



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **30285** (13) **U**  
 (51) МПК (2006)  
**A01H 1/04**  
**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 ІНДУКЦІЇ НОВОУТВОРЕНЬ У КУЛЬТУРІ НАСІННЄЗАРОДКІВ МОРКВИ IN VITRO**

1

2

(21) u200709889

(22) 03.09.2007

(24) 25.02.2008

(72) СЕРГІЄНКО ОЛЬГА ФЕДОРІВНА, UA,  
ІВЧЕНКО ТЕТЯНА ВОЛОДИМИРІВНА, UA,  
ЯРОВИЙ ГРИГОРІЙ ІВАНОВИЧ, UA

(73) ІНСТИТУТ ОВОЧІВНИЦТВА І  
БАШТАННИЦТВА УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ  
АГРАРНИХ НАУК, UA

(56)

(57) Спосіб індукції новоутворень у культурі насіннєзародків моркви in vitro, що включає

асептичну обробку бутонів і культивування їх на твердому живильному середовищі у темноті протягом 2 тижнів, виділення насіннєзародків з бутонів і культивування їх на твердому живильному середовищі з додаванням регулятора росту 2,4-Д при освітленні, який **відрізняється** тим, що вихідні рослини вирощують у польових умовах, бутони культивують на середовищі B5 без гормонів, виділені насіннєзародки культивують на середовищі B5, доповненому регулятором росту 2,4-Д, кінетином та гібереліном по 0,2 мг/л кожного.

Корисна модель належить до сільського господарства і може бути застосована для селекційних чи науково-теоретичних потреб.

Аналогом корисної моделі є метод індукції андрогенезу у культурі пиляків моркви, використаний Andersen та ін. (1990) [1]. Згідно нього пиляки, виділені з вирощених у теплиці насінневих рослин, культивували на живильному середовищі Keller, Armstrong (1978) [2], що являє собою тверде середовище B5 (Gamborg та ін.) [3], доповнене 10% сахарози, 500 мг/л глютаміну, 100 мг/л серину, 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти та 0,1 мг/л 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти (2,4-Д). Завдяки цьому методу новоутворення одержали у 13% досліджуваних генотипів. З цих новоутворень потім можна отримати дигапloidні рослини, що на кілька років дозволяє прискорити створення гомозиготних ліній.

Недоліком цього способу є неможливість отримання гаметогенних новоутворень з чоловічостерильних рослин, у яких пиляки відсутні.

Найбільш близьким за технічною сутністю до запропонованої корисної моделі є метод одержання калюсів та ембріодів з макроспор моркви in vitro (Тюкавін та ін., 2000, 2000) [4, 5], який полягає в наступному:

1. Донорські насінневі рослини моркви вирощують у вегетаційній камері при освітленості 7-8 клк, фотоперіоді 16 год і температурі повітря 20-25°C.

2. Бутони після асептичної обробки культивують протягом 2 тижнів у темноті на твердому живильному середовищі MSM [6] з 0,2 мг/л 2,4-Д.

3. З бутонів виділяють насіннєзародки і культивують їх на тому ж середовищі при освітленні до утворення ембріодів або калюсів. Найближчим за складом компонентів до середовища, яке використовується у запропонованій корисній моделі є відомий пропис B5 [3]. Склад живильного середовища-прототипу наступний, мг/л:

макроелементи:	
KNO <sub>3</sub>	3000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
MgSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O	500
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	150
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	150
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
мікроелементи:	
MnSO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	10
KI	0,75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	2
CuSO <sub>4</sub>	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0,025
органічні речовини:	
мезоінозит	100
тіамін хлорид	10

(19) **UA** (11) **30285** (13) **U**

піридоксин хлорид	1
нікотинова кислота	1
сахароза	30000
агар-агар	7000
вода	до 1л

Таблица

Частота новоутворень  
з насіннєзародків моркви у культурі in vitro, %

Спосіб-прототип індукції гіногенезу в культурі in vitro має наступні недоліки:

- після культивування бутонів на середовищі з ауксином 2,4-Д насіннєзародки розрихлюються і це значно утруднює їх виділення;

- позитивний відгук одержують при використанні тих донорських насіннєвих рослин, які вирощують у захищеному ґрунті при регульованих температурі та вологості, тоді як для селекціонерів важливо дібрати вихідні рослини із заданими ознаками безпосередньо в польових розсадниках, де їх властивості проявляються в адекватних умовах;

- застосування захищеного ґрунту істотно підвищує вартість методу.

Метою корисної моделі є підвищення виходу новоутворень (калюсів чи ембріоїдів) з насіннєзародків моркви у культурі in vitro, розширення спектру генотипів моркви, що дають позитивний результат при вирощуванні вихідних рослин у незахищеному ґрунті.

Мета досягається наступним способом:

1. Вихідні рослини вирощують у польових умовах і перед цвітінням ізолюють марлевими ізоляторами, щоб зменшити осідання пилу з повітря на суцвіття.

2. Для культури in vitro зрізають суцвіття I-II порядків за 1-2 дні до початку цвітіння. Здійснюють їх поверхневу асептичну обробку.

3. Бутони культивують на живильному середовищі В5 без гормонів протягом 2 тижнів при температурі 25°C у темноті.

4. Виділені з попередньо підготовлених бутонів (п.1-3) насіннєзародки культивують на індуктивному середовищі В5 з додаванням 2,4-Д, кінетину і гібереліну по 0,2мг/л кожного протягом 6 тижнів при освітленості 1клк, світловому періоді 16год. та температурі повітря 25°C. Приклад. Проводили дослідження з індукції гіногенезу у моркви у культурі in vitro протягом трьох років. Використовували 20 генотипів (гібридів, сортів). Вихідні рослини добирали у селекційних польових розсадниках та накривали їх марлевими ізоляторами.

Суцвіття моркви другого порядку поверхнево дезінфікували розчинами спирту та гіпохлориду натрію [7]. Введення бутонів у культуру in vitro здійснювали в стерильних умовах у пилезахисному боксі з горизонтальною примусовою вентиляцією КГТГ-1М. Бутони, а потім насіннєзародки з них культивували двома описаними вище способами: 1) - контроль, згідно Тюкав і н та ін. (2000) [4, 5]; 2) - запропонований.

Результати досліджень свідчать про те, що при запропонованому способі насіннєзародки у бутонах не розрихлювалися і легко піддавались вичлененню. Новоутворення були одержані з насіннєзародків у 25% генотипів, тоді як за допомогою способу-прототипу - у жодного генотипу (таблиця).

№ біотехнологічного каталогу вихідного генотипу	Спосіб гіногенезу	
	Прототи п	Запропоновани й
258	0	0
259	0	25,0
261	0	20,0
263	0	0
264	0	0
265	0	0
266	0	50,0
268	0	0
269	0	0
271	0	0
272	0	0
273	0	0
274	0	0
275	0	0
276	0	0
277/1	0	0
278/1	0	41,7
278/2	0	0
279/1	0	16,7
279/2	0	0
середнє	0	7,7
HIP <sub>0.05</sub>		4,53

Частота утворення калюсів у генотипів з позитивною реакцією була значною і знаходилась в межах 16,7-50,0%. Середня частота гіногенезу по досліді при запропонованій корисній моделі становила 7,7% і істотно (HIP<sub>0.05</sub>=4,53) відрізнялась від контрольного способу, де складала 0%.

Таким чином, запропонований спосіб підвищує ефективність гіногенезу моркви у культурі in vitro, робить більш зручним виділення насіннєзародків з бутонів і дозволяє отримувати позитивний результат у 25% генотипів, вирощених у незахищеному ґрунті та високу частоту новоутворень у чутливих генотипів.

Список посилань:

1. Andersen S.B., Christiansen I., Farestveit B. Carrot (*Daucus carota* L.): In vitro production of haploids and field trials// Biotechnology in Agriculture and For estry: Springer - Verlag, Berlin Heidelberg, 1990. - Vol. 12. - P.393-402.

2. Keller W.A., Armstrong K.C. High frequency production of microspore-derived plants from *Brassica napus* anter cultures// Z. Pflanzenziicht, 1978. - Vol. 80. - P.100-108.

3. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrients requirements of suspension culture of soybean root cells// Experimental Cell Researches. - 1968. - Vol.50.-P.151-158.

4. Тюкавин Г.Б., Шмыкова Н.А. Культура неопыленных семян моркови // Междунар. науч.-практич. конференция «Селекция и

семеноводство овощных культур в XXI веке». -М.: 2000. -С.275-277.

5. Тюкавин Г.Б., Домблидес А.С., Шмыкова Н.А. Гиногенез моркови *in vitro* II Междунар. науч.-практич. конференция «Селекция и семеноводство овощных культур в XXI веке». -М.: 2000. -С.277-279.

6. Masuda K., Kikuta Y., Okazava Y.A. A revision of the medium for somatic embriogenesis in carrot suspension culture// Journal of Faculty Agriculture of Hokkaido University (Japan). - 1981. - Vol. 60, Pt. 3. - P.183-193.

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