

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА ВИНАХІД

№ 117974

СПОСІБ ТРАНСФОРМАЦІЇ ТА СЕЛЕКЦІЇ КУКУРУДЗИ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на винаходи 25.10.2018.

Заступник міністра економічного розвитку і торгівлі України

М.І. Тігарчук





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **117974** (13) **C2**

(51) МПК (2018.01)

A01H 4/00

A01H 1/04 (2006.01)

A01H 6/46 (2018.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2017 00622**
(22) Дата подання заявки: **23.01.2017**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.10.2018**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.07.2018, Бюл.№ 14**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.10.2018, Бюл.№ 20**

- (72) Винахідник(и):
**Абраїмова Ольга Євгенівна (UA),
Нітовська Ірина Олександрівна (UA),
Моргун Богдан Володимирович (UA),
Дзюбецький Борис Володимирович (UA),
Черчель Владислав Юрійович (UA),
Деркач Катерина Вікторівна (UA),
Сатарова Тетяна Миколаївна (UA)**

- (73) Власник(и):
**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА ІНСТИТУТ
ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Володимира Вернадського, 14, м.
Дніпро, 49027 (UA),
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА
ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ,
03143 (UA)**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
CN 103409460 A, 26.11.2013
US 6403865 B1, 11.06.2002
US 2010192253 A1, 29.07.2010
UA 72443 C2, 15.03.2005
Wang K. Biolistic gun-mediated maize genetic transformation / K Wang, B Frame. // Methods Mol Biol. –2009. –Vol. 526. –P. 29–45
Нітовська І. О. Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи / І. О. Нітовська, О. Є. Абраїмова, Т. М. Сатарова, А. М. Шаховський, Б. В. Моргун // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. –Т. 15. –С. 112-117
Petrillo C.P. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines / C.P. Petrillo, N.P. Carneiro, A.A.C. Purcino, C.H.S. Carvalho, J.D. Alves, A.A. Carneiro // Pesquisa agropecuaria brasileira, Brasilia. - 2008. – Vol. 43 –P. 371-378

UA 117974 C2

(54) СПОСІБ ТРАНСФОРМАЦІЇ ТА СЕЛЕКЦІЇ КУКУРУДЗИ

(57) Реферат:

Винахід належить до сільського господарства і біології, зокрема до розведення рослин з новими ознаками. Винахід стосується способу отримання трансгенних ліній кукурудзи шляхом

біолістичної трансформації, що включає запилення донорних рослин, відбір та стерилізацію качанів кукурудзи з гібридними зародками F₁, асептичне видалення та експлантацію незрілих зародків на живильне середовище, індукцію калусогенезу, біолістичну трансформацію, відбір калусів на селективному середовищі для калусогенезу, регенерацію рослин на селективному середовищі для регенерації, висаджування відселектованих рослин-регенерантів у ємності з ґрунтовою сумішшю та вирощування в умовах штучного клімату, відбір рослин на селективному фоні, ДНК-аналіз усіх живих рослин-регенерантів після дії селективного фактора, в якому біолістичній трансформації піддають калусну тканину, отриману не з гомозиготних зародків, а гібридних гетерозиготних зародків кукурудзи з подальшим доббором, окрім відбору на селективних середовищах для калусогенезу та регенерації та ПЛР-аналізу їх ДНК, в умовах закритого ґрунту за дії селективного навантаження у поколіннях T₁-T₅ від самоzapилення.

С. 117974 C2

ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ
БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИКИ
ІНЖЕНЕРІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ
вул. Академіка Глушківського,
148 м. Київ 01024, УКРАЇНА

(19) UA

(51) МПК (2018.01)
A01H 4/00
A01H 1/04 (2006.01)
A01H 6/46 (2018.01)

(21) Номер заявки: а 2017 00622

(22) Дата подання заявки: 23.01.2017

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.10.2018

(41) Дата публікації відомостей про заявку та номер бюлетеня: 25.07.2018, Бюл. № 14

(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: 25.10.2018, Бюл. № 20

(72) Винахідники:
Абраїмова Ольга Євгеніївна, UA,
Нітовська Ірина Олександрівна, UA,
Моргун Богдан Володимирович, UA,
Дзюбецький Борис Володимирович, UA,
Черчель Владислав Юрійович, UA,
Деркач Катерина Вікторівна, UA,
Сатарова Тетяна Миколаївна, UA

(73) Власники:
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
ІНСТИТУТ ЗЕРНОВИХ
КУЛЬТУР НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК
УКРАЇНИ,
вул. Володимира
Вернадського, 14, м. Дніпро,
49027, UA,
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ
БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ
ІНЖЕНЕРІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Академіка Заболотного,
148, м. Київ, 03143, UA

(54) Назва винаходу:

СПОСІБ ТРАНСФОРМАЦІЇ ТА СЕЛЕКЦІЇ КУКУРУДЗИ

(57) Формула винаходу:

Спосіб отримання трансгенних ліній кукурудзи шляхом біолістичної трансформації, що включає запилення донорних рослин, відбір та стерилізацію качанів кукурудзи з гібридними зародками F₁, асептичне видалення та експлантацію незрілих зародків на живильне середовище, індукцію калусогенезу, біолістичну трансформацію, відбір калусів на селективному середовищі для калусогенезу, регенерацію рослин на селективному середовищі для регенерації, висаджування відселектованих рослин-регенерантів у ємності з ґрунтовою сумішшю та вирощування в умовах штучного клімату, відбір рослин на селективному фоні, ДНК-аналіз усіх живих рослин-регенерантів після дії селективного фактора, який відрізняється тим, що біолістичній трансформації піддають калусну тканину, отриману не з гомозиготних зародків, а гібридних гетерозиготних зародків кукурудзи з подальшим доббором, окрім відбору на селективних середовищах для калусогенезу та регенерації та ПЛР-аналізу їх ДНК, в умовах закритого ґрунту за дії селективного навантаження у поколіннях T₁-T₅ від самозапилення.

(11) 117974

Державне підприємство
«Український інститут інтелектуальної власності»
(Укрпатент)

Оригіналом цього документа є електронний документ з відповідними реквізитами, у тому числі з накладеним електронним цифровим підписом уповноваженої особи Міністерства економічного розвитку і торгівлі України та сформованою позначкою часу.

Ідентифікатор електронного документа 0640231018.

Для отримання оригіналу документа необхідно:

1. Зайти до ІДС «Стан діловодства за заявками на винаходи та корисні моделі», яка розташована на сторінці <http://base.uipv.org/searchInvStat/>.
2. Виконати пошук за номером заявки.
3. У розділі «Документи Укрпатенту» поруч з реєстраційним номером документа натиснути кнопку «Завантажити оригінал» та ввести ідентифікатор електронного документа.

Ідентичний за документарною інформацією та реквізитами паперовий примірник цього документа містить 2 арк., які пронумеровані та прошиті металевими люверсами.

Уповноважена особа Укрпатенту



І.Є. Матусевич

25.10.2018

Винахід належить до сільського господарства і біології, зокрема до розведення рослин з новими ознаками.

Відомо спосіб біолістичної трансформації генотипів кукурудзи, що включає самозапилення донорних рослин ліній, відбір і стерилізацію качанів, асептичне видалення та експлантацію незрілих зародків на живильне середовище, індукцію калусогенезу, біолістичну трансформацію калусної тканини, відбір трансгенних калусів на селективному середовищі для калусогенезу, регенерацію рослин на селективному середовищі для регенерації, вирощування відселектованих рослин-регенерантів R_0 в умовах штучного клімату та відбір трансгенних рослин на селективному фоні, ПЛР-аналіз відселектованих рослин R_0 [Petrillo C.P. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines / C.P. Petrillo, N.P. Carneiro, A.A.C. Purcino, C.H.S. Carvalho, J.D. Alves, A.A. Carneiro // Pesquisa agrorreguaria brasileira, Brasilia. - 2008. - 43(3). - P. 371-378].

Недоліком цього способу є низький рівень частоти калусогенезу і регенерації *in vitro* більшості селекційно перспективних ліній кукурудзи, що не дозволяє отримувати достатню кількість генетично трансформованих рослин-регенерантів, а також низька виживаність рослин-регенерантів на селективному фоні через недостатню адаптацію асептичних рослин до умов *in vivo*, відсутність відбору в умовах закритого ґрунту за дії селективного фактора у поколіннях.

Технічна задача полягає у створенні способу отримання трансгенних ліній кукурудзи шляхом біолістичної трансформації гібридних зародків F_1 , що включає схрещування для отримання гібридних зародків F_1 , збір і стерилізацію качанів, асептичне видалення та експлантацію незрілих зародків на живильне середовище, індукцію калусогенезу, біолістичну трансформацію калусної тканини, відбір трансформованих калусів на селективному середовищі для калусогенезу, регенерацію рослин на селективному середовищі для регенерації з високим рівнем частоти калусогенезу і регенерації *in vitro* селекційно перспективних генотипів, що дозволить отримувати достатню кількість генетично-трансформованих рослин-регенерантів, з високою виживаністю рослин-регенерантів на селективному фоні, з відбором в умовах закритого ґрунту за дії селективного фактору у поколіннях шляхом ПЛР-аналізу ДНК отриманих рослин-регенерантів R_0 , висаджуванням трансформованих рослин-регенерантів у ємності з ґрунтовою сумішшю та вирощуванням в умовах штучного клімату для отримання насіння від генетично-трансформованих рослин, добір трансгенних рослин на селективному фоні в умовах закритого ґрунту та за допомогою ПЛР-аналізу у поколіннях T_1 - T_5 від самозапилення з отриманням трансгенних ліній.

Порівняльний аналіз з найближчим аналогом показує, що спосіб, який патентується, відрізняється тим, що біолістичній трансформації піддають калусну тканину, отриману не з гомозиготних зародків, а з гібридних зародків F_1 , які мають вищий, ніж у ліній, рівень калусогенезу і регенерації, а також не використовують нищівну дію селективного агента на слабкоадаптовані до умов *in vivo* асептичні рослини-регенеранти R_0 , що зменшує втрати генетично-трансформованих рослин-регенерантів R_0 , а відбір ведуть в умовах закритого ґрунту на декількох самозапилюваних поколіннях рослин T_1 - T_5 на фоні селективного тиску з одночасним ПЛР-аналізом ДНК рослин з метою отримання трансгенних ліній.

Таким чином, спосіб отримання трансгенних ліній кукурудзи шляхом біолістичної трансформації є новим і промислово придатним.

Відомості, що підтверджують можливість здійснення винаходу:

Наприклад, качани кукурудзи з гібридними зародками F_1 на десяту-чотирнадцяту добу після запилення видалають з донорної рослини та поверхнево стерилізують. Незрілі зародки кукурудзи довжиною 1-2 мм асептично видалають із зернівок і експлантають на середовище для індукції калусогенезу. Отримані калуси двотижневого віку піддають біолістичній трансформації з використанням, наприклад, вектора, що містить ген *bar*, продукт якого фермент фосфінотрицинацетилтрансфераза забезпечує стійкість рослинних клітин до гербіциду фосфінотрицину, і ведуть культивування на селективному середовищі для калусогенезу з додаванням 5-10 мг/л фосфінотрицину. Відібрані калуси висаджують на селективне середовище для регенерації з додаванням 5-10 мг/л фосфінотрицину. Рослини-регенеранти, отримані на селективному середовищі для регенерації, висаджують у ємності з ґрунтом об'ємом 1-2 л та вирощують в умовах штучного клімату з одночасним проведенням ПЛР-аналізу ДНК рослин на присутність трансгена. Рослини R_0 , для яких підтверджено ПЛР-аналізом присутність чужорідного гена (наприклад, гена *bar*), самозапилюють або схрещують з рослинами донорного генотипу. Отримане насіння генетично-трансформованих рослин-регенерантів висаджують в умови закритого ґрунту, а рослини у певній стадії розвитку обробляють селективним агентом - фосфінотрицином у певній концентрації, проводять ПЛР-аналіз загальної ДНК для відбору рослин з вбудованим чужорідним геном. Відібрані таким чином рослини самозапилюють. Відбір

на селективному фоні та самозапилення повторюють у поколіннях T₁-T₅ до отримання трансгенних ліній.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

Спосіб отримання трансгенних ліній кукурудзи шляхом біолістичної трансформації, що включає запилення донорних рослин, відбір та стерилізацію качанів кукурудзи з гібридними зародками F₁, асептичне видалення та експлантацію незрілих зародків на живильне середовище, індукцію калусогенезу, біолістичну трансформацію, відбір калусів на селективному середовищі для

10

калусогенезу, регенерацію рослин на селективному середовищі для регенерації, висаджування відселектованих рослин-регенерантів у ємності з ґрунтовою сумішшю та вирощування в умовах штучного клімату, відбір рослин на селективному фоні, ДНК-аналіз усіх живих рослин-регенерантів після дії селективного фактора, який **відрізняється** тим, що біолістичній трансформації піддають калусну тканину, отриману не з гомозиготних зародків, а гібридних

15

гетерозиготних зародків кукурудзи з подальшим добором, окрім відбору на селективних середовищах для калусогенезу та регенерації та ПЛР-аналізу їх ДНК, в умовах закритого ґрунту за дії селективного навантаження у поколіннях T₁-T₅ від самозапилення.

Комп'ютерна верстка О. Рябо

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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