



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) B (11) 34902  
(51) A01G 7/00 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2020/0056.1

(22) 31.01.2020

(45) 26.02.2021, бюл. №8

(72) Ромаданова Наталья Владимировна; Нурманов Максат Мейрамбекович; Кушнаренко Светлана Вениаминовна

(73) Товарищество с ограниченной ответственностью «Интеграция-Тургень»; Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Институт биологии и биотехнологии растений» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(56) Ф. Папстейн, Дж. Седлак, Л. Свободова, Дж. Полак, С. Гадиу Результаты *in vitro* хемотерапии сорта яблони Фрагранс- Краткое сообщение // Садоводство (Прага).- 2013. - Вып. 40. - № 4. - С 186-190

KZ 1528 U, 29.07.2016

Упадышев, М.Т. Хемотерапия вирусов плодовых и ягодных культур *in vitro* / М.Т.Упадышев, Ю.Н. Приходько, А.Д. Петрова [и др.]. -М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2009. – 72 с

Технология получения оздоровленного от вирусов посадочного материала плодовых и ягодных культур: метод. Указания. -М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2013,-92с.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ  
ОЗДОРОВЛЕННЫХ ОТ ВИРУСОВ САЖЕНЦЕВ  
ЯБЛОНИ ХЕМОТЕРАПИЕЙ

(57) Изобретение относится к сельскохозяйственной биотехнологии, к микроклональному размножению, и может быть использовано для получения оздоровленного от вирусов суперэлитного посадочного материала яблони.

В предлагаемом способе получения оздоровленных от вирусов саженцев яблони, выращиваемых *in vitro*, включающем хемотерапию пораженных вирусами растений на питательной среде с содержанием рибавирина, согласно изобретению, пораженные вирусами побеги размером 1,5-3см культивируют пассажами от одного до трех, каждый пассаж в течение 45 дней, на питательной среде Мурасиге-Скуга, включающей 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,01 мг/л индолил масляной кислоты, 4,0 г/л агара, 1,25 г/л джелрайта, при рН 5,7 с содержанием рибавирина 50 мг/л, после чего растения укореняют в культуре *in vitro* и переводят в стерильный почвенный субстрат.

Разработан способ получения оздоровленных саженцев яблони, обеспечивающей высокий выход безвирусных растений суперэлитного посадочного материала.

(19) KZ (13) B (11) 34902

Изобретение относится к сельскохозяйственной биотехнологии, к микроклональному размножению, и может быть использовано для получения оздоровленного от вирусов суперэлитного посадочного материала яблони.

Известен способ оздоровления сортов яблони путем термотерапии в культуре *in vitro*, согласно которому отобранные донорные растения яблони, в которых были обнаружены вирусы Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), Apple stem pitting virus (ASPV) и Apple stem grooving virus (ASGV) с помощью методов ИФА (ELISA) и ОТ-ПЦР, были подвержены термотерапии с использованием меристем размером 1-2 мм путем нагрева при температуре +37-39°C в течение 25-35 дней (Ф. Папштейн, Дж. Седлах, Дж. Полак, Л. Свободова, М. Хасан, М. Брыксова Культура растительных клеток, тканей, органов // - 2008. - Т. 94/3. - С. 347-352; Л. Ванг, Г. Ванг, Н. Хонг, Р. Танг, Кс. Денг // Хортсайенс - 2006. - Т.41.-№3,-С. 729-732).

К недостаткам указанного способа относится использование для термотерапии меристем размером 1-2 мм, что усложняет технологию, а также достаточно низкий выход безвирусных растений - 23,4%.

Известен способ получения оздоровленных от вирусов саженцев яблони с использованием криотерапии, включающий следующие основные этапы: побеги пересаживают на питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л 6- бензиламинопурина (БАП), 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК), 4,0 г/л агара, 1,25 г/л джелрайта при рН 5,7, вводят в культуру *in vitro*. выращивают растения, пассируют на свежую питательную среду, закалывают побеги *in vitro*, включая 16 часов при температуре -1°C. изолированные апикальные меристемы переносят в криопробирки, в которые добавляют криопротектор PVS2, замороженные криопробирки ставят в холодильник и помещают в жидкий азот (-196°C), оттаивают и затем переносят на питательную среду (пат. KZ 1528, кл.А01G 1/06, оп. 08.07.16).

В результате проведения данного способа только 40% растительного материала яблони становится безвирусным. Другим недостатком является проведение сложной технологии криотерапии.

Известен способ оздоровления побегов яблони с помощью комбинированного метода термотерапии и криотерапии побегов *in vitro* для трудно поддающегося удалению вируса ASGV. Зараженные ASGV побеги подвергали термообработке с использованием чередующихся температур 36°C и 32°C в течение 6 недель. Изолированные меристемы из обработанных побегов подвергли криотерапии. В результате получили от 30 до 100% безвирусных растений (М.Р. Ванг, Л. Чжао, З.Х. Кюи, Л. Чен, К.К. Ванг Сочетание термотерапии с криотерапией для эффективного уничтожения вируса борозчатости древесины яблони из инфицированных *in vitro* побегов яблони // Болезни растений. - 2018, - Вып. 102.-С. 1-7.).

К недостаткам указанного способа относится то, что для получения безвирусных растений потребовался усложненный способ применения двух методик - термотерапии и криотерапии. Соответственно данный способ - дорогостоящий, трудоемкий и длительный, к тому же не во всех случаях достигнут 100% -ный результат.

Наиболее близким к предлагаемому является способ получения оздоровленных от вирусов саженцев яблони *in vitro* с помощью термотерапии и хемотерапии. Проведена термотерапия меристем размером 1-2 мм путем нагрева при температуре +37-39°C в течение 25-35 дней, далее двукратный пассаж в течение 4 недель, подросших *in vitro* побегов яблони на питательную среду МС, 30 г/л сахарозы, 1,5 мг/л БАП, 7 г/л агара, рН 5,8 с содержанием 20 мг/л рибавирина в первом пассаже и 100 мг/л рибавирина во втором пассаже. Отмечено оздоровление от вирусов ASGV, ACLSV, ASPV 76% побегов (Ф. Папштейн, Дж. Седлак, Л. Свободова, Дж. Полак, С. Гадиу Результаты *in vitro* хемотерапии сорта яблони Фрагранс - Краткое сообщение // Садоводство (Прага). - 2013. - Вып. 40. - № 4. - С 186-190).

Недостаток способа - применение двух методик оздоровления - термотерапии и хемотерапии, использование для термотерапии апикальных меристем, невысокий выход безвирусных растений; следует также отметить, что данный способ использован только для одного сорта яблони.

Задачей, на решение которой направлено изобретение, является создание способа получения оздоровленных саженцев яблони, обеспечивающего высокий выход безвирусных растений суперэлитного посадочного материала.

Для этого в предлагаемом способе получения оздоровленных от вирусов саженцев яблони, выращиваемых *in vitro*, включающем хемотерапию пораженных вирусами растений на питательной среде с содержанием рибавирина, согласно изобретению пораженные вирусами побеги размером 1,5-3 см культивируют пассажами от одного до трех, каждый пассаж в течение 45 дней, на питательной среде Мурасиге-Скуга, включающей 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты, 4,0 г/л агара, 1,25 г/л джелрайта, при рН 5,7 с содержанием рибавирина 50 мг/л, после чего растения укореняют в культуре *in vitro* и переводят в стерильный почвенный субстрат.

В предлагаемом способе в частном случае проводят три пассажа по 45 дней каждый на питательной среде с содержанием рибавирина 50 мг/л, что позволяет не проводить сложную диагностику на вирусы после каждого пассажа.

Растения, укорененные в культуре *in vitro*, пересаживают в стерильный почвенный субстрат, содержащий 30-40% чернозема, 40-60% торфа, 5-15% перлита.

Укорененные растения выращивают в теплице в условиях изоляции от вирусной инфекции.

Предлагаемый способ обеспечивает получение суперэлитного, коммерческого посадочного

материала яблони, размноженного путем клонирования, оздоровленного с помощью хемотерапии с выходом 100% безвирусных растений.

Предлагаемый способ осуществляют следующим образом.

На первом этапе с помощью биотехнологических методов культуры *in vitro* получают асептические, освобожденные от бактериальной и грибной инфекции растения *in vitro*. Использовали следующие образцы коммерческих сортов яблони: Апорт Александр форма 5, Голд Раш. Ред Фри, Ренет Ландсбергский, Суйслеппер, а также подвой Б7-35. Растения размножают - создают коллекцию на питательной среде МС, содержащей 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 4,0 г/л агар, 1,25 г/л джелрайта при pH 5,7. Коллекцию выращивают в светокультуральной комнате при температуре 23-25°C, освещенности 40  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 16-ти часовом фотопериоде, получают побеги размером 1,5-3 см, что не усложняет проведение экспериментов по сравнению с работой с меристемами размером 1-2 мм по известным способам.

Далее проводят полимеразно-цепную реакцию (ПЦР анализ) размноженного растительного материала на наличие 5 вирусов яблони: ACLSV, ASGV, ASPV, Apple mosaic virus и (ApMV), Tomato ringspot virus (ToRSV). Выявленные пораженные вирусами побеги помещают в культуральные сосуды с питательной средой для размножения МС, содержащей 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 4,0 г/л агар, 1,25 г/л джелрайта при pH 5,7 с добавлением противовирусного препарата рибавирин в концентрации в питательной среде 50 мг/л. Инфицированные побеги культивировали на указанной питательной среде с рибавирином 50 мг/л от одного до трех пассажей по 45 дней каждый в светокультуральной комнате при температуре 23-25°C, освещенности 40  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 16-ти часовом фотопериоде.

При проведении диагностики на вирусы после каждого пассажа на питательной среде с рибавирином в концентрации 50 мг/л у клонового подвоя Б 7-35 уже после первого пассажа вирусы не диагностировались. У сортов: Голд Раш, Ред Фри и Суйслеппер вирусы не были обнаружены после второго пассажа. Для сортов Апорт Александр форма 5 и Ренет Ландсбергский потребовалось три пассажа для полного осво- освобождения от вирусов. Соответственно, при использовании трех пассажей для всех образцов все инфицированные растения становились безвирусными.

Оптимально инфицированные побеги всех образцов можно культивировать на питательной среде с рибавирином 50мг/л по три пассажа, 45 дней каждый. Это позволит не проводить сложную диагностику на вирусы, включающую: выделение РНК, проверку качества выделенной РНК, постановка ПЦР (подбор праймеров, амплификация), детекция продукта ПЦР (электрофорез, ультрафиолетовое подсвечивание и

съемка в гелъдокументирующей системе) после каждого пассажа и получить 100% результат.

Для получения саженцев освобожденные от вирусов побеги клонируют на питательной среде для размножения МС, содержащей 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 4,0 г/л агар. 1,25 г/л джелрайта при pH 5,7, полученную коллекцию укореняют в культуре *in vitro* на питательной среде  $\frac{1}{2}$  МС, содержащей 30 г/л сахарозы, 0,25 мг/л ИМК, 4,0 г/л агар. 1,25 г/л джелрайта при pH 5,7. Полученные укорененные растения *in vitro* и пересаживают в стерильный почвенный субстрат, состоящий из смеси 30-40% чернозема, 40-60% торфа. 5-15% перлита, и накрывают колпаками для адаптации саженцев к условиям *in vivo*. Адаптация длится 4-6 недель, в этот период растения периодически проветривают - убирают колпаки на 15-30 мин, через 4 недели колпаки убирают совсем, саженцы готовы для пересадки в полевые условия.

Авторами предлагаемого изобретения проведены эксперименты с использованием рибавирина концентрацией: 50, 75 и 100 мг/л, длительность одного пассажа 45 дней. Выявлено, что концентрация рибавирина 75 и 100 мг/л оказалась губительной для некоторых образцов яблони (таблица). Оптимальной для достижения высокого выхода безвирусных растений была концентрация рибавирина в питательной среде - 50 мг/л, при культивировании на которой некроза выявлено не было.

В предлагаемом способе в отличие от прототипа проводят хемотерапию пассажами от одного до трех, по 45 дней каждый и концентрация в питательной среде рибавирина - 50мг/л, а в прототипе - двукратный пассаж с содержанием рибавирина 20 мг/л - первый пассаж и 100 мг/л - второй пассаж. Количество безвирусных растений в предлагаемом способе составило 100%, в прототипе - 76%.

В предлагаемом способе достигнуты высокие результаты получения оздоровленных безвирусных саженцев для шести образцов: 5 ценных сортов и 1 клонового подвоя яблони, что способствует более широкому использованию способа на практике. В прототипе результаты проведены только на одном сорте Фрагранс, что не дает гарантии получения аналогичных результатов для других сортов.

Таким образом, разработанный способ оздоровления от вирусов побегов яблони *in vitro* с использованием хемотерапии позволяет:

- получить 100% оздоровленных растений яблони шести сортов в культуре *in vitro*;
- упростить способ оздоровления от вирусов побегов яблони *in vitro*, используя только хемотерапию микрклонального размножения с противовирусным препаратом рибавирин в одной оптимальной концентрации 50 мг/л;
- удешевить способ оздоровления от вирусов побегов яблони *in vitro*, всего 100 мг рибавирина понадобится для проведения оздоровления 6 образцов (сортов или клоновых подвоев).

Наименование образца	Наличие вирусов	Наличие вирусов после хемотерапии, концентрация рибавирина 100 мг/л	Наличие вирусов после хемотерапии, концентрация рибавирина 75 мг/л	Наличие вирусов после хемотерапии, концентрация рибавирина 50 мг/л
1 .Апорт Александр форма 5	ACLSV, ApMV, ASPV	Некроз побегов	Некроз побегов	I - пассаж (ACLSV, ASPV) II - пассаж (ASPV) III - пассаж (вирусов нет)
2.Голд Раш (Gold Rush)	ACLSV, ASPV	Эксперимент не проводился	I - пассаж (ASPV) II - пассаж (вирусов нет)	I - пассаж (ASPV) II - пассаж (вирусов нет)
3.Ред Фри (Red Free)	ACLSV	I - пассаж (вирусов нет)	I - пассаж (вирусов нет)	I - пассаж (ACLSV) II - пассаж (вирусов нет)
4.Ренет Ландсбергский (Landsberger Renette)	ACLSV, ASPV	I - пассаж (ASPV) II - пассаж (вирусов нет)	I - пассаж (ASPV) II - пассаж (вирусов нет)	I - пассаж (ASPV) II - пассаж (ASPV) III - пассаж (вирусов нет)
5.Суйслеппер (Suislepper)	ACLSV, ASPV	I - пассаж (вирусов нет)	I - пассаж (ASPV) II - пассаж (вирусов нет)	I - пассаж (ASPV) II - пассаж (вирусов нет)
6.Б 7-35	ASGV	Эксперимент не проводился	Некроз побегов	I - пассаж (вирусов нет)

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения оздоровленных от вирусов саженцев яблони, выращиваемых *in vitro*, включающий хемотерапию пораженных вирусами растений на питательной среде с содержанием рибавирина. *отличающийся* тем, что пораженные вирусами побеги размером 1,5-3см культивируют пассажами от одного до трех, каждый пассаж в течение 45 дней на питательной среде Мурасиге-Скуга, включающей 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,01 мг/л индолил масляной кислоты, 4,0 г/л агара, 1,25 г/л джелрайта, при pH 5,7 с содержанием рибавирина 50 мг/л, после чего

растения укореняют в культуре *in vitro* и переводят в стерильный почвенный субстрат.

2. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что проводят три пассажа по 45 дней каждый на питательной среде с содержанием рибавирина 50мг/л.

3. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что растения, укорененные в культуре *in vitro*, пересаживают в стерильный почвенный субстрат, содержащий 30-40% чернозема, 40-60% торфа. 5-15% перлита.

4. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что укорененные растения выращивают в теплице в условиях изоляции от вирусной инфекции.