



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **91923** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
A01C 1/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 00287	(72) Винахідник(и): Сергієнко Ольга Федорівна (UA), Івченко Тетяна Володимирівна (UA), Віценя Тамара Іванівна (UA), Черненко Володимир Леонідович (UA)
(22) Дата подання заявки: 14.01.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.07.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2014, Бюл.№ 14	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ОВОЧІВНИЦТВА І БАШТАННИЦТВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, вул. Інститутська, 1, п/в Селекційне, Харківський р-н, Харківська обл., 62478 (UA)

(54) СПОСІБ СТВОРЕННЯ СТІЙКИХ ПРОТИ АЛЬТЕРНАРІОЗУ ФОРМ МОРКВИ У КУЛЬТУРІ IN VITRO

(57) Реферат:

Спосіб створення стійких проти альтернаріозу форм моркви у культурі in vitro включає одержання соматичних калюсних клонів in vitro, отримання культурального фільтрату (КФ) екстрацелюлярних метаболітів чорної гнилі *Alternaria radicina* M.D. et E., селекцію калюсів, стійких до КФ чорної гнилі у культурі in vitro, регенерацію рослин з відібраних калюсів. Для клітинного добору соматичні калюси розміщують на агаризоване живильне середовище В5 з додаванням до нього як селективного агента 30 % КФ *Alternaria radicina* M.D. et E. та культивують їх протягом 60 діб.

UA 91923 U

Корисна модель належить до сільського господарства, зокрема до селекції рослин на стійкість проти хвороб.

Чорна гниль *Alternaria radicina* M.D. et E. завдає значних економічних збитків як виробникам товарних коренеплодів, так і виробникам насіння. Тому одним з головних напрямків сучасної селекції моркви є створення комерційних форм, стійких проти вищезазначених патогенів, націлене на реалізацію біологічного потенціалу рослин, одержання якісної продукції і зменшення кількості використовуваних фунгіцидів.

Нині серед вітчизняних сортів та гібридів моркви лише сорт Оленка характеризується відносною стійкістю до збудника чорної гнилі *Alternaria radicina* M.D. et E. За останні 15 років у науковій літературі опубліковано експериментальні результати, що демонструють можливість використання культуральних фільтратів та очищених токсинів як селективних агентів при доборі стійких проти грибних патогенів форм рослин [1]. Так, за допомогою селекції калюсних тканин на середовищах з метаболітами грибів створені лінії картоплі, стійкі проти фітофторозу, томатів - проти альтернаріозу, рису - проти пірикуляріозу, люцерни і льону - проти фузаріозу, конюшини - проти склеротинії [2].

Відомі польовий метод визначення стійкості проти чорної гнилі генотипів моркви в умовах природного інфекційного фону (влітку в період вегетації, восени при закладанні коренеплодів на зберігання та навесні після зберігання), а також лабораторний - шляхом штучного зараження дисків коренеплодів [3]. Недоліком першого способу є тривалий час (кілька років) та витратність польових досліджень. Другий спосіб хоча й потребує менших витрат, проте не дає можливості отримати соматоклональні варіації досліджуваних зразків, стійкі до комплексу токсинів цього гриба.

Найбільш близьким за суттю до запропонованої корисної моделі є спосіб клітинної селекції моркви у суспензійній культурі, розроблений у Росії (прототип) [4]. Цей спосіб передбачає отримання калюсної культури *in vitro*, а з неї - суспензійної культури на апараті ролюрного типу зі швидкістю обертання 100 об./хв.. Чисту культуру гриба *Alternaria radicina* M.D. et E. Отримували на рідкому середовищі Чапека. Культуральний фільтрат (КФ) суспензії токсинів гриба отримували шляхом фільтрування через фільтрувальний папір. Культивування суспензії клітин моркви на селективному середовищі з додаванням 30-50 % КФ приводили протягом 8 пасажів, далі - пасаж без КФ і ще 4 пасажі - з КФ. Із клітин, що вижили регенерували рослини моркви, стійкі проти токсинів чорної гнилі. Наведений спосіб має наступні недоліки:

- суспензійна культура клітин вимагає дорогого обладнання (апарати для струшування культивувальних ємностей) та значних енерговитрат на цілодобове живлення апаратів;

- значна тривалість процесу отримання стійких до КФ чорної гнилі клітин - біля 215 днів, що пов'язано із необхідністю після отримання калюсів проведення 40-добового нарощування суспензійної культури клітин і 126-добової безпосередньої клітинної селекції.

Задачею пропонованого способу є створення цінних вихідних селекційних форм моркви шляхом добору в культурі ізолюваних тканин *in vitro*, стійких проти альтернаріозу генотипів.

Спосіб, що пропонується, здійснюється наступним чином:

1. Коренеплоди моркви вихідних форм вводять у стерильну культуру. Дезінфекцію коренеплодів проводять у ламінарному боксі за такою послідовністю: рослинний матеріал занурюють у розчин 70 % етилового спирту на 1 хвилину; далі його обробляють 2,6 % розчином гіпохлориту натрію за експозиції 20 хвилин та промивають не менше 5 разів стерильною дистильованою водою.

2. Висічки коренеплодів розміром 5 мм із кортикальної паренхіми, яка має у своєму складі флоему, ксилему і камбіальні клітини, розміщують на середовищі В5 з вмістом фітогормонів 0,2 мг/л 2,4 Д і 0,2 мг/л кінетину для індукції калусогенезу [4]. Культивування проводять при освітленні 2000 лк та температурі повітря 23-25 °С.

3. Нарощування калюсної маси здійснюють протягом 2 пасажів. Тривалість одного пасажу - 30 діб.

4. Культуральний фільтрат *Alternaria radicina* M.D. et E. отримують шляхом вирощування високовірulentних штамів гриба на рідкому живильному середовищі Чапека. [5].

5. Для добору стійких проти *Alternaria radicina* M.D. et E. генотипів моркви у культурі *in vitro* шматочки калюсів діаметром 10 мм розміщують на твердому живильному середовищі В5, до складу якого перед автоклавуванням додають як селективний агент 30 % рідину культурального фільтрату цього гриба. Калюси утримують при температурі від 23 °С до 25 °С, 16-годинному фотоперіоді з інтенсивністю освітлення 2000 лк протягом 60 діб.

6. Після вищезазначеного селективного періоду (90 діб) добирають калюси зеленого або ясно-зеленого кольору, пересаджують їх на свіже середовище і регенерують з них рослини за відомими методами [5].

Приклад. У культурі in vitro проводили добір калюсів моркви чотирьох генотипів: 306/1, 306/2, 307/1, 309/2 на селективному середовищі з КФ *Alternaria radicina* M.D. et E згідно з запропонованим способом. Вивчення життєздатності калюсів виявило, що на контрольному середовищі без додавання КФ калюси світло-зеленого забарвлення становили в середньому 92,7 %, а повністю некротичні - лише 8,3 %. На середовищі з 30 % КФ частка життєздатних зелених калюсів знизилась у середньому на 57 % і становила 36,7 %. Спостерігали 39,2 % калюсів з наявністю некротичної зони, яка становила 40-50 % об'єму калюсу, та 24,4 % повністю некротичних калюсів (табл. 1). Це означає, що досліджувана доза КФ є напівлетальною і дозволяє добирати калюсні клітини, стійкі до дії селективного агента.

З калюсних тканин, що вижили на селективному середовищі, регенерували рослини. Виявлено, що при перенесенні в умови ex vitro рослини мали високі адаптивні якості і їх приживлення у кокосовому субстраті становило 92,7 %, не дивлячись на те, що ювенільні рослини моркви негативно реагують на пересаджування (табл. 2).

Таблиця 1

Життєздатність калюсів моркви на середовищі з КФ чорної гнилі

Зразок	Живильні середовища					
	Без КФ			З КФ (запропоноване)		
	зелені калюси, %	калюси з некротичними зонами, %	некротичні калюси, %	зелені калюси, %	калюси з некротичними зонами, %	некротичні калюси, %
306/1	77,8	0	26,2	0	66,7	34,3
306/2	100	0	0	66,7	0	33,3
307/1	92,9	0	7,1	0	70,0	30,0
309/2	100	0	0	80,0	20,0	0
Середнє	92,7	0	8,3	36,7	39,2	24,4

Таблиця 2

Приживлення регенерантів моркви, стійких до КФ чорної гнилі, у кокосовому субстраті

Спосіб клітинної селекції	Клони моркви, стійкі до КФ чорної гнилі									Всього		
	306			307			309					
	Виса-дже-но шт.	Прижи-лось, шт.	Прижи-лось, %	Виса-дже-но шт.	Прижи-лось, шт.	Прижи-лось, %	Виса-дже-но шт.	Прижи-лось, шт.	Прижи-лось, %	Виса-дже-но шт.	Прижи-лось, шт.	Прижи-лось, %
60 днів на селектив-ному середовищі з КФ	15	13	86,7	2	2	100	24	21	87,5	41	38	92,7±4,0

Отже, запропонований спосіб скорочує тривалість отримання клітинних популяцій моркви, стійких проти комплексу токсинів чорної гнилі з 215 діб до 120 діб, не потребує складного обладнання та скорочує енерговитрати. Завдяки своїй швидкості він дозволяє за рік отримати стійкі до альтернативу генотипи моркви (фаза розвитку рослин - коренеплід), а на другий рік - їх насіння для селекційної роботи.

Джерела інформації:

1. Глеба Ю.Ю. Клеточная инженерия растений. / Ю.Ю. Глеба, К.М. Сытник. - К.: Наукова думка, 1984. - 160 с.

2. Родева В., Станчева Й. Използване на токсични метаболити от фитопатогени в in vitro селекцията за устойчивост при растенията / В. Родева, И. Станчева // Растениевъдни науки. - София (Болгария): Национален центр за аграрии науки. - 2003. - Т. 40. - С. 204-209.

3. Сазонова Л.В. Корнеплодные растения: морковь, сельдерей, петрушка, пастернак, редис, редька / Л.В. Сазонова, З.А. Власова. - Л.: Агропромиздат, 1990. - С. 72-83.

4. Раскалиева В.А., Калашникова Е.А. Использование методов биотехнологии в получении форм моркови, устойчивых к альтернариозу // Сельскохозяйственная биотехнология. Избранные работы. - М.: Воскресенье, 2001. - Т.2. - С.81-91.

5. Сергієнко О.Ф. Методика мікроклонування селекційних зразків моркви / О.Ф. Сергієнко, В.Б. Баштан, Т.К. Горова. - Мерефа: ЮБ УААН, 2004. - 12 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10 Спосіб створення стійких проти альтернаріозу форм моркви у культурі *in vitro*, що включає одержання соматичних калюсних клонів *in vitro*, отримання культурального фільтрату (КФ) екстрацелюлярних метаболітів чорної гнилі *Alternaria radicina* M.D. et E., селекцію калюсів, стійких до КФ чорної гнилі у культурі *in vitro*, регенерацію рослин з відібраних калюсів, який
15 **відрізняється** тим, що для клітинного добору соматичні калюси розміщують на агаризоване живильне середовище В5 з додаванням до нього як селективного агента 30 % КФ *Alternaria radicina* M.D. et E. та культивують їх протягом 60 діб.

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

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