



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012117407/10, 26.04.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.04.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.04.2012

(43) Дата публикации заявки: 10.11.2013 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 20.05.2014 Бюл. № 14

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **SORVARIS., et all, Preculture Medium Promotes Direct Shoot Regeneration from Micropropagated Strawberry Leaf Disks, HortScience 28 (1), 55-57, 1993, p. 55-57. СЕМЕНАС С.Э., и др., Методика клонального микроразмножения сортов земляники садовой, Плодоводство, Научные труды, Самохваловичи, 2000, с.138-144. АЛЕКСЕЕНКО Л.В., Особенности размножения (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)

(73) Патентообладатель(и):

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

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ ЗЕМЛЯНИКИ (IN VITRO)

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой способ получения растений-регенерантов земляники in vitro, включающий в себя введение эксплантов в культуру, размножение и укоренение вновь образованных in vitro побегов, где в качестве эксплантов используют фрагменты цветоложа и цветоножки из цветов земляники, взятых в фазе бутонизации, которые промывают под проточной водой в течение 15-25 минут, стерилизуют 0,1% раствором сулемы 10 минут,

затем трижды промывают стерильной дистиллированной водой, цветоложе освобождают от чашелистиков и лепестков, нарезают на фрагменты 5×5 мм и помещают срезом на питательную среду, цветоножку отделяют от цветка, отрезают фрагмент длиной 5 мм и также помещают на питательную среду. Изобретение позволяет получить увеличенное количество растений-регенерантов от одного экспланта. 1 табл., 2 ил.

RU 2 516 341 C2

RU 2 516 341 C2

(56) (продолжение):

нейтральнодневных и ремонтантных сортов земляники *in vitro*, автореферат диссертации, Москва, 1998

R U 2 5 1 6 3 4 1 C 2

R U 2 5 1 6 3 4 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012117407/10, 26.04.2012**(24) Effective date for property rights:
26.04.2012

Priority:

(22) Date of filing: **26.04.2012**(43) Application published: **10.11.2013** Bull. № 31(45) Date of publication: **20.05.2014** 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)

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD OF PRODUCTION OF PLANTS-REGENERANTS OF STRAWBERRIES (IN VITRO)**

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology. The invention provides a process for production of plants-regenerants of strawberry in vitro, comprising administering of explants to the culture, propagation and rooting of the newly formed shoots in vitro, where the fragments of flower disk and flower-stalk of the strawberry flowers are used as explants, taken in the bud stage, which are washed under flowing water for 15-25 minutes, sterilised with 0.1% mercuric

chloride solution for 10 minutes, then washed three times with sterile distilled water, the flower disk is released from the sepals and petals, cut into pieces of 5×5 mm and the cut is placed on a culture medium, the flower-stalk is separated from the flower, a piece of 5 mm long is cut and placed also on the nutrient medium.

EFFECT: invention enables to obtain a larger number of plants-regenerants from one explant.

1 tbl, 2 dwg

RU 2 516 341 C 2

RU 2 516 341 C 2

Изобретение относится к сельскохозяйственной биотехнологии и может быть использовано для массового получения качественного посадочного материала ценных сортов и гибридов земляники в питомниководстве и селекционных работах.

Известен способ получения растений-регенерантов земляники (патент СССР

5 №1658929 А1, МПК⁵ А01Н 4/00, Бюл. №24 - М., 1991), согласно которому эксплантами являлись верхушечные и латеральные почки. Растения подвергают суховоздушной терапии, а затем освобождают от патогенной микрофлоры путем обработки побегов горячей водой.

10 Недостатком данного способа (аналога) является сложность проведения стерилизации растительного материала. Земляника является почвопокровным растением, поэтому получение стерильного и жизнеспособного материала при введении в культуру *in vitro* почек вегетативного побега представляет большую трудность. Согласно данному способу гибель эксплантов после обработки составляет 23,5%.

15 Наиболее близким к предлагаемому является способ получения растений-регенерантов земляники методом дифференциации почек в ткани экспланта, где в качестве эксплантов используют листовые диски, полученные от растений, размножаемых *in vitro* (Sorvari S., Ulvinen S., Nietaranta T., Hiirsalmi H. Preculture medium promotes direct shoot regeneration from mikropropagated strawberry leaf disks// Hort Science, 20 1993, V.28, N.1, P.55-57). Данный способ позволяет исключить этап стерилизации эксплантов, так как исходные растения размножаются микроклонально. Для увеличения выхода регенерантов у земляники проводят предкультивирование на питательной среде, содержащей 6-бензиламинопурин (БАП) 0,5 мг/л, 3-индолилмасляную кислоту (ИМК) 0,5 мг/л. Это ускоряет морфогенез на листовых дисках и увеличивает количество сформировавшихся побегов от 1,5 до 9,9 на один эксплант.

25 Недостатками данного способа (прототипа) является низкий процент эксплантов (56,3-75%), регенерировавших побеги. При этом способе необходимо иметь введенные в культуру *in vitro* исходные растения.

Заявляемый способ получения растений-регенерантов земляники *in vitro*, за счет ускорения получения регенерантов, методом дифференциации почек в ткани экспланта, 30 где в качестве эксплантов используются фрагменты цветоложа и цветоножки;

- упрощает этап стерилизации и увеличивает процент жизнеспособности эксплантов;
- увеличивает эффективность процесса, тиражируемость, высокая приживаемость, низкая инфицируемость эксплантов;

35 - увеличивает коэффициент размножения, что позволяет применять в промышленном размножении.

Сущность изобретения заключается в том, что в способе получения растений-регенерантов земляники *in vitro* используют в качестве эксплантов фрагменты цветоложа и цветоножки, взятых из цветов земляники, в фазе бутонизации, промывают 15-25 минут, стерилизуют 0,1% раствором сулемы 10 минут, затем трижды промывают стерильной 40 дистиллированной водой, цветоложе освобождают от чашелистиков и лепестков, разрезают на фрагменты 5×5 мм, цветоножку отделяют от цветка, отрезают фрагмент длиной 5 мм, затем фрагменты помещают срезом на питательную среду.

Способ реализуют следующим образом:

45 Цветки земляники берут в фазе бутонизации. Перед стерилизацией промывают под проточной водой в течение 15-25 минут. Стерилизацию проводят в условиях ламинар-бокса 0,1% раствором сулемы 10 минут. Затем трижды промывают стерильной дистиллированной водой. Этот способ стерилизации позволяет получить 95% эксплантов «стерильными» и жизнеспособными. Цветоложе освобождают от чашелистиков и

лепестков, разрезают на фрагменты 5×5 мм и помещают срезом на питательную среду. Цветоножку отделяют от цветка, отрезают фрагмент длиной 5 мм и также помещают на питательную среду. Питательные среды готовят по прописи Мурасиге-Скуга, содержащей 20 мкМ БАП и 1 мкМ ИМК. Через 20-30 суток на месте среза у эксплантов цветоножки появляются побеги (Фиг.1, Геммогенез у эксплантов цветоножки земляники). Побеги фрагментов регенерируют из завязей и тканей цветоложа (Фиг.2, Геммогенез у эксплантов цветоложа земляники). Образовавшийся конгломерат легко делится на одиночные побеги, которые пересаживают на среды размножения, содержащие 0,5-1 мкМ БАП. Укореняют побеги на безгормональной среде Мурасиге-Скуга. Число побегов на один эксплант составляет от 10 до 15 штук.

В результате использования данного способа получения растений-регенерантов земляники от одного экспланта за 3 месяца культивирования получают около 200 штук растений-регенерантов, морфологически идентичных материнским экземплярам.

Состав питательной среды на основе MS, мкМ	Тип экспланта			
	цветоложе	цветоножка	чашелистики	лепестки
10,0 БАП	нет	нет	нет	нет
15,0 БАП	сл. регенерация	сл. регенерация	нет	нет
17,0 БАП	каллус	каллус	каллус	каллус
20,0 БАП+1ИМК	активная регенерация	активная регенерация	слабая регенерация	нет

Регенерационная способность различных типов эксплантов фрагментов цветка земляники сорта Лидия Норвежская в зависимости от состава питательных сред

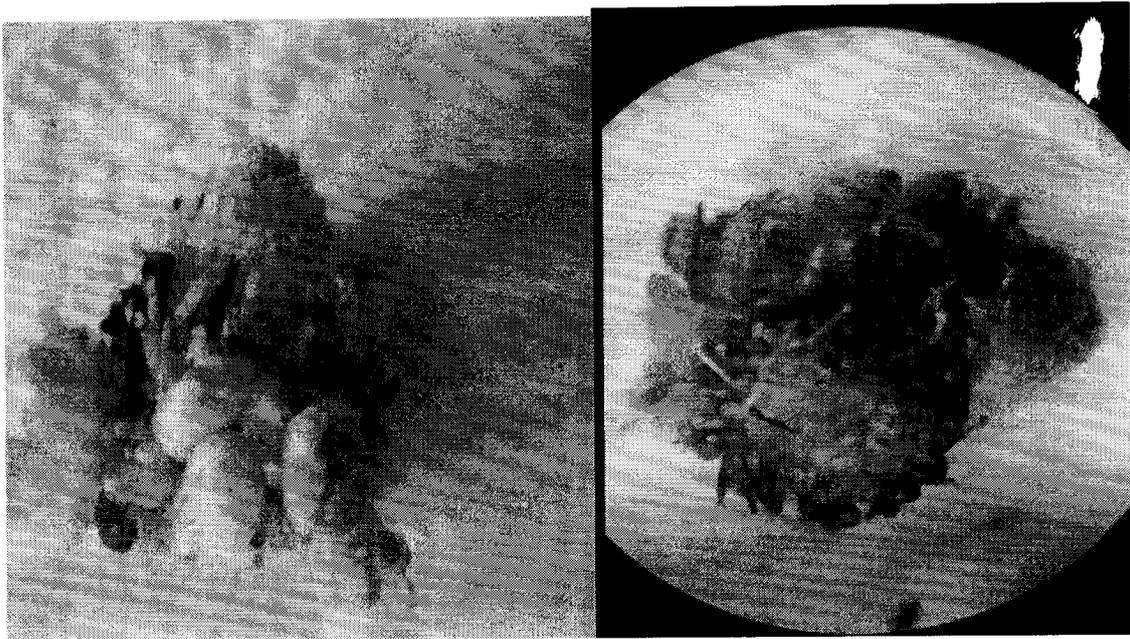
Формула изобретения

Способ получения растений-регенерантов земляники *in vitro*, включающий в себя введение эксплантов в культуру, размножение и укоренение вновь образованных *in vitro* побегов, отличающийся тем, что в качестве эксплантов используют фрагменты цветоложа и цветоножки из цветов земляники, взятые в фазе бутонизации, которые промывают под проточной водой в течение 15-25 минут, стерилизуют 0,1% раствором сулемы 10 минут, затем трижды промывают стерильной дистиллированной водой, цветоложе освобождают от чашелистиков и лепестков, разрезают на фрагменты 5×5 мм и помещают срезом на питательную среду, цветоножку отделяют от цветка, отрезают фрагмент длиной 5 мм и также помещают на питательную среду.



Геммогенез у експлантов цветоножки земляники

Фиг. 1



Геммогенез у експлантов цветоложа земляники

Фиг. 2