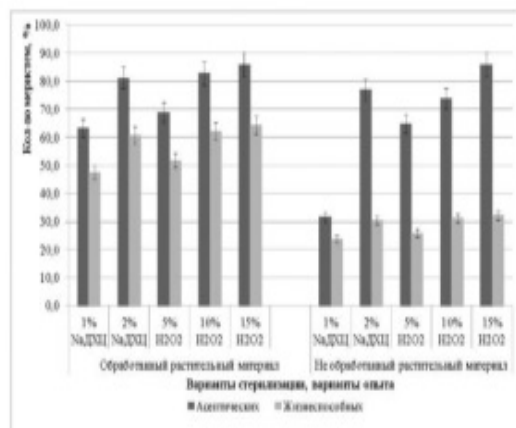




Фиг. 1. Влияние предлагаемого способа предварительной обработки растительного материала на получение асептических и жизнеспособных (регенерирующих) меристем



Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования

**«Крымский федеральный университет
имени В.И. Вернадского»**

295007 Республика Крым, г. Симферополь,
проспект Академика Вернадского, 4

Отдел интеллектуальной собственности

Начальник отдела:
Бондаренко Даниил Владимирович
Тел. раб. +7(3652)51 08 69
Тел. моб. +7(978) 618 63 17
[E-mail:work.daniil@mail.ru](mailto:work.daniil@mail.ru)

г. Симферополь, ул. Ялтинская, 20, каб. 308

**КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ В.И. ВЕРНАДСКОГО**



*Отдел интеллектуальной
собственности*

**СЕЛЬСКО-
ХОЗЯЙСТВЕННЫЕ
НАУКИ № 11**

2026 г.

Патент на изобретение № 2869584

Авторы:

**Камышникова Анна Владимировна,
Сидякин Андрей Иванович**

Раствор для предварительной обработки растительного материала, повышающий жизнеспособность, стерильность и регенерационную активность меристем при введении в культуру in vitro, способ его получения и применения

Изобретение относится к сельскому хозяйству и биотехнологии, в частности к способу предварительной обработки растительного материала перед изолированием из него меристем при введении их в культуру in vitro, с целью получения большего количества асептических жизнеспособных меристем изолируемых от исходных растений, и ускорению их регенерации в культуре in vitro. Задачей изобретения является разработка состава раствора для предварительной обработки растительного материала и способа его получения и применения, который одновременно обеспечивал увеличение полученного количества стерильных меристем, их жизнеспособности и скорость регенерации.

Техническим результатом при осуществлении заявленного изобретения является точный состав раствора для предварительной обработки растительного материала, а также способ его получения и применения, способствующий получению большего количества стерильных меристем, повышению их жизнеспособности и ускорению их регенерации - ускорению развития меристем после их введения в культуру in vitro по сравнению с предварительно необработанным растительным материалом. Способ осуществления изобретения

Способ получения раствора

Приготовление раствора бензиламинопурина: навеску 4,0 мг 6-бензиламинопурина взвешивают на аналитических весах, в подходящей емкости и растворяют в 10,0 мл 1 нормального раствора едкого натра, после полного растворения бензиламинопурина в раствор приливают 80,0 мл дистиллированной воды и 10,0 мл этилового спирта.

Приготовление раствора хлорамфеникола: навеску 100,0 мг хлорамфеникола (D-(-)-трео-1-(п-нитрофенил)-2-дихлор-ацетиламино-1,3-пропандиол) количественно переносят в подходящую емкость и растворяют в 50,0 мл этилового спирта.

Приготовление раствора витаминов: навески тиамин гидрохлорида - 1,0 мг; пиридоксин гидрохлорида - 5,0 мг; никотиновой кислоты - 5,0 мг количественно переносят в подходящую емкость, и растворяют в 50,0 мл дистиллированной воды с температурой 75- 90°C.

Приготовление раствора минеральных компонентов, антиоксидантов

и витаминоподобных веществ: в 600 мл дистиллированной воды в подходящей лабораторной посуде объемом не менее 1 литра последовательно вносят при перемешивании до полного растворения каждого из компонентов: аскорбиновую кислоту - 1000,0мг; янтарную кислоту - 1000,0 мг; натрия гидрокарбонат - 400,0 мг; гидроортофосфат калия трехводный - 400,0 мг; сульфат магния, в пересчете на безводную соль - 487,0 мг (или магния сульфат гептагидрат - 1000,0 мг); аммоний азотнокислый - 3600мг; натрий лимоннокислый, трехзамещенный двухводный - 1000,0 мг; глицин (аминоуксусную кислоту) - 1200,0 мг; инозитол (цис-1,2,3,5-транс-4,6-циклогексангексаол) - 3000,0 мг.

Получение раствора для предварительной обработки.

В раствор минеральных компонентов, антиоксидантов и витаминоподобных веществ вносят растворы бензиламинопурина, хлорамфеникола и витаминов. При помощи раствора 1-нормального едкого натра при постоянном перемешивании устанавливают рН готового раствора на уровне $6,6 \pm 0,2$ ед. уровня рН, переносят в мерный лабораторный цилиндр, доводят дистиллированной водой объем до 1,0 литра, перемешивают для равномерного распределения компонентов в растворе, и либо используют, как описано ниже, либо фасуют в подходящие емкости для хранения в замороженном состоянии при температуре не выше -20°C.

Использование раствора для предварительной обработки растительного материала с целью получения большего количества асептических меристем, повышению их жизнеспособности, и регенерации осуществляют следующим образом.

Растительный материал (побеги с почками или с меристемами: виноград, сирень, клен) нарезают в полевых условиях в виде черенков с 10-15 листьями и почками или листьями и глазками (виноград), помещают в полиэтиленовые пакеты, и доставляют в лабораторию. В лаборатории растительный материал извлекают из пакетов, и проводят предварительную обработку растительного материалом предлагаемым раствором методом опрыскивания. Для опрыскивания растительного материала используют бытовые пульверизаторы или иные устройства, обеспечивающие мелкодисперсное опрыскивание растительного материала с равномерным распределением раствора по поверхности растительного материала. Расход раствора для предварительной обработки растительного материала составляет 50 мл раствора на 10-15 черенков или 100-150 глазков (почек). Обработанный раствором по предлагаемому изобретению влажный растительный материал помещают в полиэтиленовые пакеты, не допуская высыхания раствора и сохраняют предварительно обработанный растительный материал в течение 12-24 часов при температуре от +15 до +4°C. Растительный материал после хранения извлекают из пакетов, стерилизуют известными способами [Kamyshnikova, A. V. in vitro introduction of grape varieties in demand in agriculture of the Republic of Crimea / A.V. Kamyshnikova, A.I. Sidiyakin // , 29 января 2025 года, 2025. - Р. 119-123. - EDN NLINZC], из материала с соблюдением правил асептики и общих требований по работе с культурами in vitro изолируют меристемы, меристемы переносят на известные питательные среды, например, модифицированную среду Мурасиге и Скура [Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. - 1962. - Vol. 15, No 13. - P. 473 - 497], дополненную 30 г/л сахарозы,

2,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,5 мг/л индолил-3-масляной кислоты (ИМК), культивируют при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$ в условиях освещения (16-часовой фотопериод при освещении 40-ваттными холодно-белыми люминесцентными лампами) с интенсивностью $105\text{--}115 \mu\text{mol PPFD}/\text{m}^2/\text{с}$. В результате, по сравнению с необработанным растительным материалом получают большее количество жизнеспособных, асептических и регенерирующих меристем.

Предлагаемая предварительная обработка растительного материала полученным раствором по предлагаемому способу способствует получению большего количества стерильных меристем, повышению их жизнеспособности, и ускорению регенерации микрорастений из меристем.

Формула изобретения

1. Раствор для предварительной обработки растительного материала перед введением в культуру in vitro, включающий 6-бензиламинопурина 4,0 мг, растворенного в 10,0 мл 1-нормального раствора едкого натра, 80,0 мл дистиллированной воды, 10,0 мл этилового спирта; хлорамфеникола 100 мг, растворенного в 50,0 мл этилового спирта; тиамин гидрохлорид 1,0 мг, пиридоксин гидрохлорид 5,0 мг, никотиновой кислоты 5,0 мг, растворенных в 50,0 мл дистиллированной воды; аскорбиновой кислоты 1000,0 мг, янтарной кислоты 1000,0 мг, натрия гидрокарбоната 400,0 мг, гидроортофосфата калия трехводного 400,0 мг, сульфата магния безводного 487,0 мг или магния сульфат гептагидрата 1000,0 мг, аммония азотнокислого 3600,0 мг, натрия лимоннокислого трехзамещенного двухводного 1000,0 мг, глицина 1200,0 мг, инозитола 3000,0 мг, растворенных в 600 мл дистиллированной воды, 1-нормальный раствор едкого натра в количестве, необходимом для установливания рН готового раствора на уровне $6,6 \pm 0,2$ ед., дистиллированную воду в количестве, необходимом для доведения объема готового раствора до 1 л объема.

2. Способ получения раствора по п. 1, включающий растворение навески 4,0 мг 6- бензиламинопурина в 10,0 мл 1-нормального раствора едкого натра, добавление 80,0 мл дистиллированной воды и 10,0 мл этилового спирта; растворение 100,0 мг хлорамфеникола в 50,0 мл этилового спирта; растворение в 50,0 мл дистиллированной воды с температурой 75-90°C 1,0 мг тиамин гидрохлорида, 5,0 мг пиридоксин гидрохлорида, 5,0 мг никотиновой кислоты; последовательное растворение в 600 мл дистиллированной воды 1000,0 мг аскорбиновой кислоты, 1000,0 мг янтарной кислоты, 400,0 мг натрия гидрокарбоната, 400,0 мг гидроортофосфата калия трехводного, 487,0 мг сульфат магния безводного или 1000,0 мг сульфата магния гептагидрата, 3600 мг аммония азотнокислого, 1000,0 мг натрия лимоннокислого трехзамещенного двухводного, 1200,0 мг глицина, 3000,0 мг инозитола; смешивание растворов, установливание рН готового раствора на уровне $6,6 \pm 0,2$ ед. едким натром при постоянном перемешивании раствора, доведение общего объема готового раствора до 1 литра дистиллированной водой.

3. Применение раствора по п. 1 для предварительной обработки растительного материала перед введением в культуру in vitro.