



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **79701** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A01G 31/00
A01H 4/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 13400	(72) Винахідник(и): Войтовська Вікторія Іванівна (UA), Роїк Микола Володимирович (UA), Бех Наталія Степанівна (UA), Недяк Татьяна Миколаївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 23.11.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2013, Бюл.№ 8	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ КУЛЬТУР І ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ НААН, вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03141 (UA)

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ КАЛЮСУ ІЗ ПИЛЯКІВ МІСКАНТУСУ У КУЛЬТУРІ IN VITRO

(57) Реферат:

Спосіб отримання калюсу із пиляків міскантусу у культурі in vitro включає попередню холодovu обробку вихідного матеріалу, стерилізацію, приготування живильних середовищ. При цьому як експлант використовують пиляки міскантусу, які стерилізують ультрафіолетовим опроміненням, а для індукції морфогенезу у модифіковане живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга додають БА, ІОК, дроп і цукрозу.

UA 79701 U

Корисна модель належить до галузі сільського господарства і може бути використана в сільськогосподарській біотехнології, селекції, зокрема для створення, розмноження і отримання розсади цінних селекційних матеріалів.

Гаплоїди мають одинарний набір хромосом і для їх отримання необхідно не соматичні, а статеві клітини, які є у рослин в чоловічому або жіночому гаметофіті. Отримувати гаплоїди можливо різними шляхами, як в культурі *in vitro* так і в *in vivo*.

У селекційно-генетичних дослідженнях гаплоїдні рослини використовують для вирішення таких питань:

отримання гомозиготних диплоїдних ліній в гетерозисній селекції шляхом подвоєння гаплоїдів;

для створення ряду анеуплоїдів;

для отримання тетраплоїдів у поліплоїдних видів рослин;

для подолання міжвидової несумісності;

для декоративного квітництва;

для мутаційної селекції;

для генетичного аналізу.

Відомим і найбільш близьким до корисної моделі є спосіб (Редько В.І., Роїк М.В., Недяк Т.М., Бех Н.С. Одержання гаплоїдних рослин цукрових буряків з ізольованих недозрілих зачатків // Цукрові буряки. - К., 2006.- № 6. - С. 23-26). За цього відомого способу проводять попередню холодову обробку квіткових пагонів при температурі +4 °С до 8 діб. Для стерилізації пагонів з пуп'янками використовують 5-10 % розчин хлораміну протягом 30 хвилин, потім промивають стерильною водою. Ізолювання насіннєвих зачатків із закритих пуп'янків проводять в асептичних умовах під стереоскопічним мікроскопом МБС-1 або збільшуваною лупою, відриваючи пінцетом пуп'янок від пагона і руйнуючи голкою шар паренхімних клітин нижньої частини зав'язі та висаджують їх на модифіковане живильне середовище Гамборга і Евелега (В₅), доповнене біотином 10,0 мг/л, НОК - 0,5 мг/л, дроп 1,0 мг/л. Культивування незапліднених насіннєвих зачатків відбувається упродовж 2-3 тижнів у темряві за температури 27-33 °С, а потім при 16 годинному фотоперіоді з інтенсивністю освітлення 2000-3000 лк.

Відомий і пропонований способи отримання гаплоїдних рослин мають спільні ознаки: попередня холодова обробка вихідного матеріалу за температури +4 °С, стерилізація матеріалу, приготування живильних середовищ.

Проте, спосіб одержання гаплоїдних рослин цукрових буряків з ізольованих недозрілих зачатків не забезпечує індукцію гаплоїдних рослин у міскантусу та не дає можливості отримати достатню кількість стерильного матеріалу.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб отримання гаплоїдних рослин міскантусу, що дозволить отримати індукцію гаплоїдних рослин міскантусу із пиляків та удосконалити стерилізацію рослинного матеріалу і склад живильного середовища.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі стерилізують пагони з пуп'янками, використовуючи 5-10 % розчин хлораміну протягом 30 хвилин, потім промивають стерильною водою. Попередньо проводять холодову обробку квіткових пагонів при температурі +4 °С до 8 діб. Ізолювання насіннєвих зачатків із закритих пуп'янків проводять в асептичних умовах під стереоскопічним мікроскопом МБС-1 або збільшуваною лупою, відриваючи пінцетом пуп'янок від пагона і руйнуючи голкою шар паренхімних клітин нижньої частини зав'язі та висаджують їх на модифіковане живильне середовище Гамборга і Евелега (В₅), доповнене біотином 10,0 мг/л, НОК 0,5 мг/л, дроп 1,0 мг/л. Культивування відбувається упродовж 2-3 тижнів у темряві за температури 27-33 °С, а потім при 16 годинному фотоперіоді з інтенсивністю освітлення 2000-3000 лк. У запропонованому способі використовують пагони міскантусу, із яких вилучають пиляки, яким попередньо проводять холодову обробку при температурі +4 °С до 2 діб та стерилізують їх ультрафіолетовим опроміненням за експозиції 30 хвилин і промивають дистильованою водою, що дозволяє отримати 87,5 % стерильного матеріалу. Використовують модифіковане живильне середовище Мурасіге і Скуга з доданням БА - 0,8 мг/л, ІОК - 0,8-1,0 мг/л, дроп - 0,5 мг/л та цукрози 30 г/л. Культивування за температури 24±2 °С у темряві упродовж 2 тижнів, а потім при 16 годинному фотоперіоді з інтенсивністю освітлення 2000-3000 лк.

Новими відмінними від існуючого найближчого аналога ознаками є:

введення в стерильну культуру пиляків міскантусу;

використання для стерилізації ультрафіолетового опромінення;

експозиція 30 хвилин;

додавання у середовище БА - 0,8 мг/л та цукрози 30 г/л, ІОК - 0,8-1,0 мг/л, дроп - 0,5 мг/л;

цукроза - 30,0 г/л.

Відмінні від найближчого аналога ознаки при взаємодії з відомими дозволяють отримати індукцію гапліодних рослин міскантусу із пиляків, удосконалити та знизити витрати на стерилізацію вихідного матеріалу і склад живильного середовища.

Ефективність нового способу отримання гапліодних рослин міскантусу вивчали на п'яти сортах: New, Late, Sinensis, Sachariflorus, Early.

Результати досліджень вказують, що використання 5-10 % розчину хлораміну протягом 30 хвилин забезпечує стерильність експлантів, але не забезпечує їх життєздатність. Використання ультрафіолетового опромінення за експозиції 30 хвилин для таких невеликих експлантів як пиляки, дозволяє отримати не тільки стерильний, а й життєздатний матеріал на 87,5 %. Зміна та модифікування живильного середовища за прописом Мурсіге і Скуга з додаванням БА - 0,8 мг/л, дроп - 0,5 мг/л, цукрози 30,0 г/л, ІОК - 0,8-1,0 мг/л дозволили отримати індукцію гапліодних рослин міскантусу із пиляків. Слід відзначити, що холодову обробку матеріалу зменшили до 2 діб.

Спосіб отримання калюсу із пиляків міскантусу у культурі *in vitro* здійснюється таким чином: вихідним матеріалом слугують сегменти волоті, із яких вилучають пиляки міскантусу. Їх піддають холодовій обробці при температурі +4 °С до 2 діб. Стерилізацію здійснюють ультрафіолетовим опроміненням за експозиції 30 хвилин і промивають дистильованою водою, що дозволяє отримати 87,5 % стерильного матеріалу. Пересаджування матеріалу проводять на модифіковане живильне середовище за прописом Мурсіге і Скуга (БА 0,8 мг/л, ІОК - 0,8-1,0 мг/л, дроп - 0,5 мг/л, цукроза - 30,0 г/л) та культивують за температури 24±2 °С у темряві упродовж 2 тижнів, а потім при довжині фотоперіоду 16 годин з інтенсивністю освітлення 2000-3000 лк (таблиця).

Таблиця

Показники ефективності використання запропонованого способу отримання калюсу із пиляків міскантусу у культурі *in vitro*

Показники	Відомий спосіб	Запропонований спосіб
Стерилізація	Хлорамін - 10 %	Ультрафіолетове опромінення
Експозиція, хвилин	30	30
Експлант	пагони	пиляки
Холодова обробка, діб	8	2
Стерильність експлантів, %	53,0	87,5
Мінеральна основа середовища	B ₅	MS
БА мг/л	-	0,8
ІОК мг/л	-	0,8-1,0
НОК мг/л	0,5	-
Дроп, мг/л	1,0	0,5
Біотин, мг/л	10,0	-
Цукроза, г/л	-	30,0
Індукція калюсу, %	63,0	63,0
Температура холодової обробки, °С	4	4
Довжина фотоперіоду, годин	16	16
Температура культивування, °С	24±2	24±2

Впровадження запропонованої корисної моделі дає можливість отримати калюс із пиляків міскантусу у культурі *in vitro*, підібрати і удосконалити склад живильного середовища, зменшити затрати на індукцію гапліодних рослин.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання калюсу із пиляків міскантусу у культурі *in vitro*, що включає попередню холодову обробку вихідного матеріалу при температурі +4 °С, стерилізацію матеріалу, приготування живильних середовищ, який **відрізняється** тим, що як експлант використовують пиляки міскантусу, які стерилізують ультрафіолетовим опроміненням за експозиції 30 хвилин, для індукції морфогенезу у модифіковане живильне середовище за прописом Мурсіге і Скуга додають БА - 0,8 мг/л, ІОК - 0,8-1,0 мг/л, дроп - 0,5 мг/л і 30 г/л цукрози.

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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