



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2011143443/13**, **28.10.2011**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.10.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **28.10.2011**(45) Опубликовано: **27.06.2013** Бюл. № 18(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2118486 C1**, **10.09.1998**. **UA 19053 U**,
15.12.2006. **RU 2277773 C1**, **20.06.2006**. **JP**
11220964 A, **17.08.1999**.

Адрес для переписки:

394087, г.Воронеж, ул. Тимирязева, 8, ООО
"ИНВИТРО", директору Т.Е. Галдиной

(72) Автор(ы):

Сиволапов Алексей Иванович (RU),
Галдина Татьяна Евгеньевна (RU),
Табацкая Татьяна Михайловна (RU),
Машкина Ольга Сергеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной
ответственностью "ИНВИТРО" (RU)**(54) СПОСОБ ВЫРАЩИВАНИЯ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к растениеводству, лесному, лесопарковому и сельскому хозяйству, а именно к питомниководству. Способ выращивания посадочного материала включает заготовку побегов, их стерилизацию, индукцию развития основного пазушного побега на первичных эксплантах. Укоренение изолированных побегов, их мультипликацию в условиях *in vitro*. Перевод побегов в нестерильные условия и высадку в почву. Микрочеренкование осуществляют на

питательной среде WPM - Woody Plant Medium, со сниженным содержанием БАП - бензиламинопурина 0,2 мг/л и добавлением ГК - гиббереллиновой кислоты 0,2 мг/л. Высадку пробирочных микрорастений в нестерильные условия проводят без их предварительной адаптации к условиям климатической камеры. Использование данного способа позволяет производить качественный двухлетний посадочный материал в условиях открытого грунта. 1 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21)(22) Application: **2011143443/13, 28.10.2011**(24) Effective date for property rights:
28.10.2011

Priority:

(22) Date of filing: **28.10.2011**(45) Date of publication: **27.06.2013 Bull. 18**

Mail address:

**394087, g.Voronezh, ul. Timirjazeva, 8, OOO
"INVITRO", direktoru T.E. Galdinoj**

(72) Inventor(s):

**Sivolapov Aleksej Ivanovich (RU),
Galdina Tat'jana Evgen'evna (RU),
Tabatskaja Tat'jana Mikhajlovna (RU),
Mashkina Ol'ga Sergeevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"INVITRO" (RU)****(54) METHOD OF GROWING PLANTING MATERIAL**

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: invention relates to plant production, forestry, aesthetic forestry and agriculture, namely to nursery. The method of growing planting material includes harvesting the shoots, their sterilisation, induction of development of basic auxiliary branch on primary explants, rooting of isolated shoots and their multiplication in vitro. Transfer of the shoots in non-sterile conditions and planting into the soil. Micro cutting

grafting is carried out on a nutrient medium WPM - Woody Plant Medium with a reduced content of BAM - benzylaminopurine 0.2 mg/l, and adding PS - gibberellic acid, 0.2 mg/l. The planting of test tube microplants in non-sterile conditions is carried out without their prior adaptation to the conditions of the climatic chamber.

EFFECT: use of this method enables to produce high-quality two-year planting material in conditions of the open ground.

1 tbl

Изобретение относится к растениеводству, лесному, лесопарковому и сельскому хозяйству, а именно к питомниководству.

Изобретение решает задачу производства качественного посадочного материала с высокими показателями темпа роста и повышения приживаемости саженцев.

Известен способ размножения посадочного материала древесных растений, включающий выращивание побегов *in vitro* на искусственной питательной среде, тестирование методом иммуно-ферментного анализа, прививку растений (патент РФ №2118486, МПК А01G 01/00, опубл. 10.09.1998). Однако данный способ дорогостоящий.

В качестве прототипа выбран способ размножения растений *in-vitro*, включающий высадку боковых побегов растений в заполненные агаризованной средой сосуды без дна для начального укоренения, помещение укорененных побегов в емкость, заполненную перлитом, пропитанную жидкой стерильной средой (патент РФ №2277773, МПК А01Н 04/00, опубл. 20.06.2006). Однако данный способ очень трудоемкий.

Способ предназначен для массового тиражирования хозяйственно ценных сортов древесных растений, которые относятся к трудно черенкуемым традиционным способом, и выращивания качественного стандартного посадочного материала для создания плантационных насаждений, полезащитных полос, лесных угодий.

Для этого регенерация растений осуществляется на основе пролиферации пазушных меристем (прямой выгонки пазушных побегов), их укоренения и мультипликации полученных микрорастений, т.е. с помощью модели размножения, исключающей этап каллусообразования. При этом в качестве эксплантов используются узловыи сегменты активно растущих летних неодревесневших (а не зимних одревесневших) побегов, применение гормональных питательных сред ограничивается всего одним сроком культивирования (один месяц) первичных эксплантов взрослых деревьев, а на этапе укоренения микропобегов, их дорастивания и мультипликации используются одни и те же безгормональные среды.

Предлагаемый способ выращивания посадочного материала осуществляют следующим образом.

1 этап - Заготовка побегов, изоляция эксплантов и получение асептических жизнеспособных культур.

Заготовка побегов: однолетние растущие неодревесневшие (зеленые) побеги тополя размером 40...50 см с пазушными вегетативными почками заготавливают в начале - середине июня из средней части кроны взрослых отобранных деревьев. Отбираются побеги с хорошо выраженными пазушными почками и междоузлиями. Срезанные побеги помещают в банках с водопроводной водой в условия холодильника (температура 10...12°C), где выдерживают в течение 3...5 суток для их холодовой предобработки перед изоляцией эксплантов. Каждые три дня проводится обновление срезов и смена воды.

Стерилизация побегов. Сначала проводится предварительная подготовка побегов. Для этого отрезки побегов величиной 10 см тщательно промывают теплой водой с хозяйственным мылом, а затем подвергают поэтапной стерилизации:

1) Поверхностная стерилизация коммерческим 2% раствором «Domestos» (подогретым до 30...40°C) в течение 15 минут с последующей промывкой в проточной водопроводной воде (не менее 20 минут). Осуществляется в нестерильных условиях.

2) Основная стерилизация побегов в асептических условиях (в условиях ламинар-бокса) 0,025% раствором мертиолята в сочетании с жидким дезинфицирующим

раствором "Белизна" (7% раствор) в течение 15 мин, с последующей 5-кратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Для лучшего смачивания побегов во время основной стерилизации в раствор мертиолята рекомендуется добавить Твин 20 (0,08...0,12%).

2 этап - Индукция развития основного пазушного побега на первичных эксплантах.

Простерилизованные побеги разрезают в асептических условиях на сегменты величиной 1,5-2 см с одной пазушной почкой (культуральные экспланты). Экспланты в асептических условиях (в ламинар-боксе) помещают в вертикальном или слегка наклонном положении по одному в культуральные сосуды (стеклянные биологические пробирки) с питательной средой WPM (среда №1) с добавлением 6-БАП (6-бензиламинопурина) 0,5 мг/л, ГК (гиббереллиновая кислота) 0,2 мг/л.

Более полно морфогенные потенции (формирование хорошо развитых пазушных побегов) проявляются при культивировании эксплантов на питательной среде WPM, дополненной БАП 0,5 мг/л и ГК 0,2 мг/л (таблица 1). Добавление в питательную среду ГК позволяет не только повысить количество морфогенных культур (например, в 1,7

раза у тополя Хоперский 1 (77,4% против 44,3% без ГК) и 1,9 раз - у тополя Приярского), но и способствует элонгации (дорастиванию) индуцированных побегов. В этом случае в течение месяца с момента начала культивирования формируются побеги, отличающиеся хорошим ростом в высоту (4...8 см) с нормально развитыми листовыми пластинками, отсутствием признаков соматической изменчивости. Низкое содержание БАП в среде (0,2 мг/л) на начальном этапе культивирования недостаточно для эффективной индукции и развития первичных побегов. Более же высокое содержание БАП в среде (1,0 мг/л) подавляет развитие эксплантов и рост побегов в высоту.

Для увеличения количества индуцированных побегов рекомендуется рекультивирование первичных эксплантов с отрезанным пазушным побегом (снятие апикального доминирования) на среде WPM со сниженным содержанием БАП - 0,2 мг/л и добавлением ГК 0,2 мг/л. В этом случае в течение месяца культивирования происходит интенсивное множественное образование дополнительных побегов, отличающихся хорошим ростом (3...5 см) и нормальным развитием. Количество побегов на 1 эксплант составляет 9,6 с варьированием от 6 до 14 побегов.

Таблица 1				
Морфогенетическая активность первичных эксплантов летних черенков тополя сереющего в зависимости от гормонального состава питательной среды WPM				
№ п/п	БАП мг/л	ГК мг/л	% эксплантов, сформировавших основной побег	
			Хоперский 1	Приярский
1	0,2	-	8,2±0,5	5,1±0,3
2	0,2	0,2	17,5±1,6	10,8±1,5
3	0,5	-	44,3±4,4	28,0±3,3
4	0,5	0,2	77,4±3,9*	54,4±3,6*
5	1,0	-	21,8±1,5	12,3±0,7
6	1,0	0,2	44,3±4,1	31,2±2,7

3 этап - Укоренение изолированных побегов и их мультипликация (клональное микроразмножение) в условиях *in vitro*.

Сформировавшиеся пазушные или индуцированные дополнительные побеги (достигшие высоты 1,5...3 см) изолируют и переносят на среду для спонтанного укоренения WPM или 1/2 WPM (с уменьшенным содержанием макросолей) без гормонов. Более крупные побеги перед посадкой разрезают на микрочеренки с одной пазушной почкой размером 1,5...3 см.

Для микроклонального размножения рекомендуется использовать все микрочеренки растения-регенеранта, что может повысить производительность работы. Это связано с отсутствием существенных различий между черенками разного яруса одного растения (верхняя, средняя, нижняя часть побега) по эффективности их укоренения в условиях *in vitro*. Все одноузловые сегменты хорошо укореняются и имеют нормальный рост.

Мультипликация микрорастений (многократное микрочеренкование, осуществляемое для увеличения численности клона) проводится раз в месяц или раз в 2 месяца на питательных средах WPM или 1/2 WPM без гормонов. Для этого микрочеренки длиной 1...1,5 см, содержащие одну пазушную почку, помещают по 20 штук в один пластиковый контейнер.

Перевод микрорастений в нестерильные условия необходимо проводить без предварительной адаптации в условиях климатической камеры, что позволяет повысить сохранность регенерантов на 20%.

Прямая высадка растений из пробирочной культуры в почву предусматривает отсутствие промежуточного этапа доращивания в лаборатории. Перенос микрорастений из культуральных сосудов непосредственно в нестерильный субстрат теплицы осуществляли весной и летом (май-июль). Растения, преадаптированные в открытых культуральных сосудах, извлекают и пикируют в прямолинейные бороздки, сделанные в хорошо разрыхленном и выровненном грунте.

Проливают слабым раствором марганцовки ($KMnO_4$), присыпают почвой, уплотняют. Размещение растений - от 100 до 200 штук на 1 м прямолинейными рядами. Междурядье не менее 10 см. Такое размещение способствует качественному и своевременному уходу (рыхление, прополка) в течение первого вегетационного периода, что, в свою очередь, повышает приживаемость пробирочных растений в почве.

Для получения стандартного посадочного материала (двухлетних саженцев) перезимовавшие в теплице растения ранней весной пересаживают на открытый участок. На этом этапе особое внимание следует уделять срокам высадки растений, от которых существенно зависит не только их приживаемость, но и ростовые процессы.

В течение вегетационного периода необходим уход за растениями (прополка, рыхление, подкормка минеральными удобрениями, например, Кемира-универсал), а в жаркое и сухое лето - ежедневный полив.

Предлагаемый способ способствует в максимальной степени сохранения хозяйственной и генетической ценности исходных экземпляров и позволяет в условиях открытого грунта получать качественный однородный (стандартный) двухлетний посадочный материал.

Формула изобретения

Способ выращивания посадочного материала, включающий заготовку побегов, их стерилизацию, индукцию развития основного пазушного побега на первичных эксплантах, укоренение изолированных побегов, их мультипликацию в условиях *in vitro* и перевод в нестерильные условия, отличающийся тем, что микрочеренкование осуществляют на питательной среде WPM - Woody Plant Medium, со сниженным содержанием БАМ - бензиламинопурин 0,2 мг/л и добавлением ГК - гиббереллиновой кислоты 0,2 мг/л, и высадка пробирочных микрорастений в нестерильные условия проводится без их предварительной адаптации к условиям климатической камеры.