



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2011143089/10, 25.10.2011**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.10.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **25.10.2011**(45) Опубликовано: **27.04.2013** Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ТИХОМИРОВА Л.И. Особенности микрклонального размножения сортов и гибридов Ириса сибирского (*I.sibirica* L.)/Труды Томского государственного университета. Серия биологическая. Том 274. - 2010, с.378-379. ТИХОМИРОВА Л.И. Получение растений-регенерантов Ириса из изолированных зародышей в условиях *in vitro*/Вестник Алтайского государственного аграрного (см. прод.)**

Адрес для переписки:

**656049, г.Барнаул, пр-кт 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 МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ИРИСА СИБИРСКОГО (*I.SIBIRICA* L.)

(57) Реферат:

Изобретение представляет собой способ микрклонального размножения *I.sibirica* L. *in vitro*. Растения, идентичные исходным экземплярам, получают методом прямой регенерации, минуя каллусную культуру, а в качестве эксплантов используют фрагменты трубки околоцветника и цветоножки. Экспланты культивируют на питательной среде Мурасиге-Скуга, в которую вносят фитогормоны 3 мкМ НУК в сочетании с 8 мкМ БАП и добавляют 0,6% агара. Затем побеги переносят на питательную среду,

дополненную 5-7,5 мкМ БАП, 0,1 мкМ НУК и 0,1 мкМ ИМК, размножают по схеме, чередуя среды с высоким (5-7,5 мкМ) и низким (1 мкМ) содержанием БАП. Затем побеги укореняют на питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 1 мкМ НУК. Изобретение позволяет ускорить получение регенерантов данного вида ириса прямым методом, минуя каллусную культуру, и повысить их выход путем увеличения коэффициента размножения для получения растений, идентичных исходным экземплярам. 1 табл.

(56) (продолжение):

университета. - 2010, №7 (69), с.46-48. ТИХОМИРОВА Л.И. Особенности индукции морфогенеза из различных фрагментов цветка Ириса в культуре *in vitro*/Turczaninowia. - 2010, 13 (3), 148-150.

R U 2 4 7 9 9 2 C 1

R U 2 4 7 9 9 2 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2011143089/10, 25.10.2011**(24) Effective date for property rights:
25.10.2011

Priority:

(22) Date of filing: **25.10.2011**(45) Date of publication: **27.04.2013 Bull. 12**

Mail address:

**656049, g.Barnaul, pr-kt 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 MICROCLONAL PROPAGATION OF SIBERIAN FLAG-LEAF (I.SIBIRICA I.)**

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: invention is a method of microclonal propagation of *I.sibirica* L. in vitro. The plants identical to original specimens are obtained by the method of direct regeneration, avoiding tylotic culture, and as explants the fragments of the floral envelope tube and flower stalk are used. The explants are cultivated in a Murashige and Skoog nutrient medium, in which the phytohormones 3 mcM naphthyl acetic acid in combination with 8 mcM 6-benzylaminopurine and 0.6% agar is added. Then the shoots are transferred to the nutrient medium supplemented with 5-7.5 mcM

6-benzylaminopurine, 0.1 mcM naphthyl acetic acid and 0.1 mcM indolyl-3- butyric acid, propagated by the scheme, alternating with mediums of high (5-7.5 mcM) and low (1 mcM) content of 6-benzylaminopurine. Then the shoots are enrooted in the Murashige and Skoog nutrient medium containing 1 mcM naphthyl acetic acid.

EFFECT: invention enables to accelerate the obtaining of regenerants of this type of flag-leaf by direct method, avoiding the tylotic culture, and to increase their output by increasing the multiplication factor to produce plants identical to the original specimens.

1 tbl

Изобретение относится к цветоводству и биотехнологии, может быть использовано для массового размножения ценных декоративных сортов и гибридов ириса сибирского, освобождения их от системных патогенов, а также в селекционной практике для создания новых улучшенных сортов.

Известен способ получения растений-регенерантов *I. sibirica*, согласно которому эксплантами являются верхушечные и боковые почки, изолированные с корневищ многолетних генеративных растений во время вегетации (июнь-июль) и после ее окончания (сентябрь-октябрь). Корневища выкапывали из земли, очищали от частиц почвы и отмерших тканей, делили на участки, содержащие почки, промывали в мыльном растворе и проводили стерилизацию растительного материала.

Стерильность и жизнеспособность эксплантов при введении в культуру *in vitro* составила 49-68%. Экспланты культивировали на безгормональной среде, после формирования первых листьев пересаживали на питательные среды мультипликации побегов. В результате из одного экспланта формировалось одно растение-регенерант (Ишмуратова М.М. Особенности культивирования *in vitro* растений различных экологических групп на примере видов рода *Iris L.* Растительные ресурсы. - 1999. - 35, №4. Москва. 1999. - С.67-74).

Недостатком данного способа (аналога) является сложность проведения стерилизации растительного материала. *I. sibirica* является геофитом, поэтому получение стерильного и жизнеспособного материала при введении в культуру *in vitro* почек вегетативного побега представляет большую трудность. Даже при условии успешной поверхностной стерилизации внутренняя инфекция проявляет себя на протяжении всех этапов микроклонального размножения этой культуры. При данном способе повреждается или уничтожается растение-донор.

Наиболее близким (прототипом) является способ получения растений-регенерантов *I. sibirica* на основе индукции развития почек в каллусной культуре из изолированных фрагментов трубки околоцветника. После стерилизации бутонов из них извлекали части околоцветника, которые делили на фрагменты размером 0,5×0,5 см и помещали на поверхность питательной среды Мурасиге-Скуга, дополненной 10, 20 и 30 мкМ 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксисукусная кислота) в сочетании с 5 мкМ БАП (6-бензиламинопурин). Культивирование осуществляли в условиях темноты. В первые дни культивирования наблюдали увеличения размеров эксплантов за счет растяжения клеток, а в дальнейшем сформировался зеленый плотный каллус. При пересадке каллуса на среду с уменьшенным содержанием 2,4-Д (0,2 мкМ) и культивировании его в условиях фотопериода происходила регенерация флоральных почек у *I. sibirica*.

Индукцию регенерации вегетативных почек на данной среде не удалось. В связи с этим каллусную ткань с флоральными почками пересаживали на среду с повышенной концентрацией БАП - 20 мкМ. В конце пассажа на этой среде происходила регенерация вегетативных почек. Продолжительность пассажа на одной среде составляла 25-30 суток (Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К., Клементьева Л.А., Долганова З.В. Особенности регенерации и размножения растений рода *Iris* (*Iridaceae*) *in vitro* // Раст. Ресурсы, 2004. - Т.40, вып.4. - С.56-60).

Недостатками данного способа (прототипа) является длительный период получения вегетативных почек (90 суток). Получение каллусной ткани с последующей индукцией органогенеза или соматического эмбриогенеза непригодно для использования при микроразмножении сортов растений, так как при дедифференциации клеток может происходить полиплоидизация и анеуплоидизация числа хромосом, которое способствует получению неоднородного потомства.

Задачей заявляемого изобретения является создание способа микрклонального размножения *I.sibirica* за счет ускорения получения регенерантов данного вида ириса прямым методом, минуя каллусную культуру, и повышение их выхода путем увеличения коэффициента размножения для получения растений, идентичных исходным экземплярам.

Сущность изобретения заключается в том, что способ микрклонального размножения Ириса Сибирского (*I.sibirica* L.) *in vitro* позволяет применять метод прямой регенерации, минуя стадию каллусообразования, а в качестве эксплантов используют фрагменты трубки околоцветника и цветоножки. Причем экспланты культивируют на питательной среде, которая обеспечивает высокий процент выхода генетически стабильных регенерантов в более короткие сроки. После обеззараживания бутонов трубку околоцветника и цветоножку делят на фрагменты 3×3 мм, которые затем высаживают на питательную среду Мурасиге-Скуга (MS), содержащую 3 мкМ НУК (α -нафтилуксусную кислоту) в сочетании с 8 мкМ БАП, через 30 суток образовавшиеся вегетативные побеги из всех предложенных типов эксплантов пересаживают на питательную среду, дополненную 5-7,5 мкМ БАП, 0,1 мкМ НУК и 0,1 мкМ ИМК (3-индолилмасляную кислоту) при чередовании высоких (5-7,5 мкМ) и низких (1 мкМ) концентраций БАП, укореняют побеги на среде Мурасиге-Скуга, дополненной 1 мкМ НУК.

Способ осуществляют в два этапа.

1 этап. Цветки берут в фазе бутонизации (VII этап органогенеза), когда они плотно закрыты листочками обертки, и в условиях ламинарбокса проводят стерилизацию. Части трубки околоцветника и цветоножки делят на фрагменты размером не более 3×3 мм и помещают на питательные среды.

Питательные среды готовят по прописи Мурасиге и Скуга (MS), содержащие 30 г/л сахарозы. В них вводят фитогормоны в разных концентрациях: 3 мкМ НУК в сочетании с 8 мкМ БАП, pH 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.

Через 30 суток в ткани эксплантов развиваются вегетативные побеги достаточной величины для пересадки на среды размножения. В результате прямого органогенеза получают полноценные вегетативные побеги *I.sibirica* в количестве 10-15 штук на один эксплант.

2 этап. На этапе собственно микрклонального размножения *I.sibirica* L субкультивирование побегов проводят на питательной среде, содержащей 5-7,5 мкМ БАП, 0,1 мкМ НУК и 0,1 мкМ ИМК, по схеме чередуя среды с высоким и низким (1 мкМ БАП) содержанием цитокинина, (используются питательные среды: Мурасиге-Скуга или Гамборга и Эвелега (B₅), дополненные 5-7,5 мкМ БАП, 0,1 мкМ НУК и 0,1 мкМ ИМК). Данные питательные среды позволяют получать морфологически не измененные побеги с хорошей способностью к укоренению (табл.1).

Укоренение проводят на питательной среде Мурасиге-Скуга, дополненной 1 мкМ НУК. Способность к укоренению на данной среде составляет 100%. После укоренения растения переносят в контейнеры с почвой и выращивают обычным способом до получения стандартной рассады с закрытой корневой системой.

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
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50

вариабельности полученных регенерантов. Для подтверждения идентичности регенерантов материнским растениям *I.sibirica* сорт Стерх, полученных в результате прямой регенерации побегов из тканей трубки околоцветника, проводят анализ с помощью ПЦР. Методом RAPD-анализа полногеномной ДНК не выявлено никаких отличий между материнскими экземплярами *I.sibirica* сорт Стерх и полученными от них растениями-регенерантами.

В результате использования микроклонального размножения *I.sibirica* от одного экспланта за 4 месяца культивирования получают около 100 штук растений-регенерантов, морфологически генетически идентичных материнским.

Таблица 1

Влияние концентрации БАП и способа культивирования на число и высоту побегов у *I.sibirica* сорт Стерх

БАП, мкМ	Без ауксинов				С ауксинами (0.1 мкМ НУК+0.1 мкМ ИМК)			
	Без чередования		Чередование сред с 1 мкМ БАП		Без чередования		Чередование сред с 1 мкМ БАП	
	ч.п.	в.р., мм	ч.п.	в.р., мм	ч.п.	в.р., мм	ч.п.	в.р., мм
2,5	2,5±0,5	40,5±7,7	1,8±0,1	55,3±3,6	2,2±0,3	35,7±3,1	2,4±0,4	42,7±2,3
5,0	1,7±0,1	41,4±9,3	2,0±0,1	56,0±4,6	1,9±0,3	34,7±3,8	1,9±0,2	52,3±3,0
7,5	1,9±0,3	42,7±3,0	2,0±0,3	52,0±6,3	1,5±0,2	55,0±4,2	1,8±0,2	52,1±3,1
10,0	1,5±0,2	65,3±4,6	1,5±0,2	53,4±3,6	1,5±0,3	53,6±5,9	2,0±0,5	57,1±5,5
1,0 контр	1,3±0,1	58,4±5,8						
Примечание:								
1) ч.п. - число побегов;								
2) в.р. - высота растения.								

Формула изобретения

Способ микроклонального размножения ириса Сибирского (*I.sibirica* L.) *in vitro*, включающий, культивирование эксплантов на питательной среде, размножение и укоренение регенерантов, отличающийся тем, что применяют метод прямой регенерации, минуя каллусную культуру, а в качестве эксплантов используют фрагменты трубки околоцветника и цветоножки, причем экспланты культивируют в течение 30 суток на питательной среде Мурасиге-Скуга (MS), в которую вносят фитогормоны 3 мкМ НУК в сочетании с 8 мкМ БАП и добавляют 0,6% агара, затем полученные побеги переносят на питательную среду, дополненную 5-7,5 мкМ БАП, 0,1 мкМ НУК и 0,1 мкМ ИМК, размножают по схеме, чередуя среды с высоким (5-7,5 мкМ) и низким (1 мкМ) содержанием БАП, укореняют на питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 1 мкМ НУК.