

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202100036 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.31

(51) Int. Cl. A01H 4/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.06.16

(54) СПОСОБ УКОРЕНЕНИЯ ГОРТЕНЗИИ EX VITRO

(31) 2020114240

(32) 2020.04.21

(33) RU

(71) Заявитель:
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ
"МИКРОКЛОН" (RU)

(72) Изобретатель:
Шестибратов Константин
Александрович, Аркаев Михаил
Сергеевич, Дремова Мария
Александровна (RU)

(57) Изобретение относится к сельскому хозяйству, к области биотехнологии растений. Применение изобретения может осуществляться для получения оздоровленного и безвирусного посадочного материала методом клонального микроразмножения растений in vitro. Предложенный способ заключается в применении нового подхода в укоренении и акклиматизации микрорастений in vitro, что позволяет существенно ускорить получение посадочного материала при снижении себестоимости товарной продукции.

202100036

A2

A2

202100036

СПОСОБ УКОРЕНЕНИЯ ГОРТЕНЗИИ *EX VITRO*.

Изобретение относится к области биотехнологии растений, представляет собой способ повышения эффективности укоренения микропобегов гортензии в условиях *ex vitro* и может применяться для получения оздоровленного посадочного материала гортензий, в том числе и безвирусного, с использованием технологии клонального микроразмножения растений *in vitro*.

Гортензия является широко распространенной многолетней декоративной культурой, представлена жизненными формами в виде небольших деревьев, лиан, но наиболее распространены кустарники высотой от 1 до 3 метров. Благодаря способности накапливать алюминий, выделяющийся из кислых почв, и образовывать с ним соединения, окраска цветков может варьироваться от ярко-фиолетового на щелочных почвах до синего на кислотных. Культивирование гортензий в условиях средней полосы России рекомендуется только с использованием зимнего укрытия, которое в южных районах можно не применять. Чаще всего гортензии размножают вегетативным способом, так как он позволяет сохранить сортовые особенности материнского растения. Зеленые побеги молодого растения укореняются достаточно быстро и легко, но совместно с процессами старения резко снижается эффективность зеленого черенкования. Традиционные методы вегетативного размножения (черенкование, деление куста, размножение отводками) не позволяют получить оздоровленный и безвирусный посадочный материал. Для освобождения растений от приобретенных патогенов необходимо использовать метод клонального микроразмножения растений, который также позволяет получать большое количество растений в течение всего календарного года в короткие сроки.

Известен способ клонального микроразмножения гортензий (B. Ruffoni, E. Sacco, M. Savonova *In vitro* propagation of *Hydrangea* spp.: *Methods Mol Biol.*, volume 994, 2013, 11013:231-44). Однако недостатком такого способа является высокая себестоимость полученного посадочного материала, а также удлинение сроков его получения. Так как в данном способе предлагается укоренение микропобегов гортензии в условиях *in vitro* в течение 20-35 дней с последующей акклиматизацией к нестерильным условиям. Для ускорения процесса и снижения себестоимости растений, в данном случае целесообразно использовать метод укоренения *ex vitro*, который позволяет совместить акклиматизацию и процессы ризогенеза.

Существует метод укоренения и акклиматизации растений, полученных с помощью технологии клонального микроразмножения, с применением гидропоники (D. Clapa, A. Firu, N. Joshee. *An Efficient Ex Vitro Rooting and Acclimatization Method for Horticultural Plants Using Float Hydroculture.*: *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science*, 2013, 48(9):1159-1167). Недостатком такого способа является собственно применение гидропонной технологии на этапе акклиматизации микрорастений *in vitro*. Данная технология требует существенных материальных затрат на своё создание, а также узкую направленность. Кроме того, после акклиматизации и укоренения микрорастений в условиях постоянного затопления, им потребуется адаптация к обычным условиям выращивания растений с закрытой корневой системой. Что удлинит срок

получения посадочного материала, а также снизит выход товарной продукции, так как существует риск получения растений, не отвечающих требуемым параметрам.

Целью изобретения является укоренение микропобегов гортензии *ex vitro*. Для этого были поставлены следующие задачи: 1) изменение морфологического состояния микрорастений гортензии на стадии мультипликации; 2) изменение биологического состояния микрорастений гортензии на стадии мультипликации; 3) использование на стадии укоренения *ex vitro* регуляторов роста; 4) изменение кислотности субстрата на стадии укоренения *ex vitro* совместно с внесением минеральных питательных элементов.

Решение поставленных задач достигается благодаря следующим подходам: 1) использование в качестве железирующих агентов агар-агара 5 г/л и геллановой камеди 0,3 г/л, что приводит к удлинению микропобегов гортензии на стадии мультипликации за счет увеличения свободной влаги в питательной среде; 2) депонирование культуральных сосудов с микрорастениями в условиях пониженной температуры в течение 5-6 недель для прохождения периода биологического покоя с целью уменьшения стресса на этапе укоренения *ex vitro*; 3) депонирование микропобегов гортензий в течение 4 часов в водном растворе гиббереллиновой кислоты (ГК₃) с концентрацией 10 мг/л с целью удлинения получаемых акклиматизированных растений; 4) полив растений раствором ортофосфорной кислоты (0,1 %) и минерального удобрения Florovit 0,1 % для гортензий, рододендронов и вересковых культур.

Предлагаемый способ реализуется следующим образом.

Микропобеги гортензий высаживают на этап размножения в культуральные сосуды с питательной средой с использованием агар-агара в концентрации 5 г/л и геллановой камеди 0,3 г/л. Через 4 недели культуральные сосуды переносят из светокультуральной комнаты в термощкаф с постоянной температурой +8 °С, освещением 3000-3500 Лк и фотопериодом 14/10. Далее через 35-40 дней микрорастения нарезают на микрочеренки длиной 2,5-4 см с 3-5 междоузлиями, удаляют два нижних листа и замачивают в растворе ГК₃ в концентрации 10 мг/л в течение 4 часов, после чего передают культуральные сосуды с микрорастениями в теплицу для укоренения *ex vitro* и прохождения акклиматизации к нестерильным условиям закрытого грунта. Через 4 часа с момента добавления раствора гиббереллиновой кислоты в теплице достают микрочеренки гортензии и высаживают в рассадные кассеты, заполненные увлажненным субстратом. В качестве субстрата используют верховой торф фракции 0-5 мм и перлит фракции 1-5 мм, в соотношении 3:1. После того как перлит и торф смешали, полученным субстратом заполняют рассадные кассеты и тщательно проливают 0,1 % раствором ортофосфорной кислоты с минеральным удобрением Florovit в концентрации 0,1 %. Рассадные кассеты с микрочеренками культивируют в течение 4 недель при температуре +20 - +25 °С, освещенности 5000 - 12000 Лк и фотопериоде 16/8 часов, с постепенным снижением относительной влажности воздуха с 95-100 % до 60-65 % в течение всего периода культивации. В таблице 1 приведено сравнение предлагаемого способа укоренения микропобегов гортензии с классической технологией клонального микроразмножения растений *in vitro*.

Таблица 1. Сравнение предлагаемого способа укоренения микропобегов гортензии с классической технологией клонального микроразмножения растений *in vitro*.

Сорт/метод	Количество полученных микропобегов, шт.	Приживаемость, %	Товарных, шт	Товарность, %
Bodensee/изобретение	164	97,6	161	98,2
Bodensee /классическая технология	134	79,8	123	91,8
Candlelight /изобретение	160	95,2	153	95,6
Candlelight /классическая технология	129	76,8	123	95,3
Forever & Ever Red/изобретение	163	97,0	158	96,9
Forever & Ever Red/классическая технология	114	67,9	103	90,4
Grandiflora /изобретение	158	94,0	150	94,9
Grandiflora /классическая технология	147	87,5	132	89,8

Приживаемость оценивали как процентное отношение полученных растений к высаженным. Товарность оценивали как процентное отношение товарных растений в партии к полученным. В качестве товарных считали растения высотой не менее 5 см, с присутствием хлороза листьев не более 10% от общей площади листовой поверхности, без наличия некрозов и морфологических изменений.

Примеры в детальном описании приводятся для гортензии сорта Grandiflora.

Пример 1. Сравнение желирующего агента на стадии размножения *in vitro*.

Микропобеги гортензии высаживали на стадии мультипликации на питательную среду по прописи Кворина-Лепуавра (QL) (Quoirin M., Lepoivre P. 1977. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. Acta Hort. 78:437-442), дополненной 6-БАП 0,7 мг/л и НУК 0,1 мг/л с четырьмя вариантами концентраций и смеси желирующих агентов: агар-агар 8 г/л (Вариант 1. Контроль), геллановая камель 2 г/л (Вариант 2), агар-агар 4 г/л и геллановая камель 0,5 г/л (Вариант 3), агар-агар 5 г/л и геллановая камель 0,3 г/л (вариант 4). Через 4 недели оценивали коэффициент мультипликации или размножения и длину полученных микропобегов (таб. 2).

Таблица 2. Коэффициент размножения и длина микропобегов гортензии сорта Grandiflora в зависимости от использованного желирующего агента.

Желирующий агент	Коэффициент мультипликации	Длина микропобегов, см
Вариант 1. Контроль	3,1	2,8±0,4
Вариант 2	4,3	3,2±0,7
Вариант 3	3,9	3,5±0,2
Вариант 4	6,7	5,0±0,5

Пример 2. Сравнение приживаемости и товарности растений в различном биологическом состоянии.

Для сравнения использовали микропобеги растений прошедшие этап депонирования при пониженной положительной температуре и нет, культивируемые на

питательной среде с агар-агаром в концентрации 5 г/л и геллановой камедью 0,3 г/л (таб. 3).

Таблица 3. Сравнение приживаемости и товарности растений прошедших период биологического покоя и нет.

Вариант	Приживаемость, %	Товарность, %
Прошедшие период биологического покоя	94,0	94,9
Не прошедшие период биологического покоя	64,5	79,8

Также при последующем культивировании товарных растений выявилось, что растения прошедшие депонирование в термошкафу при температуре +8 °C быстрее набирали зелёную массу, в то время как растения в другом варианте часто останавливали свой рост. Такое явление возможно связано с сильным водным стрессом, который испытывает растение, попадая в нестерильные условия закрытого грунта.

Пример 3. Сравнение воздействия регуляторов роста на выход товарной продукции.

В данном случае сравнивали воздействие раствора гиббереллиновой кислоты на микрочеренки гортензии, прошедших период биологического покоя и культивированных на выбранной питательной среде (таб. 4). В качестве контроля использовали микрочеренки без обработки ГК₃.

Таблица 4. Воздействие ГК₃ на выход товарной продукции.

Концентрация ГК ₃ , мг/л	Получено товарных растений, шт.	Товарность, %
0	112	59,7
1	129	87,6
5	134	91,3
10	150	94,9
15	143	86,3
20	120	81,7

Пример 4. Влияние наличия минеральных удобрений и кислотности почвы на приживаемость.

В качестве контроля использовали дистиллированную воду. На данном этапе использовали микрочеренки с микрорастений, прошедших замачивание в растворе ГК₃ и выдержанные в термошкафу в течение 5-6 недель. Необходимо было оценить влияние кислотности почвы и минеральных удобрений на приживаемость и выход товарной продукции растений гортензии (таб. 5).

Таблица 5. Влияние минеральных удобрений и кислотности почвы на растения гортензии.

Концентрация удобрения Florovit, %	Концентрация ортофосфорной кислоты, %	Приживаемость, %	Товарность, %
0	0	67,5	59,8
0,1	0,1	94	94,9
0,2	0,1	85,8	90,1
0,3	0,1	84,6	90,9
0,1	0,2	84,4	89,7
0,2	0,2	88,4	87,5
0,3	0,2	86,3	91,9
0,1	0,3	88,3	87,9
0,2	0,3	88,6	90,1
0,3	0,3	85,9	90

Техническим результатом описанного способа является достижение более высокой эффективности при получении посадочного материала гортензии, чем при использовании классической технологии клонального микроразмножения растений *in vitro*. Изобретение может быть использовано для снижения себестоимости и ускорения получения оздоровленного посадочного материала гортензий.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ.

СПОСОБ УКОРЕНЕНИЯ ГОРТЕНЗИИ *EX VITRO*.

1. Способ укоренения микрочеренков гортензии в условиях *ex vitro*, включающий в себя культивирование микрорастений в условиях *in vitro*, отличающийся тем, что на этапе размножения используется питательная среда со смесью желирующих агентов (агар-агар в концентрации 5 г/л и геллановая камедь в концентрации 0,3 г/л), микрорастения депонируют в культуральных сосудах в условиях пониженных положительных температур, микрочеренки проходят обработку раствором гиббереллиновой кислоты в концентрации 10 мг/л в течение 4 часов, акклиматизация проходит одновременно с укоренением микрочеренков *ex vitro* с изменением кислотности субстрата благодаря применению 0.1 % раствора ортофосфорной кислоты с внесением минерального удобрения Florigovit в концентрации 1 г/л.