



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2011143087/10, 25.10.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
25.10.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.10.2011

(45) Опубликовано: 20.05.2013 Бюл. № 14

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ТИХОМИРОВА Л.И. Особенности индукции морфогенеза из различных фрагментов цветка ириса в культуре in vitro, Turczaninoia, 2010, 13(3), с.147-151. KAWASE K. et.al. Shoot formation on floral organs of Japanese iris in vitro J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64(1): 143-148. 1995. ТИХОМИРОВА Л.И. Получение растений-регенерантов ириса из изолированных зародышей (см. прод.)**

Адрес для переписки:

656049, г.Барнаул, пр. Ленина, 61, Алтайский государственный университет, отдел инновационного развития и охраны интеллектуальной собственности

(72) Автор(ы):

**Тихомирова Людмила Ивановна (RU),  
Смирнов Сергей Владимирович (RU),  
Куцев Максим Геннадьевич (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Алтайский государственный университет" (RU)**

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ ИРИСА МЕЧЕВИДНОГО (I. ENSATA THUNB.) IN VITRO**

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения растений-регенерантов ириса мечевидного (*I. ensata Thunb.*) in vitro. Способ включает стерилизацию бутонов при условии, что бутоны, смоченные в 96%-ном этиловом спирте, обжигают в пламени спиртовки, обеззараживают в 0,1%-ном растворе сульфохлорантина в течение 20 минут, затем части трубки околоцветника делят на фрагменты 3×3 мм и высаживают на питательную среду Мурасиге-Скуга,

содержащую 3-5 мкМ НУК в сочетании с 4-8 мкМ БАП. Затем культивируют и укореняют. При этом через 30 суток культивирования образовавшиеся зачатки побегов с флоральными элементами пересаживают на питательные среды с БАП 20 мкМ и через 30 суток культивирования побеги укореняют на среде Мурасиге-Скуга с НУК 3 мкМ. Изобретение позволяет получать растения-регенеранты прямым методом, минуя каллусную культуру, с высоким процентом укоренения. 3 ил., 2 табл.

(56) (продолжение):

**в условиях in vitro. - Вестник Алтайского государственного аграрного университета, №7 (69), 2010.**



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2011143087/10, 25.10.2011

(24) Effective date for property rights:  
25.10.2011

Priority:

(22) Date of filing: 25.10.2011

(45) Date of publication: 20.05.2013 Bull. 14

Mail address:

656049, g.Barnaul, pr. Lenina, 61, Altajskij  
gosudarstvennyj universitet, otdel  
innovatsionnogo razvitija i okhrany  
intellektual'noj sobstvennosti

(72) Inventor(s):

**Tikhomirova Ljudmila Ivanovna (RU),  
Smirnov Sergej Vladimirovich (RU),  
Kutsev Maksim Gennad'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego  
professional'nogo obrazovanija "Altajskij  
gosudarstvennyj universitet" (RU)**

(54) **METHOD OF OBTAINING PLANT-REGENERATES OF IRIS ENSATA (I. ENSATA THUNB.) IN VITRO**

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: invention relates to a method of obtaining plant-regenerates of iris ensata (I. ensata Thunb.) in vitro. The method includes sterilisation of buds if the buds are soaked in 96% ethanol and burnt in the flame of a spirit lamp, disinfected in a 0.1% solution of sulfochlorantine for 20 minutes, then the parts of the perianth tube are divided into fragments of 3×3 mm and planted on the Murashige and Skoog nutritional medium containing 3-5 mcm acetic hydroperoxide in combination with 8.4 mcm

benzylaminopurine. Then they are cultivated and enrooted. And after 30 days of cultivation the formed spires with floral elements are transplanted on the nutritional media with benzylaminopurine 20 mcm and after 30 days of cultivation the shoots are enrooted on the Murashige and Skoog medium with acetic hydroperoxide 3 mcm.

EFFECT: invention enables to obtain plant-regenerates by the direct method, avoiding callus culture, with a high percentage of rooting.

3 dwg, 2 tbl

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к культивированию органов и тканей растений, и может быть использовано в цветоводстве для повышения коэффициента размножения, оздоровления посадочного материала, а также в селекционной практике для создания новых улучшенных сортов *I.ensata*.

Известен способ получения растений-регенерантов *I.ensata*, согласно которому в качестве эксплантов используют молодые побеги. Их культивируют на среде Мурасиге-Скуга, дополненной гормонами и сахарозой. Наблюдают индукцию двух видов каллуса: зеленого и белого. Из зеленого каллуса были получены побеги.

Введение активированного угля в питательную среду положительно влияло на образование корней у этих побегов (Yabuя T, Ikeda Y., Adachi T. (1991) *In vitro* propagation of Japanese garden iris *iris ensata* Thunb. // *Euphytica* 57, P.77-82).

Недостатком данного способа (аналога) является следующее. Получение каллусной ткани с последующей индукцией органогенеза или соматического эмбриогенеза не пригодно для использования при микроразмножении сортов растений, так как повышается вероятность соматической изменчивости исходного материала.

Наиболее близким является способ получения растений-регенерантов *I.ensata* на основе индукции развития почек в эксплантах околоцветник - завязь прямым путем, минуя каллусообразование. Экспланты культивировали на питательных средах Мурасиге-Скуга, дополненных фитогормонами НУК( $\alpha$ -нафтилуксусная кислота) и БАП (6-бензиламинопурин) в количестве 0-5 мг/л. Отмечена высокая способность к побегообразованию у данного типа эксплантов. Укоренить побеги автору не удалось (Kawase K, Mizutani H, Yoshioka M, Fukuda S (1995) Shoot formation on floral organs of Japanese iris *in vitro* // *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 64, P.143-8).

Недостатками данного способа является отсутствие способности к укоренению у полученных побегов *I.ensata*.

Наиболее близким является способ прямой регенерации флоральных элементов в ткани трубки околоцветника *I.ensata*. Бутоны, смоченные в 96% этиловом спирте, обжигали в пламени спиртовки. Следующий этап обеззараживания проводили в 0,1% растворе сульфохлорантина в течение 20 минут. Части цветка делили на фрагменты 3x3 мм. В качестве эксплантов использовали фрагменты трубки околоцветника.

Экспланты высаживали на питательные среды на основе MS (по прописи Мурасиге и Скуга), дополненные фитогормонами: 1-нафтилуксусной кислотой (НУК) 3-5 мкМ и 6-бензиламинопурином (БАП) 4-8 мкМ. Данным способом трубка околоцветника *I.ensata* способна регенерировать флоральные элементы (Тихомирова Л.И. Особенности индукции морфогенеза из различных фрагментов цветка ириса в культуре *in vitro* // *Turczaninowia*. 2010. - №13 (3). - С.147-151).

Недостатками данного способа (прототипа) является отсутствие способности к размножению и укоренению полученных флоральных элементов *I.ensata*, а также отсутствие подтверждения идентичности материнским экземплярам.

Задачей изобретения является создание способа получения растений-регенерантов, идентичных материнским растениям *I.ensata*, способных к дальнейшему размножению и укоренению.

Сущность изобретения

Способ получения растений-регенерантов *I.ensata*, заключающийся в том, что образование побегов осуществляется непосредственно из ткани экспланта, минуя стадию каллусообразования, зачатки побегов с флоральными элементами разделяют и пересаживают на питательные среды с БАП 20 мкМ и полноценные вегетативные

побеги укореняют на среде с НУК 3 мкМ.

Способ получения растений-регенерантов ириса мечевидного (*I.ensata* Thunb.) *in vitro*, заключающийся в том, что бутоны, смоченные в 96% этиловом спирте, обжигают в пламени спиртовки, обеззараживают в 0,1% растворе сульфохлорантина в течение 20 минут, затем части трубки околоцветника делят на фрагменты 3×3 мм и высаживают каждый фрагмент на питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую 3-5 мкМ НУК в сочетании с 4-8 мкМ БАП, затем культивируют и укореняют, а через 30 суток культивирования образовавшиеся зачатки побегов с флоральными элементами пересаживают на питательные среды с БАП 20 мкМ и через 30 суток культивирования побеги укореняют на среде Мурасиге-Скуга с НУК 3 мкМ.

Способ обеспечивает высокий процент выхода генетически стабильных регенерантов. Для подтверждения идентичности материнским экземплярам проводят анализ методом RAPD полногеномной ДНК.

Способ реализуют следующим образом.

Получение растений-регенерантов *I.ensata* осуществляют в два этапа, в качестве эксплантов используют фрагменты трубки околоцветника.

1 этап. Цветки берут в фазе бутонизации (VII этап органогенеза), когда они плотно закрыты листочками обертки. Стерилизацию материала проводят в условиях ламинар-бокса. Бутоны цветка, смоченные в 96% этиловом спирте, обжигают в пламени спиртовки, далее проводят обеззараживание в 0,1% растворе сульфохлорантина в течение 20 минут. Подобный способ обеспечивает на 100% стерильность и жизнеспособность материала. Части трубки околоцветника делят на фрагменты размером не более 3×3 мм и помещают на питательные среды.

Питательные среды готовят по прописи Мурасиге и Скуга, содержащие 30 г/л сахарозы. В них вводят фитогормоны в разных концентрациях: 3-5 мкМ НУК в сочетании с 4-8 мкМ БАП, всего девять вариантов сред (таблица 1) рН среды доводят до 5,8-5,9 и добавляют 0,6% агара. Среды разливают в пластиковые контейнеры по 30 мл или в культуральные флаконы по 10 мл. Автоклавируют приготовленные питательные среды в течение 20 мин при 120°C. Экспланты культивируют в условиях фотопериода 16/8 часов свет/темнота при 24-26°C.

В первые две недели культивирования *in vitro* все экспланты увеличиваются в размерах и приобретают зеленую окраску. Далее еще через две недели в тканях экспланта развиваются зачатки вегетативных побегов, у которых вместо примордиев первых листьев формируются структуры, похожие на доли околоцветника - флоральные элементы. Со временем эти структуры приобретают характерную для цветков данного сорта окраску (Фиг.1).

2 этап. Для получения вегетативных побегов *I.ensata* из фрагментов трубки околоцветника готовят питательные среды. Зачатки побегов с флоральными элементами пересаживают на питательные среды (используются среды Мурасиге-Скуга или Гамборга В<sub>5</sub>), содержащие 20 мкМ БАП (таблица 2). Этап, во время которого из эксплантов формируются вегетативные побеги, характеризуется как промежуточный. Через 30 дней регенерируют полноценные побеги с зелеными листьями. В результате данным способом через 60 суток получают полноценные вегетативные побеги *I.ensata* в количестве 5-8 штук на один эксплант (Фиг.2), которые укореняют на среде Мурасиге-Скуга с НУК 3 мкМ. А после этапа укоренения получают растения-регенеранты, идентичные материнским экземплярам. Для подтверждения идентичности растений-регенерантов и материнских растений *I.ensata* проводят анализ с помощью ПЦР (Фиг.3).

Необходимым условием клонального микроразмножения является стабильное воспроизводство исходного генотипа. Однако соблюдение этого условия вызывает ряд трудностей, т.к. биологически активные компоненты питательных сред способны вызвать генетические изменения в клетках, что приводит к генетической

5  
вариабельности полученных регенерантов. Методом RAPD-анализа полногеномной ДНК отличий между материнскими экземплярами *I.ensata* и растениями-регенерантами, полученными методом прямой регенерации побегов из ткани экспланта трубки околоцветника, не обнаружено.

10  
Способом получения растений-регенерантов ириса мечевидного (*I.ensata* Thunb.) *in vitro* получают побеги в количестве 5-8 штук на один эксплант, способные к дальнейшему размножению и укоренению. Высокий процент укоренения до 100% достигается на средах Мурасиге и Скуга, дополненных 3 мкМ НУК.

15

Пути морфогенеза <i>I.ensata</i> в культуре <i>in vitro</i> в зависимости от состава питательной среды и типа экспланта		Таблица 1
Количество гормонов в мкМ и их соотношение	Тип экспланта трубка околоцветника	
1БАП 1 НУК (1:1) контроль	-	
4БАП 3 НУК (1,3:1)	РФЭ, геммогенез	
4БАП 4 НУК (1:1)	РФЭ, геммогенез	
4БАП 5 НУК (1:1,25)	РФЭ, геммогенез	
6БАП 3 НУК (2:1)	РФЭ, геммогенез	
6БАП 4 НУК (1,5:1)	РФЭ, геммогенез	
6БАП 5 НУК (1,2:1)	РФЭ, геммогенез	
8БАП 3 НУК (2,6:1)	РФЭ, геммогенез	
8БАП 4 НУК (2:1)	РФЭ, геммогенез	
8БАП 5 НУК (1,6:1)	РФЭ, геммогенез	
Примечание. Прочерк означает отсутствие регенерации у эксплантов, РФЭ - рост флоральных элементов.		

30

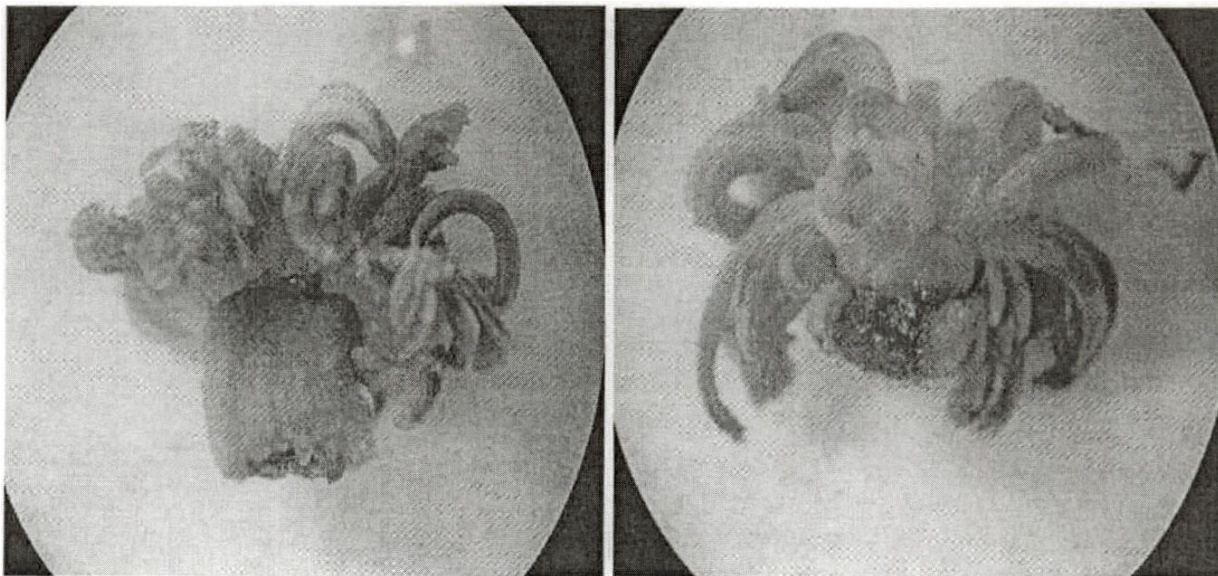
Содержание БАП мкМ в питательных средах на этапе 1	Содержание БАП мкМ в питательных средах этапа 2				Таблица 2
	5	7,5	10	20	
4	гибель экспланта	гибель экспланта	гибель экспланта	активный геммогенез	
6	гибель экспланта	гибель экспланта	гибель экспланта	активный геммогенез	
8	гибель экспланта	гибель экспланта	гибель экспланта	активный геммогенез	
1	гибель экспланта	гибель экспланта	гибель экспланта	гибель экспланта	
Зависимость формирования вегетативных побегов из вторичных эксплантов от содержания БАП в питательной среде					

35  
40

### Формула изобретения

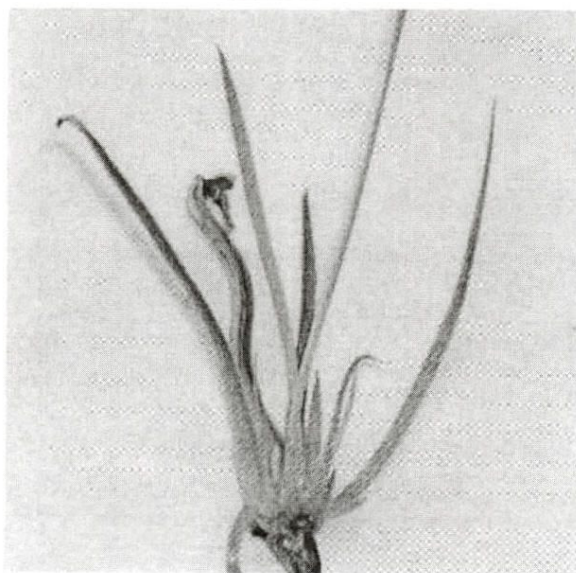
Способ получения растений-регенерантов ириса мечевидного (*I.ensata* Thunb.) *in vitro*, включающий стерилизацию бутонов, заключающийся в том, что бутоны, смоченные в 96%-ном этиловом спирте, обжигают в пламени спиртовки, обеззараживают в 0,1%-ном растворе сульфохлорантина в течение 20 минут, затем части трубки околоцветника делят на фрагменты 3×3 мм и высаживают на питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую 3-5 мкМ НУК в сочетании с 4-8 мкМ БАП, затем культивируют и укореняют, отличающийся тем, что через 30 суток культивирования образовавшиеся зачатки побегов с флоральными элементами пересаживают на питательные среды с БАП 20 мкМ и через 30 суток культивирования побеги укореняют на среде Мурасиге-Скуга с НУК 3 мкМ.

45  
50



Развитие флоральных элементов у эксплантов трубки околоцветника *I. ensata*, две стороны одного экспланта.

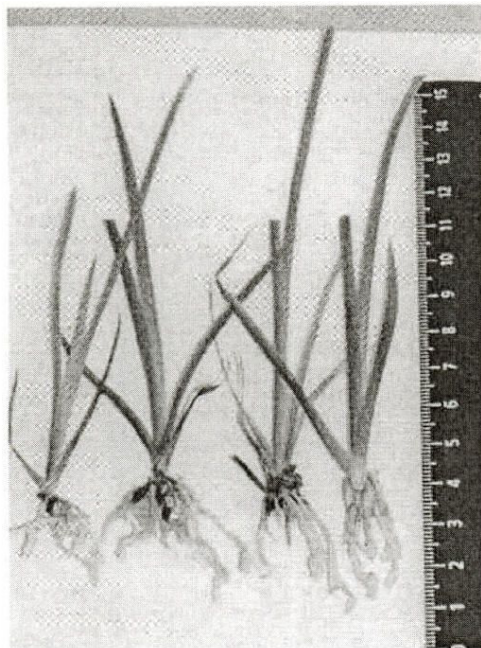
Фиг. 1



Развитие побегов у фрагментов трубки околоцветника на питательной среде с БАП 20,0 мкМ

Фиг. 2





Растения-регенеранты *I. ensata* после этапа размножения и укоренения  
Фиг. 3