



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 6332
(51) A01H 4/00 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2021/0684.2

(22) 10.03.2020

(45) 20.08.2021, бюл. №33

(72) Турдиев Тимур Туйгунович; Ковальчук Ирина Юрьевна; Мухитдинова Зинат Рахимжановна; Фролов Сергей Николаевич; Рымханова Назгуль Кабдулакызы; Белгожаев Ерасыл Мұратханұлы; 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 2080059 C1, 27.05.1997.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА МАЛИНЫ IN VITRO

(57) Полезная модель относится к биотехнологии, питомниководству, к способу получения посадочного материала малины *in vitro* с использованием метода клонального микроразмножения, и предназначено для массового размножения ягодных кустарников.

Для этого в способе получения посадочного материала малины *in vitro*, включающем клональное микроразмножение, согласно полезной модели в асептических условиях черенки со спящими

почками и/или активно растущие верхушки побегов с боковыми почками стерилизуют, полученные асептические растения размножают методом клонального микроразмножения на питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,1 мг/л индолилмасляной кислоты, 1,0 мг/л аскорбиновой кислоты, 30,0 г/л сахарозы и утроенное количество хелата железа по сравнению со стандартом, растения, достигшие 4-5 см, пассируют для укоренения на питательной среде ½ Мурасиге-Скуга, содержащей 0,25 мг/л индолилмасляной кислоты, 0,5 мг/л аскорбиновой кислоты, 0,3 мг/л гиббереллиновой кислоты, 1,5 г/л джелрайта, 3,0 г/л агара, укоренившиеся побеги пересаживают в центр почвенного субстрата, состоящего из 50% торфа, 50% чернозема и 4 г перлита, помещённого в углубление в центре.

Предлагаемый способ обеспечит получение качественного посадочного материала малины *in vitro* с высоким коэффициентом размножения, высоким процентом полученных побегов, образующих корневую систему, что позволит использовать данную технологию для массового размножения и создания плантационных насаждений.

(19) KZ (13) U (11) 6332

Полезная модель относится к биотехнологии, питомниководству, к способу получения посадочного материала малины *in vitro* с использованием метода клонального микроразмножения, и предназначено для массового размножения ягодных кустарников.

Известны биотехнологии, касающиеся выращивания малины. Известен способ сохранения ювенильного статуса культуры *in vitro* малины, включающий перенос микрорастений малины на стадиях мультипликации или укоренения на питательные среды в условиях с пониженным уровнем освещенности и пониженной температурой; смена освещенности и температуры происходит через 5 дней на стадии мультипликации и через 14 дней на стадии укоренения после начала очередного пассажа культивирования, при этом в качестве питательной среды на стадии мультипликации используют питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением сахарозы 30 г/л, инозитола 100 мг/л, пиридоксина 0,1 мг/л, тиамина 0,1 мг/л, никотиновой кислоты (PP) 0,5 мг/л, 6-бензиламинопурина (6-БАП) 0,8 мг/л и зеатина 0,1 мг/л, а на стадии укоренения в качестве питательной среды используют питательную среду ½ QL с добавлением сахарозы 20 г/л, инозитола 100 мг/л, пиридоксина 0,1 мг/л, тиамина 0,1 мг/л, никотиновой кислоты 0,5 мг/л, индолилмасляной кислоты (ИМК) 0,1 мг/л, индолилуксусной кислоты (ИУК) 0,1 мг/л, при этом уровень интенсивности освещенности снижается до 1000±200 люкс, а температура – до 4-8°C (пат. RU 2662670, кл. A01H 4/00, от. 26.07.2018).

Недостатком способа является сложность процесса, за счёт чего возрастает стоимость произведённого посадочного материала. Излишне внесение в среду для укоренения и двух ауксинов одинакового воздействия - 0,1 мг/л ИМК и 0,1 мг/л ИУК, что также удорожает стоимость саженцев. Кроме того, внесение большого количества предложенных фитогормонов на стадии мультипликации - 0,8 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л зеатина, может привести к генетическим изменениям растения, что приведёт к потере сортовой специфичности.

Известен способ получения растений - регенерантов малины *in vitro*, включающий культивирование эксплантов - листовых пластинок пробирочных растений размером более 4 мм в возрасте 3-5 месяцев, на адаксиальной поверхности которых наносят надрезы, высаживают на питательную среду, обогащённую витаминами B5, сахарозой (30 г/л), регуляторами роста БАП (2,0 мг/л), и ИМК (2,0 мг/л), агаром (8 г/л), миоинозитом (100 мг/л), после чего осуществляют культивирование при интенсивности света 80-150 Лк в течение 5-8 дней, затем культивирование ведут при освещенности, в 20 раз большей первоначальной, до получения побегов необходимой длины для укоренения (пат. RU 2080059, кл. A01H 4/00, от. 27.05.1997).

Недостаток способа заключается в том, что при использовании листовых пластинок в качестве

эксплантов может образоваться каллус, из которого получают соматклоны с изменённым геномом, что нежелательно при клональном микроразмножении растений, основным требованием к которому является точное воспроизведение исходного образца.

Задачей предлагаемой полезной модели является создание способа получения качественного посадочного материала малины *in vitro* с высоким коэффициентом размножения, высоким процентом полученных побегов, образующих корневую систему, позволяющим использовать данную технологию для массового размножения и создания плантационных насаждений.

Для этого в способе получения посадочного материала малины *in vitro*, включающем клональное микроразмножение, согласно полезной модели в асептических условиях черенки со спящими почками и/или активно растущие верхушки побегов с боковыми почками стерилизуют, полученные асептические растения размножают методом клонального микроразмножения на питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,1 мг/л индолилмасляной кислоты, 1,0 мг/л аскорбиновой кислоты, 30,0 г/л сахарозы и утроенное количество хелата железа по сравнению со стандартом, растения, достигшие 4-5 см, пассируют для укоренения на питательной среде ½ Мурасиге-Скуга, содержащей 0,25 мг/л индолилмасляной кислоты, 0,5 мг/л аскорбиновой кислоты, 0,3 мг/л гиббереллиновой кислоты, 1,5 г/л джелрайта, 3,0 г/л агара, укоренившиеся побеги пересаживают в центр почвенного субстрата, состоящего из 50% торфа, 50% чернозема и 4 г перлита, помещённого в углубление в центре.

Применение представленного способа позволило ускоренно размножить посадочный материал малины сортов Брянское Диво, Моросейка, Ласка, Геркулес и Kwelli.

Предлагается введение в культуру *in vitro* малины проводить в январе-марте после прохождения физиологического покоя путем инициации роста побегов из спящих почек, а также в период активного роста в мае-июне.

Последовательность операций.

1 этап. Получение асептических растений.

1) Заготавливать одревесневшие однолетние черенки со спящими верхушечными и пазушными почками после прохождения растениями физиологического покоя (январь- март) или зелеными побегами в период активного роста в мае-июне.

2) Черенки со спящими почками в лабораторных условиях тщательно промыть мыльным раствором, после этого стерилизовать перемешивая в течение 10 мин в растворе «Белизна» + H₂O 1:2, затем промыть в течение 1 часа проточной водой. После чего в асептических условиях ламинар-бокса черенки сегментировать на отрезки 2-3 см с включением верхушки побега и/или нескольких боковых почек. Стерилизовать 0,1% сулемой (HgCl₂) в течение 4-5 мин и промыть стерильной водой 4-5 раз, по 2-3 мин.

Активно растущие верхушки побегов с боковыми почками тщательно промыть мыльным раствором, а затем в течение 1 часа проточной водой, стерилизовать 0,1% сулемой (HgCl_2) в течение 4-5 мин и промыть стерильной водой 4-5 раз по 2-3 мин (фигура 1).

2 этап. Клональное микроразмножение.

Клональное микроразмножение растений *in vitro* проводить в светокультуральном помещении при температуре $+23-25^\circ\text{C}$, освещённость $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16-часовом фотопериод.

Полученные асептические растения малины размножать на питательной среде Мурасиге - Скуга, включающей 0,5 мг/л БАП; 0,1 мг/л ИМК; 1,0 мг/л АК; 30,0 г/л сахарозы и утроенное содержание хелата железа по сравнению со стандартом. Представленный состав питательной среды обеспечивает лучшие результаты клонального микроразмножения. Коэффициент размножения сортов Брянское Диво, Моросейка, Ласка, Геркулес и Kwe1 составляет от 4 до 6 в зависимости от генотипа, а микропобеги хорошо развиты, отличаются выравненностью, одинаковой толщиной, высотой и ярко-зелеными листьями (фигура 2).

3 этап. Получение корневой системы в условиях *in vitro*

Для стимуляции образования корневой системы малины растения, достигшие 4-5 см, пассировать на питательную среду, содержащую $\frac{1}{2}$ Мурасиге-Скуга, 0,25 мг/л ИМК, 0,5 мг/л АК, 0,3 мг/л ГК, 1,5 г/л джелрайта, 3,0 г/л агара. Этот состав оптимальный. Побеги, образовавшие корневую систему, составляют 90%. Через 4-5 недель у растений формируется корневая система хорошего качества в среднем с 4-5 корнями, на которых образуются многочисленные корневые волоски (фигура 3).

4 этап. Перевод растений в нестерильные условия и высадка в почвенный субстрат.

Перевод растений из культуры *in vitro* в *in vivo* успешно проходит в условиях закрытого грунта при влажности воздуха около 90%. Для перевода укоренившихся побегов малины *in vivo* с высокой

приживаемостью использовать почвенный субстрат, состоящий из 50% торфа, 50% чернозема и 4 г перлита, помещённого в углубление в центре.

Почвенный субстрат и перлит предварительно стерилизовать путем автоклавирования (с помощью автоклава ВК-75-01) в течение 1 часа при 0,8-1,0 атм., или путем термообработки в сухожаровом шкафу (ШС-80-01) при 170°C в течение 1 часа.

Таким образом, разработанный способ получения посадочного материала малины *in vitro*, включающий этапы: получение асептических растений, клональное микроразмножение, получение корневой системы в условиях *in vitro*, перевод растений в нестерильные условия и высадку в почвенный субстрат с получением на каждом этапе высоких результатов, позволяет использовать его для массового, ускоренного размножения малины - коэффициент размножения 4-6, и получать оздоровленный посадочный материал.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ получения посадочного материала малины *in vitro*, включающий клональное микроразмножение, *отличающийся* тем, что в асептических условиях черенки со спящими почками и/или активно растущие верхушки побегов с боковыми почками стерилизуют, полученные асептические растения размножают методом клонального микроразмножения на питательной среде Мурасиге - Скуга, содержащей 0,5 мг/л б- бензиламинопурина, 0,1 мг/л индолилмасляной кислоты, 1,0 мг/л аскорбиновой кислоты, 30,0 г/л сахарозы и утроенное количество хелата железа, растения, достигшие 4 - 5 см, пассируют для укоренения на питательной среде $\frac{1}{2}$ Мурасиге - Скуга, содержащей 0,25 мг/л индолилмасляной кислоты, 0,5 мг/л аскорбиновой кислоты, 0,3 мг/л гиббереллиновой кислоты, 1,5 г/л джелрайта, 3,0 г/л агара, укоренившиеся побеги пересаживают в центр почвенного субстрата, состоящего из 50% торфа, 50% чернозема и 4 г перлита, помещённого в углубление в центре.



Фиг.1 – Введение в культуру *in vitro* активно растущих побегов



Фиг.2 – Клональное микроумножение растений *in vitro* в светокультуральном помещении



ФИГ. 3 – Образование корневой системы в культуре *in vitro*



Фиг. 4 – Контейнерная культура малины в условиях защищённого грунта