



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **108513**

(13) **U**

(51) МПК

A01H 1/04 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 12316**

(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):

**Шестопад Оксана Леонідівна (UA),
Замбріборщ Ірина Сергіївна (UA),
Мазур Зоя Олександрівна (UA),
Колібабчук Татьяна Володимирівна (UA),
Ігнатова Світлана Олександрівна (UA)**

(73) Власник(и):

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

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ НОВОУТВОРЕНЬ В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ ЖИТА ОЗИМОГО

(57) Реферат:

Спосіб отримання новоутворень в культурі пиляків жита озимого шляхом андрогенезу in vitro включає отримання калюсу методом культури in vitro пиляків. Пиляки культивуються на середовищі 190-2 з додаванням вітамінів за прописом MS, 5 мг/л 2,4-D, 0,5 мг/л НОК, 500 мг/л глютаміну, 500 мг/л проліну, 100 мг/л мезоінозитулу, 60 г/л мальтози, 3,2 г/л фітогелю.

UA 108513 U

Корисна модель належить до біотехнології, а саме до отримання новоутворень в культурі пиляків *in vitro* жита.

В селекційно-генетичній роботі із різними злаковими культурами все більш затребуваним та необхідним є застосування біотехнології, а саме культури ізолюваних пиляків. Отримання гаплоїдів шляхом культури ізолюваних пиляків представляє альтернативу традиційним селекційним підходам з поліпшення жита озимого (*Secale cereale* L.).

Серед інших злаків, жито вважається не достатньо чутливим до культури ізолюваних пиляків *in vitro* видом. З літературних джерел відомо, що для культури ізолюваних пиляків та мікроспор *in vitro* жита розроблено та описано особливості проходження перших етапів індукції мікроспор в культурі ізолюваних пиляків, формування калусів, ембріодогенез, регенерація зелених рослин та рослин по типу "альбіно". Всі ці процеси детерміновано "генотипом" і немає універсального живильного середовища для будь якого житнього генотипу [1, 2, 3]. Здатність генотипів жита до культури ізолюваних пиляків є кількісно спадковою рисою і кодується ядерними генами та цитоплазматичними факторами [4]. Співвідношення та взаємозв'язок таких показників, як індукція новоутворень, регенерація альбіно та зелених рослин успадковуються незалежно [5, 6].

В Україні розробок у біотехнологічному напрямку з отримання дигаплоїдних рослин жита, із використанням культури ізолюваних пиляків не проводили, хоча необхідність у цих роботах є.

Найбільш близькою до корисної моделі, що заявляється, є оригінальна методика отримання гаплоїдів шляхом культури пиляків жита дослідників з Фінляндії [7]. Колосся донорних рослин перед вилученням пиляків стерилізують 70 % етанолом (обприскування), асептично вилучають пиляки та висаджують на тверде живильне середовище 190-2 із додаванням 5 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кінетину, 500 мг/л глютаміну, 60 г/л мальтози, 3 г/л фітогелю. Висаджені пиляки культивували перші 3 доби у темряві за температури + 32 °С, надалі - при + 28 °С до появи новоутворень.

Недоліком даної методики є специфічність її застосування для генотипів жита північноєвропейської селекції. Кліматичні відмінності та ендемічні генотипи жита, що вирощуються на теренах України, призводять до створення унікального рослинного матеріалу, який по-іншому реагує на умови культивування пиляків *in vitro*, надані у протоколі методики прототипу.

З метою усунення вказаних недоліків, пропонується принципово інший спосіб стерилізації донорного матеріалу, додавання у індукційне середовище іншого гормону цитокінінового ряду, а саме НОК в концентрації 0,5 мг/л та додатково амінокислоту пролін (500 мг/л), що має протекторні властивості.

В основу корисної моделі поставлена задача тестування ефективності методики-прототипу із нашими модифікаціями на генотипах ржі української селекції.

Відмінності корисної моделі, що заявляється, від найближчого аналога: 1) заміна поверхневого способу стерилізації донорного колосся етиловим спиртом на тривалу (60 хв.) його обробку гіпохлоридом кальцію; 2) додавання у середовище замість кінетину - нафтилоцтової кислоти (НОК) (0,5 мг/л), а разом із глютаміном, використовувати іншу амінокислоту - пролін (500 мг/л).

Спосіб забезпечує отримання новоутворень з морфогенних мікроспор пиляків жита з подальшою можливістю отримання з них рослин-регенерантів.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених прийомів та досягнутим результатом (отримання новоутворень від більшості досліджених генотипів) можна пояснити наступним чином.

Вибір оптимального способу стерилізації матеріалу залежить від його морфологічних особливостей та ступеня зараженості. На момент взяття в культуру *in vitro* пиляків жита української селекції, колосся знаходиться поза листової обгортки і у дощову погоду ступінь інфікування даного донорного матеріалу досить значна. Саме тому нами дібрана жорстка стерилізація гіпохлоритом кальцію. Надалі негативну дію стерилізуючого агента "нейтралізують" додаванням в живильне середовище для індукції амінокислоти пролін, яка виявляє протекторні властивості та допомагає рослині на клітинному рівні подолати наслідки стресу.

Спосіб здійснюється таким чином

Як дослідний рослинний матеріал застосовують пиляки жита озимого. Попередню обробку зрізаних пагонів з колоссям проводять у воді протягом 3-5 діб за температури 2-4 °С у темряві.

Колосся поверхнево стерилізують розчином комерційного препарату "Білізна" з додаванням поверхнево-активної речовини TWIN 80 протягом 60 хв. Після зливають стерилізуючий агент та заливають колосся на 10 хв. 0,01 н розчином HCl. Наприкінці, п'ятиразово промивають матеріал стерильною дистильованою водою. Ізолювані пиляки висаджують на живильне індукційне

середовище 190-2 [7, 8]. В середовище додавали наступні речовини: вітаміни за прописом MS, 2,4-D-5 мг/л, НОК - 0,5 мг/л, глютамін - 500 мг/л, пролін - 500 мг/л, мезоінозитол - 100 мг/л, 60 г/л мальтози, фітогель 3,2 г/л. [3]. Висаджені пиляки культивують перші 3 доби у темряві за температури 32 °С, надалі - при 28 °С до появи новоутворень. Сформовані макроструктури пересаджують на середовище MS у половинній концентрації солей з додаванням ІОК - 0,5 мг/л та кінетин - 1,0 мг/л, 30 г/л сахарози [3] і культивують у темряві 3-4 тижня до появи центрів регенерації, далі - за температури 24 °С та умов 16-годинного фотоперіоду, інтенсивності освітлення 10 тис. люкс до формування рослин.

Приклад 1

Вивчали проходження перших етапів андрогенезу in vitro в культурі пиляків жита озимого за використання різних індукційних живильних середовищ - W14 [9] та 190-2. Донорні рослини вирощували в польових умовах Верхняцької дослідно-селекційної станції. Пагони з колоссям зрізали з донорних рослин та у сумці-холодильнику передавали для подальших досліджень в лабораторію культури тканин СГІ - НЦНС. За результатами оцінки морфогенетичної активності мікроспор чотирьох генотипів жита: № 24, № 25, № 36, № 37 показана досить висока чутливість трьох форм (крім жита за № 37) до наданих умов культивування пиляків in vitro [10]. Слід відмітити, що значний рівень формування новоутворень отримали як на одному, так і на другому живильному середовищі. Найвищий рівень формування новоутворень на середовищі 190-2 спостерігали у жита № 24-21,52±3,27 відсотків, а на середовищі W14 у зразка жита № 36-8,22±3,21 відсотків. Загалом, середовище 190-2 було більш ефективним щодо проходження перших етапів андрогенезу: новоутворення отримали від 3 з 4 досліджених генотипів, тоді як на живильному середовищі W14 - лише від двох. Регенерація була дуже незначною. Всього отримано 5 альбіносних рослин-регенерантів від двох генотипів (табл.).

Таблиця

Ефективність морфогенезу в культурі пиляків in vitro жита озимого

Генотип	Середовище	Кількість пиляків	Кількість новоутворень		Кількість рослин-регенерантів (альбіно)	
			шт.	%	шт.	%
№ 24	190-2	158	34	21,52±3,27*	2	1,27±0,89
№ 25		108	12	11,11±3,02	3	2,78±1,58
№ 36		186	13	6,99±1,87	-	-
№ 37		23	0	0	-	-
№ 24	W14	103	0	0	-	-
№ 25		68	3	4,41±2,49	-	-
№ 36		73	6	8,22±3,21	-	-
№ 37		89	0	0	-	-

Примітка: * - достовірно при $p \leq 0,01$

Джерела інформації:

1. Deimling S., Flehighaus-Roux T. Haploidy in rye. In: Jain, M.S., Sopory S.K., Veilleux R.E. (eds), Plant Cell Tissue Organ Culture-1997. - P. 181-204.
2. Rakoczy-Trojanowska, M. The influence of genotype and medium of rye (*Secale cereale* L.) anther culture [Text] / M. Rakoczy-Trojanowska, M. Smiech, S. Malepszy // Plant Cell Tissue Organ Culture-1997. - Vol. 48. - P. 15-21.
3. Immonen, S. Media composition and anther plating for production of androgenic green plants from cultivated rye (*Secale cereale* L.) [Text] / S. Immonen, H. Anttila // Plant Physiology-2000. - Vol. 156. - P. 204-210.
4. Bolibok, H. Genetic mapping of QTLs for tissue culture response in plants [Text] / H. Bolibok, M. Rakoczy-Trojanowska // Euphatica. - 2006. - Vol. 149. - P. 73-83.
5. Zheng, M. Y. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) - doubled haploid production via induced embryogenesis [Text] / M. Y. Zheng // Plant Cell Tissui Org. Cult. - 2003. -Vol. 73.- P. 213-230.
6. Agache, S. Studies of the genetic relationship between anther culture response and somatic tissue culture abilities in wheat [Text] / S. Agache, J. De Buyser, Y. Henry, J. Snape // Plant Breeding. - 1988. - Vol. 100. - P. 26-33.
7. Tenhola-Roininen T. Rye doubled haploids: Finland, 2009. - 93 p.

8. Wang X. The effect of potato II medium for tritcale anther culture [Text] / X. Wang, H. Hu // Plant Sci. Lett. - 1984. - Vol. 36. - P. 237-239.

9. Ouyang, J. A new synthetic medium (W14 medium) for wheat anther culture [Text] / J. Ouyang, S. Jia, C. Zhang, X. Chen, G. Feng // Annual Report, Institute of Genetics, Academia Sinica. - 1989. - P. 91-92.

40. Шестопад О.Л., Замбріборщ І.С., Ігнатова С.О., Мазур З.О. Дослідження морфогенетичної активності мікроспор in vitro в культурі пиляків жита [Текст] // Scientific Journal "ScienceRise". - № 3/1(8). - 2015. - С. 7-11.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання новоутворень в культурі пиляків жита озимого шляхом андрогенезу in vitro, що включає отримання калюсу методом культури in vitro пиляків, який **відрізняється** тим, що пиляки культивуються на середовищі 190-2 з додаванням вітамінів за прописом MS, 5 мг/л 2,4-D, 0,5 мг/л НОК, 500 мг/л глютаміну, 500 мг/л проліну, 100 мг/л мезоінозиту, 60 г/л мальтози, 3,2 г/л фітогелю.

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