



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) B (11) 34523  
(51) A01H 4/00 (2006.01)  
A01H 5/04 (2018.01)  
A01G 2/00 (2018.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2019/0394.1

(22) 29.05.2019

(45) 04.12.2020, бюл. №48

(72) Турдиев Тимур Туйгунович; Ковальчук Ирина Юрьевна; Мухитдинова Зинат Рахимжановна; Фролов Сергей Николаевич; Ногайбаев Акжол Масалимулы; Бессчетнов Александр Петрович

(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Институт биологии и биотехнологии растений» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(56) RU 2485755 C1, 27.06.2013

SU 1079215 A1, 15.03.1984

RU 227773 C2, 20.06.2006

UA75015 U, 26.11.2012

### (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ТУРАНГОВОГО ТОПОЛЯ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

(57) Изобретение относится к биотехнологии, сельскому хозяйству, лесоводству, питомниководству и предназначено для микроклонального размножения туранговых тополей.

В способе получения посадочного материала тополя в условиях in vitro, включающем заготовку побегов, их стерилизацию, получение асептических растений, клональное микроразмножение, получение корневой системы в условиях in vitro, перевод растений в нестерильные условия и высадку

в почвенный субстрат, согласно изобретению осуществляют заготовку одревесневших однолетних черенков с верхушечными и пазушными зимующими почками, стерилизацию почек, отделенных от одревесневших однолетних черенков в асептических условиях, проводят 0,1% сулемой с последующим промыванием стерильной водой, затем выделяют экспланты размером 2-3 мм с меристематической тканью, клональное микроразмножение осуществляют на питательной среде МС с содержанием витамина В<sub>1</sub> 1,5 - 2,5 мг/л, глюкозы 20,0 мг/л, ГК- 0,01 мг/л, а также хелата железа FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 55,6 мг/л; Na<sub>2</sub>ЭДТА-2H<sub>2</sub>O - 74,6 мг/л, при pH среды 6,5, затем растения, достигшие 4-5 см, пассируют на модификацию жидкой питательной среды 1/2 (WPM), α-нафтилуксусной кислоты 0,2 мг/л и активированного угля 1,0 г/л, при pH среды 6,5, далее проводят прямую высадку растений из пробирочной культуры на стерилизованный почвенный субстрат, состоящий из смеси 50% торфа, 40% чернозёма и 10% песка.

Разработанный способ получения посадочного материала турангового тополя в условиях in vitro клональным микроразмножением позволяет ускоренно получать качественные побеги in vitro для массового тиражирования и получения посадочного материала высокого качества.

(19) KZ (13) B (11) 34523

Изобретение относится к биотехнологии, сельскому хозяйству, лесоводству, питомниководству и предназначено для микрклонального размножения туранговых тополей.

Туранга - вид лиственных деревьев из рода Тополь (*Populus*) семейства Ивовые (*Salicaceae*) - является эндемичным, реликтовым древесным растением Центральной Азии.

Корни этого дерева способны проникать в поисках подпочвенных вод на 30 метровую глубину, что и позволяет ему расти там, где ни одно другое растение выжить не способно. По сути, это самое живучее дерево на планете. Туранговый тополь растет даже в самой страшной пустыне мира Такла-Макан, где вообще нет никакой растительности. Ученые полагают, что туранговый тополь - одно из немногих деревьев, переживших ледниковый период.

Туранговый тополь занесен в Красную книгу Казахстана. Дерево отличается долговечностью, декоративностью, высокой засухоустойчивостью, солеустойчивостью, способностью произрастать на песчаных почвах и укреплять берега рек и тем самым препятствует опустыниванию земель.

Сферы применения турангового тополя разнообразны - лесоводство, охрана окружающей среды, стройиндустрия, энергетика, разные отрасли производства (мебельная, текстильная, медицинская и др.), а также создание промышленных плантаций разного целевого назначения.

Известен способ получения посадочного материала тополя клональным микроразмножением в условиях *in vitro*, включающий заготовку побегов, их стерилизацию, индукцию развития основного пазушного побега на первичных эксплантах, укоренение изолированных побегов, мультипликацию полученных микрорастений с помощью модели размножения, исключающей этап каллусообразования и перевод в нестерильные условия, причем микрочеренкование осуществляют на питательной среде Woody Plant Medium (WPM), со сниженным содержанием бензиламинопурина (БАП) - 0,2 мг/л и добавлением гиббереллиновой кислоты (ГК) - 0,2 мг/л; причем высадку пробирочных микрорастений в нестерильные условия проводят без их предварительной адаптации к условиям климатической камеры (пат. RU 2485755, кл. A01G 1/00, оп. 27.06.2013).

Недостаток способа заключается в том, что питательная среда по данному способу не позволяет получить качественные побеги, так как у растений образуется каллус, как на основании побега, на побегах, а также листьях, что приводит к гибели растений. Кроме того, способ требует проращивания черенков в лабораторных условиях в течение 3-4 недель, что увеличивает срок получения асептических растений.

Задачей изобретения является разработка способа получения посадочного материала турангового тополя в условиях *in vitro* клональным микроразмножением для ускоренного получения качественных побегов *in vitro* для массового

тиражирования и получения посадочного материала высокого качества.

Для этого в способе получения посадочного материала тополя в условиях *in vitro*, включающем заготовку побегов, их стерилизацию, получение асептических растений, клональное микроразмножение, получение корневой системы в условиях *in vitro*, перевод растений в нестерильные условия и высадку в почвенный субстрат, согласно изобретению осуществляют заготовку одревесневших однолетних черенков с верхушечными и пазушными зимующими почками, стерилизацию почек, отделенных от одревесневших однолетних черенков в асептических условиях, проводят 0,1% сулемой с последующим промыванием стерильной водой, затем выделяют экспланты размером 2-3 мм с меристематической тканью, клональное микроразмножение осуществляют на питательной среде МС с содержанием витамина В<sub>1</sub> 1,5 - 2,5 мг/л, глюкозы 20,0 мг/л, ГК - 0,01 мг/л, а также хелата железа FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 55,6 мг/л; Na<sub>2</sub>ЭДТА·2H<sub>2</sub>O - 74,6 мг/л, при pH среды 6,5, затем растения, достигшие 4-5 см, пассируют на модификацию жидкой питательной среды ½ (WPM), α-нафтилуксусной кислоты (НУК) 0,2 мг/л и активированного угля 1,0 г/л, при pH среды 6,5, далее проводят прямую высадку растений из пробирочной культуры на стерилизованный почвенный субстрат, состоящий из смеси 50% торфа, 40% чернозёма и 10% песка.

Использование 0,1% сулемы для освобождения растительных тканей от латентной инфекции сокращает время стерилизации, при этом позволяет получать качественные побеги и высокий процент асептических растений. Получение асептических растений через меристематическую культуру дает возможность исключить этап проращивания зимующих почек в лабораторных условиях.

Содержание витамина В<sub>1</sub> от 1,5 до 2,5 мг/л в питательной среде для клонального микроразмножения приводит к более быстрому росту побегов и улучшению их общего состояния, а использование глюкозы исключает витрификацию у растений турангового тополя. Повышение pH среды до 6,5 по сравнению со стандартным значением - 5,7 и концентрации хелата железа до двух раз приводит к образованию качественных побегов и их активному росту, и развитию, так как в естественных условиях туранговый тополь произрастает на сильнощелочных почвах с высоким содержанием железа.

Уменьшение концентрации питательной среды WPM до ½ и присутствие фитогормона НУК 0,2 мг/л, а также взвеси активированного угля 1,0 г/л для затемнения среды стимулирует образование качественной корневой системы и корневых волосков. Использование жидкой среды исключает повреждение корневой системы при пересадке растений из культуры *in vitro* в почвенный субстрат. Для достижения максимальной приживаемости растений в контейнерах оптимально использовать субстрат, состоящий из смеси 50% торфа, 40% чернозёма и 10% песка.

Пример.

1. Заготовку одревесневших однолетних черенков с верхушечными и пазушными почками проводили после прохождения растениями физиологического покоя (январь-март).

2. Черенки в лабораторных условиях вначале промыли в мыльном растворе в течение 1 часа, после этого выдержали в растворе «Белизна» ½, разведенной в воде, перемешивая в течение 10 мин с последующим ополаскиванием проточной водой 1 час. Затем в асептических условиях ламинар-бокса

из одревесневших однолетних черенков отделили почки, стерилизовали 0,1% сулемой ( $HgCl_2$ ) в течение 3-4 мин и промыли стерильной водой 4-5 раз.

3. В асептических условиях из почек выделили экспланты с меристематической тканью размером 2-3 мм.

Эффективность способа получения асептических растений, предложенного нами, составляет до 93,3%, таблица 1, фигура 1.

Таблица 1

Стерилизация верхушечных и пазушных (боковых) почек

Стерилизующий агент, концентрация	Время экспозиции, мин.	Кол-во эксплантов, шт.	Инфицировано, шт.	Некротизировано, шт.	Регенерация	
					шт.	%
$HgCl_2$ , 0,1%	3,5	30	0	2	28	93,3

4. Клональное микроразмножение турангового тополя осуществляли на питательной среде МС, с содержанием витамина  $B_1$  (тиамин) - 2,5 мг/л, с использованием 20,0 мг/л глюкозы, с добавлением 0,01 мг/л ГК, хелата железа -  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  - 55,6 мг/л;  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$  - 74,6 мг/л и pH среды 6,5.

Коэффициент размножения (Кр), средний за пассаж, возрос до 10,5 по сравнению со стандартной средой МС с Кр 2,1. На средах БТМ и WPM Кр также ниже и составляет 1,3 и 1,8 соответственно таблица 2, фигура 2.

Таблица 2

Клональное микроразмножение турангового тополя

Состав питательной среды	Кол-во посаженных растений, шт.	Кол-во образовавшихся побегов (среднее за 3 пассажа), шт.	Коэффициент размножения, среднее значение
МС, $B_1$ -2,5 мг/л, глюкоза 20 г/л, ГК-0,01 мг/л, хелат железа - $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 55,6 мг/л; $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ - 74,6 мг/л, pH 6,5	10	105	10,5

5. Для стимуляции образования корневой системы растения, достигшие 4-5 см, пассировали на модифицированную жидкую питательную среду ½ WPM, содержащую 0,2 мг/л НУК и 1,0 г/л активированного угля, pH среды 6,5. Через 4-5 недель растения начали формировать корневую систему, количество корней на такой среде в

среднем составляет 9,8, качество хорошее, на корнях образовались многочисленные корневые волоски, которые при пересадке в грунт не обламывались. Приживаемость в почвенном субстрате составила 95% таблица 3, 4; фигура 3.

Таблица 3

Влияние состава питательной среды на ризогенез в культуре in vitro

Питательная среда	Колич. растений, шт.	Количество образовавшихся корней в жидкой среде	
		шт.	среднее
WPM, НУК-0,2 мг/л, акт. уголь-1,0 г/л	5	7+5+9+18+10	9,8

Приживаемость растений туранги в почвенном субстрате (in vivo) в зависимости от способа культивирования и состава питательной среды, pH 6,5

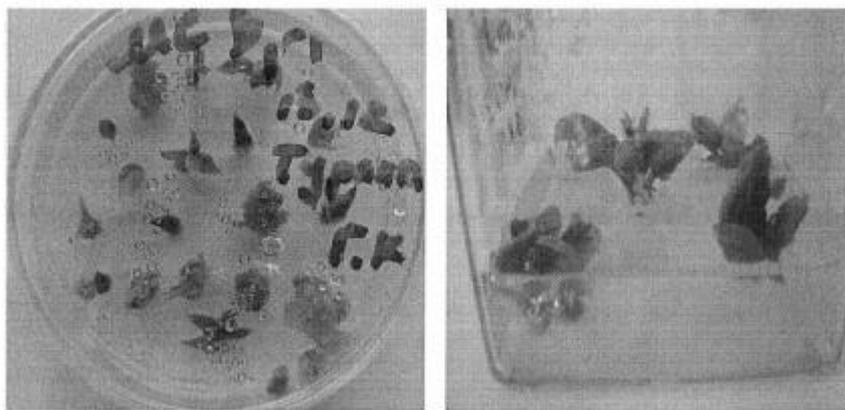
Состав питательной среды	Питательная среда	Кол-во посаженных растений,шт	Кол-во прижившихся растений в почвенном субстрате	
			шт.	%
WPM, НУК-0,2 мг/л, акт. уголь-1,0г/л	жидкая	20	19	95,0

6. Проводили прямую высадку растений из пробирочной культуры в почву с оптимизацией почвенного состава: смесь 50% торфа, 40% чернозёма и 10% песка, простерилизованная путем автоклавирования при температуре 102°C от 0,8 до 1,0 атм. В течение 20 мин., фигура 4. В этом случае 95-100% растений прижились в нестерильных условиях защищённого грунта, в то время как на почве приживаемость составляла не более 40% растений.

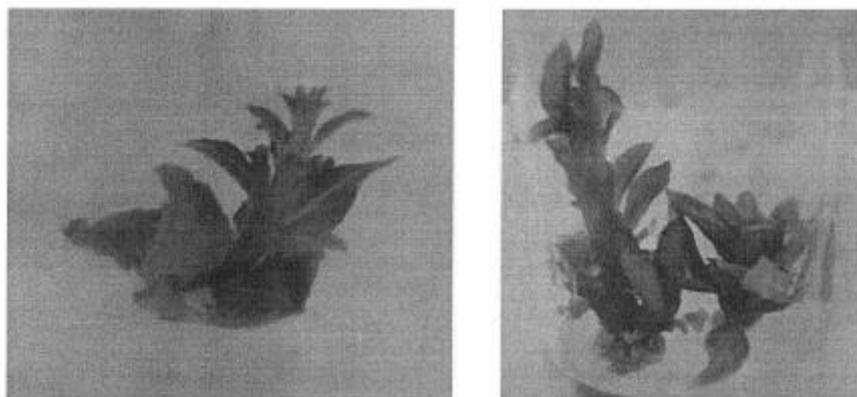
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения посадочного материала тополя в условиях in vitro, включающий заготовку побегов, их стерилизацию, получение асептических растений, клональное микроразмножение, получение корневой системы в условиях in vitro, перевод растений в нестерильные условия и высадку в почвенный субстрат, *отличающийся* тем, что осуществляют заготовку одревесневших однолетних

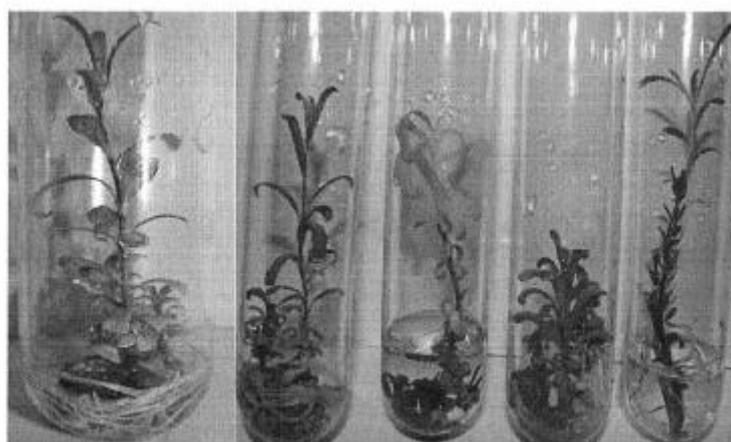
черенков с верхушечными и пазушными зимующими почками, стерилизацию почек, отделенных от одревесневших однолетних черенков в асептических условиях, проводят 0,1% сулемой с последующим промыванием стерильной водой, затем выделяют экспланты размером 2-3 мм с меристематической тканью, клональное микроразмножение осуществляют на питательной среде МС с содержанием витамина В<sub>1</sub> 1,5 - 2,5 мг/л, глюкозы 20,0 мг/л, ГК- 0,01 мг/л, а также хелата железа FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 55,6 мг/л; Na<sub>2</sub>ЭДТА×2H<sub>2</sub>O - 74,6 мг/л, при pH среды 6,5, затем растения, достигшие 4-5 см, пассируют на модификацию жидкой питательной среды ½ (WPM), α-нафтилуксусной кислоты 0,2 мг/л и активированного угля 1,0 г/л, при pH среды 6,5, далее проводят прямую высадку растений из пробирочной культуры на стерилизованный почвенный субстрат, состоящий из смеси 50% торфа, 40% чернозёма и 10% песка.



Фигура 1



Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4