



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013138105/10, 14.08.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
14.08.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.08.2013

(43) Дата публикации заявки: 20.02.2015 Бюл. № 5

(45) Опубликовано: 10.04.2015 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2360964 C1, 10.07.2009.  
ЛЯПКОВА Н.С., Разработка методов культивирования тканей копеечника *in vitro*, Биотехнология, N1, 1999, с.55-61. Новикова Т.И., Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального Сибирского ботанического сада, Вестник ВОГиС, том 12, N4, 2008, с.564-572

Адрес для переписки:

656049, г.Барнаул, пр. Ленина, 61, Алтайский государственный университет, отдел 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 РАЗМНОЖЕНИЯ КОПЕЕЧНИКА ЧАЙНОГО (*HEDYSARUM THEINUM KRASNOB.*)

(57) Реферат:

Изобретение относится к сельскохозяйственной биотехнологии. Изобретение представляет собой способ размножения копеечника чайного, где вызревшие простерилизованные семена копеечника чайного (*Hedysarum theinum* Krasnob.) высаживают на питательные среды Мурасиге-Скуга для введения в культуру ткани, через 20-30 суток развившиеся побеги пересаживают на среды размножения MS, затем образовавшиеся конгломераты

микроробегов делят и пересаживают на среды, содержащие 1,0 БАП+L-глутамин и аденин сульфат 100 мг/л. Растения-регенеранты размножают, укореняют и адаптируют к нестерильным условиям. Изобретение позволяет повысить эффективность процесса, тиражируемости, адаптации в условиях гидропоники и получить стандартные саженцы копеечника чайного. 4 ил., 1 табл.

C 2  
2 5 4 7 5 9 3  
R U

R U  
2 5 4 7 5 9 3  
C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2013138105/10, 14.08.2013**(24) Effective date for property rights:  
**14.08.2013**

Priority:

(22) Date of filing: **14.08.2013**(43) Application published: **20.02.2015** Bull. № 5(45) Date of publication: **10.04.2015** Bull. № 10

Mail address:

**656049, g.Barnaul, pr. Lenina, 61, Altajskij  
gosudarstvennyj universitet, otdel 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 REPRODUCTION OF TEA TICK TREFOIL (HEDYSARUM THEINUM KRASNOB)**

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: invention relates to agricultural biotechnology. The invention is a method of reproduction of tea tick trefoil, when the matured sterilized seeds of tea tick trefoil (*Hedysarum theinum* Krasnob) are planted in the Murashige-Skoog culture medium for insertion into tissue of the culture, in 20-30 days the developed shoots are transplanted to the MS medium of reproduction, then the formed conglomerates of microshoots are divided and

transplanted to the media comprising 1.0 BAP + L-glutamine and adenine sulphate 100 mg/l. The plants-regenerants are reproduced, rooted and adapted to non-sterile conditions.

EFFECT: invention enables to improve the efficiency of the process, replicability, adaptation under conditions of hydroponics, and to obtain standard seedlings of tea tick trefoil.

4 dwg, 1 tbl

RU 2 547 593 C 2

RU 2 547 593 C 2

Изобретение относится к сельскохозяйственной биотехнологии и может быть использовано для массового получения качественного посадочного материала лекарственного растения копеечника чайного.

5 Известны методы культивирования тканей *in vitro* (аналог) двух видов копеечника - копеечника забытого и копеечника альпийского (Ляпкова Н.С., Хадеева Н.В., Шаин С.С., Майсурян А.Н. Разработка методов культивирования тканей копеечника *in vitro*. Биотехнология, 1999, 1, С.55-61). Авторам удалось получить каллусные ткани листового, стеблевого и корневого происхождения, а также изолированные корни этих растений.

10 Культивирование недифференцированно растущих клеток растений не всегда гарантирует сохранение биосинтеза видоспецифичных соединений в условиях *in vitro*. Кроме того, выращивание клеточных культур, а также культивирование изолированных корней на питательной среде, содержащей фитогормоны, существенно ограничивает вероятность дальнейшего использования получаемой растительной массы и тем самым снижает ценность метода.

15 Наиболее близким к предлагаемому способу является «Культура корня *Hed.th.* (*Hedysarum theinum* Krasnob.) - продуцент изофлавонов» (Патент РФ №2360964 от 10.07.2009, Бюл. №19). Задача изобретения - получение культуры корня *Hed.th.*, интенсивно растущей в условиях *in vitro* на безгормональных питательных средах, сохраняющей способность к синтезу изофлавонов, характерных для корней целого

20 растения, и обладающей генетической и биохимической стабильностью, для контролируемого выращивания лекарственного сырья в любое время года.

Поставленная задача решалась созданием новой культуры корня *Hedysarum theinum* Krasnob., депонированной в Коллекции генетически трансформированных корней растений при Институте физиологии растений РАН - под обозначением *Hed.th.* -

25 продуцента изофлавонов: ононина, гликозида тексазина, малонилононина, формононетина.

Недостатком данного метода является культивирование только корней, а наземная часть при этом отсутствует. Вегетативные органы также представляют лекарственную

30 ценность и могут быть использованы.

Заявляемый способ размножения копеечника чайного методом культуры *in vitro* позволяет получить активно растущие растения-регенеранты с полноценными вегетативными органами и корневой системой.

35 Сущность способа размножения копеечника чайного (*Hedysarum theinum* Krasnob.) заключается в том, что используются вызревшие простерилизованные семена копеечника чайного, которые высаживают на питательные среды Мурасиге-Скуга (MS), не содержащие гормоны, через 20-30 суток развившиеся побеги пересаживают на среды размножения MS с добавлением 5 мкМ БАП (6-бензиламинопурина), 2,5 мкМ кинетина и 5 мкМ ГК, затем образовавшиеся конгломераты микропобегов делят и пересаживают на среды, содержащие 1,0 БАП+L-глутамин и аденин сульфат 100 мг/л. Микропобеги

40 размножают и укореняют в последующих пассажах. После адаптации к нестерильным условиям получают стандартные саженцы копеечника чайного.

Способ реализуют следующим образом.

Перед стерилизацией семена копеечника чайного промывают под проточной водой в течение 15-25 минут. Стерилизацию проводят в условиях ламинар-бокса 0,1%

45 раствором сулемы 10 минут. Затем трижды промывают стерильной дистиллированной водой. Этот способ стерилизации позволяет получить 70% эксплантов «стерильными» и жизнеспособными. Питательные среды для этапа введения в культуру ткани готовят по прописи Мурасиге-Скуга (MS), они не содержат гормоны, на них высаживают

простерилизованные семена (Фиг.1. Побег копеечника чайного на этапе введения в культуру ткани).

Через 20-30 суток развившиеся побеги пересаживают на среды размножения MS с добавлением 5 мкМ БАП (6-бензиламинопурина), 2,5 мкМ кинетина и 5 мкМ ГК (гибберелловой кислоты) (табл.1) для микроразмножения (Фиг.2. Микроразмножение копеечника чайного). Образовавшиеся конгломераты микропобегов легко делятся на одиночные, которые пересаживают на среды, содержащие 1,0 мкМ БАП+L-глутамин и аденин сульфат (100 мг/л). Для длительного получения активно пролиферирующей культуры необходимо использовать схему чередования сред с высоким и низким содержанием БАП через один пассаж. В результате чего получают стерильную культуру копеечника со стабильным коэффициентом размножения  $3,3 \pm 0,4$ . Число побегов на один эксплант за один пассаж составляет от 2 до 15 штук. Укореняют побеги на среде Мурасиге-Скуга дополненной 3 мкМ НУК ( $\alpha$ -нафтилуксусная кислота). Адаптацию растений-регенерантов копеечника чайного к нестерильным условиям проводят на гидропонной установке, используя  $\frac{1}{4}$  минерального состава среды MS (Фиг.3.) Через 25-30 суток адаптации получают стандартные саженцы (Фиг.4. Растение-регенерант копеечника чайного после адаптации на гидропонной установке).

На основании теоретического расчета по формуле  $V_n = V_1 \times G^{(n-1)}$  (где n - количество месяцев культивирования,  $V_1$  - количество микропобегов, G - коэффициент размножения) от одного растения при данном способе культивирования можно получить за 12 месяцев до 159432 саженцев копеечника чайного, если коэффициент размножения равен 3,0.

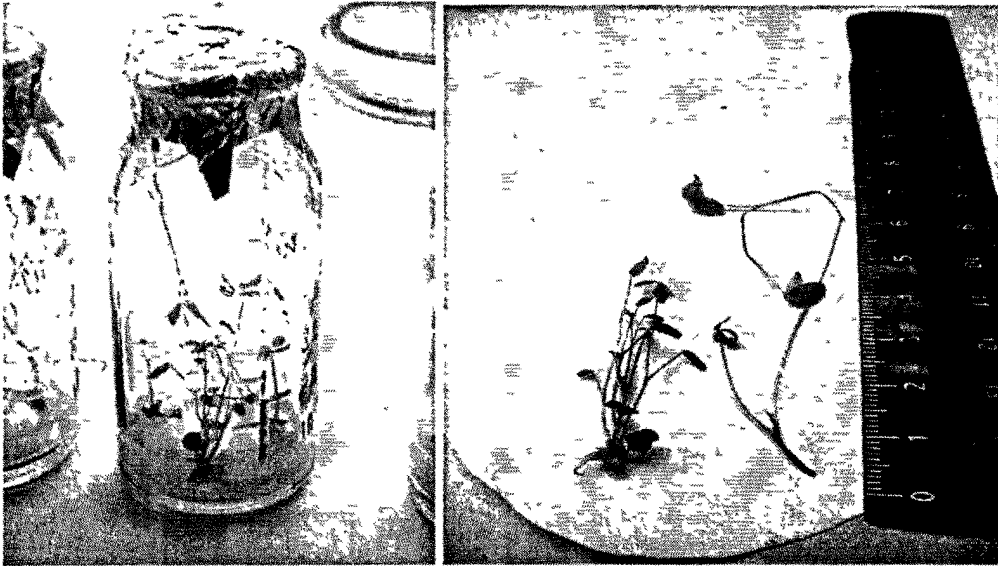
Высокая эффективность процесса, тиражируемость, адаптация в условиях гидропоники определяют промышленную применимость предлагаемого способа.

Таблица 1.  
Влияние гормонального состава питательных сред и схемы культивирования на побегообразование у копеечника чайного

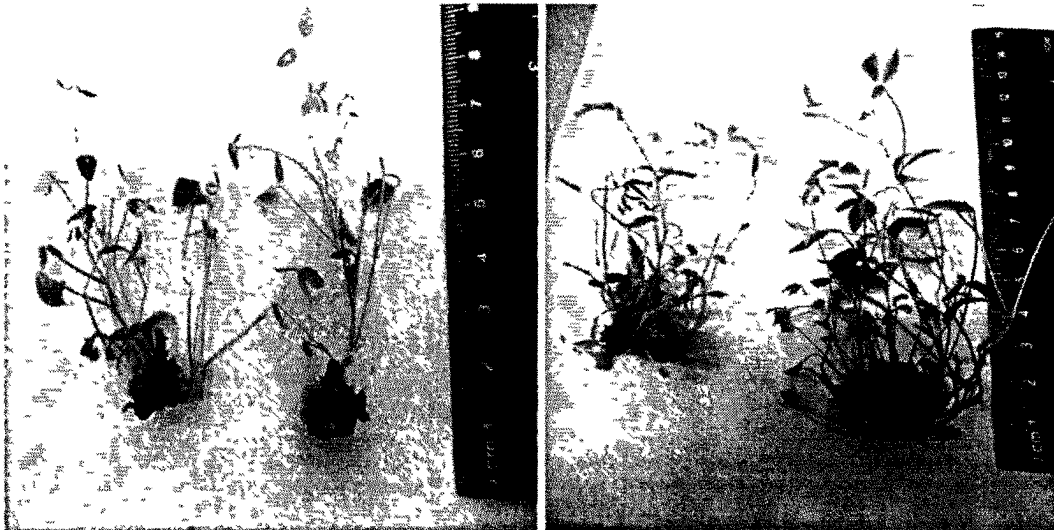
Гормональный состав питательной среды, мкМ, (№ среды)	Высота растений, мм	Коэффициент размножения	Примечание
1,0 БАП+L-глутамин и аденин сульфат 100 мг/л (78)	$30,1 \pm 0,1$	1,0	рост в длину, гибель побегов 40%
2,5 БАП (98)	$20,3 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1$	гибель побегов 20%
5 БАП+2,5 кинетина +5 ГК (204)	$30,7 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,5$	гибель побегов 20%
5 БАП+1 НУК	$30 \pm 0,7$	$2,0 \pm 0,2$	гибели побегов 30%
Чередование сред 204 и 78	$40,5 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,4$	стабильный рост и размножение

#### Формула изобретения

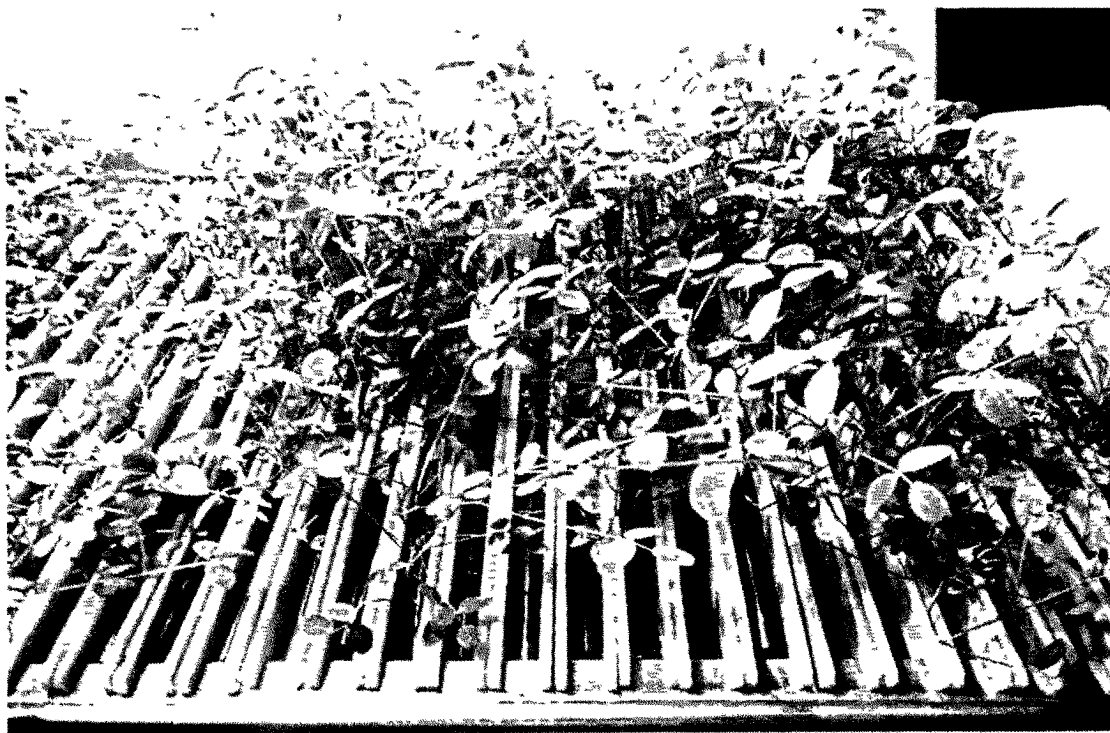
Способ размножения копеечника чайного (*Hedysarum theinum* Krasnob.), включающий в себя культуру ткани, отличающийся тем, что используют семена копеечника чайного, которые высаживают на питательные среды Мурасиге-Скуга (MS), не содержащие гормоны, через 20-30 суток развившиеся побеги пересаживают на среды размножения MS с добавлением 5 мкМ БАП, 2,5 мкМ кинетина, 5 мкМ ГК (гибберелловой кислоты), образовавшиеся микропобеги делят и пересаживают на среды, содержащие 1,0 БАП+L-глутамин и аденин сульфат 100 мг/л, чередуют среды с высоким и низким содержанием БАП через один пассаж, укореняют побеги на среде MS, дополненной 3 мкМ НУК, адаптируют к нестерильным условиям на гидропонной установке с  $\frac{1}{4}$  минерального состава среды MS.



Побеги копеечника чайного на этапе введения в культуру ткани  
Фиг. 1



Микроразмножение копеечника чайного  
Фиг. 2



Адаптация растений-регенерантов копеечника чайного на гидропонной установке

Фиг. 3



Растение-регенерант кофейника чайного после адаптации на гидропонной установке

Фиг. 4