



МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2016/0275.2

(22) 20.05.2016

(45) 28.02.2017, бюл. №4

(72) Какимжанова Алмагуль Апсаламовна; Каримова Венера Конысбаевна; Нұрғазы Айдана Серікболқызы; Мағзұмова Гүлмира Козовна; Раманкулов Ерлан Мирхайдарович

(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Национальный центр биотехнологии" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(56) RU №2485755, 28.10.2011

(54) СПОСОБ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ПОСАДОЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ ТОПОЛЯ СЕРЕБРИСТОГО И ТОПОЛЯ БОЛЛЕ

(57) Полезная модель относится к биотехнологии растений, может быть использована в лесном, лесопарковом хозяйстве и питомниководстве для массового получения селекционного посадочного материала ценных древесных растений, в частности, тополя серебристого и тополя Болле.

Задача полезной модели - получение качественного стандартного посадочного материала тополя серебристого и тополя Болле с помощью микроклонального размножения, которые относятся к трудно черенкуемым традиционным способом видам тополя.

Новизна полезной модели - разработан и внедрен способ размножения тополя серебристого (*Populus alba* L.) и тополя Болле (*Populus bolleana* L.) биотехнологическими методами для создания производства конкурентоспособной и

экспоориентированной продукции в виде готовых саженцев для озеленения городов с учетом имеющихся неблагоприятных почвенно-климатических условий.

Технический результат полезной модели заключается в повышении коэффициента размножения микропобегов тополя серебристого и тополя Болле из пазушных почек введенных в культуру *in vitro*.

Сущность полезной модели заключается в том, что микроклональное размножение для укоренения и роста микропобегов тополя серебристого и тополя Болле из пазушных побегов осуществляют с уменьшенным содержанием макросолей на питательной среде  $\frac{1}{2}$  WPM с добавлением ИМК 0,01 мг/л. При добавлении в питательную среду  $\frac{1}{2}$  WPM гормона ИМК 0,01 мг/л происходит более быстрый рост, формирование хорошо развитой корневой системы, что позволяет высадить микропобеги сразу в почвогрунт. Корневая система микропобегов тополя серебристого и тополя Болле, культивируемых на данной среде, более мощная и такие растения лучше укореняются в грунте (90-100%), также повышается коэффициент размножения, что является важным в лесном питомниководстве для массового получения селекционного посадочного материала ценных древесных растений.

Достижения технического результата позволит массово тиражировать трудно черенкуемые традиционным способом тополя серебристого и тополя Болле для создания плантационных насаждений, полезащитных полос, лесных угодий.

Полезная модель относится к биотехнологии растений, может быть использована в лесном, лесопарковом хозяйстве и питомниководстве для массового получения селекционного посадочного материала ценных древесных растений, в частности, тополя серебристого и тополя Болле.

Тополь серебристый - *Populus alba* L. это стройное декоративное дерево с прямым стволом и узкой кроной, серебристой окраской листы. Используется для озеленения. Зимостоек, относительно засухо- и газоустойчив, светолюбив.

Тополь Болле - *Populus bolleana* L. дико произрастает в Средней Азии. Стройное дерево высотой до 30 м, с колонновидной или узкоовальной гладкой кроной, зеленовато-серой корой, у старых деревьев - серой и трещиноватой. Легко переносит сухость воздуха. Дымо- и газоустойчив. Светолюбив. Теплолюбив, один из наиболее жароустойчивых видов тополей. Ветроустойчив. Рекомендуются для аллей, небольших групп, садово-парковых композиций.

В настоящее время применение современных технологий для массового размножения, таких как клональное микроразмножение растений является актуальным для трудноукореняющегося тополя Болле (*Populus bolleana* L.) и восприимчивого к болезням тополя серебристого (*Populus alba* L.). В целом, применение технологий клонального микроразмножения, по сравнению с традиционными методами вегетативного размножения, имеет ряд преимуществ: высокий коэффициент размножения; получение в большом количестве вегетативного потомства; оздоровление посадочного материала; возможность работать круглый год и планировать выпуск растений к определенному сроку; сохранение ценных генотипов растений в культуре *in vitro*; получать однородное клоновое потомство от взрослых деревьев [Королева Ю.А. и др., 2012].

Известен способ клонального микроразмножения селекционного посадочного материала березы карельской. В качестве экспланта использовали проростки гибридных семян, которые разрезали на черенки и высаживали на питательную среду Мурашига-Скуга (МС). Также на этой среде проводили мультипликацию побегов, их укоренение и посадку в почвогрунт. Недостатком этого способа является то, что для клонального микрочеренкования использовали универсальную питательную среду МС, которая была разработана в 1962 году и предназначена для культивирования клеток растений. В основном для лучшего роста растений тополя в культуре *in vitro* рекомендуется использовать питательную среду Woody Plant Medium (WPM), предназначенную для древесных культур, которая разработана Lloyd G. и McCown B.H. (1981). (Патент RU №2066953 от 15.04.1994 А01Н 4/00. «Способ клонального микроразмножения селекционного посадочного материала березы карельской»).

Известен способ микрочлонального размножения ольхи черной *in vitro*, которая включает культивирование каллусных культур из стерильных эксплантов стеблевых сегментов, листьев, листовых

черешков, используя питательные среды МС, WPM с содержанием фитогормонов: 6-бензиламинопурина (6-БАП) от 0,2 до 1,5 мг/л,  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота (НУК) от 0,2 до 0,5 мг/л, индолилмасляная кислота (ИМК) - 2 мг/л, получение пробирочных растений-регенерантов и их дальнейшую адаптацию при освещенности 2000 люкс в теплице. Недостатком этого способа является то, что растения-регенеранты, полученные от каллусной культуры, отличаются большой генетической гетерогенностью и физиологической асинхронностью. Таким образом, растения-регенеранты, полученные от каллусной культуры, становятся генетически неоднородными, что нежелательно для клонального микроразмножения селекционного посадочного материала. (Патент RU №2515385 от 7.12.2012 А01G. «Способ микрочлонального размножения ольхи черной *in vitro*»).

Аналог полезной модели. В качестве прототипа выбран способ выращивания посадочного материала тополей Хоперского и Приярского, состоящий из следующих этапов - заготовка побегов, их стерилизация, индукция развития основного пазушного побега, укоренение изолированных побегов и мультипликация их в условиях *in vitro*. Перевод побегов в нестерильные условия и посадку в почву. Авторы патента оптимизировали условия выращивания посадочного материала для сортов тополей Хоперского и Приярского. Для мультипликаций микрорастений тополей Хоперского и Приярского использовали питательную среду WPM или  $\frac{1}{2}$  WPM без гормонов. Недостатком микрочлонального размножения является то, что эффективность побего- и корнеобразования зависит от генотипа древесных растений и гормонального состава среды, в связи с этим, подобранные условия культивирования не подходят для трудно черенкуемых традиционным способом тополя серебристого и тополя Болле (Патент RU №2485755 от 28.10.2011 А01G. «Способ выращивания посадочного материала»).

Задача полезной модели - получение качественного стандартного посадочного материала тополя серебристого и тополя Болле с помощью микрочлонального размножения, которые относятся к трудно черенкуемым традиционным способом видам тополя.

Новизна полезной модели - разработан и внедрен способ размножения тополя серебристого (*Populus alba* L.) и тополя Болле (*Populus bolleana* L.) биотехнологическими методами для создания производства конкурентоспособной и экспортоориентированной продукции в виде готовых саженцев для озеленения городов с учетом имеющихся неблагоприятных почвенно-климатических условий.

Технический результат полезной модели заключается в повышении коэффициента размножения микроростков тополя серебристого и тополя Болле из пазушных почек введенных в культуру *in vitro*.

Сущность полезной модели заключается в том, что микроклональное размножение для укоренения и роста микропобегов тополя серебристого и тополя Болле из пазушных побегов осуществляют с уменьшенным содержанием макросолей на питательной среде  $\frac{1}{2}$  WPM с добавлением ИМК 0,01 мг/л. При добавлении в питательную среду  $\frac{1}{2}$  WPM гормона ИМК 0,01 мг/л происходит более быстрый рост, формирование хорошо развитой корневой системы, что позволяет высадить микропобеги сразу в почвогрунт. Корневая система микропобегов тополя серебристого и тополя Болле, культивируемых на данной среде, более мощная и такие растения лучше укореняются в грунте (90-100%), также повышается коэффициент размножения, что является важным в лесном питомниководстве для массового получения селекционного посадочного материала ценных древесных растений.

Достижения технического результата позволят массово тиражировать трудно черенкуемые традиционным способом тополя серебристого и тополя Болле для создания плантационных насаждений, защитных полос, лесных угодий.

Поставленная цель достигается с помощью способа клонального микроразмножения посадочного материала тополя серебристого и тополя Болле, включающего на первом этапе заготовку и стерилизацию побегов, изоляцию и культивирование пазушных почек. Для получения

сеянцев введено в культуру *in vitro* 1120 экплантов двух видов тополей, из них получено 878 микропобегов: 402 микропобега для получения целых пробирочных растений, 359 микропобега на среде WPM для корнеобразования и 117 пробирочных растений высажено в почвогрунт (таблица 1, фиг.1).

Высаженные в почвогрунт пробирочные растения были накрыты прозрачными пластиковыми стаканами, где приживаемость микропобегов составила 100%. Через 1-2 недели начался разворачиваться лист главного побега и с этого момента это растение назвали сеянцем (фиг.2).

Таким образом, нами получено 117 посадочного материала в виде саженцев, активно растущих в почвогрунте горшках тополя серебристого 80 растения и тополя Болле 37 растений с помощью микроклонального размножения. Первая партия 12 клонов в почвогрунте горшках передано в АО «Астана-Зеленстрой», которые занимаются озеленением города Астаны для высадки в зимнюю теплицу и лесной питомник.

Одной из главных задач клонального микроразмножения является получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному генотипу. В связи с этим, на начальном этапе проводили молекулярно-генетическую идентификацию микропобегов тополей для определения их идентичности с исходными видами.

Таблица 1

Результаты микроклонального размножения тополя для получения сеянцев

Вид тополя	Эксплант введенный <i>in vitro</i> , шт	Выбракованный экплант, шт	Микропобеги, шт	Корнеобразование, шт	Высаженные в почву, шт
Серебристый	750	172	274	224	80
Болле	370	70	128	135	37
Итого	1120	242	402	359	117

В ходе эксперимента для определения «чистоты» клонов двух видов тополя использовали RAPD-маркеры. Вначале провели подбор RAPD-праймеров для определения идентичности между клонами двух видов тополя. Провели подбор 5 праймеров на 2-х клонах тополя серебристого.

В качестве исходной формы использовали тополь, растущий в природных условиях, от которого были получены пробирочные пазушные побеги. В качестве клона брали первичные пробирочные пазушные побеги, полученные в культуре *in vitro*. Исходная форма и по четыре клона тополя серебристого и тополя Болле были проанализированы с использованием 5 RAPD-маркеров (фиг.3).

В результате анализа с использованием 5 RAPD-праймеров (OPD 3, OPD 12, OPK 6, OPK 8, OPK 10) все клоны тополей серебристого и Болле были идентичны исходным растениям.

На электрофореграмме видно, что при определении чистоты тополя серебристого все четыре клона были идентичны по 7 фрагментам с исходной формой (фиг.4). При амплификации ДНК

4 клонов тополя Болле в зависимости от праймера количество фрагментов варьировало от 5 до 12 фрагментов размером от 300 до 2600 п.н.

Проанализированные с помощью RAPD-маркеров клоны (пазушные пробирочные побеги) тополя серебристого и тополя Болле были микроклонально размножены для получения микропобегов и сеянцев.

На завершающем этапе оздоровленный посадочный материал в виде пробирочных растений, сеянцев и саженцев в почвогрунте тополей серебристого и Болле можно использовать при благоустройстве и озеленении городов.

Методика использования полезной модели

#### 1. Заготовка и стерилизация побегов

Для заготовки срезали с пазушными почками однолетние растущие неодревесневшие побеги размером 45-55 см с июня по июль месяцы из взрослых деревьев. Срезанные побеги помещали в стакан с водой и ставили в холодильную камеру для их холодной обработки в течение 3-5 суток.

Разрезанные побеги размером около 6 см тщательно промывали проточной теплой водой и

стерилизовали. Стерилизация состояла из двух этапов: 1 - предварительная стерилизация, которая проходила в нестерильных условиях (поверхностная стерилизация), 2 - основная стерилизация в асептических условиях (в условиях ламинар-бокса).

Поверхностную стерилизацию побегов в нестерильных условиях проводили 2% коммерческим раствором «Domestos» с добавлением 2 капель детергента «Твин 20» в течение 20 минут с последующей промывкой в водопроводной воде в течение 20 минут.

Основную стерилизацию побегов проводили в стерильных условиях ламинар-боксе с жидким хлорсодержащим реагентом «Белизна» 5% раствором в течение 15 минут. По окончании стерилизации побеги трижды промывали стерильной дистиллированной водой.

#### 2. Введение пазушных почек в культуру *in vitro*

В ламинар-боксе у пазушных почек удаляли покровные чешуи и листья, оставляя два наиболее глубоко расположенных листочка, которые вычленили и помещали в питательную среду WPM (Woody plant medium) с добавлением 0,5 мг/л БАП (6-бензиламинопурин), 0,2 мг/л ГК (гибберелловая кислота) для роста пазушных почек.

Культивировали пазушные побеги в климатической камере «BINDER KBWF 720» с 16-часовым световым режимом, освещенностью - 2-3 клк, температурой 24-26°C, влажностью 70%. Через 2-4 недели культивирования из пазушной почки формировался основной побег.

#### 3. Регенерация и укоренение пробирочных растений

Регенерация меристемных растений состояла из следующих этапов - индукция побегообразования, их элонгация и укоренение.

Для увеличения количества побегов видов тополей серебристого и Болле использовали питательные среды WPM и MS с гормонами роста БАП в концентрации - 0,2 мг/л; 0,5 мг/л; 1,0 мг/л и ГК - 0,2 мг/л.

Укоренение пробирочных побегов двух видов тополей проводили на среде WPM с уменьшенным вдвое содержанием макросолей (½ WPM) с гормоном роста ИМК (индолилмасляная кислота) 0,01 мг/л; 0,5 мг/л или на безгормональной питательной среде.

4. Высадка в почвогрунт, адаптация и размножение в почвогрунте пробирочных микропобегов, получение сеянцев для высадки в лесной питомник

Размноженные пробирочные растения высаживали в почвогрунт в горшки, которые накрывали пластиковыми стаканами для поддержания высокой влажности до 70% необходимой для сохранения тургора у пробирочных растений. Растения, высаженные в почвогрунт выращивали в фактеростатной комнате с 16-часовым фотопериодом, освещенностью - 2-3 клк, температурой 24-26°C. У растущих растений через 7 дней влажность постепенно снижали до влажности окружающей среды. Сеянцы,

прошедшие адаптацию высаживали в теплицу, где их дорастивали в течение одного вегетационного периода для высадки в лесной питомник.

Статистический анализ проводили по общепринятым методикам.

#### 5. Определение «чистоты» ДНК-маркерами

Выделение тотальной ДНК образцов тополя проводили по Edwards, 1991. Измерение оптической плотности раствора ДНК проводили при длине волны 260 нм на «Nanodrop 1000», которая позволила установить концентрацию и чистоту нуклеиновых кислот. Отношение величины D при 260 кD при 280 позволяло судить о чистоте нуклеиновой кислоты.

Для определения «чистоты» RAPD-маркерами применяли полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием пяти информативных праймеров. Реакционная среда для RAPD-амплификации состояла (общий объем 15 мкл): 10x Tag буфер - 1,5 мкл, смесь 4 dNTPs (2 mM) - 1,5 мкл, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) - 1,5 мкл, RAPD - маркер (10 pM) - 2,0 мкл, Tag ДНК полимеразы (5 ед/мкл) - 0,2 мкл, ДНК (100 нг/мкл) - 1,0 мкл.

ПЦР включающую предварительную денатурацию тотальной ДНК при 94°C в течение 5 мин., последующие 35 циклов (94°C - 30 сек., 37°C - 45 сек., 72°C - 1 мин.) и элонгацию при 72°C - 7 мин, проводили на термоамплификаторе Eppendorf (Германия).

Электрофорез продуктов амплификации со случайными праймерами проводили в агарозном геле (1,7% агароза, TBE-буфер, с добавлением 5 мкл бромистого этидия) с использованием камеры для горизонтального электрофореза. После электрофореза гели анализировали в УФ-свете и фотографировали с использованием компьютерной программы.

Примеры выполнения предлагаемого способа.

Пример 1. Способ клонального микроразмножения при использовании регенерации пазушных побегов тополя

При разработке технологии микроклонального размножения тополя особенно важным этапом является регенерация пазушных побегов. Основной целью этого этапа является регенерация растений на основе прямой пролиферации пазушных меристем, их укоренение и мультипликация полученных микропобегов. Для регенерации основных пазушных побегов были использованы однолетние неодревесневшие побеги тополя серебристого и тополя Болле с пазушными вегетативными почками. Исследователи для культивирования тополя используют питательные среды MS и WPM с добавлением фитогормонов, таких как бензил аминопурин (БАП) [Kang B. et al, 2009].

Нами был оптимизирован состав питательной среды WPM для роста и развития из экспланта пазушных побегов двух видов тополей. Было изучено влияние фитогормонов (БАП и ГК). Изучены следующие варианты среды WPM: 1) БАП 0,2 мг/л, ГК 0,2 мг/л; 2) БАП 0,5 мг/л, ГК 0,2 мг/л. Простерилизованные побеги разрезали в

асептических условиях на сегменты величиной 0,5-2 см с одной пазушной почкой (фиг.1).

Через 30 дней культивирования был проведен анализ результатов эксперимента и установлено, что высокая регенерация пазушных основных побегов двух видов тополей происходило на втором варианте питательной среды WPM с добавлением гормонов (БАП 0,5 мг/л и ГК 0,2 мг/л).

Наибольший процент сформированных хорошо развитых пазушных основных побегов получено при культивировании эксплантов на питательной среде WPM с БАП 0,5 мг/л и ГК 0,2 мг/л, у тополя серебристого - 70,2%, у тополя Болле - 57,3% (фиг.5).

Процент регенерации пазушных побегов у тополя серебристого выше, чем у тополя Болле. Это связано с тем, что тополь серебристый обладает высокой интенсивностью жизнедеятельности и быстрым ростом в культуре *in vitro* и природных условиях, по сравнению с тополем Болле [Редько Г.И., 1975]. Как видно из эксперимента, на начальном этапе культивирования пазушных побегов низкое содержание БАП 0,2 мг/л в среде недостаточно для эффективной индукции и развития первичных побегов.

Таким образом, для регенерации пазушного побега тополя серебристого и тополя Болле лучше

подходит среда WPM с добавлением гормонов БАП 0,5 мг/л и ГК 0,2 мг/л.

Пример 2. Способ клонального микроразмножения при использовании индуцированных побегов тополя

В литературе имеются сведения об использовании различных питательных сред с гормонами для увеличения количества индуцированных побегов [Kang B. et al, 2009, Cavusoglu A. et al, 2011, Khattab S. et al, 2011]. Показано, что наилучший рост пролиферации побегов у тополя был на среде WPM для древесных культур с БАП в концентрации 0,1 и 0,2 мг/л, а увеличение концентрации БАП не дало положительного эффекта для увеличения побегов [Khattab S. et al, 2011].

Нами был оптимизирован состав питательной среды для увеличения количества индуцированных побегов. Было изучено влияние концентрации фитогормонов БАП и ГК. Испытаны следующие варианты среды WPM: 1) БАП 1,0 мг/л, ГК 0,2 мг/л; 2) БАП 0,5 мг/л, ГК 0,2 мг/л; 3) БАП 0,2 мг/л, ГК 0,2 мг/л; 4) БАП 0,5 мг/л; среда МС: 5) БАП 1,0 мг/л, ГК 0,2 мг/л; 6) БАП 0,5 мг/л, ГК 0,2 мг/л; 7) БАП 0,2 мг/л, ГК 0,2 мг/л; 8) БАП 0,5 мг/л (Фиг.6, таблица 2). Эксперименты проводили на серебристом тополе. Использовали первичный эксплант с отрезанным пазушным побегом.

Таблица 2

Показатели увеличения количества индуцированных побегов у тополя серебристого

Варианты	1 день		15 день		30 день		50 день	
	Побеги, шт	Длина побега, см	Побеги, шт	Длина побега, см	Побеги, шт	Длина побега, см	Побеги, шт	Длина побега, см
I - WPM с БАП 1,0 и ГК 0,2 мг/л	1	1,46	2,0	1,76	3,0	2,1	5,4	2,3
II - WPM с БАП 0,5 и ГК 0,2 мг/л	1	2,18	2,0	2,36	3,2	2,52	5,4	2,66
III - WPM с БАП 0,2 и ГК 0,2 мг/л	1	3,2	3,2	3,38	7,0	5,3	11,2	5,54
IV - WPM с БАП 0,5 мг/л	1	1,42	1,2	1,48	2,2	1,72	3,6	1,84
V-МС с БАП 1,0 и ГК 0,2 мг/л	1	1,3	1,0	1,5	1,2	1,58	1,8	1,72
VI - МС с БАП 0,5 и ГК 0,2 мг/л	1	1,84	1,0	2,08	1,0	2,08	1,4	2,14
VII - МС с БАП 0,2 и ГК 0,2 мг/л	1	2,22	2,6	2,42	5,0	3,24	7,8	3,34
VIII - МС с БАП 0,5 мг/л	1	1,6	1,8	1,82	3,0	2,02	5,4	2,6

Через 15, 30 и 50 дней культивирования был проведен анализ результатов эксперимента и установлено, что наилучшее увеличение количества побегов тополя происходило на третьем варианте

питательной среды WPM с добавлением гормонов (БАП 0,2 мг/л и ГК 0,2 мг/л). Так, среднее количество побегов вида серебристого составило 11,2 шт; длина побегов - 5,54 см.

Наиболее медленное развитие побегов наблюдали на шестом варианте среды (МС с БАП 0,5 и ГК 0,2 мг/л): среднее количество побегов составило всего лишь 1,4 шт, длина побегов - 2,14 см. Не было выявлено положительного эффекта БАП 1,0 мг/л и ГК 0,2 мг/л на увеличение количества побегов.

Таким образом, для увеличения количества побегов из пазушных побегов лучше подходит твердая среда МС с добавлением гормонов БАП 0,2 мг/л и ГК 0,2 мг/л.

Пример 3. Способ клонального микроразмножения при использовании укоренения

Одним из важных этапов получения сеянцев в культуре *in vitro* мужских экземпляров тополя серебристого *Populus alba L.* и тополя Болле *Populus bolleana L.* является индукция корнеобразования. Для получения сеянцев тополя серебристого (*Populus alba L.*) и тополя Болле (*Populus bolleana L.*) из пробирочных микропобегов, прежде всего, нужно подобрать питательную среду с гормонами, на которой будет нормально происходить рост и развитие корней.

В литературе в качестве среды для индукции корнеобразования микропобегов четырех видов тополя использовали питательные среды Schenk Hildebrandt (SH) и Woody Plant Medium (WPM) с добавлением 5 мг/л никотиновой кислоты (НК) [Muller A. et al, 2013], WPM или WPM ½

(с уменьшенным содержанием макросолей) без гормонов [Машкина О.С. и др., 2011], WPM с ауксином индолилмасляной кислоты (ИМК) 0,5 мг/л [Cavusoglu A. et al, 2011].

Нами был оптимизирован состав питательной среды WPM для индукции корнеобразования и укоренения микропобегов двух видов тополей. Было изучено влияние безгормональной среды WPM и дополненной ауксином - индолил масляная кислота (ИМК). Испытаны следующие варианты среды WPM: 1) без гормонов; 2) ½ WPM (уменьшенное содержание макросолей); 3) ½ WPM, ИМК 0,5 мг/л; 4) ½ WPM, ИМК 0,01 мг/л. Добавляли ауксин ИМК в концентрации 0,01 мг/л и 0,5 мг/л в среду, чтобы определить необходимое количество экзогенных гормонов для получения микропобегов на основе пролиферации пазушных меристем (прямой выгонки пазушных побегов) и индукции корнеобразования, исключая этапа каллусообразования. Повышенная концентрация ауксинов в среде способствует образованию каллусной ткани, что подтверждается литературными данными [Kang B. et al, 2009, Cavusoglu A. et al, 2011].

Эксперименты проводили на двух видах тополя, по каждому варианту анализировали по 30 пробирочных микропобегов. Для получения целых микропобегов образовавшиеся побеги изолировали и переносили на среду для укоренения (таблица 3).

Таблица 3

Индукция корнеобразования микропобегов в культуре *in vitro*

Генотип	Вариант среды	Количество микропобегов			Длина побега, см	Индукция каллуса
		Общее	Укорененных	%		
Тополь серебристый	1 - WPM	30	16	53,3	4,1	-
	2 - ½ WPM	30	20	66,7	6,8	-
	3 - ½ WPM + ИМК 0,5	30	9	30,0	5,1	+
	4 - ½ WPM + ИМК 0,01	30	24	80,0	7,2	-
Тополь Болле	1 - WPM	30	10	33,3	5,0	-
	2 - ½ WPM	30	16	53,3	7,7	-
	3 - ½ WPM + ИМК 0,5	30	8	26,7	5,6	+
	4 - ½ WPM + ИМК 0,01	30	17	56,7	6,4	-

Примечания: 1 - «+» индуцируется каллус; 2 - «-» не образуется каллус

Через 30 дней культивирования был проведен анализ результатов эксперимента и установлено, что наилучшее укоренение микропобегов тополя происходило на четвертом варианте с уменьшенным содержанием макросолей - ½ WPM с добавлением ИМК 0,01 мг/л, что составило по тополю серебристому 80%, по тополю Болле - 56,7%. Также лучшие результаты получены на втором варианте среды - ½ WPM без гормона, по тополю серебристому 66,7%, по тополю Болле - 53,3%. По двум видам тополя на варианте среды ½ WPM с ауксином ИМК 0,5 мг/л наблюдали образование каллусной ткани.

Процент укорененных растений у двух видов тополя отличается, это связано с различным

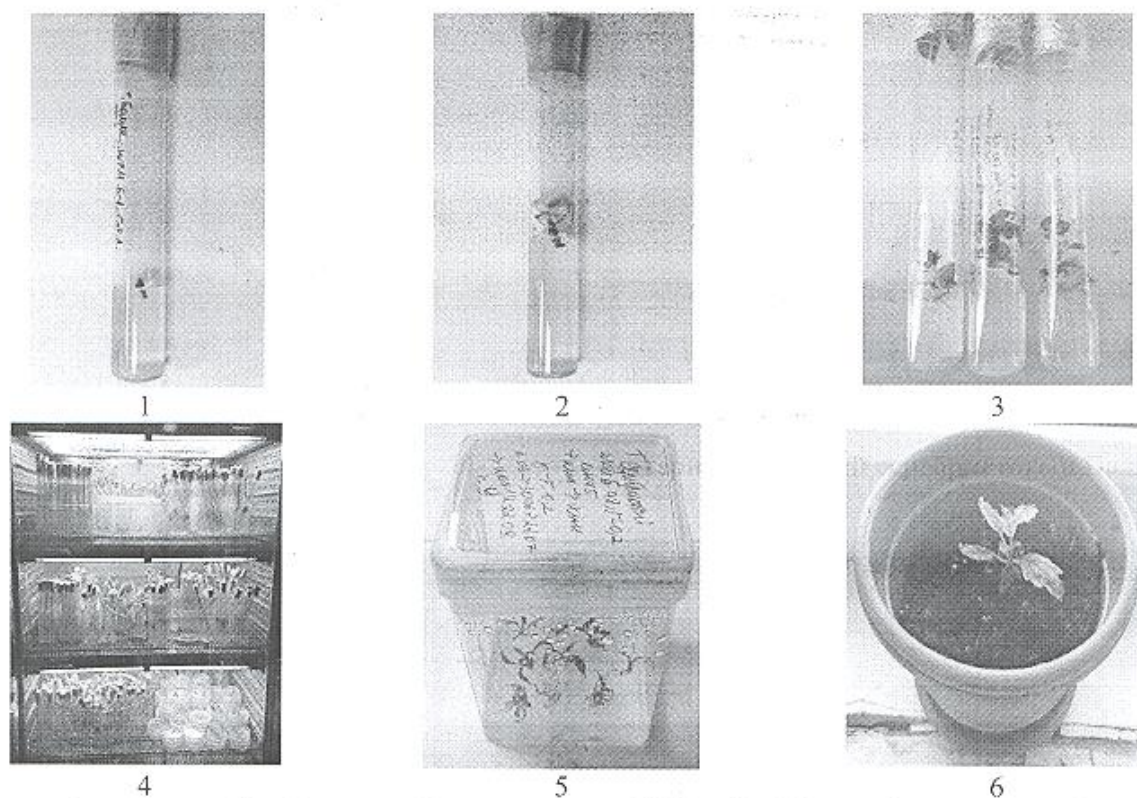
уровнем и набором собственных гормонов, из-за этого, они могут проявлять различную морфогенную активность и способность к регенерации целых растений в культуре *in vitro* (фиг.7). При укоренении микропобегов наблюдали активный рост их в высоту. Через месяц культивирования побеги достигали длиной от 4,1 до 7,7 см.

Следовательно, питательная среда ½ WPM для древесных культур с добавлением гормона ИМК 0,01 мг/л является наиболее оптимальной для укоренения и роста микропобегов тополя серебристого и тополя Болле.

### ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ клонального микроразмножения посадочных материалов тополя серебристого и тополя Болле, включающий культивирование микропобегов *in vitro* путем черенкования на питательную среду  $\frac{1}{2}$  Woody Plant Medium,

содержащую уменьшенное содержание макросолей, получение укоренных пробирочных микропобегов и высадку полученных растений в почвогрунт, **отличающийся** тем, что питательная среда  $\frac{1}{2}$  Woody Plant Medium, содержит гормон индолилмасляную кислоту 0,01 мг/л.



1 – пазушный побег сорта Болле на среде WPM с БАП 0,5 мг/л, ГК – 0,2 мг/л; 2 – развитие основного пазушного побега; 3 – укоренные микропобеги; 4 – растущие микропобеги в климатической камере; 5 - размножение индуцированных побегов тополя серебристого; 6 - микропобег, высаженного в почвогрунт

Получение сеянцев тополей с помощью микроклонального размножения

Фиг.1



1

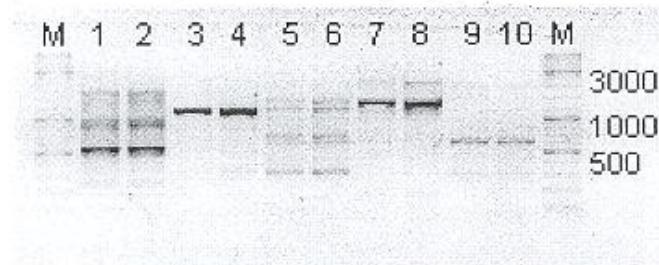


2

1 - сеянцы, растущих в почвогрунте фактеростатной комнате; 2 - адаптация микропобегов, растущие в теплице АО «Астана-Зеленстрой»

Адаптация и размножение в почвогрунте микропобегов тополя

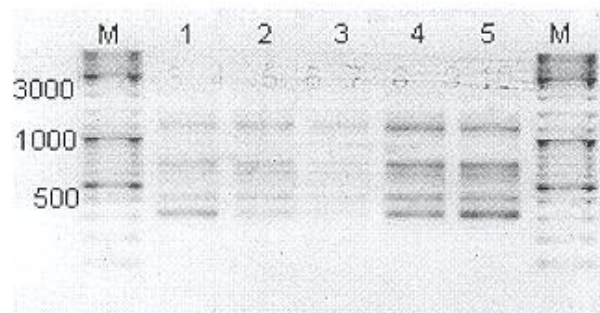
**Фиг.2**



1, 2 – праймер (OPD 3); 3, 4 – праймер (OPD 12); 5, 6 – праймер (OPK 6), 7, 8 – праймер (OPK 8), 9, 10 – праймер (OPK 10)

Подбор RAPD-праймеров OPD 3, OPD12, OPK 6, OPK 8, OPK 10 двух клонов тополя серебристого

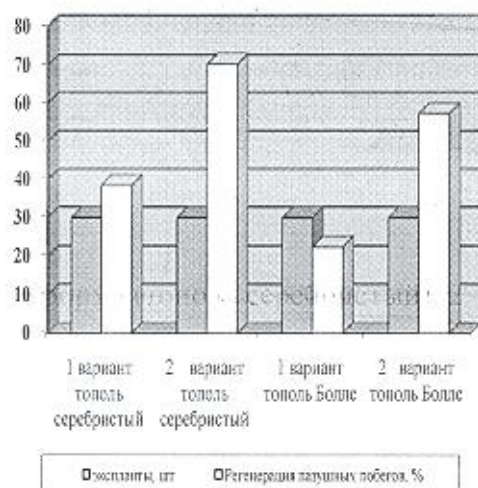
**Фиг.3**



M – маркер, 1 – исходная форма (тополь серебристый), 2 – клон №1, 3 – клон №2, 4 – клон №3, 5 – клон №4

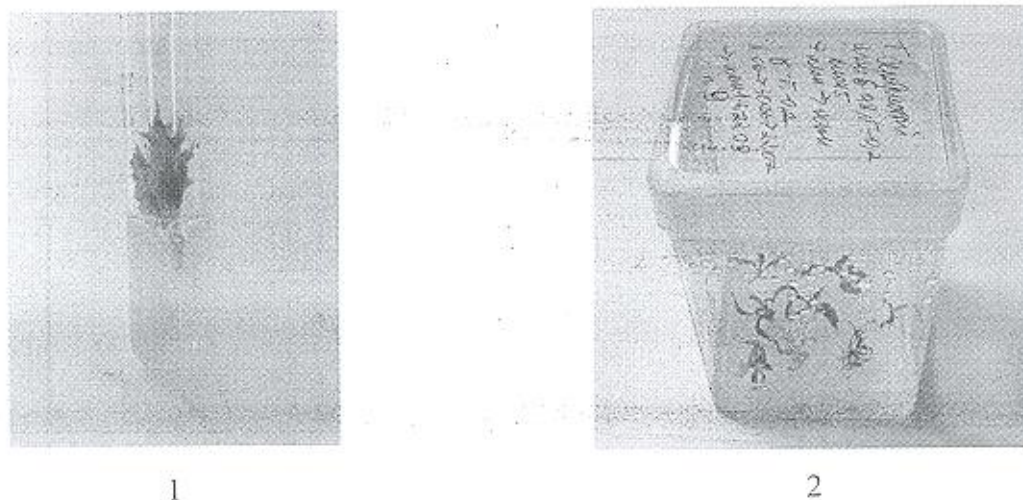
Фрагмент RAPD-анализа маркером OPK 6 исходной формы и четырех клонов (пробирочные пазушные побеги) тополя серебристого

**Фиг.4**



Регенерация пазушных побегов в зависимости от гормонального состава среды WPM

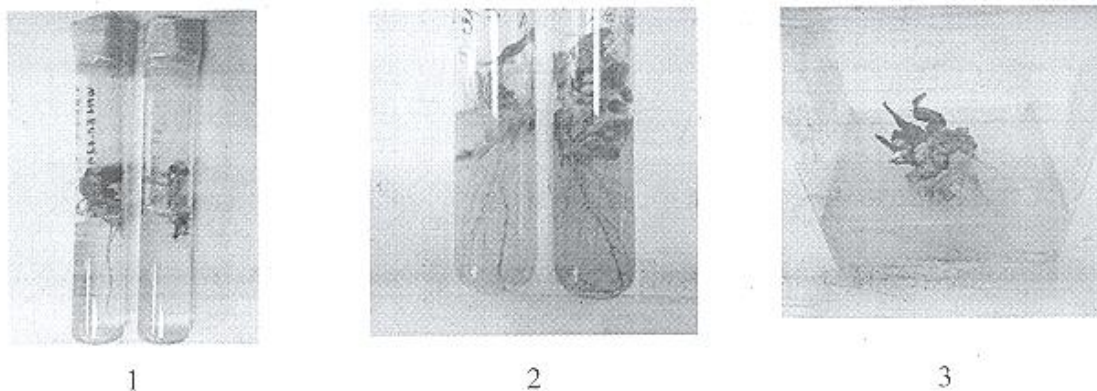
Фиг.5



1 – индуцированные побеги на среде WPM с БАП 0,2 мг/л, ГК – 0,2 мг/л;  
2 – размножение индуцированных побегов через 2 недели

Размножение индуцированных побегов тополя

Фиг.6



1 – индуцированные корни тополя Болле на среде  $\frac{1}{2}$  WPM; 2 – укорененные микропобеги тополя серебристого; 3 – индукция калусообразования микропобегов на среде  $\frac{1}{2}$  WPM с ИМК 0,5 мг/л

Укоренение микропобегов двух видов тополей

**Фиг.7**