



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106144** (13) **U**

(51) МПК (2016.01)

**A01H 1/04** (2006.01)

**A01G 7/00**

**A01G 1/00**

**G01N 33/483** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 21/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

- (21) Номер заявки: **а 2014 08257**  
(22) Дата подання заявки: **21.07.2014**  
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.04.2016**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.03.2015, Бюл.№ 6**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.04.2016, Бюл.№ 8**

- (72) Винахідник(и):  
**Лях Віктор Олексійович (UA),  
Яранцева Вікторія Василівна (UA),  
Левчук Ганна Миколаївна (UA),  
Полякова Ірина Олексіївна (UA)**
- (73) Власник(и):  
**ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ  
ЗАКЛАД "ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ" МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І  
НАУКИ УКРАЇНИ,  
вул. Жуковського, 66, м. Запоріжжя, 69600  
(UA)**
- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
Усатов А.В. Особенности клеточной структуры листьев культурного и дикорастущего подсолнечника *Helianthus annuus* L. / А.В. Усатов, Г.Ф. Федоренко, Е.В. Машкина и др. // Маслиничные культуры. Научно-техн. бюллет. ВНИС маслинич. культур. – 2009. – Вып. 2. (141)  
Определение мезоструктурных характеристик фотосинтетического аппарата растений: руководство к лабораторным занятиям большого спецпрактикума по физиологии и биохимии растений / [составители Р.А. Борзенкова, Е.В. Храмцова]. - Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2006. - 27 с., С. 15

UA 106144 U

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МОРФОЛОГІЇ ПЛАСТИДНОГО АПАРАТУ РОСЛИН

### (57) Реферат:

Спосіб визначення морфології пластидного апарату рослин включає: відбір проби, приготування препаратів, дослідження їх під мікроскопом, вимірювання параметрів хлоропластів, визначення за їх значенням морфології пластидного апарату рослин. Як пробу використовують ціле листя рослини, фіксують його у суміші Темпера та виготовляють парафінові мікротомні препарати.



Корисна модель належить до біології, а саме до фізіології та біохімії рослин, та може бути використаний у генетиці та селекції рослин.

Відомий спосіб визначення морфології пластидного апарату рослин [Паушева З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М.: Агропромиздат, 1988. - 271 с., С. 56-58], який включає: відбір проби, її фіксування, виготовлення парафінових мікротомних препаратів, їх фарбування, зневоднення етиловим спиртом, заміщення в них спирту на ксилол, поміщення препаратів у канадський бальзам, просушування та дослідження їх під мікроскопом, визначення морфології хлоропластів рослин.

Недоліком цього способу є дослідження хлоропластів рослин лише після додаткового фарбування препаратів.

Ознаками, спільними з рішенням, що заявляється, є:

- відбір проби;
- фіксування проби;
- виготовлення парафінових мікротомних препаратів;
- дослідження препаратів під мікроскопом;
- визначення морфології хлоропластів рослин.

Найближчим аналогом є спосіб визначення морфології пластидного апарату рослин [Определение мезоструктурных характеристик фотосинтетического аппарата растений: руководство к лабораторным занятиям большого спецпрактикума по физиологии и биохимии растений / [составители Р.А. Борзенкова, Е.В. Храмцова]. - Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2006. - 27 с., С. 15], який включає відбір проби з листя рослин за допомогою пробочних свердел з відомим діаметром; приготування тимчасових препаратів, для чого проводять мацерацію тканин шляхом додавання до проби 0,5-1,0 н НСІ; витримання на водяній бані при температурі 80-100 °С протягом 10-30 хв. та розмішування їх до отримання однорідної суспензії; дослідження препаратів під мікроскопом, вимірювання лінійних розмірів хлоропластів, визначення за їх значенням морфології пластидного апарату рослин.

Недоліками цього способу є висока вірогідність руйнування хлоропластів під час приготування і зберігання тимчасових препаратів та неможливість довготривалого зберігання проби.

Ознаками, спільними з рішенням, є відбір проби, приготування препаратів, дослідження їх під мікроскопом, вимірювання лінійних розмірів хлоропластів, визначення за їх значенням морфології пластидного апарату рослин.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення морфології пластидного апарату рослин.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення морфології пластидного апарату рослин включає відбір і фіксацію листя рослин у суміші Темпера та виготовлення парафінових мікротомних препаратів дозволяє вже на ранніх етапах розвитку рослин вимірювати лінійні розміри хлоропластів, визначати за їх значенням морфологічні особливості пластидного апарату рослин; фотографувати та зберігати отримані результати; створювати їх електронну базу.

Суттєвими ознаками способу є:

- відбір проби цілого листя рослин;
- фіксування проби в суміші Темпера;
- виготовлення парафінових мікротомних препаратів;
- дослідження їх під мікроскопом;
- вимірювання лінійних розмірів хлоропластів;
- визначення за їх значенням морфології пластидного апарату. Відмінними від прототипу ознаками є використання як проби цілого листя рослин, фіксування в суміші Темпера, виготовлення парафінових мікротомних препаратів.

Заявлений спосіб здійснюють так:

Відбирають проби (листя рослин) та фіксують у суміші Темпера (0,2 % хлорної міді, 0,2 % азотнокислої міді та 1 % розчин фенолу), яка дозволяє зберігати забарвлення хлоропластів [Барыкина Р.П. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Р.П. Барыкина, Т.Д. Веселова, А.Г. Девятков, Х.Х. Джалилова, Г.М. Ильина, Н.В. Чубатова. - М.: МГУ, 2004-312 с., С. 28]. Виготовляють з них парафінові мікротомні препарати, для чого промивають проби у дистильованій воді, зневоднюють їх, послідовно просочують хлороформом та парафіном, заливають в парафін та вплавають в парафінові блоки, що можуть тривало зберігатися, з яких роблять мікротомні зрізи, наклеюють їх на предметні скельця, просушують препарати, послідовно видаляють зі зрізів: парафін - ксилолом, ксилол - спиртом; спирт - дистильованою водою. Після чого поперечні зрізи листя поміщають у гліцерин, накривають покривними

скельцями та досліджують під мікроскопом. Спосіб дозволяє вимірювати лінійні розміри хлоропластів та визначати за їх значенням морфологічні особливості, фотографувати та зберігати отримані результати; створювати їх електронну базу.

Приклад конкретного виконання.

5 Для дослідження були використані рослини [Генетическая коллекция вида *Linum usitatissimum* L.: каталог / [сост. Лях В.А., Мищенко Л.Ю., Полякова И.А.]. - Запорожье, 2003. - 60 с., С. 17, 19], вирощені в польових умовах:

- сорт льону олійного Циан;
- мутантні лінії на його основі:

10 - M-80 (viridis);  
- M-81 (xantha).

Для аналізу пластидного апарату у всіх ліній, вирощених у польових умовах, на стадії бутонізації відбирали листя та витримували в 10-кратному об'ємі фіксатора - суміші Темпера (0,2 % хлорної міді, 0,2 % азотнокислої міді та 1 % розчин фенолу) протягом 10 днів у темряві, після чого пробу промивали великою кількістю дистильованої води.

Здійснювали зневоднення проби, для чого проводили рослинний матеріал через 12 змін спиртів: по дві зміни відповідно 20 %, 40 %, 60 %, 70 %, 96 % та 100 % спирту. У кожній зміні спиртів пробу витримували по 1 годині. Потім проводили просвітлення проби, для чого пробу послідовно витримували по 1 годині в кожному з таких розчинів: спирт з хлороформом у співвідношенні 3:1; 1:1; 1:3 та двох змінах хлороформу. Пробу залишали в хлороформі, а зверху нашаровували парафін, витримували в термостаті при температурі 55-57 °C до повного випаровування хлороформу (заливка в парафін). Потім виготовляли "парафінові пряники", для чого парафін разом із пробю виливали на пласку поверхню та залишали вистигати; та вплавляли їх у парафінові блоки (5×5×5 см). З парафінових блоків виготовляли серії зрізів товщиною 10 мкм, поміщали їх на воду з температурою 40 °C для розправлення. Зрізи наклеювали на предметні скельця. Як клей використовували суміш білка курячого яйця з гліцерином (у співвідношенні 1:2) з додаванням антисептика (тимолу чи фенолу). Залишали їх у термостаті при 40 °C для випаровування зайвої води. Проводили депарафінування зрізів, для цього скельця з наклеєними зрізами промивали у трьох змінах ксилолу, двох змінах 100 % спирту, одній зміні 75 % спирту та одній 50 % спирту та трьох змінах дистильованої води. Час перебування у кожній зміні - 20-30 хв. Потім поміщали зрізи у гліцерин та накривали покривними скельцями.

Розміри хлоропластів (довжину й ширину) вимірювали стандартними методами за допомогою окуляр-мікрометра.

35 При вимірюванні хлоропластів на п'яти зрізах у тридцятикратному повторенні в кожному зразку стандартними методами було виявлено, що хлоропласти мутантних зразків за лінійними параметрами значно відрізнялися від хлоропластів контрольних рослин (таблиця).

Отримані препарати фотографували за допомогою тринокулярного мікроскопа MS-3330 і окулярної камери MA88-500 при збільшенні ×640 і ×1600 разів.

Таблиця

#### Морфологія пластид

Генотип льону олійного	Параметри хлоропластів	
	Довжина, мкм	Ширина, мкм
Циан (контроль)	5,4±0,22	2,3±0,11
M-80 (viridis)	2,4±0,4**	1,8±0,14*
M-81 (xantha)	4,2±0,26*	0,8±0,27**

Примітка: \*, \*\* - відмінності від контролю суттєві при P < 0,01; 0,001.

На фіг. 1 зображено хлоропласти контрольного зразка Циан.

На фіг. 2 зображено хлоропласти хлорофільного мутанта M-80 (viridis).

На фіг. 3 зображено хлоропласти хлорофільного мутанта M-81 (xantha).

45 Хлоропласти мутантних ліній мали менші розміри в порівнянні з контрольним зразком. Хлоропласти контрольного зразка Циан мали довжину - 5,4 мкм та ширину - 2,3 мкм. У хлорофільного мутанта M-80 хлоропласти мали менші розміри, ніж у контролю. У хлорофільного мутанта M-81 хлоропласти були значно вужчі порівняно з контролем. Хлоропласти усіх досліджуваних рослин розміщувались по периметру клітини.

Отримані дані вказують, що морфологічні характеристики хлоропластів змінювалися залежно від типу хлорофільних змін рослини. Найбільші зміни в морфології хлоропластів спостерігалися у хлорофільного мутанта типу *xantha*. У мутанта типу *viridis* зменшення лінійних розмірів хлоропластів було менш вираженим.

5 Заявлений спосіб дозволяє визначати морфологію пластидного апарату вже на ранніх етапах розвитку рослини, досліджувати лінійні розміри хлоропластів та їх морфологічні особливості; фотографувати та зберігати отримані результати, він є простим та не потребує високовартісного обладнання.

10

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення морфології пластидного апарату рослин, що включає: відбір проби, приготування препаратів, дослідження їх під мікроскопом, вимірювання параметрів хлоропластів, визначення за їх значенням морфології пластидного апарату рослин, який

15 **відрізняється** тим, що як пробу використовують ціле листя рослини, фіксують його у суміші Темпера та виготовляють парафінові мікротомні препарати.

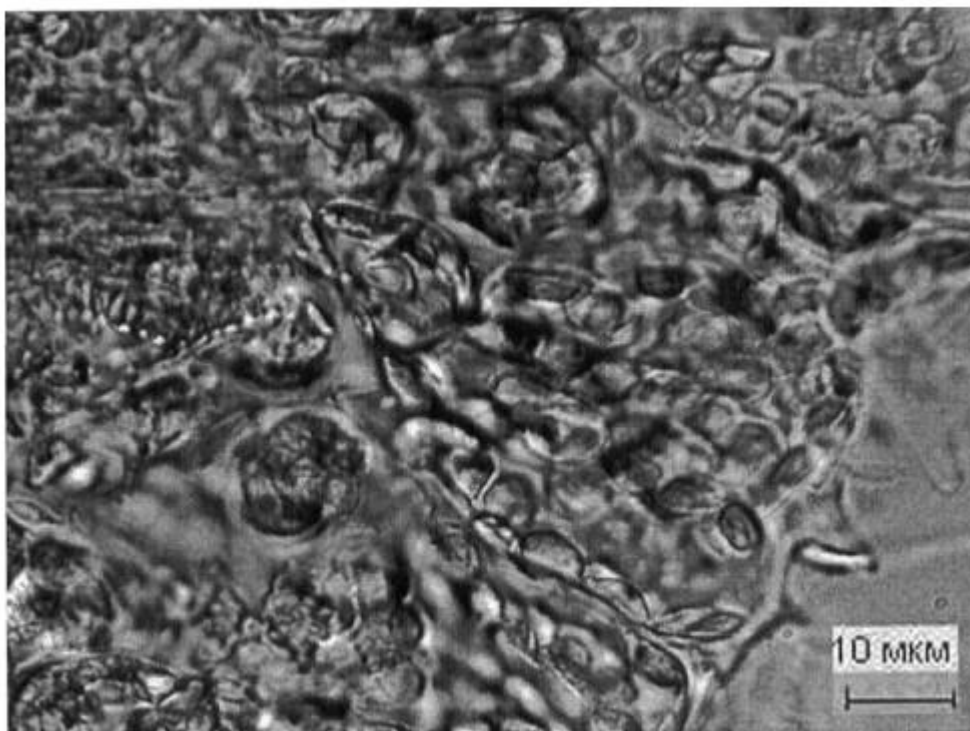
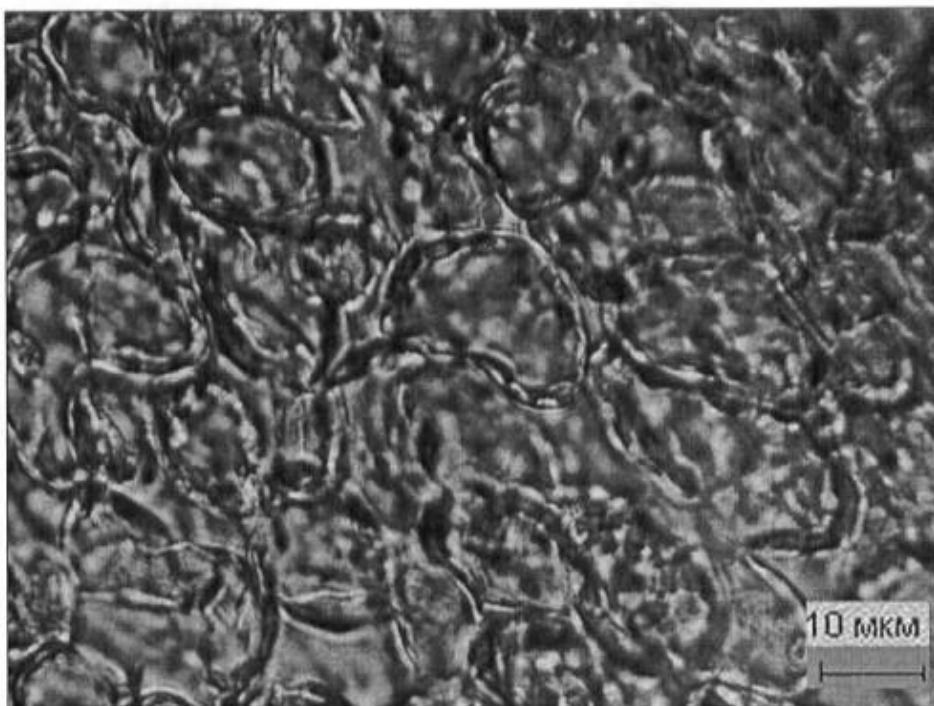
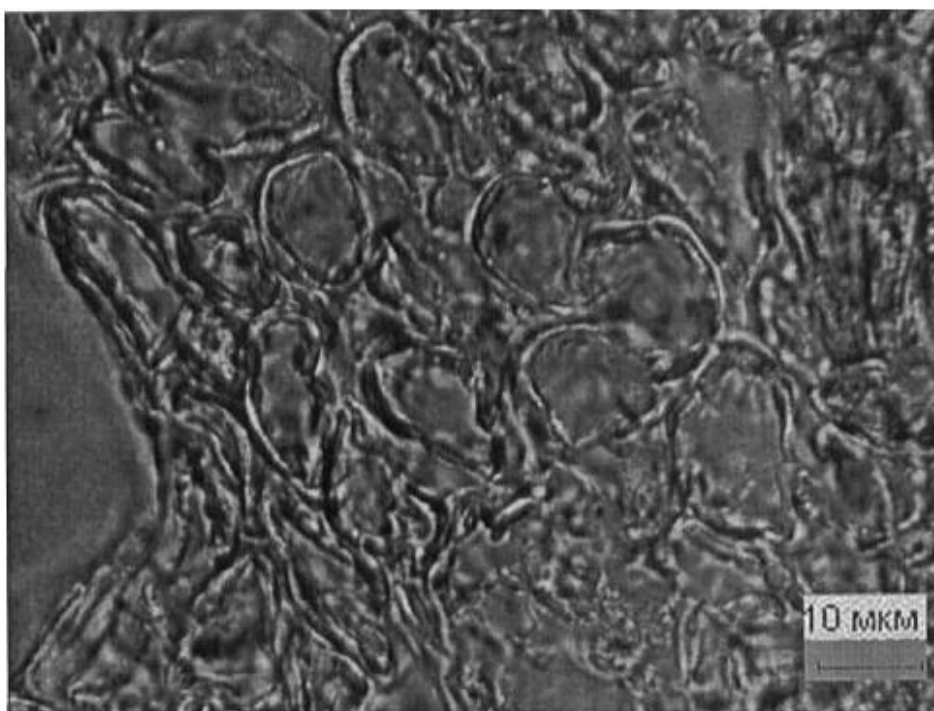


Fig. 1



**Fig. 2**



**Fig. 3**

---

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

---

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