



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112541** (13) **U**  
(51) МПК (2016.01)  
**A01H 4/00**  
**C12N 5/04** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<p>(21) Номер заявки: <b>u 2016 05406</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>19.05.2016</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>26.12.2016</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>26.12.2016, Бюл.№ 24</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Поліщук Валентин Васильович (UA), Доронін Володимир Аркадійович (UA), Опалко Анатолій Іванович (UA), Балабак Анатолій Федорович (UA), Карпук Леся Михайлівна (UA), Поліщук Олег Васильович (UA), Кравченко Юлія Анатоліївна (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА, вул. Інститутська, 1, м. Умань, Черкаська обл., 20300 (UA)</b></p>
--	--

**(54) ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ РОЗМНОЖЕННЯ IN VITRO БАТЬКІВСЬКИХ ФОРМ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ**

**(57) Реферат:**

Живильне середовище для розмноження in vitro батьківських форм цукрових буряків, в якому використано модифіковане базове живильне середовище за прописом Гамборга і Евелега (B5). З метою підвищення якості вкорінення рослин-регенерантів цукрових буряків та прискореного розмноження батьківських форм в живильне середовище додають барвник метиленовий синій у концентрації 0,05 %, який інтенсивно забарвлює живильне середовище і знижує гальмівний вплив світла на розвиток бічних коренів і підвищує активність ІМК.

UA 112541 U



Об'єкт корисної моделі: Затемнене живильне середовище для прискореного розмноження батьківських компонентів цукрових буряків.

Область застосування: селекція і насінництво; насінництво та насіннезнавство, біотехнологія, цитологія, фізіологія, ембріологія та морфогенез рослин.

5 Суть корисної моделі: для збільшення коефіцієнтів розмноження батьківських форм цукрових буряків до модифікованого живильного середовища введено барвник метиленовий синій в концентрації 0,05 %.

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

10 Цукрові буряки *Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima* Doell належать до роду *Beta* L., 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 енергоощадних технологій є актуальною селекційною задачею. Цукрові буряки є перехреснозапильною, гетерозиготною та дворічною рослиною і для створення нових сортів та гібридів методами класичної селекції витрачається понад 15 років. Включення у селекційно-насінницький 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 мікроклінів 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 цвітущості; 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].

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 DR., 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 забезпечило успішне культивування цієї культури на всіх послідовних етапах мікроклонування.

Наразі зовсім відсутня інформація про затемнення живильних середовищ для якісного розмноження насінними зачатками чоловічостерильних простих гібридів між спорідненими інбредними лініями, а пропонувані методи лише фрагментарно описують окремі етапи збільшення світового періоду при мікроклональному розмноженні 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 цвітущості.

45 Задачею корисної моделі є розробка живильного середовища для позасезонного масового вегетативного розмноження чоловічостерильних форм цукрових буряків у лабораторії мікроклонального розмноження, а саме затемнення агаризованого живильного середовища для підвищення якості вкорінення рослин-регенерантів цукрових буряків з використанням метиленового синього барвника.

50 Відомий найближчий аналог "Спосіб прискореного розмноження стійких до цвітущості ЧС-форм цукрових буряків з використанням технологій *in vitro*" [11], в якому використано модифіковано базове живильне середовище за прописом Гамборга і Евелега (B5) [9]. Суть модифікації полягає у використанні залізовмісного елемента, який відрізняється тим, що як залізовмісний елемент застосовується залізо сірчанокисле ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) - 27,8 мг/л та антиоксидант  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -37,3 мг/л, а також додатково введено Міо-інозитол - 100 мг/л та збільшено вміст джерела вуглеводів до 30 г/л сахарози, містить фітогормон 6-бензиламінопурін (БАП) - 1,0 мг/л та вітаміни: тіамін HCl ( $\text{B}_1$ ) - 0,4 мг/л; піродоксин HCl ( $\text{B}_6$ ) - 0,1 мг/л; нікотину кислоту (PP) та аскорбінову кислоту (C) - 1,0 мг/л.

60 Задача вирішується тим, що в модифіковане базове живильне середовище за прописом Гамборга і Евелега (B5) додають барвник метиленовий синій у концентрації 0,05 %, який

інтенсивно забарвлює/затемнює агаризоване живильне середовища і тим самим знижує гальмівний вплив світла на розвиток бічних коренів і підвищує активність ІМК. Затемнення агаризованого живильного середовища з використанням метиленового синього барвника підвищує якість вкорінення рослин-регенерантів цукрових буряків. Велике значення для культивованих верхівок пагонів відіграє тривалість світлового дня. При тривалості фотоперіоду 16 годин, коефіцієнт розмноження вище, ніж при 8 і 12-годинному світловому дні. Проведене вивчення методичних питань, направлених на підвищення показників розвитку кореневої системи (довжина і кількість коренів), шляхом затемнення живильного середовища ризогенезу нейтральною речовиною - метиленовим синім барвником показало, що кращі результати спостерігались у всіх генотипів при його використанні в концентрації 0,05 %.

Для підвищення якості вкорінення рослин-регенерантів цукрових буряків нами було розроблено метод затемнення агаризованого живильного середовища з використанням метиленового синього барвника. Сама ідея затінення живильного середовища використовувалась на деяких плодово-ягідних культурах [12]. У середовище В5-А6 з ІМК було добавлено барвник метиленовий синій у концентраціях 0,01 та 0,05 %.

У схему досліду для вивчення впливу на процес ризогенезу у пробіркових рослин-регенерантів цукрових буряків затемнення живильного середовища барвником метиленовий синій включили наступні варіанти:

1. (Контроль) - середовище В5-А6-ІМК;

2. Середовище В5-А6-ІМК з додаванням барвника метиленовий синій в концентрації 0,01 %;

3. Середовище В5-А6-ІМК з додаванням барвника метиленовий синій в концентрації 0,05 %.

Слід зазначити, що з додаванням барвника метиленовий синій процес вкорінення виявився значно кращим у всіх варіантах досліду (фіг. 1). Однак, найкращі результати формування кореневої системи було відмічено у пробіркових рослин третього варіанту з додаванням барвника метиленовий синій в концентрації 0,05 %, де ризогенез виявився на рівні 78-85 %. Досить добрі показники зафіксовано і другому варіанті досліду з концентрацією барвника метиленовий синій 0,01 %, де процес коренеутворення становив 66-70 %.

Барвник метиленовий синій при концентрації 0,05 % інтенсивніше забарвлює живильне середовище, що, на нашу думку, знижує гальмівний вплив світла на розвиток бічних коренів і підвищує активність ІМК. Середній показник вкорінення мікрокоренів за ЧС-формами становив 81,5 %.

Пропонований спосіб перевірено при додаванні у середовище В5 барвника метиленовий синій в концентрації 0,01 % та 0,05 %.

Розроблена технологія дає змогу отримувати до 40-80 тис. рослин-регенерантів за рік з кожного введеного експланта.

Джерела інформації:

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

2. Колодяжная Я.С. Получение регенератов сахарной свеклы / Я.С. Колодяжная, Е.В. Дейнеко // Онтогенез. - 2002. - Том. 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. Методичні рекомендації по клональному мікророзмноженню цукрових буряків / В.І. Редько, І.І. Ільєнко, Л.Л. Павловська, В.О. Білоус. - К.: ІЦБ, 1997. - 10 с.

5. Мишуткина Я.В. Микроразмножение сахарной свёклы in vitro / Я.В. Мишуткина, А.К. Гапоненко., К.Г. Скрыбин // 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. Sugar beet (*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 // 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.

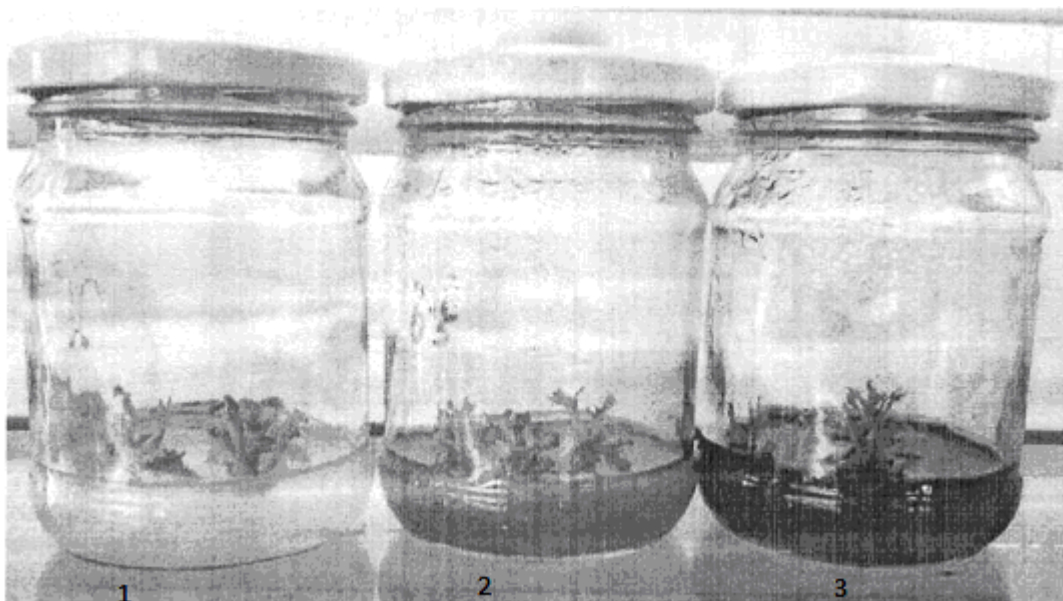
10. Murashige T., Skoog F. Are vi sed medium for apid grow thand bioassayw ith tobacco tissue culture // Physiol. Plant. - 1962. - Vol.15. - P. 473-497.

11. Патент на корисну модель № 7596 від 25.12. 2012 р. (Україна). Спосіб прискореного розмноження стійких до цвітушності ЧС - форм цукрових буряків з використанням технологій in vitro; заявл. 06.04.2012; опубл. 25.12. 2012, Бюл. № 24. - 4 с.

5 12. Расторгуев С.Л. Совершенствование селекционного процесса плодовых и ягодных растений на основе цитологических методов и культуры изолированных тканей.: Автореф. доктор, с.-х. наук.: 06.07.05 / Мичуринск-Наукоград РФ. - М., 2008. - 41 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10 Живильне середовище для розмноження in vitro батьківських форм цукрових буряків, в якому використано модифіковане базове живильне середовище за прописом Гамборга і Евелега (В5), яке **відрізняється** тим, що з метою підвищення якості вкорінення рослин-регенерантів цукрових буряків та прискореного розмноження батьківських форм в живильне середовище додають барвник метиленовий синій у концентрації 0,05 %, який інтенсивно забарвлює живильне  
15 середовище і знижує гальмівний вплив світла на розвиток бічних коренів і підвищує активність ІМК.




---

Комп'ютерна верстка Т. Вахричева

---

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

---

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