

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202000014** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.30

(51) Int. Cl. *A01H 1/04* (2006.01)
A01H 6/74 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.12.24

**(54) СПОСОБ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ЯБЛОНИ НЕДЗВЕЦКОГО
(MALUS NIEDZWETZKYANA)**

(96) KZ2019/091 (KZ) 2019.12.24

(71) Заявитель:
**ТОВАРИЩЕСТВО
С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ГРЕНЛАБ" (KZ)**

(72) Изобретатель:
**Какимжанова Алмагуль
Апсаламовна, Нуртаза Айдана
Серикболкызы, Магзумова
Гульмира Козовна, Есимсеитова
Асель Кайратовна, Каримова
Венера Конысбаевна, Жаныбекова
Жанаргуль Токтамысовна,
Раманкулов Ерлан Мирхайдарович
(KZ)**

(57) Изобретение относится к биотехнологии растений, включая микрклональное размножение редкого, исчезающего вида яблони Недзвецкого (*Malus Niedzwetzkyana*). Данное изобретение может применяться в ботанических садах, природных парках, озеленении для сохранения и воспроизводства. Техническим результатом изобретения является при микрклональном размножении увеличение количества микропобегов до 24,8 штук на 1 растение, увеличение количества корней до 11,6 штук на 1 растение и повышение эффективности адаптации растений-клонов яблони Недзвецкого в почвогрунте до 85,4% при использовании для полива калия азотнокислого в концентрации 900 мг/л. Сущность изобретения заключается в том, что способ микрклонального размножения яблони Недзвецкого состоит из следующих этапов: введение в культуру *in vitro* пазушных почек, мультипликация и укоренение микропобегов, адаптация и выращивание в почвогрунте растений-клонов, отличающийся тем, что используют для культивирования апикальных меристем среду Quoirin&Lepoivre с добавлением 30 г/л сахара, 7 г/л агара, 1,0 мг/л бензиламинопурина и 3,0 мг/л кинетина, для мультипликаций микропобегов среду Quoirin&Lepoivre с добавлением 30 г/л сахара, 7 г/л агара, 0,5 мг/л бензиламинопурина, 1,0 мг/л гибберелловой кислоты и 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты, для укоренения среду $1/2$ QL с добавлением 30 г/л сахара, 5 г/л агара, 1,5 мг/л индолилмасляной кислоты, для адаптации укорененные микропобеги размером 3-5 см высаживают в нейтрализованный торф, поливают калием азотнокислым (900 мг/л).

A1

202000014

202000014

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

СПОСОБ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ

ЯБЛОНИ НЕДЗВЕЦКОГО (*MALUS NIEDZWETZKYANA*)

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии растений, включая микроклональное размножение редкого, исчезающего вида яблони Недзвецкого (*Malus niedzwetzkyana*). Данное изобретение может применяться в ботанических садах, природных парках, озеленении для сохранения и воспроизводства.

Описание уровня техники

Сохранение природного биоразнообразия является актуальной проблемой в современном мире для всех без исключения стран [Beyond Predictions: Biodiversity Conservation in a Changing Climate: review., 332, 2011, Kuussaari M. et al, 24:564–571, 2009, Wulff A.S., 8:9, 2013]. Неотъемлемой и жизненно важной частью биоразнообразия живой природы, определяющей устойчивость экосистем, являются растения. Согласно Красному списку Международного союза охраны природы (МСОП), являющемуся самым всеобъемлющим и глобальным источником информации о сохранении видов растений и животных на Земле, на сегодняшний день 12055 видов растений во всем мире находятся под угрозой исчезновения [Vie J-C. et al., Wildlife in a changing world. An analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species. 2009, Paunescu A., 14:4095–4103, 2009].

В Казахстане это цифра составляет 52 вида [Vie J-C. et al., Wildlife in a changing world. An analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species. 2009.]. Многие виды растений сталкиваются с повышенным риском вымирания из-за разрушения среды обитания, чрезмерного сбора, непригодной практики ведения сельского и лесного хозяйства, урбанизации, загрязнения, фрагментации и деградации, распространения инвазивных чужеродных видов (некоренных видов, которые сильно колонизируют конкретную среду обитания) и изменения климата [Bunn E. et al., 47:188–200, 2011, Dullinger S., 2:619–622, 2012, Sax D.F. et al., 105:11490–11497, 2008, Hahs A.K., 12:1165–1173, 2009].

Одним из таких видов, подвергшимся печальным последствиям человеческой деятельности в дикой природе, является яблоня Недзвецкого (*Malus niedzwetzkyana* Dieck). Это очень редкий вид деревьев, находящийся под угрозой исчезновения и внесенный в Красный список Международного союза охраны природы (МСОП) и в Красную книгу Казахстана. В настоящее время угрозы для них представляют сокращение и деградация местообитания из-за расширения зоны и развития сельского хозяйства, прививки

коммерческих сортов и гибридизация, приводящие к генетической эрозии, и чрезмерный выпас скота.

Яблоня Недзвецкого – это невысокое дерево высотой 5-8 метров, чьи ветви, листья, цветы, плодовая кожица и мякоть полностью окрашены в насыщенный пурпурный цвет [Ji X.H., 120:325–337., 2015, Wang N., 127:217–227, 2016, Reim S. et al, 5:89–104, 2006]. Такую отличительную расцветку яблоне Недзвецкого придает чрезвычайно высокое содержание антоцианов – водорастворимых флавоноидных фитопигментов. Антоцианы, попадая в человеческий организм, действуют как естественные антиоксиданты, которые обеспечивают защиту от свободных радикалов и других вредных веществ. Повышенное содержание антоцианов выделяет яблоню Недзвецкого среди других видов яблонь, наделяя ее заметными преимуществами, и придает дополнительную важность сохранению этого вида [Wang N., 127:217–227, 2016, Ji X.H. et al, 123:389–404, 2015, Wang X. et al, 50:1, 2015, Tsuda E., 56:159–170, 2012, Ozgen M. et al, 119:275–279, 2009].

Яблони традиционно размножают семенами либо вегетативными методами [Dobránszki J. et al, 28:462–488, 2010, Magyar-Tábori K. et al, 101:251–267, 2010, Rai M.K. et al, 27:671–679, 2009, Khan S. et al, 19:1–11, 2012]. Такие методы имеют свои преимущества: семена производятся в большом количестве, что обеспечивает достаточно низкие затраты для размножения, многие семена могут храниться в течение длительного времени без потери жизнеспособности, они легко распространяются. Однако, с помощью семенного размножения невозможно получить генетически идентичные растения, так как, происходит расщепление. Также размножение семенами приводят к соматической изменчивости, серьезному недостатку, в которых необходима клonalная однородность полученных растений [Khan S. et al, 19:1–11, 2012, Reed B.M. et al, 47:1–4, 2011, George E.F. et al, 2008]. При вегетативном размножении генотип материнского растения сохраняется, кроме того, сокращается продолжительность ювенильного периода, но многие древесные породы плохо размножаются вегетативным способом. Эффективность размножения при этом не очень высока, даже на ювенильной стадии [Reim S. et al, 5:89–104, 2006, Dobránszki J. et al, 28:462–488, 2010, Magyar-Tábori K. et al, 101:251–267, 2010]. Вегетативные методы не обеспечивают получение здорового, устойчивого к грибным, бактериальным и вирусным инфекциям потомства, поскольку существует возможность их накопления и передачи. Технологии размножения с помощью прививок сложны и трудоемки. Также, как и в естественных условиях, рост и развитие растений при традиционном разведении, стабильно зависит от сезона [Rai M.K. et al, 27:671–679, 2009, Reed B.M. et al, 47:1–4., 2011, Pence V.C., 99:214–220, 2013]. Однако, несмотря на то, что

данный способ использовался, он был ни эффективным, ни рентабельным отчасти вследствие того, что циклы размножения являются слишком долгими, и за данное количество времени и в данном объеме пространства можно создать лишь ограниченное количество растений.

Современные биотехнологические методы преодолели проблемы традиционных методов размножения, предоставив возможность предотвращения исчезновения редких растительных видов [Volis S. et al, 19:2441–2454, 2010, Seaton P.T. et al, 76:193–203, 2010]. Одним из самых распространенных биотехнологических инструментов, успешно используемым для реализации этих целей, является метод микроклонального размножения [Gonçalves S. et al, 53:774–778, 2009, Tavares A.C. et al, 46: 47–56, 2010, Pence V.C., 47:176–187, 2011, Kharkwal A.C., 62:211–216, 2008].

Следовательно, будет полезным способ микроклонального размножения *Malus niedzwetzkyana*, не только для сохранения редкого исчезающего вида, но и для озеленения населенных пунктов. Это связано с комплексом биологических положительных признаков и свойств, таких как, высокая засухоустойчивость, жароустойчивость, зимостойкость, морозоустойчивость, газоустойчивость и ветроустойчивость. Яблоня Недзвецкого в течение всего вегетационного периода сохраняет красоту и декоративность. Вышеуказанные характеристики яблони Недзвецкого в значительной степени соответствуют потребностям современных озеленителей.

Таким образом, декоративный, редкий и исчезающий вид яблони Недзвецкого, размноженный путем микроклонального размножения сохранивший свои специфические характеристики, будет иметь большой рыночный потенциал. Также готовые сеянцы и саженцы яблони Недзвецкого могут быть использованы для озеленения населенных пунктов с учетом имеющихся неблагоприятных почвенно–климатических условий.

Предшествующий уровень техники

Известен способ клонального микроразмножения подвоев яблони, в котором на этапах введения в культуру и микрочеренкования в питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) в качестве стимулятора роста добавляется препарат фуrolан в концентрации 0,004 мг/л, вместо синтетических регуляторов роста. Недостатком этого способа является то, что при микроклональном размножении плодовых видов яблонь MM106 и СК-4 с использованием препарата фуrolан было получено максимально только 7 дополнительных побегов от одного экспланта. Также данный способ оптимизирован для размножения плодовых подвоев яблони и не эффективен для размножения дикорастущего, исчезающего вида яблони Недзвецкого. [Патент RU №2523305 от

21.02.2013 А01Н 4/00 (2006.01). «Способ микроклонального размножения подвоев яблони»].

Известен способ микроклонального размножения сорта яблони *Malus domestica* CSR6R6-666, в котором для мультипликации используют среду МС, содержащую 0,8 мг/л бензиламинопурин (БАП), 0,2 мг/л нафтилуксусную кислоту (НУК) и 30 г/л сахарозу; для укоренения – среда МС, содержащую 0,5 мг/л индолилмасляную кислоту (ИМК) и 20 г/л сахарозу. Недостатком этого способа является то, что у яблони *Malus domestica* CSR6R6-666 на 45 дней культивирования *in vitro* было образовано только 5,5 корней на одном микропобеге. [CN106937597 (A) - 2017-07-11. Tissue culture and rapid propagation method applicable to novel *Malus domestica* variety with high flavonoid content. Authors: Chen Xuesen et al].

Известен способ быстрого выращивания сеянцев подвой яблони М9, который состоит из следующих этапов: 1 этап - стерилизация пазушных почек и культивирование на питательную среду МС с добавлением 25 г/л сахара, 5 г/л агара, 0,2-1,0 мг/л БАП и 0,2-0,6 мг/л НУК; 2 этап - клональное размножение микропобегов на среде МС с добавлением 25 г/л сахара, 5 г/л агара, 0,2-1,0 мг/л БАП, 0,2-0,6 мг/л НУК и 0,2-0,5 г/л гидролизата казеина; 3 этап - укоренение микропобегов на среде МС с добавлением 25 г/л сахара, 5 г/л агара, 0,05-0,12 мг/л ИМК и 4 этап – закаливание и пересадка микрорастений в почвогрунт. Недостатком данного способа является то, что у яблони М9 при культивировании на среде из 52 экспланта сформировалось только 213 микропобегов, в среднем на 1 эксплант образовалось 4,1 микропобега. Кроме этого, пробирочные растения яблони М9 получали через каллусные ткани, которая приводит к соматической изменчивости. Таким способом тяжело получить генетически идентичные растения, так как, происходит расщепление. [CN103931492 (A) — 2014-07-23. Tissue-culture rapid seedling growing method for apple rootstock M9. Authors: Wang Yanfang et al].

Аналог изобретения. В качестве прототипа выбран способ клонального микроразмножения вида яблони *Malus zumi*, в котором для введения в культуру *in vitro* использовали питательную среду МС с добавлением 10 г/л сахара, 4,5 г/л агара и 0,2-0,3 мг/л БАП; для мультипликации – среда МС с добавлением 10 г/л сахара, 4,5 г/л агара и 0,6-0,8 мг/л БАП; для укоренения – среда ½ МС с добавлением 10 г/л сахара, 4,5 г/л агара и 0,1-0,2 мг/л ИМК. Недостатком данного способа является то, что при микроклональном размножении яблони *Malus zumi* было получено максимально количество микропобегов от одного экспланта 6,79 штук. [CN103155866 (A) — 2013-06-19. *Malus zumi* tissue culture rapid propagation seedling raising method. Authors: Li Guoying et al].

Сущность изобретения

Изобретение направлено на эффективное микроклональное размножение микропобегов декоративного редкого и исчезающего вида *Malus Njeczwezkyana* и обеспечение высокой приживаемости растений-клонов в почвогрунте, с сохранением специфических характеристик для получения посадочного материала. Это позволит получить высококачественный посадочный материал в большом количестве для их реализации на рынке озеленения, а также сохранить и воспроизвести редкий исчезающий вид яблони Недзвецкого.

Задача изобретения – разработка способа микроклонального размножения декоративного редкого и исчезающего вида *Malus Njeczwezkyana*.

Новизна изобретения - разработан новый способ микроклонального размножения декоративного редкого и исчезающего вида *Malus Njeczwezkyana*, обеспечивающий высокую скорость размножения, высокую скорость укоренения и высокую адаптацию растений-клонов в почвогрунте.

Техническим результатом изобретения является при микроклональном размножении увеличение количества микропобегов до 24,8 штук на 1 растение, увеличение количества корней до 11,6 штук на 1 растение и повышение эффективности адаптации растений-клонов яблони Недзвецкого в почвогрунте до 85,4% при использовании для полива калия азотнокислого в концентрации 900 мг/л.

Сущность изобретения заключается в следующем: способ микроклонального размножения яблони Недзвецкого, состоит из следующих этапов: введение в культуру *in vitro* пазушных почек, мультипликация и укоренение микропобегов, адаптация и выращивание в почвогрунте растений-клонов. Согласно настоящего изобретения однолетние побеги яблони Недзвецкого разрезают на сегменты и обрабатывают дезинфицирующим средством, затем почки стерилизуют в 12% перекиси водорода (H_2O_2) в течение 4 минут и изолированные апикальные меристемы культивируют на питательную среду *QL* (*Quoirin&Lepoivre*) с добавлением 30 г/л сахара, 7 г/л агара, 1,0 мг/л БАП и 3,0 мг/л кинетина. Через 3-4 недели регенерированные микропобеги пересаживают на питательную среду *QL* с добавлением 30 г/л сахара, 7 г/л агара, 0,5 мг/л БАП, 1,0 мг/л гибберелловой кислоты (ГК) и 0,01 мг/л ИМК для мультипликаций дополнительных побегов, пассирование на свежую питательную среду проводят с интервалом 4-5 недель. Затем отдельные микропобеги размером 3-4 см культивируют на среде $\frac{1}{2}QL$ с добавлением 30 г/л сахара, 5 г/л агара 1,5 мг/л ИМК для укоренения. На всех этапах

микрклонального размножения микробеги выращивают в фактеростатной комнате с 16-часовым световым режимом, освещенностью 4-5 тыс.люкс, температурой 24-26°C.

Для адаптации, укорененные микробеги размером 3-5 см, высаживают в нейтрализованный торф, поливают калием азотнокислым (900 мг/л) и далее полив проводят водой. Растения-клоны выращивают в оранжерее при температуре 24-26°C, влажности 80-100%, 16-часовым фотопериодом в течение 14 дней с момента высадки в субстрат под флуоресцентными лампами, под пленкой для поддержания оптимальной влажности, необходимой для сохранения тургора растений. После этого адаптированные растения-клоны выращивают до появления 2-3 новых листьев под флуоресцентными лампами в оранжерии и далее их переводят в условия пленочной теплицы при естественном освещении.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

Увеличение количества микробегов

Способ, предлагаемый в настоящем изобретении, является особенно эффективным при использовании *QL* с добавлением 30 г/л сахара, 7 г/л агара, БАП 0,5 мг/л, ГК 1,0 мг/л и ИМК 0,01 мг/л для мультипликации микробегов яблони Недзвецкого (таблица 1). Так, на 50-ый день культивирования количество микробегов на эксплант в среднем составил 24,8 шт. Микробеги были зеленого цвета и имели развитые листья (рисунок 1).

Таблица 1 – Оптимизация питательной среды для увеличения количества микробегов яблони Недзвецкого в культуре *in vitro*

Вариант	Количество микробегов, штук		
	1-ый день	25-ый день	50-ый день
I - <i>QL</i> с БАП 0,5 мг/л, ГК 1,0 мг/л, ИМК 0,01 мг/л	1,0	9,0±0,58	24,8±1,94
II - <i>QL</i> с БАП 1,0 мг/л, ИМК 0,2 мг/л	1,0	2,6±0,14	4,4±0,14
III - <i>QL</i> с БАП 1,0 мг/л, кинетин 3,0 мг/л	1,0	2,6±0,14	4,4±0,54

Увеличение количества корней

Настоящее изобретение представляет также результаты исследований по индукции образованию корней у микробегов в культуре *in vitro*. Оптимальным является питательная среда $\frac{1}{2}QL$ с добавлением 30 г/л сахара, 5 г/л агара и ИМК 1,5 мг/л (таблица

2). На этом варианте наблюдается положительная динамика роста корней в течение всего периода культивирования. Таким образом, достаточное количество корней увеличит процент приживаемости микропобегов при адаптации в условиях *ex vitro*.

Как показали результаты, на I варианте питательной среды количество корней, в среднем, составило 11,6 шт. на микропобег на 50-ый день культивирования. Длина корней составила 2,88 см., что значительно больше остальных 2 вариантов (рисунок 2).

Таблица 2 – Оптимизация питательной среды для увеличения количества корней яблони Недзвецкого в культуре *in vitro*

Вариант пит.среды	Количество образовавшихся корней у микропобегов и их длина					
	1-ый день		25-ый день		50-ый день	
	Корни, шт	Длина, см	Корни, шт	Длина, см	Корни, шт	Длина, см
I - ½QL с ИМК 1,5 мг/л	-	-	7,2±0,86	0,66±0,04	11,6±0,84	2,88±0,92
II - ½QL с ИМК 1,0 мг/л	-	-	-	-	3,0±0,36	0,42±0,01
III - ½QL без гормонов	-	-	-	-	2,0±0,70	0,24±0,01

Адаптация растений-клонов яблони Недзвецкого в почвогрунте

Одним из важных этапов клонального микроразмножения является адаптация к нестерильным условиям. Трудности адаптации связаны с нарушением физиологических процессов в связи с переносом растений в новые условия (влажность, температура, пересадка в почвенный субстрат).

В результате опыта установлено, что для адаптации микропобегов к нестерильным условиям предпочтительным вариантом является высадка укорененных микропобегов в нейтрализованный торф и полив калием азотнокислым (900 мг/л), где процент приживаемости в оранжереи составил 85,4% (таблица 3, рисунок 3). После этого адаптированные растения-клоны переводят в условия пленочной теплицы при естественном освещении (рисунок 4).

Таблица 3 – Адаптация микрорастений яблони Недзвецкого в почвогрунте

Вариант	Грунт	Полив	Кол-во высаженных растений, шт	Кол-во адаптирова нных растений, шт	Процент приживаемо сти в оранжереи
I	Торф	KNO ₃ (900 мг/л)	1200	1025	85,4
II	Торф	Вода	375	105	28,0
III	Торф	KNO ₃ (900 мг/л) + вода, в соотношении 1:1	565	267	47,2

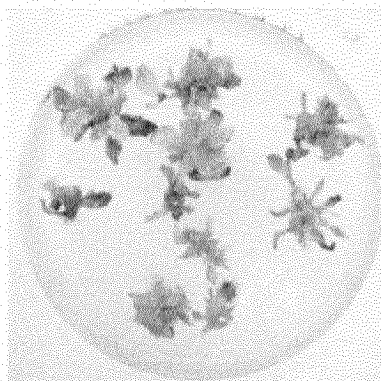
Формула изобретения

Способ микроклонального размножения растений, включающий введение в культуру *in vitro* пазушных почек, мультипликацию и укоренение микропобегов, адаптацию в почвогрунте растений-клонов, отличающийся тем, что для культивирования апикальных меристем яблони Недзвецкого используют среду *Quoirin&Lepoivre* с добавлением 30 г/л сахара, 7 г/л агара, 1,0 мг/л бензиламинопурина и 3,0 мг/л кинетина, для мультипликаций микропобегов используют среду *Quoirin&Lepoivre* с добавлением 30 г/л сахара, 7 г/л агара, 0,5 мг/л бензиламинопурина, 1,0 мг/л гибберелловой кислоты и 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты, для укоренения применяют среду $\frac{1}{2}$ QL с добавлением 30 г/л сахара, 5 г/л агара, 1,5 мг/л индолилмасляной кислоты, для адаптации укорененные микропобеги, высаживают в нейтрализованный торф и поливают калием азотнокислым (900 мг/л).

Способ микрклонального размножения яблони Недзвецкого (*Malus Niedzwetzkyana*)



а – Вариант I (*QL* с БАП 0,5 мг/л, ГК 1,0 мг/л, ИМК 0,01 мг/л)

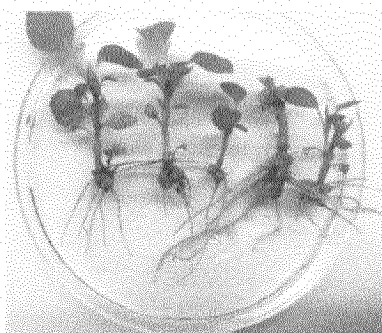


б – Вариант II (*QL* с БАП 1,0 мг/л, ИМК 0,2 мг/л)



в – Вариант III (*QL* с БАП 1,0 мг/л, кинетин 3,0 мг/л)

Рисунок 1 – Микропобеги яблони Недзвецкого на 50-ый день культивирования на 3-х вариантах питательных сред для мультипликации микропобегов



а – Вариант I ($\frac{1}{2}QL$ с ИМК 1,5 мг/л)



б – Вариант II ($\frac{1}{2}QL$ с ИМК 1,0 мг/л)



в – Вариант III ($\frac{1}{2}QL$ без добавления гормонов)

Рисунок 2 - Микропобеги яблони Недзвецкого на 50-ый день культивирования на 3-х вариантах питательных сред для индукции ризогенеза



Рисунок 3 – Адаптация микрорастений в почвогрунте оранжерии



Рисунок 4 – Растущие в теплице сеянцы яблони Недзвецкого

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202000014

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A01H 1/04 (2006.01)

A01H 6/74 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A01H 1/04; A01H 6/74

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины) ЕАПАТИС, ESPACENET, GOOGLE; микроклонирование, микроклональное размножение, среда Кворин-Лепорье (Лепуавра), мультипликация, ризогенез, яблоня, microclonal propagation, mericlone, QL, Gourine-Lepouvre, apple tree

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	МАТУШКИНА О.В. и др. Клональное микроразмножение яблони и груши в системе производства высококачественного посадочного материала. АГРО XXI 2009 №4-6. УДК 634.11.634.13:581.143.6 найдено в < https://www.agroxxi.ru/journal/20090406/20090406017.pdf > весь документ.	1
Y	НЕКРАСОВ Э.В. Размножение <i>Armeniaca Mandshurica</i> (Rosaceae) в культуре in vitro. Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН, 2017, Вып. 28, с. 81-88. УДК 581.144:581.6 <doi:10.17581/bbgi1814> весь документ.	1
Y	RU 2486237 C1 (ГНУ ВНИИС ИМ. И.В.МИЧУРИНА РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ), 2013.06.27, реферат, описание.	1
A	KZ 4252 U (РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ «ЖЕТЫСУСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ИЛЬЯСА ЖАНСУГУРОВА» МИНИСТЕРСТВА ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН), 2019.08.23, реферат.	1
A	KZ 9205 A (КАЗАХСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПЛОДОВОДСТВА И ВИНОГРАДАРСТВА), 2000.07.14, реферат.	1
A	KZ 27409 A4 (ТОВАРИЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ «КАЗАХСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЗАЩИТЫ И КАРАНТИНА РАСТЕНИЙ», ТОВАРИЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ «КАЗАХСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПЛОДОВОДСТВА И ВИНОГРАДАРСТВА») 2013.20.15, реферат.	1
A	US 20180206427 A1 (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC., CLEMSON UNIVERSITY), 2018.07.26, реферат.	1
A	BOUDABOUS M. et al., Micropropagation of apple (<i>Malus domestica</i> L. cultivar Douce de Djerba) through in vitro culture of axillary buds, Acta Bot. Gallica, 2010, v.157. No 3, p.513-524, <doi:10.1080/12538078.2010.10516227> реферат	1
A	J. A. T. da SILVA et al. In vitro tissue culture of apple and other <i>Malus</i> species: recent advances and applications, Planta, 2019, v.249, p.975-1006, найдено в < https://doi.org/10.1007/s00425-019-03100-x > весь документ.	1

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

«P» - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

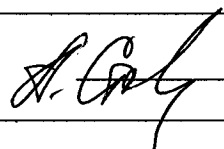
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 24/07/2020

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальник Управления экспертизы

Начальник отдела Химии и медицины



А.В.Чебан