

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 136225

СПОСІБ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ ЛАВАНДИ  
ВУЗЬКОЛИСТОЇ В КУЛЬТУРІ IN VITRO

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи  
і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні  
моделі 12.08.2019.

Заступник Міністра економічного  
розвитку і торгівлі України

Ю.П. Бровченко



(21) Номер заявки: **u 2019 01855**

(22) Дата подання заявки: **25.02.2019**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **12.08.2019**

(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **12.08.2019, Бюл. № 15**

(72) Винахідник:  
**Манушкіна Тетяна  
Миколаївна, UA**

(73) Власник:  
**МИКОЛАЇВСЬКИЙ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ,  
вул. Георгія Гонгадзе, 9, м.  
Миколаїв, 54020, UA**

(54) Назва корисної моделі:

**СПОСІБ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ ЛАВАНДИ ВУЗЬКОЛИСТОЇ В КУЛЬТУРІ IN VITRO**

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб клонального мікророзмноження лаванди вузьколистої в культурі in vitro, який включає біотехнологічні прийоми на трьох етапах культивування, який відрізняється тим, що на I та II етапах культивування проводять на живильному середовищі Мурасиге і Скуга (МС), доповненому кінетином (1,0 мг/л) та пібереловою кислотою (1,0 мг/л); на III етапі до живильного середовища ½ МС додають індолілоцтову кислоту (ІОцК) (0,5 мг/л) та індолілолійну кислоту (ІОлК) (0,5 мг/л); на IV етапі адаптація рослин до умов in vivo проводять на субстраті торф:перліт:ґрунт:пісок у співвідношенні 2:1:1:1.

Державне підприємство  
«Український інститут інтелектуальної власності»  
(Укрпатент)

Оригіналом цього документа є електронний документ з відповідними реквізитами, у тому числі з накладеним електронним цифровим підписом уповноваженої особи Міністерства економічного розвитку і торгівлі України та сформованою позначкою часу.

Ідентифікатор електронного документа 2390070819.

Для отримання оригіналу документа необхідно:

1. Зайти до ІДС «Стан діловодства за заявками на винаходи та корисні моделі», яка розташована на сторінці <http://base.uipv.org/searchInvStat/>.
2. Виконати пошук за номером заявки.
3. У розділі «Документи Укрпатенту» поруч з реєстраційним номером документа натиснути кнопку «Завантажити оригінал» та ввести ідентифікатор електронного документа.

Ідентичний за документарною інформацією та реквізитами паперовий примірник цього документа містить 2 арк., які пронумеровані та прошиті металевими люверсами.

Уповноважена особа Укрпатенту

І.Є. Матусевич

12.08.2019





МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **136225** (13) **U**  
(51) МПК (2019.01)  
**A01B 79/00**

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

(21) Номер заявки: <b>u 2019 01855</b>	(72) Винахідник(и): <b>Манушкіна Тетяна Миколаївна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>25.02.2019</b>	(73) Власник(и): <b>МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Георгія Гонгадзе, 9, м. Миколаїв, 54020 (UA)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>12.08.2019</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>12.08.2019, Бюл.№ 15</b>	

**(54) СПОСІБ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ ЛАВАНДИ ВУЗЬКОЛИСТОЇ В КУЛЬТУРІ IN VITRO**

**(57) Реферат:**

Спосіб клонального мікророзмноження лаванди вузьколистої в культурі in vitro який включає біотехнологічні прийоми на трьох етапах культивування, причому на I та II етапах культивування проводять на живильному середовищі Мурасиге і Скуга (МС), доповненому кінетином (1,0 мг/л) та гібереловою кислотою (1,0 мг/л); на III етапі до живильного середовища ½ МС додають індолілоцтову кислоту (ІОцК) (0,5 мг/л) та індолілолійну кислоту (ІОлК) (0,5 мг/л); на IV етапі адаптація рослин до умов in vivo проводять на субстраті торф:перліт:ґрунт:пісок у співвідношенні 2:1:1:1.

UA 136225 U

Корисна модель належить до галузі сільського господарства, зокрема до технології розмноження та одержання садивного матеріалу сільськогосподарських культур.

Відомий спосіб клонального мікророзмноження лаванди, який включає розробку прийомів культивування на трьох етапах клонального мікророзмноження [1].

5 Недоліками способу є те, що не розроблено систему клонального мікророзмноження лаванди, відсутній етап адаптації мікророслин до умов *in vivo*.

В основу корисної моделі поставлено задачу - визначення оптимального поєднання прийомів клонального мікророзмноження з метою отримання найбільшої кількості саджанців.

10 Поставлена задача вирішується тим, що впровадження біотехнологічних прийомів забезпечує оптимальне поєднання умов клонального мікророзмноження лаванди в культурі *in vitro*: на I та II етапах культивування проводиться на живильному середовищі Мурасиге і Скуга (МС), доповненому кінетином (1,0 мг/л) та гібереловою кислотою (1,0 мг/л); на III етапі до живильного середовища  $\frac{1}{2}$  МС додається індолілоцтова кислота (ІОцК) (0,5 мг/л) та індолілолійна кислота (ІОлК) (0,5 мг/л); на IV етапі адаптація рослин до умов *in vivo* проводиться на субстраті торф:перліт:ґрунт: пісок у співвідношенні 2:1:1:1.

15 Лабораторні дослідження з розробки прийомів культивування на чотирьох етапах клонального мікророзмноження проводились у лабораторії клонального мікророзмноження Інституту ефіроолійних і лікарських рослин УААН.

20 Матеріалом для проведення досліджень служили рослини лаванди вузьколистої *Lavandula angustifolia* Mill, сортів Степова і Синєва та перспективних селекційних зразків 337-9 і 310-17.

Донорні рослини лаванди вирощували в умовах закритого ґрунту в вегетаційних посудинах. Як експланти використовували апікальні меристеми висотою 0,7 мм, які виділяли з верхівкових та пазушних бруньок однорічних пагонів. При проведенні експериментальної роботи застосовували загальноприйняті методи в культурі ізольованих тканин рослин.

25 Для стерилізації фрагменти пагонів з бруньками обробляли 70 %-ним етанолом (40 сек.) та 50 %-ним розчином препарату "Брадофен" (12 хв.) і тричі промивали в стерильній дистильованій воді. Асептичну роботу проводили в ламінарному боксі КПГ-1. Меристеми виділяли під біокулярним мікроскопом МБС-9 при 16-кратному збільшенні.

30 Для культивування ізольованих меристем та мікроживців використовували як базове живильне середовище МС. Кислотність середовища доводили до рН 5,5-5,6 за допомогою 0,1н НСІ або 0,1н КОН перед автоклавуванням. Живильне середовище розливали в хімічні пробірки діаметром 15 мм по 10 мл і автоклаували при температурі 120 °С, тиску 0,8 атм. впродовж 20 хв.

35 На кожному з етапів клонального мікророзмноження модифікували гормональний склад живильного середовища відповідно до необхідного шляху морфогенезу та вивчали вплив ендогенних і екзогенних факторів на ефективність культивування лаванди *in vitro*.

40 На етапі введення апікальні меристеми культивували на рідких і агаризованих живильних середовищах. До складу агаризованих середовищ додавали агар в концентрації 0,7 % і меристеми висаджували на поверхню середовища. При використанні рідких середовищ меристеми розміщували на містках з фільтрувального паперу.

45 На етапах власне мікророзмноження і укорінення мікропагонів *in vitro* основний пагін одержаних меристемних рослин розрізали на мікроживці довжиною 4-8 мм з однією парою листків, а також відділяли додаткові мікропагони довжиною 4-8 мм з однією парою розгорнутих листків. Одержані мікроживці культивували на агаризованих живильних середовищах таким чином, щоб нижня частина мікроживця була занурена в живильне середовище.

Експланти культивували в термостатованій культуральній кімнаті при температурі 25-26 °С, освітленості 2-3 клк, фотоперіоді 16 годин, відносній вологості повітря 60-70 %. Тривалість циклу культивування визначали експериментально, залежно від інтенсивності розвитку рослин-регенерантів.

50 Для адаптації до умов *in vivo* відбирали добре розвинені мікророслини, які висаджували в посудини об'ємом 200 мл зі стерильними субстратами різного складу. Висаджені рослини розміщували під плівковим укриттям на 14 днів і утримували при температурі 18-20 °С. Рослини, що пройшли адаптацію, культивували в умовах закритого ґрунту.

55 У процесі досліджень вивчали особливості морфогенезу ізольованих апікальних меристем лаванди в культурі *in vitro*, визначали вплив ендо- та екзогенних факторів і підбирали оптимальні умови для розвитку експлантів на чотирьох етапах клонального мікророзмноження: ізолювання експланту, введення і ініціація його розвитку в умовах *in vitro*; власне мікророзмноження; укорінення мікропагонів; адаптація мікророслин до умов *in vivo*.

60 Стерилізацію експлантів проводили послідовним витриманням фрагментів пагонів у 70 %-ному етанолі 40 секунд, 50 %-ному розчині препарату "Брадофен" 12 хвилин, і тричі промивали

в автоклавованій дистильованій воді. Дослідження показали, що такий спосіб стерилізації забезпечував вихід стерильних меристем на рівні 100,0 %, приживлюваність меристем складала 96-100 %.

5 На етапі введення меристем лаванди в культуру *in vitro* оптимальним визначено живильне середовище МС, доповнене кінетином (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л) - МС5, на якому частота регенерації складала 100 %, розвивався основний пагін висотою 19,33-42,98 мм з 5-8 парами листків і 3,03-7,81 шт. додаткових пагонів.

10 Поряд із загальними особливостями морфогенезу меристем лаванди в культурі *in vitro* виявлено значні відмінності між досліджуваними генотипами за кількісними показниками основних біометричних параметрів мікророслин (Табл. 1).

Таблиця 1

Вплив генотипу на розвиток меристемних рослин лаванди на першому етапі клонального мікророзмноження (середовище МС5, 50 діб культивування)

Сорт, зразок	Частота регенерації, %	Висота основного пагону, мм	Кількість пар листків, шт.	Частота множинного пагоноутворення, %	Кількість додаткових пагонів, шт.	Коефіцієнт розмноження
Синєва	100,0	19,33±2,05	4,64±0,58	100,0	7,81±0,87	1:12,42
Степова	100,0	42,98±4,23	7,03±0,82	100,0	3,03±0,48	1:10,06
337-9	95,0±0,0	26,37±3,67	4,39±0,32	95,0±5,0	4,61±0,40	1:8,55
310-17	90,0±5,0	11,33±1,78	3,61±0,21	85,0±0,0	4,62±0,72	1:7,18

15 Виявлені відмінності в рості основного та додаткових пагонів на першому етапі клонального мікророзмноження зумовлювали різні коефіцієнти розмноження: у сорту Синєва - 1:12,42, у сорту Степова - 1:10,06, у зразку 337-9-1:8,55, у зразку 310-17-1:7,18. Найкращим строком відбору експлантів є квітень та жовтень. Не виявлено залежності регенераційних процесів від розміщення меристем на пагоні донорної рослини.

20 На етапі власне мікророзмноження лаванди як експланти використовували мікроживці, які одержували при розділенні основного пагону меристемних рослин на фрагменти довжиною 4-8 мм з однією парою листків та відокремленні додаткових пагонів довжиною 4-8 мм з однією парою розгорнутих листків. Найбільш оптимальний розвиток мікропагонів відбувався на живильному середовищі МС5.

25 Для одержання максимальної кількості мериклонів при подальшому субкультивуванні поєднували мікроживцювання основних пагонів та відділення додаткових пагонів. Генотипічні особливості сортів та зразків обумовлювали різну інтенсивність ростових процесів і, як наслідок, різні коефіцієнти розмноження: у сорту Синєва - 1:11,12, у сорту Степова - 10,42, у зразку 337-9-1:11,83, у зразку 310-17-1:6,72.

30 Вивчення особливостей розвитку меристемних рослин лаванди протягом десяти пасажів показало, що вони характеризуються високою регенераційною здатністю протягом всього терміну культивування *in vitro*. Частота регенерації у сортів Синєва, Степова і зразка 337-9 залишалася стабільно високою до 10-го пасажу і складала 80,0-100,0 %. Найнижчою регенераційною здатністю відрізнявся зразок 310-17, у якого, починаючи з 5-го пасажу, частота регенерації пагонів знижувалася до 72,5-47,5 %. При цьому у досліджуваних генотипів не спостерігалось різних коливань коефіцієнта розмноження в різних пасажах, і цей показник 35 зберігався на стабільному рівні у сорту Синєва і зразку 337-9 до 8-го пасажу (1:7,77-12,45 і 1:7,60-11,85 відповідно), у сорту Степова до 7-го пасажу (1:6,19-11,81), у зразку 310-17 - до 6-го пасажу (1:6,14-8,37) (Табл. 2).

40 Таким чином, при клональному мікророзмноженні лаванди доцільно проводити 6-8 пасажів залежно від генотипу. В середньому за рік можна провести етап введення, чотири пасажі на етапі власне мікророзмноження, етапи укорінення мікропагонів і адаптації до умов *in vivo*. Сумарний вихід саджанців з однієї меристеми за рік складав: у сорту Синєва - 208 тис. шт., у сорту Степова - 119 тис. шт., у зразку 337-9-149 тис. шт., у зразку 310-17-23 тис. шт.

Коефіцієнти розмноження меристемних рослин лаванди залежно від кількості пасажів

Пасаж	Сорт, зразок							
	Синєва		Степова		337-9		310-17	
	за пасаж	всього	за пасаж	всього	за пасаж	всього	за пасаж	всього
0 (введення)	1:12,45	12	1:10,06	10	1:8,55	9	1:7,18	7
1	1:11,12	138	1:10,42	105	1:11,83	101	1:6,72	48
2	1:11,97	1657	1:11,81	1238	1:11,85	1199	1:7,62	368
3	1:10,87	18013	1:9,69	11996	1:11,71	14035	1:7,57	2783
4	1:11,59	208776	1:9,95	119361	1:10,62	149056	1:8,37	23295
5	1:11,61	2423893	1:8,13	970405	1:8,21	1223753	1:7,44	173318
6	1:9,52	23075463	1:6,19	6006807	1:7,60	9300522	1:6,14	1064171
7	1:10,36	239061804	1:8,11	48715202	1:10,92	101561711	1:3,78	4022566
8	1:7,77	1857510218	1:5,34	260139176	1:9,24	938430210	1:3,24	13033112
9	1:5,99	11126486206	1:4,41	1147213768	1:5,93	5564891150	-	-
10	1:5,89	65535003754	1:4,45	5105101267	1:6,87	38230802198	-	-

5 Одержані дані показують високу ефективність методу клонального мікророзмноження на основі культури меристем *in vitro*, що особливо важливо для одержання великої кількості посадкового матеріалу в стислі строки при обмеженій кількості маточних рослин нових сортів для швидкого впровадження їх у виробництво та розмноженні унікального селекційного матеріалу.

10 Найбільш ефективним для укорінення мікропагонів лаванди в умовах *in vitro* визначено живильне середовище  $\frac{1}{2}$ МС, доповнене ІОЛК та ІОЦК в концентрації по 0,5 мг/л - МС18, на якому частота укорінення становила 100,0 % у сортів Синєва, Степова і у зразку 337-9, та 85,0 % у зразку 310-17. Кількість коренів і їх довжина відрізнялися у генотипів, що досліджувалися: у сорту Синєва формувалося 4,13 шт. коренів довжиною 29,14 мм, у сорту Степова регенерувало найбільше коренів - 6,28 шт. довжиною 20,73 мм, у зразку 337-9 утворювалося 4,53 шт. коренів найбільшої довжини - 32,51 мм, у зразку 310-17 формувалося 2,52 шт. коренів довжиною 25,14 мм.

15 Для адаптації відбирали мікророслини лаванди з добре розвинутою кореневою системою і висаджували в горщечки об'ємом 200 мл зі стерильним субстратом різного складу. Горщечки з рослинами розміщували під плівковим укриттям і культивували при температурі 18-20 °С і постійному зволоженні. Найвища приживлюваність мікророслин всіх генотипів - 95,0-100,0 % була забезпечена на субстраті торф:перліт:ґрунт:пісок у співвідношенні 2:1:1:1. Визначено, що для адаптації меристемних рослин лаванди до умов *in vivo* достатньо періоду 14 днів, за які формується 2-3 пари листків. Після періоду адаптації плівкове укриття знімали і рослини культивували в звичайних умовах ще 46 днів.

25 В результаті проведених досліджень розроблено технологію клонального мікророзмноження лаванди (Табл. 3). Меристемні рослини лаванди мали типові для сортів та зразків морфологічні ознаки: форму куща, листків, суцвіття, забарвлення квіток. У жодному випадку у мериклонів не було відмічено морфологічних відхилень від норми.

Біотехнологічна схема клонального мікророзмноження рослин лаванди

Етап мікророзмноження	Особливості культивування
1. Ізолювання експланту, введення і ініціація його розвитку в умовах <i>in vitro</i>	Експлант: апікальна меристема висотою 0,2-0,7 мм з однією- двома парами примордіальних листків.
	Стерилізація рослинного матеріалу: 70 %-ний етанол (40 сек.), 50 %-ний "Брадофен" (12 хв.).
	Оптимальний строк відбору експлантів: квітень та жовтень.
	Живильне середовище: МС, доповнене кінетином (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л).
	Умови культивування: температура 25-26 °С, освітленість 2-3клк, фотоперіод 16 год., відносна вологість повітря 70 %.
	Тривалість культивування: 50 діб.
	Частота регенерації: 90,0-100,0 %.
2. Власне мікророзмноження	Коефіцієнт розмноження: 1: 7-1: 12.
	Експлант: мікроживець довжиною 4-8 мм з однією парою листків.
	Живильне середовище: МС, доповнене кінетином (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л).
	Умови культивування: температура 25-26 °С, освітленість 2-3клк, фотоперіод 16 год., відносна вологість повітря 70 %.
	Тривалість культивування: 50 діб.
3. Укорінення мікропагонів	Частота регенерації: 85,7-100,0 %.
	Коефіцієнт розмноження: 1: 7-1: 12.
	Кількість пасажів за рік: чотири.
	Експлант: мікроживець довжиною 4-8 мм з однією парою листків.
	Живильне середовище: ½МС, доповнене ІОлК (0,5 мг/л) та ІОцК(0,5 мг/л).
4. Адаптація мікророслин до умов <i>in vivo</i>	Умови культивування: температура 25-26 °С, освітленість 2-3 клк, фотоперіод 16 год., відносна вологість повітря 70 %.
	Тривалість культивування: 50 діб.
	Частота укорінення: 85,0-100,0 %.
	Кількість мікророслин за рік: 23-208 тис. шт.
	Субстрат: торф: перліт: ґрунт: пісок 2:1:1:1.
4. Адаптація мікророслин до умов <i>in vivo</i>	Умови культивування: температура 18-20 °С, підживлення розчином Кнопа після посадки і через 14 днів.
	Тривалість культивування: 60 днів, з них 14 днів під плівковим укриттям при вологості повітря 100 %.
	Приживлюваність: 90-100 %.

Отже, виходячи з наведених експериментальних даних можна стверджувати, що на етапах введення меристем лаванди в культуру *in vitro* та власне мікророзмноження оптимальним є живильне середовище МС, доповнене кінетином (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л), на етапі укорінення – ½ МС із додаванням ІОцК (0,5 мг/л) та ІОлК (0,5 мг/л), на етапі адаптації рослин до умов *in vivo* - субстрат торф: перліт: ґрунт: пісок у співвідношенні 2:1:1:1.

Джерела інформації:

1. Егорова Н.А. Микроразмножение лаванды *in vitro* / Н.А. Егорова // Вісник Харківського національного аграрного університету. Сер. Біологія. - 2002.- № 9(1).- С 65-71.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб клонального мікророзмноження лаванди вузьколистої в культурі *in vitro*, який включає біотехнологічні прийоми на трьох етапах культивування, який **відрізняється** тим, що на I та II етапах культивування проводять на живильному середовищі Мурасиге і Скуга (МС), доповненому кінетином (1,0 мг/л) та гібереловою кислотою (1,0 мг/л); на III етапі до живильного середовища ½ МС додають індолілоцтову кислоту (ІОцК) (0,5 мг/л) та індолілоліїну кислоту



(ЮлК) (0,5 мг/л); на IV етапі адаптація рослин до умов in vivo проводять на субстраті торф:перліт:ґрунт:пісок у співвідношенні 2:1:1:1.

Таблиця 1. Дані експерименту за період з 15.05.2018 по 15.06.2018 рр.

№	Параметр	Значення	№	Параметр	Значення
1	Температура повітря	18,5 ± 0,5 °С	1	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см
2	Відносна вологість повітря	65 ± 5 %	2	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см
3	Відносна вологість субстрату	75 ± 5 %	3	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см
4	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см	4	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см
5	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см	5	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см
6	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см	6	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см
7	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см	7	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см
8	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см	8	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см
9	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см	9	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см
10	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см	10	Висота рослин	12,5 ± 0,5 см

UA 136225 U

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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