



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **108512**

(13) **U**

(51) МПК

A01H 1/04 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 12315**

(22) Дата подання заявки: **14.12.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.07.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.07.2016, Бюл.№ 14**

(72) Винахідник(и):

**Доброва Ганна Олександрівна (UA),
Замбріборщ Ірина Сергіївна (UA),
Шестопал Оксана Леонідівна (UA)**

(73) Власник(и):

**СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ІНСТИТУТ -
НАЦІОНАЛЬНИЙ ЦЕНТР
НАСІННЄЗНАВСТВА ТА
СОРТОВИВЧЕННЯ,
вул. Овідіопольська дорога, 3, м. Одеса,
65036 (UA)**

(54) ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ C17B ДЛЯ ІНДУКЦІЇ НОВОУТВОРЕНЬ В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ ПШЕНИЦІ ТВЕРДОЇ IN VITRO

(57) Реферат:

Поживне середовище C17B для індукції новоутворень в культурі пиляків пшениці твердої in vitro, яке включає сольовий та вітамінний склад за стандартним прописом поживного середовища C17. Амінокислоти додають до середовища за прописом середовища BAD-1. Додатково додають пролін і глютамін в концентрації 400 мг/л; лимонну та яблучну кислоти в концентрації 1 мг/л.

UA 108512 U

Корисна модель належить до біотехнології, а саме отримання подвоєних гаплоїдів пшениці твердої.

Отримання подвоєних гаплоїдів - це один з найпоширеніших біотехнологічних прийомів, який дозволяє істотно скоротити селекційний процес. Одним з основних методів отримання гаплоїдних рослин є культура пиляків *in vitro*, першим етапом якого є індукція новоутворень. Тому розробка оптимального індукційного поживного середовища для пшениці твердої є актуальною задачею для дослідників біотехнологів.

Найбільш близьким до корисної моделі є індукційне поживне середовище С17 [1]. Авторами проведено тестування різних генотипів пшениці твердої на здатність до індукції новоутворень в культурі пиляків *in vitro*. Ефективність поживного середовища оцінювали, визначаючи рівень індукції новоутворень. Даний спосіб обрано як найближчий аналог.

До недоліків прототипу треба віднести наступне: за культивування пиляків генотипів пшениці твердої на даному поживному середовищі не отримують високий рівень індукції новоутворень і відмічають залежність цього показника від факторів "генотип рослин" і "умови вирощування" донорного матеріалу.

З метою усунення вказаних недоліків прототипу пропонується спосіб, заснований на модифікації складу поживного середовища С17 за вмістом амінокислот і органічних кислот.

В основу корисної моделі поставлені задачі:

а) розробка оптимального поживного середовища для генотипів пшениці твердої регіону Півдня України; б) збільшення рівня індукції новоутворень генотипів пшениці твердої в культурі пиляків *in vitro*.

Поставлені задачі вирішуються використанням модифікованого середовища С17В. Як базовий вибрано сольовий та вітамінний склад за стандартним прописом поживного середовища С17.

Відмінність модифікованого середовища від прототипу - амінокислоти до середовища додавали за прописом середовища BAD-1, додатково додавали пролін і глютамін в концентрації 400 мг/л; лимонну та яблучну кислоти в концентрації 1 мг/л. Розроблене поживне середовище виявилось ефективним для індукції новоутворень в культурі пиляків *in vitro* більшості протестованих генотипів пшениці твердої.

Спосіб забезпечує отримання більшої кількості новоутворень на індукційному поживному середовищі і, відповідно, вищу ефективність методу.

Причинно-наслідковий зв'язок між модифікаціями поживного середовища і досягнутим результатом (підвищення рівня індукції новоутворень) можна пояснити так.

В основі гіпотези наших досліджень є стаття М. Dogramaci-Altuntepe et al. [2], в якій показано, що рівень індукції новоутворень пшениці твердої був вищим при культивуванні пиляків на багатому на амінокислоти середовищі BAD-1. Однак запропоновані поживні середовища С17 і BAD-1 [1, 2] виявились неефективними для індукції новоутворень сортів і гібридів пшениці твердої, що вирощується на Півдні України. У зв'язку з цим актуальною була розробка універсального індукційного поживного середовища саме для місцевих генотипів.

Дослідні середовища С17 і BAD-1 відрізняються як за загальною концентрацією мінеральних солей, так і за співвідношенням окремих елементів. Загальна концентрація солей в середовищі BAD-1 становить 3216,88 мг/л, а в середовищі С17-2418,56 мг/л. Відомо, що занижка або завелика концентрація солей у поживному середовищі є лімітуючим фактором, що пригнічує формування новоутворень. Середовище BAD-1 подібне до середовища С17 за співвідношенням хімічних елементів, але відрізняється більш високою загальною концентрацією солей і більшим вмістом кальцію. На нашу думку, саме ці фактори стали причиною низького рівня індукції новоутворень і подальшої регенерації пшениці твердої при використанні індукційного середовища BAD-1. І в подальшому ми зосередилися на модифікації поживного середовища на основі сольового складу середовища С17.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Рослини пшениці твердої вирощують на польових ділянках. Пагони з пиляками зрізають з донорних рослин, коли вакуолізовані мікроспори знаходяться у середньопізній одноядерній фазі розвитку. Фазу розвитку мікроспор визначають цитологічним методом [3], яка, за даними авторів [4, 5] є оптимальною для розвитку мікроспор за спорофітним шляхом в умовах *in vitro*. Для стимуляції переходу мікроспор з гаметофітного шляху розвитку на спорофітний проводять попередню обробку зрізаного колосся низькими позитивними температурами (3-5 °C) у водному розчині АБК з концентрацією 0,5 мг/л протягом 7 діб. Колосся поверхнево стерилізують насиченим розчином гіпохлориту кальцію за прийнятою методикою [6]. Пиляки експлантують на агаризоване поживне середовище С17В для індукції новоутворень. Склад гормонів середовища: 2,4-Д в концентрації 2 мг/л та кінетин в концентрації 0,5 мг/л. Рівень індукції

новоутворень визначають як відсоток новоутворень від кількості висаджених пиляків для кожного генотипу і довірчій інтервал[7].

Приклад 1.

Проводили оцінку ефективності розробленого поживного середовища для яро-озимих гібридів другого покоління пшениці твердої. Визначали рівень індукції новоутворень на протестованих поживних середовищах і довірчий інтервал. Рівень індукції новоутворень пшениці твердої на розробленому поживному середовищі фактично був вищий для всіх протестованих генотипів (табл. 1).

Приклад 2.

Проводили оцінку ефективності розробленого поживного середовища для яро-озимих гібридів пшениці твердої пшениці твердої: Altar 84, Ангел, Ангара, Науам, ФОЧА-1. Визначали рівень індукції новоутворень на протестованих поживних середовищах і довірчий інтервал. Рівень індукції новоутворень пшениці твердої на розробленому поживному середовищі фактично був вищий для всіх протестованих генотипів, за винятком зразків пшениці Altar 84 і Ангел. Для Altar 84 індукція новоутворень на прототипному середовищі С17 виявилась достовірно вищою, а для ФОЧА-1 достовірно кращим було середовище С17В (табл. 2).

Приклад 3.

Проводили оцінку ефективності розробленого поживного середовища для озимих гібридів F₁ пшениці твердої: DF-900-83/WPB-881 / Новинка4 (Т42), DF-900-83/WBK-881 / Лінкор (Т432), DF-900-83/WBK-881 / Золоте руно (Т44), DF-900-83/WBK-881 / Янтар одеський (Т45). Рівень індукції новоутворень пшениці твердої на розробленому поживному середовищі фактично був вищий для всіх протестованих генотипів, за винятком генотипу Т42, на якому індукція новоутворень була однаковою на обох середовищах. Достовірно вищий рівень індукції новоутворень на розробленому середовищі С17В у порівнянні з його аналогом С17 отримано у двох з чотирьох озимих гібридів пшениці твердої (табл. 3).

Таким чином, розроблене поживне середовище не поступалось, або було кращим для всіх протестованих генотипів [8, 9].

Таблиця 1

Індукція новоутворень в культурі пиляків яро-озимих гібридів пшениці твердої

№	Генотип	Індукція новоутворень, %		t-критерій Стюдента
		С17	С17В	
T1	(Сарат. Золотий x Gidara 2) x Гардемарин	1,85±0,92	2,83±1,06	0,70
T8	Topdy 18/ФОЧА1/Altar84 x (Yav79 x Алий парус) x {Корал x [(LR-1 x 504/67) x Хар. 1] x [(Tigris x Айсб. од.) x (Айсб.од x Нов.4)]}/	0,88±0,62	3,00±0,69	2,29**
T12	Haurani x (Yav79 x Алий парус) x {Корал x [(LR-1 x 504/67) x Хар. 1] x [(Tigris x Айсб. од.) x (Айсб.од. x Нов.4)]}/	0	0,85±0,49	1,73*
T15	Topdy 18/ФОЧА1/Altar84 x Босфор	0	1,40±0,53	2,29**

Примітка * - різниця достовірна при p<0,05; ** - різниця достовірна при p<0,01

Таблиця 2

Індукції новоутворень в культурі пиляків ярих сортів пшениці твердої

Генотип	Індукція новоутворень, %		t-критерій Стюдента
	середовище С17	середовище С17В	
Altar 84	2,11±1,21	1,79±1,77	2,64**
Ангел	1,46±1,02	1,35±0,77	0,09
Ангара	0	1,75±1,23	1,42
Науам	0,65±0,64	2,16±1,07	1,21
ФОЧА-1	0,80±0,46	4,67±1,44	2,56**

Примітка. ** - різниця достовірна при p<0,01

Таблиця 3

Індукції новоутворень в культурі пиляків пшениці твердої озимої

Форма	Генотип	Індукція новоутворень, %		t-критерій Стьюдента
		середовище С17н	середовище С17В	
Озимі гібриди	T42	2,74±0,78	2,72±0,81	0,02
	T43	2,71±0,63	4,25±0,76	1,56
	T44	1,72±0,60	5,91±0,92	3,81**
	T45	1,14±0,36	2,36±0,54	1,88*

Примітка * - різниця достовірна при $p < 0,05$

** - різниця достовірна при $p < 0,01$

Джерела інформації:

1. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. Advances in haploid production in higher plants // Springer Science+Business Media B.V.: The Netherlands. - 2009-P. 1-208.
2. M. Dogramaci-Altuntepe, T. S. Peterson and P. P. Jauhar. Anther Culture-Derived Regenerants of Durum Wheat and Their Cytological Characterization // Journal of Heredity-2000-Vol. 92. Is. 1-P. 56-64.
3. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений // М.: Агропромиздат. - 1988. - 270 с.
4. Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н. // Известия РАН. Серия биологии. - 1997. - № 6 - С. 668-676.
5. Круглова Н.Н. Микроспора злаков, как модельная система для изучения путей морфогенеза: Автореферат доктора биологических наук 03.00.05. // Институт биологии Уфимского центра РАН. - 2002. - 48 с.
6. Ігнатова С.О., Жосонар М.В., Лобанова К.І., Шестопап О.Л. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків // Методичні рекомендації. Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. -2008. - 12 с.
7. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика // Минск: Издательство Минского университета. - 1973. - 316 с.
8. Замбріборщ І.С., Доброва Г.О., Шестопап О.Л., Паламарчук А.І. Вплив індукційного живильного середовища на формування новоутворень у культурі пиляків in vitro пшениці твердої // Фактори експериментальної еволюції організмів. - 2014. - Т. 15 - С. 72-75.
9. Доброва Г.О. Вплив поживного середовища на індукцію новоутворень тетраплоїдної пшениці в культурі пиляків in vitro // Тези доповідей. Матеріали VIII Міжнародної конференції молодих учених "Біологія: від молекули до біосфери". - 2013. - С. 145.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Поживне середовище С17В для індукції новоутворень в культурі пиляків пшениці твердої in vitro, яке включає сольовий та вітамінний склад за стандартним прописом поживного середовища С17, яке **відрізняється** тим, що амінокислоти додають до середовища за прописом середовища BAD-1, додатково додають пролін і глютамін в концентрації 400 мг/л; лимонну та яблучну кислоти в концентрації 1 мг/л, розроблене поживне середовище виявилось ефективним для індукції новоутворень в культурі пиляків in vitro більшості протестованих генотипів пшениці твердої.

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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