



УКРАЇНА

(19) UA (11) 55234 (13) U  
(51) МПК (2009)  
A01G 17/00  
A01G 31/00  
B82B 3/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) НАНОМОДИФІКОВАНЕ ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ  
ВИНОГРАДУ IN VITRO**

1	2																																														
<p>(21) u201006231 (22) 25.05.2010 (24) 10.12.2010 (46) 10.12.2010, Бюл.№ 23, 2010 р. (72) КОСІНОВ МИКОЛА ВАСИЛЬОВИЧ, КАПЛУ- НЕНКО ВОЛОДИМИР ГЕОРГІЙОВИЧ (73) КОСІНОВ МИКОЛА ВАСИЛЬОВИЧ, КАПЛУ- НЕНКО ВОЛОДИМИР ГЕОРГІЙОВИЧ (57) 1. Наномодифіковане поживне середовище для мікробіологічного розмноження винограду in vitro, що містить макро- і мікроелементи, вітаміни, вуглеводи, фітогормони за прописом Мурасіге і Скуга із зменшеною кількістю макроелементів і вітамінів і з додаванням в її склад індолілоцтової кислоти, яке <b>відрізняється</b> тим, що містить карбо- кислати макро- і мікроелементів, отримані взаємо- дією карбонової кислоти з наночастинками макро- і мікроелементів або з наночастинками їх оксидів, або з наночастинками їх гідроксидів. 2. Наномодифіковане поживне середовище для мікробіологічного розмноження винограду in vitro за п. 1, яке <b>відрізняється</b> тим, що має наступне співвідношення компонентів, мг/л:</p>	<table><tr><td>амоній азотнокислий</td><td>820</td></tr><tr><td>калій азотнокислий</td><td>950</td></tr><tr><td>калій фосфорнокислий одноза- міщений</td><td>68</td></tr><tr><td>борна кислота</td><td>6,0-10</td></tr><tr><td>калій йодистий</td><td>0,83</td></tr><tr><td>індолілоцтова кислота</td><td>0,1-3</td></tr><tr><td>6-бензиламінопурин (6-БАП)</td><td>0,8-1,0</td></tr><tr><td>мезоінозит</td><td>50-120</td></tr><tr><td>тіамін хлорид</td><td>0,2-5</td></tr><tr><td>піридоксин хлорид</td><td>1-5</td></tr><tr><td>нікотинова кислота</td><td>1</td></tr><tr><td>кукурудзяний крохмаль</td><td>65000-75000</td></tr><tr><td>сахароза</td><td>15000-17000</td></tr><tr><td>карбоксилат калію</td><td>100-1000</td></tr><tr><td>карбоксилат кальцію</td><td>50-600</td></tr><tr><td>карбоксилат магнію</td><td>40-500</td></tr><tr><td>карбоксилат марганцю</td><td>2-100</td></tr><tr><td>карбоксилат цинку</td><td>0,5-100</td></tr><tr><td>карбоксилат міді</td><td>0,001-0,1</td></tr><tr><td>карбоксилат заліза</td><td>3-100</td></tr><tr><td>карбоксилат кобальту</td><td>0,001-0,1</td></tr><tr><td>карбоксилат молібдену</td><td>0,001-1</td></tr><tr><td>вода</td><td>до 1 л.</td></tr></table>	амоній азотнокислий	820	калій азотнокислий	950	калій фосфорнокислий одноза- міщений	68	борна кислота	6,0-10	калій йодистий	0,83	індолілоцтова кислота	0,1-3	6-бензиламінопурин (6-БАП)	0,8-1,0	мезоінозит	50-120	тіамін хлорид	0,2-5	піридоксин хлорид	1-5	нікотинова кислота	1	кукурудзяний крохмаль	65000-75000	сахароза	15000-17000	карбоксилат калію	100-1000	карбоксилат кальцію	50-600	карбоксилат магнію	40-500	карбоксилат марганцю	2-100	карбоксилат цинку	0,5-100	карбоксилат міді	0,001-0,1	карбоксилат заліза	3-100	карбоксилат кобальту	0,001-0,1	карбоксилат молібдену	0,001-1	вода	до 1 л.
амоній азотнокислий	820																																														
калій азотнокислий	950																																														
калій фосфорнокислий одноза- міщений	68																																														
борна кислота	6,0-10																																														
калій йодистий	0,83																																														
індолілоцтова кислота	0,1-3																																														
6-бензиламінопурин (6-БАП)	0,8-1,0																																														
мезоінозит	50-120																																														
тіамін хлорид	0,2-5																																														
піридоксин хлорид	1-5																																														
нікотинова кислота	1																																														
кукурудзяний крохмаль	65000-75000																																														
сахароза	15000-17000																																														
карбоксилат калію	100-1000																																														
карбоксилат кальцію	50-600																																														
карбоксилат магнію	40-500																																														
карбоксилат марганцю	2-100																																														
карбоксилат цинку	0,5-100																																														
карбоксилат міді	0,001-0,1																																														
карбоксилат заліза	3-100																																														
карбоксилат кобальту	0,001-0,1																																														
карбоксилат молібдену	0,001-1																																														
вода	до 1 л.																																														

Корисна модель відноситься до сільського го-  
сподарства, а саме до поживних середовищ для  
виробництва елітних саджанців винограду і може  
бути застосована для вирощування безвірусного  
посадочного матеріалу винограду.

Успіх культури in vitro багато в чому визнача-  
ється умовами, в яких культивуються ізолювані  
клітини і тканини і, в першу чергу, - складом пожи-  
вних середовищ. На клональне мікророзмноження  
впливають гормони, мінеральні солі, вітаміни і  
вуглеводи. Тому поживне середовище повинне  
включати в свій склад всі необхідні рослинам мік-  
ро- і макроелементи, вітаміни, вуглеводи, різні  
фітогормони або їх синтетичні аналоги. При мікро-  
розмноженні in vitro часто використовують середо-  
вища Мурасіге і Скуга, Ніча і Ніч, Лінсмайера і Ску-  
га, Шенка і Хільдебрандта, Гамборга і Евелега,

Хеллера та інші. Зазвичай використовують сере-  
довище Мурасіге-Скуга (MS), яке містить багато  
неорганічного азоту, що стимулює процеси орга-  
ногенезу і соматичного ембріогенезу. Склад пожи-  
вного середовища необхідно підбирати для кожно-  
го виду рослин. В якості джерела вуглецевого  
живлення використовують різні вуглеводи типу  
сахарози, глюкози, фруктози, галактози [Цыренов  
В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование  
изолированных клеток и тканей растений: Учебно-  
методическое пособие. - Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003. -  
58 с.].

Відоме поживне середовище Мурасіге і Скуга,  
що складається з мікро- і макроелементів, фітого-  
рмона 6-Бензиладенін 1мг/л, з додаванням агару  
6000-14000мг/л, сахарози 30000мг/л і комплексу  
вітамінів [П.Я. Голодрига и др. МЕТОДИЧЕСКИЕ

UA (11) 55234 (13) U

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО КЛОНАЛЬНОМУ МИКРО-РАЗМНОЖЕНИЮ ВИНОГРАДА. Ялта. - 1986г. - С. 19-20].

Недоліком даного середовища є використання великої кількості дорогого агару, який буває недостатньо чистим, що призводить до зміни рН середовища. На агаризованому середовищі досить низька приживаність експлантів і недостатньо швидкий їх розвиток.

Відоме поживне середовище для мікроклонального розмноження винограду in vitro [Патент України № 47417. ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ МІКРОКЛОНІВ ВИНОГРАДУ. МПК А01G 31/00, А01G 17/00. Опубл. 15.07.2002, бюл. № 7], що містить в якості основи поживне середовище Мурасіге і Скуга, сахарозу, вітаміни за Мурасіге і Скуга, фітогормони і загусник, при цьому в якості загусника містить кукурудзяний крохмаль, а в якості фітогормонів - 6-Бензиламінопурин (6-БАП).

Недоліком відомого поживного середовища є те, що разом з необхідними макро- і мікроелементами в ньому містяться в значній кількості сульфат-, нітрат- і хлорид-іони, що знижує засвоюваність макро- і мікроелементів.

Найбільш близьким до пропонованого є модифіковане поживне середовище Мурасіге і Скуга для мікроклонального розмноження винограду in vitro [Патент Росії № 2264706. СПОСОБ ОПТИМИЗАЦИИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ВИНОГРАДА IN VITRO. МПК А01Н4/00, А01Н25/00, С12N5/00. Опубл. 27.11.2005], що містить макро- і мікроелементи, вітаміни, вуглеводи, фітогормони за прописом Мурасіге і Скуга із зменшеною кількістю макроелементів і вітамінів і з додаванням в її склад індолілоцтової кислоти і що має наступний склад, мг/л:

амоній азотнокислий - $\text{NH}_4\text{NO}_3$	138;
калій азотнокислий - $\text{KNO}_3$	950;
магній сірчаноокислий 7-водний - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185;
калій фосфорнокислий однозамісний - $\text{KH}_2\text{PO}_4$	68;
кальцій хлористий 2-водний - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	296;
борна кислота - $\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2;
марганець сірчаноокислий 4-водний - $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3;
мідь сірчаноокисла 5-водна - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025;
кобальт хлористий 6-водний - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025;
цинк сірчаноокислий 4-водний - $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6;
натрій молібденовокислий 2-водний - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25;
калій йодистий - КJ	0,86;
залізо сірчаноокисле 7-водне - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8;
трилон-Б - $\text{Na}_2\text{EDTA}$	37,3;
мезоінозит	50;
тіамін HCl	0,2;
індолілоцтова кислота (IOK)	0,1-3;
вода	до 1л.

Недоліком відомого поживного середовища є те, що разом з необхідними макро- і мікроелементами в ньому містяться в значній кількості сульфат-, нітрат- і хлорид-іони, що знижує засвоюваність макро- і мікроелементів.

В основу корисної моделі поставлена задача підвищення ефективності поживного середовища.

Запропоноване, як і відоме поживне середовище для мікроклонального розмноження винограду in vitro містить макро- і мікроелементи, вітаміни, вуглеводи, фітогормони за прописом Мурасіге і Скуга із зменшеною кількістю макроелементів і вітамінів і з додаванням в її склад індолілоцтової кислоти і, відповідно до цієї пропозиції, містить карбоксилати макро- і мікроелементів, отримані взаємодією карбонової кислоти з наночастинками макро- і мікроелементів, або з наночастинками їх оксидів, або з наночастинками їх гідроксидів. При цьому має наступне співвідношення компонентів, мг/л:

Амоній азотнокислий	820
Калій азотнокислий	950
Калій фосфорнокислий однозамісний	68
Борна кислота	6,0-10
Калій йодистий	0,83
Індолілоцтова кислота	0,1-3
6-Бензиламінопурин (6-БАП)	0,8-1,0
Мезоінозит	50-120
Тіамін хлорид	0,2-5
Піридоксин хлорид	1-5
Нікотинова кислота	1
Кукурудзяний крохмаль	65000-75000
Сахароза	15000-17000
Карбоксилат калію	100-1000
Карбоксилат кальцію	50-600
Карбоксилат магнію	40-500
Карбоксилат марганцю	2-100
Карбоксилат цинку	0,5-100
Карбоксилат міді	0,001-0,1
Карбоксилат заліза	3-100
Карбоксилат кобальту	0,001-0,1
Карбоксилат молібдену	0,001-1
Вода	до 1л

Наномодифіковане поживне середовище для мікроклонального розмноження винограду in vitro містить карбоксилати макро- і мікроелементів, отримані взаємодією карбонової кислоти з наночастинками макро- і мікроелементів, або з наночастинками їх оксидів, або з наночастинками їх гідроксидів. Це підвищує ефективність поживного середовища за рахунок зменшення кількості нітрат-сульфат- і хлорид-іонів без зниження кількості необхідних макро- і мікроелементів.

Наномодифіковане поживне середовище для мікроклонального розмноження винограду in vitro має наступне співвідношення компонентів, мг/л:

Амоній азотнокислий	820
Калій азотнокислий	950
Калій фосфорнокислий однозамісний	68
Борна кислота	6,0-10
Калій йодистий	0,83
Індолілоцтова кислота	0,1-3
6-Бензиламінопурин (6-БАП)	0,8-1,0

Мезоїнозит	50-120
Тіамін хлорид	0,2-5
Піридоксин хлорид	1-5
Нікотинова кислота	1
Кукурудзяний крохмаль	65000-75000
Сахароза	15000-17000
Карбоксилат калію	100-1000
Карбоксилат кальцію	50-600
Карбоксилат магнію	40-500
Карбоксилат марганцю	2-100
Карбоксилат цинку	0,5-100
Карбоксилат міді	0,001-0,1
Карбоксилат заліза	3-100
Карбоксилат кобальту	0,001-0,1
Карбоксилат молібдену	0,001-1
Вода	до 1л

При вмісті компонентів менше нижніх меж знижується ефективність поживного середовища. Вміст компонентів більше верхніх меж призводить до його дорожчання і до перевищення кількості необхідних макро- і мікроелементів, що також знижує ефективність поживного середовища.

Приклад. Наномодифіковане поживне середовище для мікроклонального розмноження винограду *in vitro* отримують таким чином. Спочатку отримують колоїдний розчин наночастинок макро- і мікроелементів. Колоїдний розчин наночастинок отримують, наприклад, електроімпульсною абляцією металевих гранул у воді [див. патент України № 37412. СПОСІБ ОТРИМАННЯ ЕКОЛОГІЧНО ЧИСТИХ НАНОЧАСТИНОК ЕЛЕКТРОПРОВІДНИХ МАТЕРІАЛІВ «ЕЛЕКТРОІМПУЛЬСНА АБЛЯЦІЯ» МПК В01J 2/02. Опубл. 25.11.2008. Бюл. № 22]. Отримані нано- і мікрочастинки володіють високою екологічною чистотою і не містять домішок хімічних речовин.

Потім отримують карбоксилати макро- і мікроелементів. Для цього у водний колоїдний розчин,

що містить наночастинок металу, оксиду металу, гідроксиду металу додають карбонову кислоту, наприклад, лимонну кислоту. За рахунок високої хімічної активності наночастинок здійснюється утворення карбоксилатів металів. Оскільки до числа реагентів не входять ніякі інші речовини, а наночастинок практично повністю беруть участь в хімічній реакції утворення солей карбонових кислот, то утворюється продукт високої екологічної чистоти [див. патент України на корисну модель № 39397. НАДЧИСТИЙ ВОДНИЙ РОЗЧИН НАНОКАРБОКСИЛАТУ МЕТАЛУ. МПК (2006): C07C 51/41, C07F 5/00, C07F 15/00. Опубл. 25.02.2009, бюл. № 4/2009].

Потім готують поживне середовище, для чого в реактор з мішалкою вносять розчини, дотримуючи наступного порядку:

- розчин солей макроелементів;
- карбоксилати макроелементів;
- карбоксилати мікроелементів;
- розчин сахарози;
- вітаміни, фітогормони;
- крохмальний розчин.

Для приготування середовища готують концентрат макроелементів, при цьому кожна з макро-солей розчиняється послідовно в невеликій кількості води. Потім до отриманої суміші додають карбоксилати макроелементів, карбоксилати мікроелементів, сахарозу, вітаміни, фітогормони і всі ретельно перемішують. Після цього проводять желювання кукурудзяним крохмалем. Розчин доводять дистильованою водою до 1 л. Суміші ретельно перемішують протягом 5 хвилин, потім 1-2 хвилини ведуть вертикальне перемішування шляхом барботажу при включеній мішалці. Відбирають контрольні проби для визначення рН середовища. рН середовища складає 5,6-5,8.