



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118712** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
A01C 1/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 01446	(72) Винахідник(и): Шевага Галина Миколаївна (UA), Гунчак Володимир Михайлович (UA), Зеля Аврелія Георгіївна (UA), Бундук Юлія Михайлівна (UA), Гинга Лариса Танасіївна (UA), Олійник Тетяна Миколаївна (UA), Кирик Микола Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 16.02.2017	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 28.08.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 28.08.2017, Бюл.№ 16	(73) Власник(и): УКРАЇНСЬКА НАУКОВО-ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ КАРАНТИНУ РОСЛИН ІЗР НААНУ, с. Бояни, Новоселицький р-н, Чернівецька обл., 60321 (UA)

(54) СПОСІБ ОПТИМІЗАЦІЇ СКЛАДУ ЖЕЛЮЮЧИХ АГЕНТІВ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ МІКРОРОСЛИН КАРТОПЛІ, ОТРИМАНИХ В УМОВАХ IN VITRO

(57) Реферат:

Спосіб оптимізації складу желюючих агентів на регенерацію мікророслин картоплі, отриманих в умовах in vitro, що включає живильне середовище Мурасіге-Скуга на основі агару (8 г/л), причому використовують живильне середовище Мурасіге-Скуга, модифіковане із кукурудзяним крохмалем (80 г/л), в якому проводять культивування живців картоплі з перспективою використання у біотехнології рослин, як значно дешевший та ефективніший за агар желеутворювач живильного середовища для культури in vitro.

UA 118712 U

Корисна модель належить до галузі сільського господарства, а саме біотехнології клонального мікророзмноження рослин картоплі.

У сучасних умовах сільськогосподарського виробництва насінництво картоплі вимагає прискореного розмноження нових сортів на основі насіння високих категорій. Значним резервом для формування високопродуктивного насіння є використання оздоровленого *in vitro* вихідного матеріалу та використання різних методів прискореного розмноження. У практиці зарекомендувала себе технологія клонального мікророзмноження картоплі на основі культивування мериклональних рослин на живильних середовищах *in vitro*. Штучні живильні середовища для культивування *in vitro* рослинних клітин, тканин та органів є багатокомпонентними сумішами, які містять мінеральні та органічні сполуки різної хімічної природи. Вони забезпечують об'єкти, що культивуються трофічними і фізіологічно активними речовинами на фоні оптимального потенціалу рН [1,2].

У культурі *in vitro* картоплі використовують тверді живильні середовища, виготовлені на основі агару - суміш високомолекулярних полісахаридів з екстрактів декількох різновидів червоних водоростей, який складається із двох полісахаридів - агарози і агаропектину. Використовується для загущування рідких живильних середовищ, надаючи їм желеподібного стану. В агарі можуть міститись хлориди, сульфати, іони кальцію, магнію і заліза. Концентрація домішок змінюється залежно від джерела морських водоростей і методу виробництва агару. У продажу є очищені агари, які цілком придатні для культури тканини рослин. Виготовляють агар за кордоном, а із країн ближнього зарубіжжя - в Прибалтиці та Росії (із усіх країн близького зарубіжжя тільки в цих країнах є необхідні для його виробництва ресурси сировини). Вартість агару, що ввозиться в Україну, дуже висока, та агароїд, що виробляється в Україні, суттєво відрізняється від агару за хімічним складом і не придатний для застосування в культурі *in vitro* [3-8].

Згаданий спосіб має такі недоліки:

1. Вони є трудомісткими та дорогівартісними.
2. Потребує високого ступеня очищення.
3. Травмування рослини при пересаджуванні на адаптацію.
4. Зниження коефіцієнта клонального мікророзмноження.
5. Сприяє вітрифікації клональних мікророслин.

В основу корисної моделі поставлено задачу: розробити спосіб оптимізації складу желуючих агентів на регенерацію клональних мікророслин картоплі.

Поставлена задача вирішується тим:

1. Запропонований спосіб дозволяє здешевити собівартість із заміном агару.
2. Не потребує очищення від домішок.
3. Підвищує коефіцієнт розмноження в 3 рази.
4. Покращує регенерацію рослин при клональному мікророзмноженні.
5. Зберігає стабільну желеподібну структуру без висихання та розтріскування впродовж усього періоду культивування.

Отже, спосіб, що заявляється, відповідає критерію корисної моделі "новизна" та "суттєві відміни".

ПРИКЛАДИ ЗДІЙСНЕННЯ СПОСОБІВ

Приклад 1.

Для дослідницької роботи використовували живці клональних мікророслин, які культивували на середовищі Мурасіге-Скуга [9] на основі агару (8 г/л). Живильне середовище стерилізували шляхом автоклавування під тиском 1 атм. упродовж 15-20 хв., роботу проводили у стерильних умовах ламінарного боксу. При цьому використовували сорти картоплі української селекції: Слов'янка, Поліська рожева. Після висаджування, пробірки з рослинами картоплі переносили у культоральну кімнату і вирощували за температури повітря 22-24 °С, відносній вологості 60-80 %, освітленні 4 клк, світловому періоді 16 годин. Після того як регенеранти утворювали 5-6 вузлів їх знову живцювали і процес регенерації повторювався. У процесі досліджень проводили візуальні спостереження за розвитком живців, періодом ризогенезу (початок утворення коренів, доба) та біометричні обліки розвитку. Спостереження і обробку експериментальних даних проводили через кожні 40 діб [10,11]. Отримані результати представлено в додатку 1, таблиця 1.

Приклад 2.

Як і у вищеописаному прикладі використовували живці клональних мікророслин, які культивували на середовищі Мурасіге-Скуга [9] на основі крохмалів (кукурудзяного, картопляного, пшеничного) з концентрацією від 50 мг/л до 150 мг/л. Концентрацію крохмалів встановлювали експериментальним шляхом у процесі проведення досліджень.

У результаті проведеної науково-дослідницької роботи встановлено, що найбільш оптимальною концентрацією крохмалів для культивування клональних мікророслин картоплі виявилась концентрація 80 г/л. За умов застосування більш високих концентрацій утворювались доволі щільні середовища, що ускладнювало процес висаджування мікроживців, до того ж частина їх ламалася і вибраковувалась. У той же час, середовище з концентрацією крохмалю 50 мг/л виявилось рідким і не забезпечувало фіксування мікроживців у середовищі, що робило його непридатним для використання при клональному мікророзмноженні.

Встановлено, що для досягнення високого рівня приживлюваності найкращим було живильне середовище Мурашіге-Скуга модифіковане із кукурудзяним крохмалем, яке сприяло збереженню більшої кількості життєздатних рослин мікроживців картоплі в культурі *in vitro* (додаток 1).

Так, кількість клональних мікророслин сорту Слов'янка, придатних для подальшого розмноження становила 95 %, для сорту Поліська рожева відповідно 90 %. На живильних середовищах з картопляним та пшеничним крохмалем кількість життєздатних рослин складала 80-85 % у сорту Слов'янка та 70-75 % у сорту Поліська рожева. У варіантах із застосуванням агару кількість життєздатних мікроклонів була на рівні 71-73 %. Розвиток живців на середовищах з крохмалю перші тижні після висаджування відбувався швидше, ніж на контрольних середовищах з агаром. Так, якщо у контролі початок розвитку спостерігався вже лише на 5-10 добу, то на експериментальному кукурудзяному середовищі на 3-7 добу (додаток 2).

На середовищі з агаром відбувалась затримка розвитку кореневої системи у порівнянні із середовищами з желуючими агентами. Якщо на середовищах з кукурудзяним крохмалем початок ризогенезу у мікроживців картоплі спостерігався на 3-7 добу після висаджування, то на середовищах з агаром тільки на 6-9 добу. У процесі культивування розвиток мікроживців на середовищі з крохмалю прискорювався, які були придатні для подальшого розмноження.

При аналізі біометричних показників було відмічено пряму їх залежність від типу живильного середовища на якому культивували рослини (додаток 3).

Найвищі клональні мікророслини сорту Слов'янка формувалися на живильному середовищі з желуванням кукурудзяним крохмалем: висота зеленого приросту дорівнювала 19,23 см, що на 7,21 см більше, ніж мінімальне значення на середовищі з агаром. За довжиною міжвузлів на основному пагоні між мікророслинами, які культивували на живильних середовищах з кукурудзяним, картопляним та пшеничним агаром вірогідної різниці не було.

Виходячи з результатів проведених досліджень, можна зробити висновок, що за рахунок використання кукурудзяного крохмалю, як желеутворювача замість агару, відбувається підвищення якості клональних мікророслин картоплі та здешевлення технології, оскільки у стандартній технології за використання агару на 1 л живильного середовища витрачається 8 г агару вартістю 9,12 грн. У розробленій нами технології можливе використання крохмалю, за якої на 1 л витрачається 80 г крохмалю вартістю 1,6 грн. Таким чином, відбувається п'ятикратне здешевлення технології за рахунок використання економічної схеми витрат (9,12 грн. / 1,6 грн. = 5,6).

ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

1. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацка. - К., Наукова думка, 2005. - 528 с.

2. Методичні рекомендації. Оздоровлення сортів картоплі методом культури апікальних меристем. / [Т.М. Олійник, К.А. Слободян, О.О. Шевченко та ін.]: Ін-т картоплярства НААН. - Немішаєве; ТОВ "КВІЦ", 2012. - 28 с.

3. Біотехнологія. [Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Коломієць Ю.В., Антіпов І.А.] - Київ: ТОВ "Аграр Медіа Груп", 2013. - 350 с.

4. Упадышев Т.М. Оздоровление и размножение нетрадиционных ягодных и плодовых культур / Т.М. Упадышев // Садоводство и виноградарство. - 1996. - №4. - С. 15-17.

5. Gonzães M., Hernândes I., Jouve N. Analysis of anther culture response in hexaploid triticale // Plant Breeding. - 1997. - V. 116. - P. 302-304.

6. Duarte de Oliveira P.P. Controle de oxidacao no cultivo in vitro de embriões de estrelícia (Strelitzia reginae) / P.P. Duarte de Oliveira, P. Renato, P. Moacir. // Rev. bras. horticult. ornam. - 2007. - V. 13, № 2. - P. 107-112.

7. Білинська О.В. Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози (мутації *ae i su2*) у складі штучного живильного середовища для одержання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro* / О.В. Білинська // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: біологія. - 2010. - Вип. 11 (№ 905). - С. 60-65.

8. Гончарова С.А. Вивчення впливу заміників агар-агару на гідратацію тканин у рослин-регенерантів колекційних сорторазків огірка / С.А. Гончарова // Генетичні ресурси рослин. - 2004. - № 1. – С. 47-50.

9. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Planta. – 1983 - № 157-S. 385-391.

10. Калинин Ф.Л. Технология микрклонального размножения растений. Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Саринацкая. - К.: Наук. думка, 1992. - 290 с.

11. Мельник П.О. Оптимізація середовища для культивування рослин картоплі / П.О. Мельник, Г.М. Шевага // Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей: Тезисы докладов международной научно-практической конференции 11-14 сентября 2007 г. - Одесса, 2007. - С. 53.

Таблица 1

Вплив крохмалів на ініціацію стебло- і ризогенезу у мікроживців картоплі в культурі in vitro

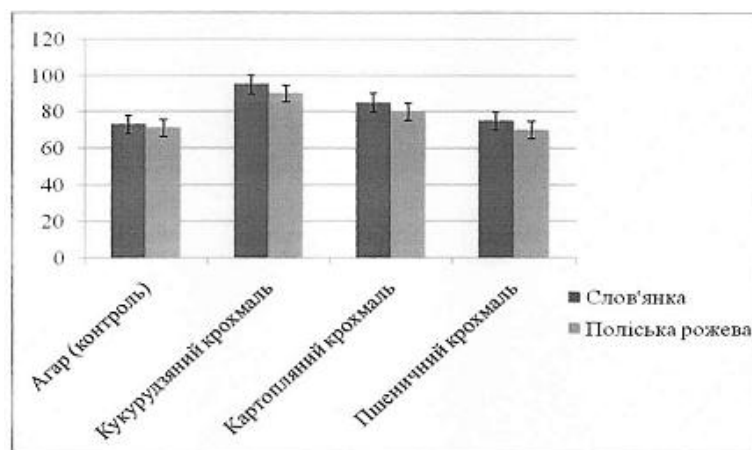
Сорт картоплі	Желюючі агенти							
	Агар (контроль)		Кукурудзяний крохмаль		Картопляний крохмаль		Пшеничний крохмаль	
	Початок, доба							
	стебло-генезу	ризогенезу	стебло-генезу	ризогенезу	стебло-генезу	ризогенезу	стебло-генезу	ризогенезу
Слов'янка	5-6	6-9	3-5	3-7	4-5	7-8	4-5	7-9
Поліська рожева	6-7	7-8	4-5	6-7	5-6	6-7	6-7	7-8

15

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оптимізації складу желюючих агентів на регенерацію мікророслин картоплі, отриманих в умовах in vitro, що включає живильне середовище Мурасіге-Скуга на основі агару (8 г/л), який **відрізняється** тим, що використовують живильне середовище Мурасіге-Скуга, модифіковане із кукурудзяним крохмалем (80 г/л), в якому проводять культивування живців картоплі з перспективою використання у біотехнології рослин, як значно дешевший та ефективніший за агар желеутворювач живильного середовища для культури in vitro.

20



Фіг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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