

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2549785

СПОСОБ ГИСТОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ВИНОГРАДНЫХ ПОБЕГОВ МОРОЗАМИ

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение Высшего профессионального образования КАБАРДИНО-БАЛКАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.М. КОКОВА (RU)*

Автор(ы): *Тамахина Аида Яковлевна (RU)*

Заявка № 2013157464

Приоритет изобретения 24 декабря 2013 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 01 апреля 2015 г.

Срок действия патента истекает 24 декабря 2033 г.

Врио руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2013157464/13, 24.12.2013
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.12.2013
Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 24.12.2013
(45) Опубликовано: 27.04.2015 Бюл. № 12
(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: SU 1172488 A1, 15.08.1985. RU 2407278
C1, 27.12.2010. RU 2426300 C2, 20.08.2011.
WURMS K. et al. Effects of milsana and
benzothiadiazole on the ultrastructure of
powdery mildew haustoria on cucumber //
Phytopathology, 1999, Vol.89, N9, P. 728-736

Адрес для переписки:
360030, г.Нальчик, пр. Ленина, 1в, КБГАУ, НИС
(патентный отдел), Апажеву А.К.

(72) Автор(ы):
Тамахина Аида Яковлевна (RU)
(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение Высшего
профессионального образования
КАБАРДИНО-БАЛКАРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.М. КОКОВА
(RU)

(54) **СПОСОБ ГИСТОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЯ
ВИНОГРАДНЫХ ПОБЕГОВ МОРОЗАМИ**(57) **Формула изобретения**

Способ гистохимического определения степени повреждения виноградных побегов морозами, включающий окрашивание свежих поперечных срезов побегов винограда толуидиновым синим и синим Эванса, оценку степени повреждения и локализации участков неповрежденного камбия в баллах: 0-2 - считают побеги неповрежденными, частично и среднеповрежденными; 3 - поврежденные побеги в благоприятных условиях могут регенерировать; 4-5 - побеги считают очень сильно поврежденными, погибшими и требуют удаления.

RU 2 549 785 C1

RU 2 549 785 C1



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013157464/13, 24.12.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.12.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.12.2013

(45) Опубликовано: 27.04.2015 Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SU 1172488 A1, 15.08.1985. RU 2407278 C1, 27.12.2010. RU 2426300 C2, 20.08.2011. WURMS K. et al. Effects of milsana and benzothiadiazole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria on cucumber // Phytopathology, 1999, Vol.89, N9, P. 728-736

Адрес для переписки:

360030, г.Нальчик, пр. Ленина, 1в, КБГАУ, НИС
(патентный отдел), Апажеву А.К.

(72) Автор(ы):

Тамахина Аида Яковлевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение Высшего профессионального образования КАБАРДИНО-БАЛКАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.М. КОКОВА (RU)

(54) СПОСОБ ГИСТОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ВИНОГРАДНЫХ ПОБЕГОВ МОРОЗАМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области сельского хозяйства, а именно к виноградарству. Способ включает окрашивание свежих поперечных срезов побегов винограда толудиновым синим и синим Эванса. Оценивают степень повреждения и локализации участков неповрежденного камбия в баллах: 0-2 - считают побеги неповрежденными, частично и среднеповрежденными; 3 -

поврежденные побеги в благоприятных условиях могут регенерировать; 4-5 - побеги считают очень сильно поврежденными, погибшими и требуют удаления. Способ обеспечивает простоту и быстроту процедуры окрашивания, длительный срок хранения растворов красителей, определение степени обрезки куста. 6 ил., 1 табл., 2 пр.

RU 2 549 785 C1

RU 2 549 785 C1

Изобретение относится к сельскому хозяйству, а именно к области виноградарства, и может быть использовано в хозяйствах для уточнения результатов полевой оценки повреждения виноградных растений морозами и сохранения наиболее ценных сортов винограда для изучения возможности их районирования.

5 Известен полевой метод оценки повреждения винограда морозами, основанный на визуальной оценке окраски глазков и древесины на продольных срезах, луба - на поперечных надрезах побегов [1]. Данный метод трудоемок и не точен, так как при повреждении луба камбий (образовательная ткань, обеспечивающая регенерацию побега) может остаться неповрежденным.

10 Известен способ определения степени повреждения виноградных побегов путем окрашивания поперечных срезов из средней части замороженных побегов солями тетразолия (2,3,6-три-фенилтетразолий хлоридом) [2]. Недостатком данного способа является сложность проведения и неточность результатов ввиду отсутствия информации о состоянии камбия.

15 Известен также способ оценки регенерации поврежденных тканей побегов винограда, основанный на выявлении живых и мертвых клеток тканей путем окрашивания свежеприготовленных срезов 0,1% раствором нейтрального красного в 60% спирте [3]. Недостатком данного способа является необходимость приготовления очень тонких срезов и невозможность дифференцированного окрашивания камбия.

20 Наиболее близким техническим решением (прототип) задачи определения степени повреждения виноградных побегов морозами является анализ структуры феллемного слоя перидермы. Этот способ основан на оценке интенсивности флуоресценции клеток феллемы побегов по пятибалльной шкале и определении степени вызревания побегов по цвету и интенсивности первичной флуоресценции [4]. Недостатком способа является
25 отсутствие информации о возможной степени повреждения побегов после воздействия критических отрицательных температур.

Цель изобретения - повышение точности определения степени повреждения виноградных побегов после воздействия критических отрицательных температур.

30 Поставленная цель достигается окрашиванием свежих поперечных срезов побегов винограда толуидиновым синим и синим Эванса, оценкой степени повреждения и локализации участков неповрежденного камбия в баллах: 0-2 - считают побеги неповрежденными, частично и среднеповрежденными; 3 - поврежденные побеги в благоприятных условиях могут регенерировать; 4-5 - побеги считают очень сильно поврежденными, погибшими и требуют удаления.

35 Способ осуществляется путем окрашивания камбия цитоплазматическими витальными красителями - толуидиновым синим и синим Эванса, применяющимися в гистохимической практике для прижизненного окрашивания мукополисахаридно-протеиновых комплексов.

40 На фиг.1 показан поперечный срез стебля винограда, окрашенный толуидиновым синим, $\times 300$ (к - камбий, л - луб): а) степень повреждения камбия 0 баллов, б) степень повреждения камбия 2 балла.

На фиг.2 показан поперечный срез стебля винограда, окрашенный синим Эванса: а) $\times 300$; б) $\times 600$.

45 На фиг.3 показан камбий и феллоген (ф) на поперечном срезе стебля винограда, $\times 300$: а) толуидиновый синий; б) синий Эванса.

Для анализа производят бритвой поперечные срезы свежих побегов (одно- и двухлетних). Средняя проба 20 побегов. Толщина срезов не более 0,1 мм. Окрашивание срезов толуидиновым синим проводят в следующей последовательности: 1) фиксация

в смеси 4% уксусной кислоты и 70% спирта (1:1) в течение 1 часа; 2) окрашивание в течение 1 мин в растворе красителя (0,1% раствор в 2% уксусной кислоте). Результат: камбий окрашен в фиолетовый, луб - в желтый, древесина - в голубой цвет (фиг.1, фиг.3а).

5 Окрашивание срезов синим Эванса проводят в следующей последовательности: 1) фиксация в 70% спирте в течение 1 часа; 2) окрашивание в течение 1 мин в растворе красителя (0,1% раствор в кипяченой воде); 3) промывание в спирте. Результат: камбий окрашен в синий цвет, луб - в желтый, древесина - в голубой цвет (фиг.2, фиг.3б).

10 Срезы помещают на предметное стекло, микроскопируют в световом биологическом микроскопе при $\times 200-400$. При осуществлении способа необходимо пользоваться предлагаемой шкалой определения степени повреждения побегов по сохранности камбия в баллах.

Балльная оценка степени повреждения побега морозами по сохранности камбия		
15 Балл	Степень повреждения и интенсивность окрашивания камбия	Степень повреждения побега
0	Сплошное широкое или местами суженное кольцо камбия, клетки окрашены интенсивно и равномерно.	Нет повреждения
1	Кольцо камбия узкое, с небольшими разрывами. Повреждено до 10% общей площади ткани. Клетки окрашены интенсивно, неравномерно.	Частичное повреждение
2	Повреждение камбия 11-40%. Неповрежденные участки камбия расположены в зоне сердцевинных и радиальных лучей. Клетки окрашены интенсивно, неравномерно.	Среднее повреждение
20 3	Повреждение камбия 41-50%. Камбий выявляется в виде небольших островков, расположенных местами в непосредственной близости друг от друга. Клетки окрашены слабо.	Сильное повреждение
4	Повреждение камбия 51-75%. Неповрежденные небольшие участки камбия изолированы друг от друга. Клетки окрашены слабо.	Очень сильное повреждение.
5	Камбий поврежден на 100%	Погиб

25 Пример 1. После сильных морозов в третьей декаде ноября 2011 г. и в феврале 2012 г. ($-25,8^{\circ}\text{C}$) у изучаемого винограда сорта Бианка в предгорной зоне Кабардино-Балкарской Республики весной по результатам полевой оценки 70% учетных побегов имели признаки повреждения глазков, луба, древесины и требовали удаления.

30 Гистохимическое окрашивание срезов побегов толуидиновым синим и синим Эванса позволило выявить камбий со средней степенью повреждения (до 40%) у 30% учетных побегов с признаками повреждения. При этом неповрежденные участки камбия расположены в зоне сердцевинных и радиальных лучей. Клетки окрашены интенсивно, неравномерно (оценка 2 балла). Данные побеги рекомендуется сохранить. Остальные побеги имели камбий с сильным и очень сильным повреждением и требуют удаления.

35 Пример 2. После сильных зимних морозов у районированного винограда сорта Подарок Магарача по результатам полевой оценки 20% учетных побегов имели признаки повреждения глазков, луба и древесины. Гистохимическое окрашивание срезов побегов толуидиновым синим и синим Эванса выявило очень сильное повреждение камбия (более 50%). Неповрежденные небольшие участки камбия изолированы друг от друга. Клетки окрашены слабо (оценка 4 балла). Такие побеги 40 следует обрезать.

Таким образом, способ позволяет уточнить результаты полевой оценки повреждения виноградных побегов после воздействия критических отрицательных температур, определить степень обрезки куста. Кроме того, способ обеспечивает удобство 45 визуальной оценки степени жизнеспособности камбия в результате дифференцированной окраски тканей, простоту и быстроту процедуры окрашивания, низкую затратность, длительный срок хранения растворов красителей (3 месяца).

Источники информации

1. Мишуренко А.Г., Шерер В.А., Овчинникова Л.Ф. Зимостойкость винограда / Под

ред. Мишуренко А.Г. - Киев: Урожай, 1975. - 176 с.

2. Тюрин М.М., Гоголева Г.А. Комплексная оценка устойчивости плодовых растений к морозу // Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. - Л., 1973. - С.381.

5 3. Физиологические основы адаптации многолетних культур к неблагоприятным факторам среды: Сб. тр. / Отв. ред. С.И. Тома. - Кишинев: Штиинца, 1984. - 296 с.

4. SU №1172488 А, 15.08.1985. А.И. Литвак. Способ определения степени вызревания побегов винограда. Бюл. №30.

10 Формула изобретения

Способ гистохимического определения степени повреждения виноградных побегов морозами, включающий окрашивание свежих поперечных срезов побегов винограда толуидиновым синим и синим Эванса, оценку степени повреждения и локализации участков неповрежденного камбия в баллах: 0-2 - считают побеги неповрежденными, 15 частично и среднеповрежденными; 3 - поврежденные побеги в благоприятных условиях могут регенерировать; 4-5 - побеги считают очень сильно поврежденными, погибшими и требуют удаления.

20

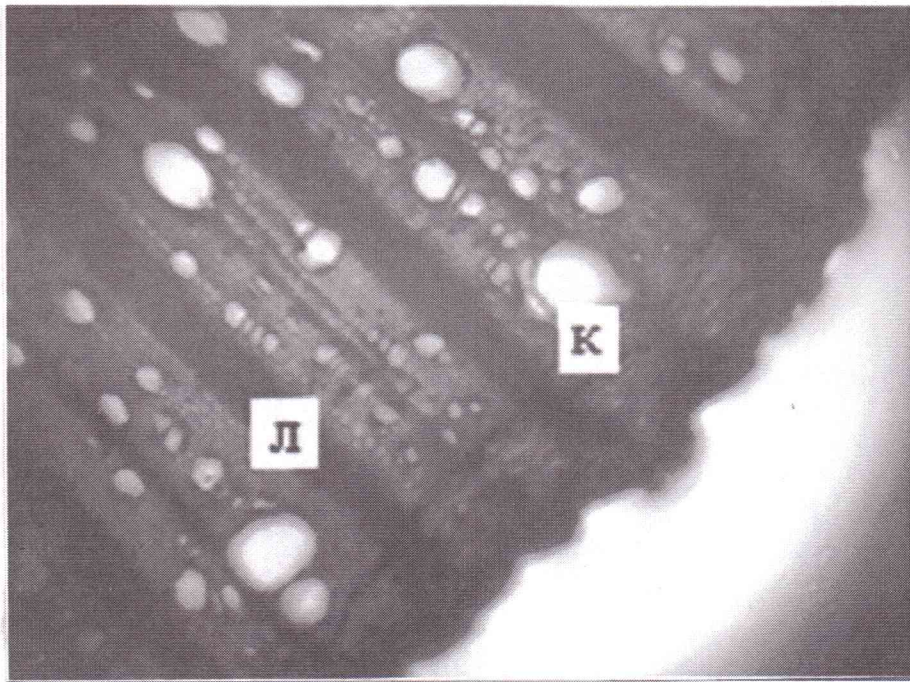
25

30

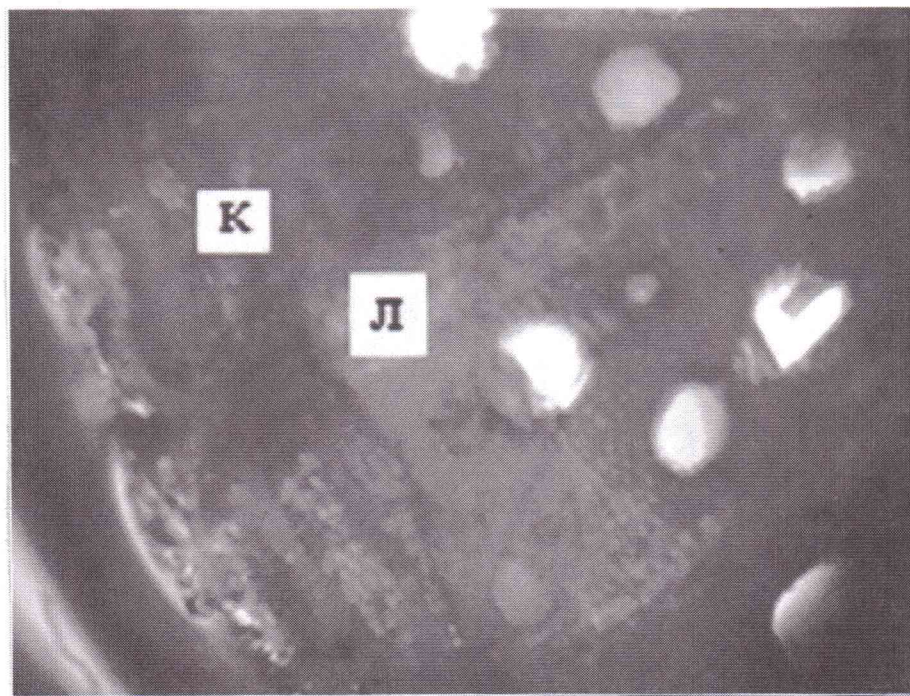
35

40

45

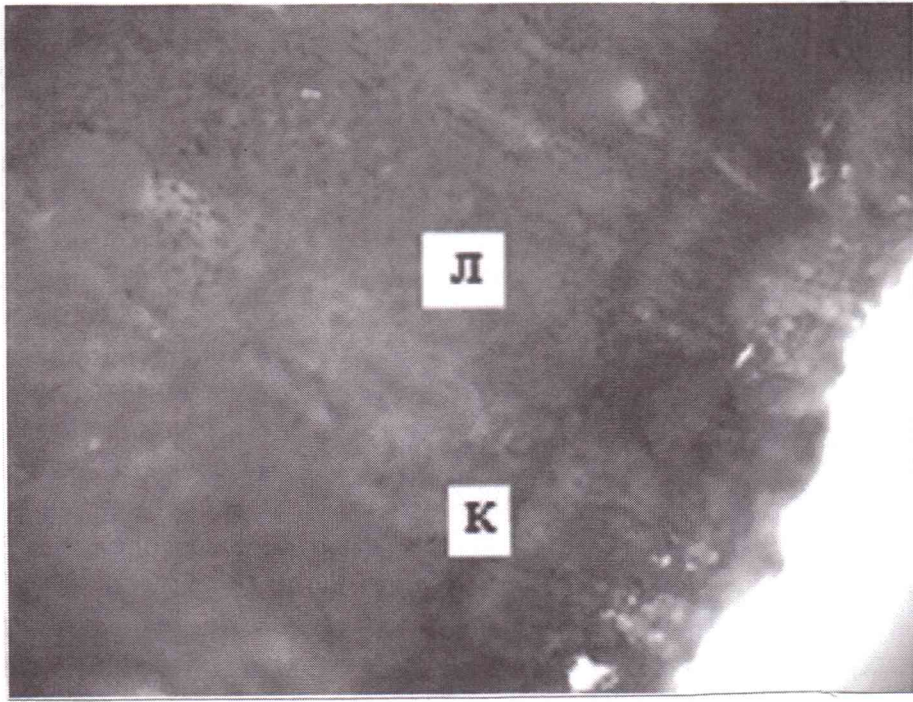


а)

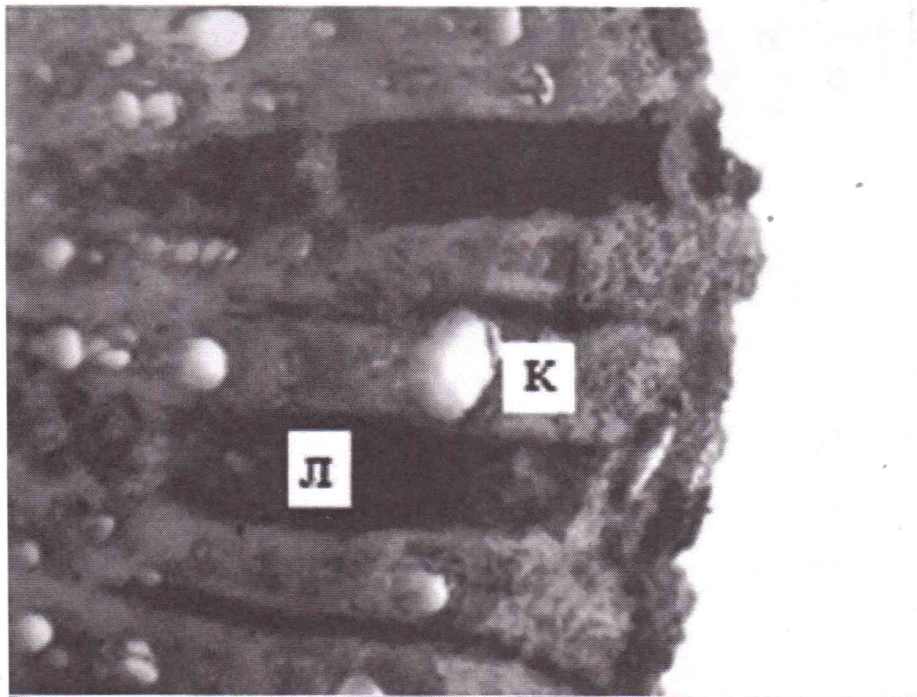


б)

Фиг. 1

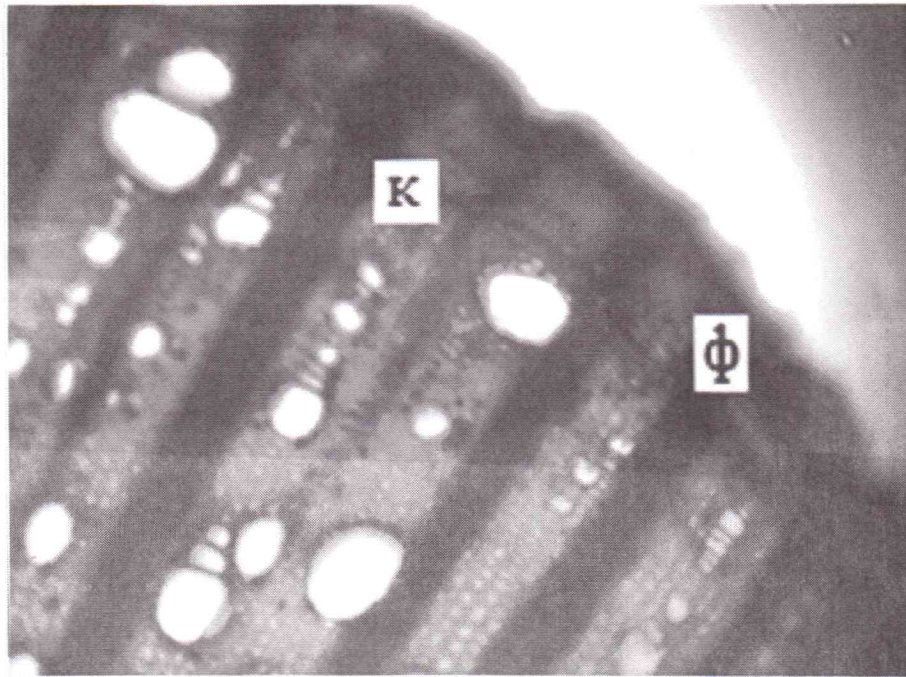


а)

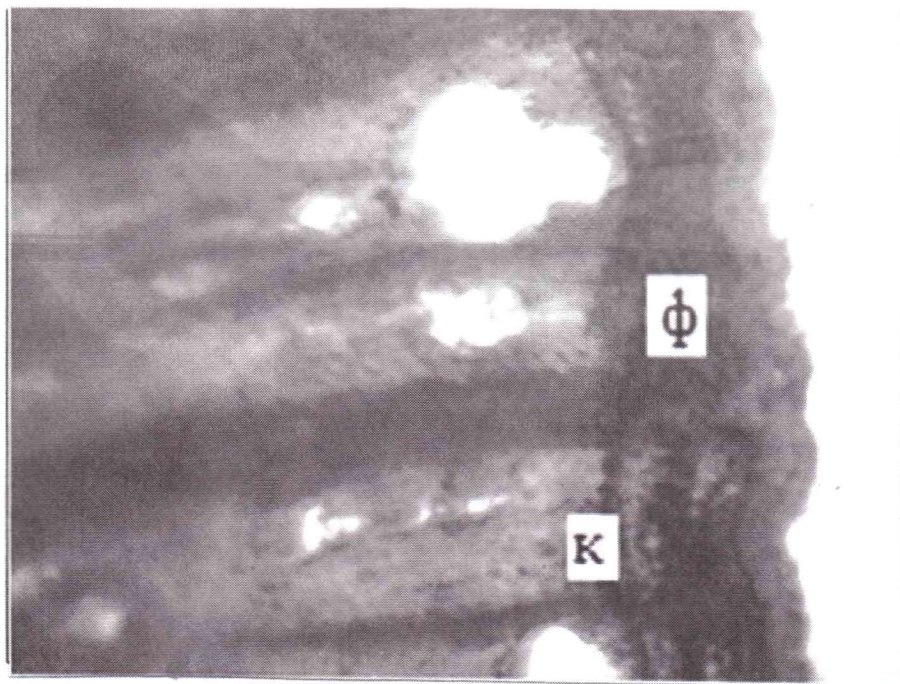


б)

Фиг. 2



а)



б)

Фиг. 3