



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения**

К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

1

(21) 2101504

(22) 08.02.2021

(46) Бюл. 178, 2021

(71)(73) Таджикский национальный университет (TJ)

(72) Астанакулова Г.М. (TJ); Сайдализода С.Ф. (TJ);

Киёмзода З.С. (TJ); Назарзода Н.Н. (TJ);

Алиев К. (TJ)

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗВИРУСНОГО
КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO***

(56) 1. Матвеева Е.М. Способ микроклонального размножения картофеля. Патент RU 2487532 (13) C1, МПК A01H 4/00, AO1G7/100. 20.07.2013

2. Светлана И.А. Способ микроклонального размножения картофеля *in vitro* сорта картофеля Алена. Патент RU 2637361 C1, МПК AO1 114/00 04.12.2017

(57) Изобретение относится к биотехнологии растений получению оздоровленного безвирусного и

2

продуктивного исходного материала, используемого для производства семенного картофеля.

Техническое решение представляет собой способ оздоровления картофеля и его микроклонального размножения *in vitro*, при котором из этиолированных ростков вычленяется апикальная часть (1,0-1,5см), стерилизуют в 0,15% меркурий хлориде в течение 7 минут с последующей промывкой 70% этиловым спиртом и трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой, культивируют верхушки микроэсплантов апикальной части этиолированных ростков картофеля (0,3-0,5мм) в среде Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением фолиевой кислоты (50мг/л) и антивирусного препарата 1,β-d-рибофуранозил-1,2,4,- триазол-3-карбоксамид (рибаверин) (8мг/л), и выращивают в течение 20-25 дней при фотопериоде 16/8г, с последующей пересадкой в свежую питательную среду МС. Через 2 месяца формируются растения-регенеранты, пригодные для микрозамножения.

Изобретение относится к биотехнологии растений, в частности получения оздоровленного безвирусного и продуктивного исходного материала, используемого для производства семенного картофеля.

Картофель является важнейшей пищевой и технической культурой в Таджикистане и дает в 3 раза больше белка, чем пшеница, и в 1-1,5 раза больше, чем кукуруза. Белок картофеля содержит ряд аминокислот, которые по пищевой ценности превосходят все растительные белки. Но в последние годы, в результате глобального изменения климата, происходит тенденция падения урожайности и его качества по причине засоления пахотной почвы и усиление внешних вредоносных вирусов, а также других бактериальных и грибных болезней. Вместе с тем население в мире достигнет более 10-миллиарда, к 2030 г что требует изыскание новых путей решения продовольственной безопасности. Производство продукции в первую очередь зависит от обеспечения сельскохозяйственных производителей собственным качественным семенным материалом. В последние годы при производстве семенного материала широко используется получение оздоровленного исходного материала с применением приемов биотехнологии. Это подчеркивает актуальность решения пищевой безопасности государства посредством разработки новых способов оздоровления картофеля от вирусов и других патогенов, поскольку они снижают урожайность картофеля на 40-60%. Биотехнологический подход позволяет в кратчайшие сроки обнаружить формы растений, обладающие стресс-толерантностью и продуктивностью, что создает базу для производства оздоровленного семенного картофеля и интенсифицирует товарное производство с меньшими затратами.

Отечественный сорт картофеля «Таджикистан» высокоурожайный, красноплодный, имеет отличные вкусовые характеристики, отличается высокой товарностью, способен давать стабильно-высокий урожай разных в экологических картофелеводческих (горных, предгорных) зонах. Сорт отличается устойчивостью к высокой температуре и засолению почвы, аккумулирует в клубнях двухвалентного FeCl_2 , что полезно для людей с низким содержанием гемоглобина в крови. Сорт картофеля «Таджикистан» принят как стандартный сорт, решением Министерства сельского хозяйства РТ что служило в свою очередь объектом наших исследований для решений продовольственной безопасности.

Известен способ микроразмножения картофеля, включающий культивирование оздоровленных растений *in vitro* путем микроочеренкования на питательной среде Мурасиге-Скуга (МС), содержащей макро- и микроэлементы, витамины по Уайту, сахарозу, глицерин, НУК, агар; получение меристемных растений и растений-регенерантов, которые подвергаются ежесуточному воздействию температурой $+4+5^\circ\text{C}$ в течение 2 ч в течение 6-7 дней [1].

Наиболее близким по сущности к заявляемому изобретению является способ микрочлониального размножения картофеля *in vitro* сорта картофеля «Алена», включающий стерилизацию, культивирование растений картофеля *in vitro*, путем микроочеренкования на среде Мурасиге-Скуга по прописи, витамины по Уайту, получения микроклубней *in vitro*, оздоровления исходных растений картофеля от вирусов стерилизацией в 0,3%-ном растворе диацита в течение 3-5 минут, промывкой стерильной водой [2].

Недостатком данного способа размножения картофеля является низкая скорость роста растений-регенерантов *in vitro*, низкий выход микроклубней, высокий уровень содержания вирусов в растениях-регенерантах, и высокий процент мутантных регенерантов, что отрицательно сказывается на выживаемости растений в последующих поколениях и нестабильности получения урожая, что в свою очередь снижает себестоимость растений-регенерантов.

Целью изобретения является получение безвирусных растений картофеля *in vitro* с использованием росто-регулируемого препарата фолевой кислоты и противовирусного препарата 1,β-d-рибофуранзил-1,2,4-тиазол-3-карбоксамид (рибаверин) из этиолированных ростков картофеля.

Сущность разработки способа оздоровления картофеля и его микрочлониального размножения *in vitro*, при котором из этиолированных ростков вычленивается апикальная часть (0,3-0,5 мм), стерилизуется в 0,15% хлориде ртути 7 минут, промывается 70% этиловым спиртом, и далее промывается трехкратно стерильной дистиллированной водой. Далее верхушки ростков (0,2-0,5 мм) культивируют в среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением фолевой кислоты (5 мг/л) и противовирусного препарата рибаверина-1,β-d-рибофуранзил-1,2,4-тиазол-3-карбоксамид (8 мг/л), полученном оздоровленном растении, и последующим микроочеренкованием в стеклянной пробирке (2х28 см) и выращивание в условиях фитофона при 16/8 ч фотопериоде (см. табл. 1). Причем противовирусного препарата рибаверина стерилизуют через антибактериальный фильтр и добавляют после автоклавирования питательной среды МС

Технологическим результатом заявляемого изобретения является получение оздоровленного (безвирусного) сорта картофеля и рекомендуется также для перспективных существующих в мире сортов картофеля, повышение коэффициента размножения регенерантов, обеспечение технической простотой и снижение себестоимости. Конечным результатом изобретения является обеспечение импортозамещения зарубежных сортов и налаживания семеноводства картофеля на безвирусной основе. Указанный технический результат микроразмножения *in vitro* достигается следующим образом:

Таблица 1.

Состав питательной среды (МС)			
Состав питательной среды, мг/л	Прототип	Аналог	Предлагаемое решение
Аммоний азотнокислый	16500	16500	16500
Калий азотнокислый	19000	19000	19000
Кальций хлористый двухводный	4400	4400	4400
Магний сернокислый семиводный	3700	3700	3700
Калий фосфорнокислый однозамещенный	1700	1700	1700
Борная кислота	6,2	6,2	5,0
Марганец сернокислый четырехводный	27,7	27,7	27,7
Цинк сернокислый четырехводный	8,6	8,6	8,6
Калий йодистый	0,83	0,83	0,83
Натрий молибденовокислый двухводный	0,25	0,25	0,25
Медь сернокислая пятиводная	0,025	0,025	0,025
Кобальт хлористый шестиводный	0,025	0,025	0,025
Трилон Б (Fe-хелат)	373	374-390	570
Железо сернокислое семиводное	27,8	27,8	27,8
Глицин	3	-	-
Индолилуксусная кислота (ИУК)	-	0,5-1,5	1,0
Кинетин	-	1-2	-
Тиамин	0,5	1,0-1,2	5,0
Аденин	-	1,0-1,5	-
Пиридоксин	0,5	0,5	5,0
Активированный уголь	1000-2000	-	-
Аскорбиновая кислота	1-2	2-4	10,0
Сахароза	20000-8000	81000-85000	2000-5000
Агар-агар	7000	7000	6000
Рибаверин (1, β -d-рибофуранзил-1,2,4-триазол-3-карбоксимид	-	-	8,0
Фолиевая кислота	-	-	500

Таблица 2.

Эффект режима стерилизации ростков картофеля				
№	Способ стерилизации	Количество эксплантов, шт	Количество чистых от инфекции эксплантов, шт	% живых стерильных эксплантов
1	Ртуть хлорид: 4 мин (0,15%)	28	5	18
	7 мин	28	25	89
	10 мин	28	2	7
2	70% этиловый спирт+20% перекись водорода: 4 мин	28	16	58
	7 мин	28	5	18
	10мин	28	0	0

При таких способах стерилизации процент живых стерильных эксплантов в условиях культивирования *in vitro* в среде Мурасиге-Скуга (МС) достигает при обработке смесью 76% этилового спирта и 20% перекиси водорода до-58%. 0,15% ртути хлоридом 89%, что является важным для достижения поставленной цели (таблица 2). При более низких концентрациях стерилиантов очень высок процент заражения питательных сред микробными и грибными патогенами. При более длительном воздействии стерилианты оказывают губительное действие на рост эксплантов, причем независимо от сорта и степени оздоровленности клубней картофеля. При планировании работы также необходимо учитывать особенности генотипа и степень их оздоровленности. Как видно из данных табл.3, уровень оздоровленности клубней резко увеличивает процент живых экс-

плантов при стерилизации различными стерилиантами. Кроме того, при длительном клонировании полученные ростковые регенеранты *in vitro* способствуют сохранению генотипа по сравнению с меристемными регенерантами, где кратность клонирования ограничена 4 или 5 черенкованиями. Для росткового клонирования *in vitro* рекомендуется использовать только оздоровленные клубни картофеля. Для данной цели впервые нами использован противовирусный препарат рибаверин, который способствует полному освобождению растений картофеля от вирусов и фолиевую кислоту в качестве стимулятора роста. Содержание вирусов в нашем способе составляет 0.02-0.08% (табл.3).

Таблица 3.

Количество живых эксплантов в зависимости от оздоровленности генотипа картофеля с добавлением рибаверина (8мг/л)

Генотип	Количество эксплантов, шт	Количество живых эксплантов, шт	% живых стерильных эксплантов	Содержание вируса, %
Жуковский ранний (оздоровленный) + рибаверин	28	20	71	0,03
Жуковский ранний без рибаверина	33	29	87	9,4
Пикассо (оздоровленный)	28	23	82	11,8
Пикассо + рибаверин	28	26	93	0,08
Клон 73 + рибаверин (оздоровленный)	28	18	64	0,02
Клон 73 без рибаверина	28	25	89	7,4
Пикассо (массовая репродукция)	28	9	32	17.4
Жуковский (массовая репродукция)	28	8	28	76,6
Таджикистан+рибаверин	28	26	93	0.02

При использовании ростков от клубней массовой репродукции процент живых эксплантов в два раза ниже, чем при использовании ростков от клубней оздоровленного материала. Следует отметить, что ростки от клубней массовой репродукции не гарантируют освобождения растений-регенерантов от вирусных инфекций. Разработанный нами способ полностью освобождает растения от вирусов и других инфекций, а также дает возможность получения в короткий срок больших количеств растений-регенерантов, что важно для производства элитного семенного картофеля.

Настоящее изобретение обладает целым рядом преимуществ перед существующим. Сочетание процесса предварительной обработки экспланта раствором хлорида ртути и их регенерация с добавлением фолиевой кислоты в культуру явную среду позволяет более эффективно выявить нежизнеспособные экспланты, получить более перспективные и пригодные для получения микро-растения, в дальнейшем микро-растение будут использованы для

обработки раствором противовирусного препарата рибаверина, гарантирующим освобождение материала от вирусов и других инфекций. Данный способ отличается от существующих:

- а) высокой приживаемостью в условиях *in vitro*;
- б) сокращение сроков получения растений-регенерантов *in vitro* в несколько раз
- в) низкий уровень мутантных растений-регенерантов по сравнению с меристемной культурой
- г) более эффективное освобождение от вирусов (до 100%).

Пример 1.

Использовали культуры апикальных меристем в среде Мурасиге –Скуга (МС) pH 6,7-6,9 с добавлением фитогормонов (кинетин, 6-БАП, НУК, ИМК) и большой концентрации сахарозы (7000-8000г/л.) В этих условиях из апикальных меристем получаем регенеранты в течение 6-9 месяцев. И затем их амплифицировали в нужном количестве микро-

соба заключается в том, что он не учитывает эффект сахарозы в ходе регенерации апикальных меристем, а высокая концентрация сахарозы и фитогормонов вызывают появление многочисленных мутантных регенератов, из которых трудно отобрать регенераты характерные материнским растениям. Для отбора оздоровленных и нормальных регенератов требуется время и дополнительные трудовые затраты. По этой причине данный пример имеет низкую эффективность и характерен только для отдельных сортов картофеля.

Пример 2.

Использовали среду МС с добавлением 2000-3000г/л сахарозы для культивирования апикальных меристем в условиях *in vitro*. В этих условиях не корректировали pH культуральной среды. При использовании в среде МС макроэлементов, таких как KH_2PO_4 или NaH_2PO_4 , значение pH сильно падает до 3,5-4,0. В этих условиях ризогенез и органогенез регенератов из апикальной меристемы сильно замедляется и формируются многочисленные бесхлорофильные регенераты, что также затрудняет отбор растений, характерных материнским.

Полученные этим методом регенераты теряют формирование микроклубней *in vitro*, которое является основой семеноводства картофеля, свободного от вирусов и инфекций и также является малопродуктивным.

Предлагаемое нами решение получения свободных от вирусов и инфекций регенератов из апикальной части этиолированных ростков размером 0,3-0,5мм устраняет недостатки вышеупомянутых методов и является универсальным для всех без исключения сортов картофеля, что способствует получению оздоровленных регенератов-растений и способствует ускоренному получению высококачественного семенного картофеля.

Пример 3.

Использование для получения растений-регенерантов картофеля в системе *in vitro* столонов картофеля. В этих целях применяли среду Мурасиге – Скута (МС) с добавлением в среду культивирования *in vitro* сахарозы 2000г/л, ИМК и рибаверина в концентрации 20мг/л. Недостаток этого способа заключается в том, что для этой цели обязательной процедурой является использование столонов из регенератов, свободных от вирусов и индукции в си-

стеме *in vitro*, что требует дополнительного дорогостоящего оборудования. Более того, регенерация растений из столонов в культуре занимает более 3-5 месяцев, что также способствует образованию мутантных растений, а это негативно сказывается на процесс амплификации регенерантов.

Разработанное нами решение является более простым и дешевым с большим экономическим эффектом.

Ни в одной из известных публикаций, посвященных данной области биотехнологии, не описано предлагаемое в изобретении решение. В сельском хозяйстве Таджикистана существует потребность в разработке упрощенного, экономичного, экологически безопасного и более эффективного способа получения оздоровленного семенного элитного картофеля. А потребность в семенном оздоровленном картофеле в мире из года в год увеличивается. Данный способ является востребованным в системе картофелеводства Таджикистана, так как отсутствует система получения элитного материала. Таким образом предлагаемый нами метод является новым и эффективным способом получения безвирусного картофеля *in vitro*.

Изобретение позволяет получить в короткие сроки, оздоровленные сорта картофеля, повысить коэффициент размножения растений, ускорить рост эксплантов, снизить содержание вирусов до минимума (0,02-0,03%), обеспечить техническую простоту культивирования и снизить себестоимость микро-растений (Фиг 1-2, табл. 1-3).

В таблице 4 приводятся результаты выхода оздоровленных регенерантов из культуры верхушки побегов (0,3-0,5мм) заявляемым способом, а также для сравнения по способам, приведенным в аналогах и прототипе (табл.3).

Таким образом, предлагаемый способ позволяет получать в большом количестве микро-растения *in vitro*, полностью свободные от вирусов, что делает возможным его применение в картофелеводстве для всех сортов для интенсификации производства семенного и пищевого картофеля, что в будущем будет базовой отраслью для обеспечения пищевой безопасности населения Таджикистана и мира в целом, с низкой себестоимостью (5-7 сомони шт/растений) по сравнению с существующим меристемным (18-25 сомони) (таблица 4).

Таблица 4.

Сравнительная характеристика способов оздоровления картофеля *in vitro*

Эксплант	Длительность регенерации,	Выход оздоровленного материала с одного экспланта	% вирусов в регенерантах	Стоимость, сомони
Апикальная меристема	6-9 месяц	1400-3500шт	3-5	18-25
Ростки	1-2 месяц	13-17шт	100	1-2
Предлагаемый способ	2-2,5 месяц	3800-6000шт	0,02-0,03	5-8

В результате исследований нами был усовершенствован протокол микроразмножения картофеля, включающий следующие этапы:

а) Из этиолированных ростков клубней картофеля получили первичные экспланты. Для изолирования первичных эксплантов оптимальным является использование 10-15 дневных ростков клубней картофеля, выращенных в темноте при температуре 20-22°C. Этиолированные ростки обрабатывали 0.15% раствором меркурий хлорида (оптимальным является 7 мин), в качестве первичного экспланта использовали апикальную часть ростков размером 0.3-0.5мм и культивировали по прописи МС и с добавлением антивирусного препарата рибаверина (8мг\л) и в качестве ускорителя ростовых процессов использовали фолиевую кислоту (50мг\л).

б) Инструкцию побегообразования из первичного экспланта ростков осуществляли на культурной среде МС с микро-и макроэлементами, витаминами, сахарозой и агаром по прописи МС, но без добавления кинетина и 6-БАП-а (бензиламинопурина). Применение данного протокола обеспечивает регенерацию от 73 до 89%

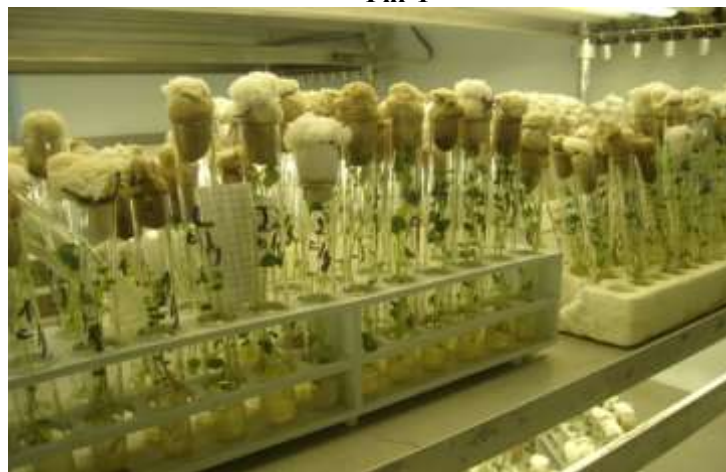
в) Для максимального освобождения от вирусов и других инфекций следует культивировать на среде МС по прописи и с добавлением ИМК (2мг\л); рибаверин (8мг\л); фолиевая кислота (50мг\л). Такой протокол обеспечивает получение регенерантов, свободных от вирусов (до 98.99%), а также получения от 3800 до 6000 микрорастений с одного экспланта за 8 циклов культивирования в системе *in vitro*.

Использование заявленного способа микроразмножения картофеля *in vitro* позволяет получить свободные от вирусов и патогенов растения-регенеранты отечественного сорта картофеля «Таджикистан» с высоким потенциалом и выход растений-регенерантов с низкой себестоимостью. Предлагаемый способ очень прост в использовании и не требует специального оборудования. Предложенное техническое решение экологически безопасен и может быть использован в картофелеводстве и является универсальным для всех сортов. Имеющиеся в литературе методы получения безвирусных побегов растений с использованием рибаверина сообщается также для плодовых культур (яблонь), а для картофеля - 2-тиоурацил (6-7) который является мутагеном

Способ получения безвирусного картофеля *in vitro*



Фиг 1



Фиг 2

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения безвирусного картофеля *in vitro*, включающий стерилизацию питательной среды, культивирование микроэкспланта из апикального этиолированного почки клубней картофеля *in vitro* на питательную среду, содержащую макро- и микро-элементы по прописи Мурасиге-Скуга, Fe-хелат, агар-агар, витамины по Уайту, сахарозу и аскорбиновую кислоту, получение регенерантов и получение микроклубней картофеля, **отличающийся тем, что** из этиолированных ростков вычлениают апикальную часть (1,0-1,5см), стерилизуют их в 0,15% хлориде ртути в течение 7 минут с последующей промывкой 70% этиловым спиртом и трехкратной промыв-

кой стерильной дистиллированной водой, культивируют микроэкспланты от стерильных ростков размером 0,3-0,5мм в условиях *in vitro* в среде Мурасиге-Скуга (МС), затем микроэкспланта переносят в среду регенерации и добавляют фолиевая кислота в концентрации 50мг/л для ускоренного получения растен-ий-регенерантов, для полного очищения микроэс-планта от вируса в среде регенерации добавляют ан-тивиральный препарат (1,β-d-рибофуранозил-1,2,4,-триазол-2-карбоксамид (рибаверин) в концентрации 8мг/л, причем антивирусного препарата стерилизу-ют через антибактериального фильтра и добавляют после автоклавирования питательной среды МС.

Компьютерный набор: Нигораи А.

Заказ	Тираж	Подписное
Национальный патентно-информационный центр РТ 734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а		