



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **34859** (13) **U**
(51) **МПК (2006)**
A01G 7/00
C12N 5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ГАПЛОЇДІВ ЯЧМЕНЮ У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ IN VITRO

1

2

(21) u200803639

(22) 21.03.2008

(24) 26.08.2008

(46) 26.08.2008, Бюл.№ 16, 2008 р.

(72) БІЛИНЬСЬКА ОЛЕНА ВОЛОДИМИРІВНА, UA,
ТИМЧУК СЕРГІЙ МИХАЙЛОВИЧ, UA, ДУЛЬНІВ
ПЕТРО ГЕОРГІЄВИЧ, UA, ДЕРЕБІЗОВА ОЛЬГА
ЮРІЇВНА, UA

(73) ІНСТИТУТ РОСЛИННИЦТВА ІМЕНІ В.Я.
ЮР'ЄВА УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НА-
УК, UA

(57) Спосіб одержання гаплоїдів ячменю в культурі пиляків in vitro, який включає культивування пиляків на штучному живильному середовищі і отримання з них калусів, ембріодів та рослин-регенерантів, який **відрізняється** тим, що як гелеутворюючий компонент штучного живильного середовища використовують крохмаль природного мутанту кукурудзи ае з вмістом амілози 55-60 % в концентрації 65 г/л.

Корисна модель відноситься до сільськогосподарства, а саме - до способів отримання вихідного матеріалу для селекції ячменю у культурі пиляків in vitro.

Відомі способи одержання гаплоїдів рослин з мікроспор у культурі пиляків in vitro на штучних живильних середовищах, гелеутворюючим компонентом яких є гетерополісахарид агар-агар [1, 2] вимили недоліками агар-агару (аналог) є:

- відсутність в Україні сировинної бази і вітчизняного виробництва;

- придатність для використання у середовищах для культивування пиляків in vitro агар-агару іноземного виробництва лише високого ступеню очищення, який виробляється провідними фірмами і має високу вартість;

- негативний вплив на процес утворення макроструктур порівняно з рідким середовищем, яке в свою чергу пригнічує регенерацію рослин і сприяє їхній вітрифікації [3].

Відомий спосіб одержання гаплоїдних рослин ячменю у культурі пиляків in vitro, який полягає у застосуванні у складі штучних живильних середовищ замість агар-агару ячмінного крохмалю [4]. Але гель, утворений ячмінним крохмалем, має низьку щільність, через що для утримання пиляків на його поверхні необхідним є використання синтетичної тканини сітчастої фактури. До того ж, ячмінний крохмаль виробляється лише у Фінляндії і відсутній у каталогах фірм-виробників хімічних реактивів для культури in vitro.

Найбільш близькими по технічній суті до запропонованої корисної моделі за дією є хімічно модифіковані крохмалі ДККмод, Д2 і інші [5], які рекомендовані для застосування в якості гелеутворюючих компонентів штучних живильних середовищ у концентрації 50-150г/л при клональному мікророзмноженні овочевих культур з метою зменшення ступеню вітрифікації рослин-регенерантів і підвищення їх життєздатності, а також для одержання гаплоїдів ячменю у культурі пиляків in vitro [6].

Використання прототипу в середовищі для культивування пиляків in vitro трьох сортів ярого ячменю призводить до зменшення кількості андрогенних структур, але одночасно сприяє переважанню серед них ембріодів, що позитивно впливає на частоту регенерації рослин і їх життєздатність через зниження ступеню вітрифікації [6].

Недоліками прототипу є:

- пригнічення процесів індукції новоутворень;
- необхідність хімічної модифікації для забезпечення гелеутворюючих властивостей;
- швидке (в середньому через 12-14 дб після приготування середовища) висихання і розтріскування гелю.

Задачею запропонованої корисної моделі є розробка складу штучного живильного середовища для збільшення виходу гаплоїдів ячменю у культурі пиляків in vitro.

Ця задача вирішується шляхом заміни гелеутворюючих компонентів - агар-агару [1, 2] і хімічно модифікованих крохмалів [6] крохмалем природно-

(13) **U**(11) **34859**(19) **UA**

го високоамілозного мутанту кукурудзи ае. За рахунок цього досягається зростання частоти регенерації рослин та зменшення витрат праці, коштів і часу на хімічну модифікацію крохмалю і відкриваються можливості для отримання екологічно чистого препарату, який утворює більш стабільний гель при зменшенні вдвічі порівняно з хімічно модифікованим крохмалем кількості гелеутворюючого компонента.

Суть корисної моделі полягає в тому, що на відміну від прототипу у запропонованій корисній моделі як гелеутворюючий компонент використовується кукурудзяний крохмаль природного походження з вмістом амілози 55-60%, виділений з зерна лінії-носія мутантного гену - ае. Важливою перевагою амілозного крохмалю ае над прототипом є стимулювання регенерації рослин на тлі відсутності негативного впливу на індукцію, ріст і розвиток новоутворень. Окрім цього, для отриман-

ня придатної для культивування експлантів щільності гелю витрачається вдвічі менше крохмалю амілозного типу ае, ніж хімічно модифікованого крохмалю [5, 6]. Гель, утворений з крохмалю високоамілозного типу ае, зберігає структуру без висихання і розтріскування впродовж 30 діб, що є достатнім терміном для індукції новоутворень.

Порівняльний аналіз запропонованого способу з прототипом свідчить, що в якості гелеутворюючого компонента штучного живильного середовища замість хімічно модифікованого крохмалю використовується крохмаль природного мутанту кукурудзи ае з вмістом амілози 55-60% в концентрації 65г/л, який не зазнає хімічної модифікації.

Порівняльні характеристики гелеутворюючих властивостей живильних середовищ на основі агар-агару, хімічно модифікованого крохмалю та крохмалю високоамілозного мутанту кукурудзи ае наведено в Таблиці 1.

Таблиця 1

Гелеутворюючі властивості штучних живильних середовищ на основі різних полісахаридів

Характеристики гелю	Термін використання	Варіанти живильних середовищ		
		на основі агар-агару	на основі хімічно модифікованого крохмалю	на основі крохмалю природного мутанту кукурудзи ае
1	2	3	4	5
Колір	на момент утворення гелю	безбарвний	молочно-білий	молочно-білий
	15 діб	безбарвний	молочно-білий	молочно-білий
	30 діб	безбарвний	молочно-білий	молочно-білий
Прозорість	на момент утворення гелю	прозорий	непрозорий	непрозорий
	15 діб	прозорий	непрозорий	непрозорий
	30 діб	прозорий	непрозорий	непрозорий
Структура	на момент утворення гелю	еластична, пружна, без шпарин	еластична, пружна, без шпарин	еластична, пружна, без шпарин
	15 діб	еластична, пружна, без шпарин	мало еластична, непружна, з шпаринами на поверхні	еластична, пружна, без шпарин
	30 діб	еластична, пружна, без шпарин	мало еластична, непружна, з шпаринами на поверхні та в товщі гелю	еластична, пружна, без шпарин
Стабільність	на момент утворення гелю	висока	висока	висока
	15 діб	висока	висока	висока
	30 діб	висока	висока	висока
Водоутримуюча здатність	на момент утворення гелю	висока	висока	висока
	15 діб	висока	середня	висока
	30 діб	висока	середня	висока

За структурою, стабільністю та водоутримуючою здатністю гелі з крохмалю природного мутанту кукурудзи ае не поступаються гелям, що отримані з агар-агару і переважають гелі, які отримані з хімічно модифікованого крохмалю. Живильні середовища, які виготовлено згідно запропонованого способу, зберігають стабільну желеподібну структуру без висихання та розтріскування протягом 30

діб з моменту виготовлення, що є цілком достатнім терміном для індукції новоутворень в культурі пилляків *in vitro*.

Для кращого розуміння опису корисної моделі наводяться конкретні приклади.

Приклад 1. Приготування живильного середовища на основі крохмалю мутанту кукурудзи ае. Всі компоненти живильного середовища, окрім

крохмалю, розчиняють в потрібних концентраціях в бідистильованій воді. Половину отриманого розчину переносять до окремої скляної колби або хімічного стакану і нагрівають до 50-60°C. До іншої половини розчину компонентів живильного середовища додають крохмаль з розрахунку 65г/л і ретельно перемішують до стану гомогенної суспензії. Суспензію тонкою цівкою переносять до нагрітого розчину компонентів живильного середовища і нагрівають суміш до температури кипіння при постійному перемішуванні. Отриманий клейстер негайно розливають по пробірках або колбах об'ємом 50-100см³ і піддають стерилізації в автоклаві при температурі 120±2°C і тиску 78кПа протягом 20 хвилин. Стерилізований клейстер охолоджують до кімнатної температури і залишають для гелеутворення протягом 12 годин і далі використовують для отримання гаплоїдів ячменю.

Приклад 2. Порівняльна оцінка морфогенетичного ефекту живильних середовищ з використанням різних гелеутворювачів у культурі пиляків *in vitro* ячменю.

Для дослідження морфогенетичного ефекту гелеутворюючих речовин було використано лінію ДГ00-126, яка характеризується високою здатністю до андрогенезу *in vitro*.

Рослини для отримання культури пиляків *in vitro* вирощували у польових умовах. Добирали колосся, яке містило пиляки з мікроспорами у середній та пізній фазі розвитку. Попередню обробку колосся проводили, вміщуючи пагони у воду і витримуючи їх впродовж 5-6 діб при температурі +4°C у холодильнику. Асептичну культуру пиляків отримували за власною методикою [7].

Як контроль було використане розроблене нами для культивування

пиляків ярого ячменю середовище NMSмод.2, яке містило макроелементи середовища N6 [8], мікроелементи середовища MS [9] і такі компоненти в мг/л: 2,4-Д - 2 (2,4-дихлорфеноксіцтова кис-

лота); БАЛ (бензиламінопурін) - 0,5; В₁ - 1; В₆ і РР - по 0,5; гліцин - 2; аланін і пролін - 100; глутамін - 200; лактальбумін - 300; міо-інозитол - 100; а також мальтозу - 90г/л; картопляний екстракт - 20%; крохмаль - 10г/л; агар-агар - 0,76%.

В відповідних дослідних варіантах агар-агар було замінено на хімічно модифікований крохмаль Д-2 [5] у концентрації 120г/л і кукурудзяний крохмаль, отриманий з зерна природного мутанта ае у концентрації 65г/л.

Чашки Петрі і пробірки з висадженими на штучне живильне середовище пиляками вміщували у термостат і інкубували при температурі 24°C впродовж 30-35 діб.

Новоутворення - калюс і ембріоїди - пересаджували на регенераційне живильне середовище Р: мінеральна основа MS, вітаміни В₁, В₆ і РР - по 0,5мг/л; глутамін, міо-інозитол по - 100мг/л; сахароза - 30г/л; агар-агар - 0,8%. Регенерацію проводили при освітленні 4-5клк, фотоперіоді 16 годин, температурі 22-24°C.

Спостереження проводили, починаючи з 20-ї доби культивування пиляків *in vitro*. При цьому підраховували пиляки, на поверхні яких утворилася принаймні одна макроструктура (калюс, ембріоїд), ембріоїди і рослини-регенеранти як на індукційному, так і на регенераційному середовищі.

Ефективність експериментального андрогенезу *in vitro* оцінювали за такими показниками (у відсотках від загальної кількості культивованих пиляків):

кількість пиляків з новоутвореннями; кількість зелених рослин-регенерантів; кількість ембріоїдів.

Експериментальні дані оброблено за допомогою дисперсійного аналізу [10].

Результати дослідження впливу гелеутворюючих компонентів штучних живильних середовищ на процеси індукції новоутворень і регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* ячменю наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Результативність культури пиляків *in vitro* у лінії ячменю ДГ00-126 з високою андрогенною здатністю в залежності від гелеутворюючого компонента живильного середовища

Варіанти живильних середовищ	Висаджено пиляків, шт.	Отримано					
		пиляків з новоутвореннями		ембріоїдів		зелених рослин	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
на основі агар-агару	425	183	43,06	177	41,64	133	31,29
на основі хімічно модифікованого крохмалю	329	102	31,00	245	74,46	128	38,90
на основі крохмалю природного мутанту кукурудзи ае	301	136	45,18	248	82,39	158	52,49
НІР ₀₅			7,20		6,60		7,14

Ці оцінки свідчать, що за кількістю пиляків з новоутвореннями ефективність застосування живильних середовищ на основі крохмалю високоамілозного мутанту кукурудзи ае та агар-агару

дуже близька і перевищує ефективність використання середовищ на основі хімічно модифікованих крохмалів. Разом з тим, середовище, яке містило крохмаль високоамілозного мутанту кукурудзи ае,

подібно до середовища з хімічно модифікованим крохмалем, сприяло індукції ембріодогенезу.

Основною перевагою живильних середовищ на основі крохмалів мутанту кукурудзи ае є значне зростання частоти регенерації зелених рослин порівняно із середовищами на основі агар-агару та хімічно модифікованого крохмалю.

Запропонований спосіб одержання гаплоїдів ячменю в культурі пиляків *in vitro* дозволяє підвищити частоту морфогенних новоутворень - ембріоїдів і ембріогенного калюсу, збільшити частоту регенерації рослин, подовжити термін використання штучного живильного середовища, поліпшити його структурно-механічні властивості, спростити процедуру виготовлення, знизити вартість та підвищити екологічну безпечність виробництва гелеутворювачів для культури тканин.

Джерела інформації

1. Clapham P. Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro* //Z. Pflanzenzücht. - 1973. - 69. - P.142-155.

2. Hunter C.P. Plant regeneration method //European patent application. - 1987. №0245892. - A2. - P.8.

3. Kohlenbach H.W., Wernike W. Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture //Ztsch. Pflanzenphysiol. - 1978. - v. 86, N 5. - P.463-472.

4. Sorvari S. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther culture //Annales Agr. Fennic - 1986. - v. 25. - P.127-133.

5. Деклараційний патент на винахід 52031, Україна, МПК 7, C08B31/02, A01N57/00, A01N59/00, A01C1/06. Спосіб отримання полімерних матеріалів /П.Г. Дульнев, С.І. Кондратенко, Т.В. Чернишенко, В.П. Мірошніченко, Т.В. Івченко, С.А. Гончарова. - Опубл. 16.12.02, Бюл. №12.

6. Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Модифицированный крахмал ДКК мод. как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников //Физиология и биохимия культурных растений. - 2007. - т. 39, №2. - С. - С.136-143.

7. Білінська О.В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*J. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro*: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. - Харків: 1997. - 19с.

8. Chu C.-C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops //Plant Tissue Culture: Proc. Symp. - Peking: Science Press, 1978. - P.43-45.

9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures //Physiol. Plant. - 1962. - v. 15. - P.473-497.

10. Плохинский Н.А. Биометрия. - М.: Изд. Московского университета, 1964. - 367с.