання насіння при цьому збільшується до 30 діб. Вплив високої концентрації гібереліну 50 мг/л надалі впливає негативно на формування міжвузлів і кількість утворених пагонів. За умов близького способу проростання насіння відбувається впродовж 30 діб, а на основі корисної моделі впродовж 14 діб.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити і спростити спосіб отримання культуральної розсади із проростків насіння видів роду *Paulownia*, що дасть можливість в лабораторних умовах зменшити вплив на проростки насіння хімічної речовини гіпохлориду, завдяки тривалості стерилізації до 5 хвилин, а саме зародкових листочків і апікальних меристем пророщених в умовах *in vivo*, а вихід експериментального матеріалу в умовах *in vitro* збільшується до 90-95 % культуральних пагонів, при цьому зменшувати негативний вплив на формування міжвузлів високою концентрацією гібереліну до 50 мг/л, забезпечуючи завдяки модифікації відсоткової частки гормональних речовин 6-БАП і кінетину, збільшення пагоноутворення і формування міжвузлів впродовж трьох пасажів. Термін пророщування насіння *in vivo* зменшується до 14 діб у зрівнянні з близьким способом - 30 діб.

Новими відмінними ознаками корисної моделі від найближчого аналога є:

1. Пророщування природного насіння різних видів павлової проходить без обробки стерилізуючими речовинами, в чашках Петрі з використанням зволоженого стерильного фільтрувального паперу. Освітлення 1500 Лк, температура повітря 24-28 °С.

2. Використання для стерилізації як експлантів не насіння, а зародкових листочків і апікальних меристем проростків

3. Стерилізація розчином гіпохлориду проводим з відсотковою часткою 20 % і термін стерилізації зменшений до 5 хвилин.

4. Для досягнення регенерації додаткових пагонів в умовах першого пасажу використовують живильні середовища з додаванням БАП 1,5 мг/л і кінетину 1,5 мг/л, цукрози 30 000 мг/л, мезоінозиду 100 мг/л з ваговою часткою, що забезпечує зменшення негативного впливу калусоутворення в області ризогенезу під дією гормональних речовин, що наразі впливає на життєздатність розсади в ґрунтових умовах.

6. Використання безгормонального середовища для досягнення осьового росту пагонів

7. Використання ростового середовища з додаванням БАП 0,3 мг/л і гібереліну 0,15 мг/л для збільшення кількості вузлів в процесі клонування садивного матеріалу.

8. Індукція коренеутворення відбувається без використання ІМК (індоліл-масляної кислоти) 1,0 мг/л в умовах як безгормонального, так і в умовах ростового середовища.

9. Морфогенна реакція експлантів на частоту проліферації пазушних пагонів оцінювалася при взаємодії БАП і кінетину на відміну від застосування в близькому способі тідіазурону і ЮК (індоліл-оцтової кислоти), що значно впливає на життєздатність розсади на негативне калусоутворення в області ризогенезу.

Відмінні від найближчого аналога ознаки при взаємодії з відомими, а саме використання концентрації гіпохлориду 20 % з терміном дії 5 хвилин при стерилізації експлантів, отриманих при пророщуванні насіння в чашках Петрі дозволять отримати якісний садивний матеріал з хорошою кореневою системою для проведення акліматизації і пересадки в ґрунтові умови. Здешевити і удосконалити спосіб мікроклонального розмноження можливо без використання для стерилізації насіння тривалої дії гіпохлориду впродовж 30 хвилин та високої концентрації

гібереліну 50 мг/л, досягаючи формування додаткових пагонів при використанні в складі культуральних середовищ БАП і кінетину у співвідношенні 1,5 мг/л до 1,5 мг/л, цукрози 30 000 мг/л, мезоінозиду 100 мг/л. Зменшення концентрації до 0,3 мг/л БАП і 0,15 мг/л кінетину необхідно для подолання калусоутворення в зоні ризогенезу і досягнення високих показників в 5 ґрунтових умовах.

Ефективність нового способу мікроклонального розмноження видів роду *Paulownia* з використанням в якості експлантів зародкових листочків і апікальних меристем із проростків насіння для створення колекції *in vitro* використано на таких матеріалах:

- *Paulownia tomentosa* - природній інтродукований вид;
- *Paulownia elongata* - природній інтродукований вид;
- *Paulownia '9501'* (*Paulownia tomentosa* x *Paulownia fortunei*);
- *Paulownia 'Zo7'* (*Paulownia tomentosa* x *Paulownia fortunei* x *Paulownia kawakamii*);
- *Paulownia 'Shan thong'* (*Paulownia tomentosa* x *Paulownia fortunei*).

З отриманих результатів дослідження видно, що пророщування насіння на вологому стерильному фільтрувальному папері в чашках Петрі до формування експлантів зародкових листочків і апікальних меристем впродовж 14 діб забезпечує високу ефективність у зрівнянні із стерилізацією насіння, а саме дією стерилізуючих речовин на культуральні експланти. Слід визнати, що також доцільно використовувати в першому пасажі БАП і кінетин, що забезпечує формування додаткових бокових пагонів для всіх генотипів із наступним етапом пересадки на безгормональне середовище для активного відновлення росту головного пагона, з наступною пересадкою на ростове середовище із співвідношення гормонів БАП 0,3 мг/л і кінетину 0,15 мг/л для формування додаткових міжвузлів і підвищення ефективності мікроклонального розмноження для отримання культуральної розсади.

Заявлений спосіб мікроклонального розмноження павловнії з використанням як експлантів апікальних меристем із проростків насіння включає наступні етапи, які здійснюємо таким чином.

1. Підготовка насіння до проростання:

- Чашки Петрі стерилізують етиловим спиртом 70 %, висівають насіння на стерильний фільтрувальний папір, використовують простерилізовану в автоклаві дистильовану воду.

- Насіння висівають на фільтрувальний папір з стерильною ватою чи марлею змоченою стерильною водою. Для статистичного аналізу використовують по 100 насінин в 4 повторах.

2. Проростання насіння здійснюють в умовах *in vivo* до формування первинних зародкових листочків і апікальних меристем впродовж 14 діб. Проростання оцінюють на 7, 10 і 14 день.

3. Переносять на культуральне середовище з включенням ВАР 1,5 мг/л, кінетину 0,5 мг/л для проліферації бокових пагонів.

4. Вузлові експланти культивують на середовищі безгормональному для досягнення максимального росту осьового пагона.

5. Переносять культуральні пагони на ростове середовище із концентрацією БАЛ 0,3 мг/л і кінетину 0,15 мг/л для збільшення кількості вузлів на один експлант.

6. Вкорінення відбувається при тиражуванні на основному безгормональному, або на ростовому середовищі без використання ІМК.

Відмінні і подібні ознаки запропонованого способу мікроклонального розмноження павловнії з використанням як експлантів зародкових листочків і апікальних меристем із проростків насіння і близького способу мікророзмноження шести генотипів павловнії методом культури тканин занесено в таблицю.

Таблиця

Ознаки	Відомий спосіб	Запропонований спосіб
Об'єкт для отримання експлантів	насіння	насіння
Об'єкт для введення в культуру in vitro	насіння	зародкові листочки і апікальні меристеми
Умови пророщування насіння Фітогормони Температура Фотоперіод	in vitro, гіберелін - 50 мг/л, 22-25 °С відсутній	in vivo, без використання гормонів, 24-28 °С 16/8
Термін пророщування насіння	30 діб	14 діб
Стерилізуючі речовини відсоткова частка термін експозиції	гіпохлорид+Тwin-20 30 % 15 хвилин	гіпохлорид 20 % 5 хвилин
Гормональні речовини для проліферації додаткових пагонів і міжвузлів	тідіазурон 0,5 мг/л ІОК	БАП 1,5 мг/л кінетин 1,5 мг/л, цукроза 30000 мг/л, мезоінозид 100 мг/л
Особливості вкорінення культуральної розсади: гормони та їх відсоткова частка	ІМК від 0,5 до 1,0 мг/л	БАП - 0,3 мг/л, кінетин -0,15 мг/л

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб мікроклонального розмноження павловнії з використанням як експлантів апікальних меристем із проростків насіння для створення колекції вихідних матеріалів in vitro видів роду Paulownia, що включає використання насіння і штучних живильних середовищ в системі in vitro, стерилізуючих речовин гіпохлориду натрію для отримання культуральної розсади, макро- і мікросолей на основі Мурасіге-Скуга, який **відрізняється** тим, що пророщування насіння
- 10 відбувається в умовах in vivo впродовж 14 діб, стерилізація зародкових листочків і апікальних меристем проводиться 20 % розчином гіпохлориду натрію із терміном експозиції 5 хвилин, додаткові пагони отримують на живильному середовищі Мурасіге-Скуга з включенням гормональних речовин БАП 1,5 мг/л і кінетину 1,5 мг/л, цукрози 30 000 мг/л, мезоінозиду 100 мг/л з переведенням на безгормональне середовище для відновлення росту осьового пагона, а
- 15 для досягнення максимальної кількості міжвузлів і вкорінення культуральної розсади здійснюється з додаванням БАП - 0,3 мг/л, кінетину - 0,15 мг/л.