



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 147115

(13) U

(51) МПК

A01H 1/04 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2020 05779**

(22) Дата подання заявки: **07.09.2020**

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **15.04.2021**

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **14.04.2021, Бюл.№ 15**

(72) Винахідник(и):

**Шестопап Оксана Леонідівна (UA),
Замбріборщ Ірина Сергіївна (UA),
Чекалова Марія Сергіївна (UA)**

(73) Володілець (володільці):

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

**(54) ДОБІР РОСЛИН-ДОНОРІВ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ
ЛІНІЙНОГО МАТЕРІАЛУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ НА ПЕРШИХ ЕТАПАХ СЕЛЕКЦІЙНОГО ДОБОРУ**

(57) Реферат:

Спосіб добору рослин-донорів, при якому отримують лінійний матеріал в культурі пиляків пшениці м'якої озимої, гомозиготних ліній методом культури in vitro пиляків. Підвищують ефективність рівня регенерації рослин, для цього використовують донорний матеріал з рослин популяції гібридів F₂.

UA 147115 U

UA 147115 U

Корисна модель належить до біотехнології, і може бути використана для отримання лінійного селекційного матеріалу пшениці м'якої.

Сучасний селекційний процес у розвинутих країнах Світу базується на залученні новітніх біотехнологічних розробок молекулярної генетики, культури тканин *in vitro*, цитогенетики та ін. Біотехнологічні методи мають велике значення для полегшення і прискорення селекційного процесу. Вони дають можливість отримати нові форми пшениці, стійкі до різних несприятливих факторів, в максимально короткі терміни і без задіяння великих посівних площ [1-4]. Для злакових культур, і зокрема м'якої пшениці, біотехнологія одержання гомозиготного матеріалу з мікроспор є найбільш розповсюдженою. Культура пиляків пшениці привертає увагу дослідників простотою виконання і дозволяє одержати протягом одного покоління генетично однорідний і стабільний селекційний матеріал, відкриває можливість отримання широкого спектра константних рекомбінантів із гібридів перших поколінь [5, 6].

Однак, незважаючи на успішні результати, важливою є проблема залежності ефективності гаплопродукції в культурі пиляків м'якої пшениці від генотипу, яка не дає змогу забезпечити передбачуваність результатів при роботі з будь-яким генотипом і підштовхує дослідників на пошуки можливої активації морфогенетичної компетентності даних генотипів пшениці в умовах *in vitro*. Актуальним завданням дослідників є розробка і оптимізація біотехнологічної методики, яка дозволить максимально швидко і ефективно отримувати стабільні форми стійких рослин пшениці. Мета роботи - оцінити рівень гаплопродукційної здатності в процесі андрогенезу *in vitro* популяцій різних поколінь (F_1 , F_2) гібридів пшениці м'якої озимої однієї і тієї ж комбінації схрещування і визначити оптимальну генерацію пшениці для максимально ефективного застосування даної біотехнології.

Найбільш близьким до корисної моделі, що заявляється, є стаття [Андрогенетическая способность отдаленных гибридов F_1 - F_3 озимых гексаплоидных тритикале с мягкой пшеницей Н.М. Ермишина, Е.М. Кременовская, О.Н. Гукасян ГНУ "Институт генетики и цитологии НАН Беларуси", Минск, Беларусь 2008 год.] [7]. У відповідності з даними статті для ефективного отримання подвоєних гаплоїдів пшениці с D/R заміщеннями необхідно використовувати більш пізні покоління віддалених гібридів (F_2 , F_3)

Даний спосіб вибрано як аналог.

Недоліки аналогу: 1) робота була проведена на малій кількості генотипів; 2) для віддалених гібридів характерна стабілізація геному у кожному наступному поколінні (менше порушень за формування мікрогаметоцитів).

Для усунення недоліків даного способу пропонується спосіб отримання ліній пшениці озимої, оснований на удосконаленні методу культури пиляків *in vitro* шляхом добору донорного матеріалу.

В основі корисної моделі, що пропонується, є дослідження впливу віку генерації донорного матеріалу на ефективність андрогенезу *in vitro* при культивуванні пиляків пшениці м'якої озимої.

У зв'язку з цим мета дослідження - вивчення ролі віку генерації гібридної комбінації у процесах формування новоутворень та регенерації рослин в культурі пиляків пшениці м'якої озимої з метою удосконалення етапів біотехнології отримання гомозиготного матеріалу

Поставлена задача вирішуються в способі шляхом дослідження різних за генерацією популяцій одних й тих самих комбінацій схрещування пшениці м'якої озимої на кожному з етапів андрогенезу за культивування пиляків *in vitro*.

Відмінності корисної моделі, що заявляється, від аналогу:

апробація методу на більшій кількості генотипів;
оцінка регенераційного потенціалу F_1 , F_2 , популяцій одних й тих самих комбінацій схрещування різних генотипів пшениці м'якої озимої в умовах одного року.

Спосіб забезпечує отримання новоутворень з морфогенних мікроспор пиляків пшениці та регенерацію з них зелених рослин.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених прийомів та досягнутим результатом (отримання ліній від кожного дослідженого генотипу пшениці) можна пояснити наступним чином.

Вибір оптимального донорного матеріалу, який забезпечує, по-перше, належну генетичну різноманітність і, по-друге - гарантоване отримання дигаплоїдного матеріалу для задоволення потреб селекції даного виду. Проведене порівняльне дослідження окремих етапів андрогенезу *in vitro* гібридних популяцій пшениці м'якої озимої різних генерацій. Показано, що при культивуванні пиляків на штучному індукційному живильному середовищі з мікроспор обох досліджених генерацій формується достатня кількість новоутворень із різним морфогенним потенціалом. Однак, далі, на регенераційному живильному середовищі максимально можливий,

для даних умов експерименту, рівень регенерації зелених рослин забезпечується в культурі калюсу, отриманого з мікроспор рослин гібридних популяцій F₂.

Спосіб здійснюється таким чином.

В якості рослинного матеріалу застосовуються пиляки пшениці м'якої. Колосся зрізують, коли вакуолізовані мікроспори більшості пиляків знаходяться на середньопізньої стадії розвитку. Попередню обробку зрізаного колосся, проводять у воді за температури 2 °C-4 °C протягом 3-5 діб. Стерилізацію колосся проводять розчином комерційного препарату "Білізна" протягом 40 хв., надалі, зливають його і заливають 0,01 н. розчином HCl (10 хв.) з наступним п'ятиразовим промиванням стерильною дистильованою водою. Пиляки експлантують у пробірки на тверде індукційне живильне середовища 190-2 з додаванням 1,5 мг/л 2,4-дихлорфенооцтової кислоти (2,4-Д), 0,5 мг/л кінетину та 90 г/л сахарози [8] та культивують у темряві перші 3 доби за температури 30 °C, а надалі - за температури 25 °C. Для регенерації з новоутворень застосовують живильне середовище MS з додаванням 0,5 мг/л кінетину та 30 г/л сахарози [8]. Новоутворення культивують на світлі за температури 24 °C. Для культивування регенерантів використовують безгормональне живильне середовище MS із половинним складом макро- та мікросолей.

Приклад 1

Проводили оцінку ефективності запропонованого способу на перших етапах гаплопродукційного процесу [9]. Як дослідний матеріал використовували пиляки пшениці м'якої 4 простих гібридів першого покоління та 4 гібридів другого покоління (тих же комбінацій схрещувань): Вікторія одеська / Lavantus; Вікторія од. / 070028s24; Вікторія од. / 114013; Вікторія од. / Alhambra. Досліджували рівень морфогенної здатності мікроспор рослин гібридів F₁ та рослин популяції F₂ пшениці м'якої озимої однієї і тієї ж комбінації схрещування. Показано, що за даних умов експерименту усі досліджені генотипи виявились чутливими до першого етапу андрогенезу *in vitro* (формування новоутворень). Відсоток формування новоутворень від висаджених пиляків коливався від 0,64±0,26 до 8,33±0,71. При цьому, найвищим відсотком новоутворень характеризувався генотип F₂ Вікторія од. / 114013. Щодо регенерації зелених рослин шляхом андрогенезу *in vitro*: з новоутворень усіх чотирьох комбінацій гібридів F₂ отримані зелені рослини, тоді як з новоутворень гібридів F₁, лише однієї - Вікторія/Lavantus (рис. 1).

Приклад 2

Проводили дослідження щодо визначення гаплопродукційної здатності шести гібридів першого покоління та рослин популяції F₂ того самого генотипу одночасно. Показано, що за показником "формування новоутворень" чотири з шести гібридів F₁ мали достовірно більші значення, ніж рослини з популяції F₂ тієї ж комбінації схрещування. І лише для двох гібридних популяцій (Наснага / Самурай та Нива / Колонія) саме в культурі пиляків рослин F₂ формування новоутворень відбувалось інтенсивніше за таку в гібридів F₁. Щодо регенерації зелених рослин шляхом андрогенезу *in vitro*, результати дослідження були ще більш показовими: отримані зелені рослини лише з новоутворень п'яти комбінацій гібридів F₁, тоді як з новоутворень рослин гібридних популяцій F₂ зелені регенеранти одержані від кожної комбінації схрещування (рис. 2).

Отже, як показано нами за результатами дворічних досліджень, для створення ефективної біотехнології отримання подвоєних гаплоїдів з простих гібридних популяцій пшениці м'якої озимої в якості донорного матеріалу доцільно використовувати пиляки гібридів другого покоління. Однак, необхідна обов'язкова оцінка селекційної цінності отриманих регенерантів та проведення додаткових експериментів (більшої кількості комбінацій схрещувань) для остаточного висновку щодо цього питання.

Джерела інформації:

1. Литвиненко М.А. Біотехнологічні методи у селекції сільськогосподарських культур // Вісник аграрної науки. 2010, № 6. С. 11-14.
2. Rizkala Aida, Al-Ansary, Attia, Haiba, Nasseef. Response of some Egyptian and introduced wheath hybrids to androgenic process// International Journal of Agricultural Research. 2012, Vol. 7. P. 205-214.
3. Tadesse W., Tawkaz S., Inagaki M.N., Picard E., and Baum M. Methods and Applications of Doubled Haploid Technology in Wheat Breeding. ICARDA, Aleppo, Syria. 2013, P. 3-6.
4. Решетников, В.Н. Спиридонович Е.В., Фоменко Т.И., Носов А.М. Растительная биотехнология - способ рационального использования биосинтетического потенциала Наука и инновации. 2014, № 5. С. 21-25.
5. Литвиненко М. А., Топал М. М., Шестопал О. Л., Замбріборщ І. С., Галаєв О. В. Удосконалена технологія селекційного процесу пшениці м'якої озимої з використанням

біотехнологічних і молекулярно-генетичних методів / Науково-методичний посібник. Одеса: Астропринт, 2015. 41 с.

5 6. Ігнатова С. О. Біотехнологічні основи одержання гаплоїдів, віддалених гібридів і соматичних регенерантів зернових і бобових культур в різних системах *in vitro*: автореф. дис. ... докт. біол. наук: спец. 03.00.20 "Біотехнологія" / С.О. Ігнатова. - Ялта, 2004.-46 с.

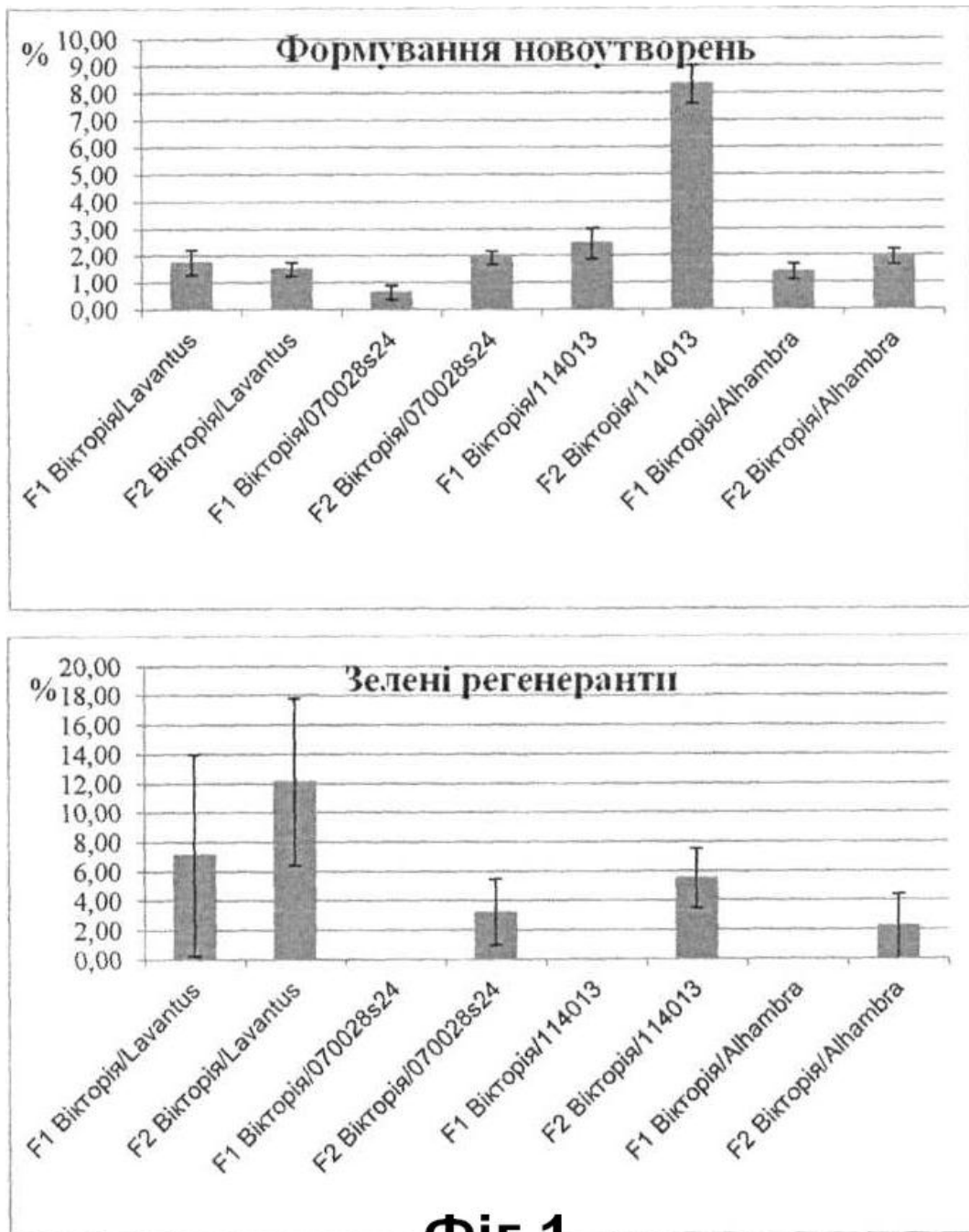
7. Н.М. Ермишина, Е.М. Кременевская, О.Н. Гукасян Андрогенетическая способность отдаленных гибридов FI-F3 озимых гексаплоидных тритикале с мягкой пшеницей // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: материалы Междунар. науч. конф., 3-6 дек. 2008 г., Минск. - Минск: Изд. центр БГУ, 2008. - С 78-80.

10 8. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків: Методичні рекомендації / Ігнатова С.О., Жосонар М.В., Лобанова К.І. та ін.; Півден. біотехнолог. Центр в рослин-ві УААН. Одеса, 2008. 12 с.

15 9. Шестопал О. Л., Замбріборщ І. С, Бойко М.С. Гаплопродукційна здатність сортів F1 та F2 гібридів пшениці м'якої озимої // Міжнар. наук, конфер. "Актуальные научные исследования в современном мире". 2017, Вин. 6(26). С.156-161.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20 Спосіб добору рослин-донорів, при якому отримують лінійний матеріал в культурі пиляків пшениці м'якої озимої, гомозиготних ліній методом культури *in vitro* пиляків, який **відрізняється** тим, що підвищують ефективність рівня регенерації рослин, для цього використовують донорний матеріал з рослин популяції гібридів F₂.



Фіг.1