



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A01H 4/00 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2024111647, 26.04.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.04.2024

Дата регистрации:
05.11.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.04.2024

(45) Опубликовано: 05.11.2024 Бюл. № 31

Адрес для переписки:

117593, Москва, ул. Соловьинный пр-д, 14, кв.
352, Попова Анна Олеговна

(72) Автор(ы):

Ибрагимова Салмаз Магомедсаидовна (RU),
Силкова Ольга Геннадьевна (RU),
Кочетов Алексей Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Федеральный
исследовательский центр Институт
цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук" (ИЦиГ СО РАН)
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA A. et
al. Effective and simple in vitro regeneration
system of Miscanthus sinensis, M. x giganteus and
M. sacchariflorus for planting and biotechnology
purposes., Biomass and Bioenergy., 2017., vol. 107.,
p. 219-226. ШЕХОВЦОВ С.В и др.
Биотехнологический потенциал новой
технической культуры - мискантус сорт
СОРАНОВСКИЙ., (см. прод.)

(54) СПОСОБ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO СОРТА
МИСКАНТУСА "СОРАНОВСКИЙ"

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и представляет собой способ получения посадочного материала в культуре *in vitro* для сорта мискантуса «Сорановский» и переноса их в условия *ex vitro* для дальнейшего роста и развития. Для получения микроклонов используются молодые побеги от растений доноров 5-6-месячного возраста. Вырезаются два верхних узла с фрагментами стебля сверху и снизу размером около 5-7 мм. После стерилизации узлы побегов помещают на питательную среду для

активации интеркалярных меристем, расположенных в узлах, и образования побегов, а далее на среду для мультипликации побегов. На этапе тиражирования отбираются клоны с множеством микропобегов, часть разделяют на отдельные микрорастения и помещают на среду для укоренения, а часть разделяют на пучки по 3-4 побега и помещают вновь на среду для мультипликации. Изобретение позволяет увеличить количество микроклонов на выходе в одном пассаже. 4 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013, т. 17, N 4/1, с. 765-771. ПОЦЕЛУЕВ О.М. и др. Основные способы размножения *Miscanthus* для создания технических промышленных плантаций в умеренном

R U 2 8 2 9 6 5 2 C 1

R U 2 8 2 9 6 5 2 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A01H 4/00 (2024.08)

(21)(22) Application: **2024111647, 26.04.2024**

(24) Effective date for property rights:
26.04.2024

Registration date:
05.11.2024

Priority:

(22) Date of filing: **26.04.2024**

(45) Date of publication: **05.11.2024** Bull. № 31

Mail address:

**117593, Moskva, ul. Solovinyj pr-d, 14, kv. 352,
Popova Anna Olegovna**

(72) Inventor(s):

**Ibragimova Salmaz Magomedsaidovna (RU),
Silkova Olga Gennadevna (RU),
Kochetov Aleksej Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
nauchnoe uchrezhdenie "Federalnyj
issledovatel'skij tsentr Institut tsitologii i genetiki
Sibirskogo otdeleniya Rossijskoj akademii nauk"
(ITsiG SO RAN) (RU)**

(54) **METHOD FOR CLONAL MICROPROPAGATION IN CULTURE IN VITRO OF MISCANTHUS "SORANOVSKIY"**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and represents a method of producing planting material in culture *in vitro* for the variety of miscanthus "Soranoskiy" and their transfer into ex vitro conditions for further growth and development. To obtain micro-clones, young shoots from 5-6-month-old plants are used. Two upper nodes are cut with stem fragments from above and from below about 5-7 mm in size. After sterilization, the sprout units are placed on a nutrient medium for activation of intercalary meristems located

in the units, and formation of sprouts, and then on the sprout multiplication medium. At the stage of replication, clones with multiple micro-sprouts are selected, part is divided into separate micro-plants and placed on a rooting medium, and part is divided into bunches of 3-4 sprouts and placed again on the medium for multiplication.

EFFECT: invention allows increasing the number of micro-clones at the outlet in one passage.

1 cl, 4 dwg, 1 ex

RU 2 829 652 C1

RU 2 829 652 C1

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности, к созданию промышленных технических плантаций мискантуса сорта Сорановский с использованием микроклонов, полученных в культуре *in vitro* и переносу их в условия *ex vitro* для дальнейшего роста и развития. Стебли мискантуса являются источником высококачественной целлюлозы, которая служит сырьем для целого спектра биоразлагаемой продукции, а также продуктов ее химической модификации. Сорт мискантуса «Сорановский», созданный на основе вида *Miscantus sacchariflorus (Maxim)*, обладает значительным преимуществом, по сравнению с другими видами и сортами, созданными на основе видов *M. sinensis*, *M. giganteus*, *M. purpurascens*. Вид *M. sacchariflorus* является холодостойкими занимает северные ареалы распространения среди видов данного рода [Слынько Н.М., Горячкова Т.Н., Шеховцов С.В и др. Биотехнологический потенциал новой технической культуры - мискантус сорт СОРАНОВСКИЙ. // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013, Т. 17, № 4/1, С. 765-771], [Дорогина О.В., Васильева Нуждина О.Ю. и др. Ресурсный потенциал некоторых видов рода *Miscanthus Anderss.* в условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири. // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2018, Т. 22, № 45, С. 553-559]. Сорт Сорановский характеризуется высоким выходом целлюлозы у зрелых растений и составляет - 53,6 %.[Гисматулина Ю.А. Сравнительный химический состав пяти урожаев мискантуса сорта Сорановский: растение в целом, лист, стебель. // Успехи современного естествознания (химические науки), 2016, № 4, С. 23-26]. Плантации, заложенные клонами мискантуса единожды, способны давать высококачественную продукцию в течение 20 лет [Слынько Н.М., Горячкова Т.Н., Шеховцов С.В и др. Биотехнологический потенциал новой технической культуры - мискантус сорт СОРАНОВСКИЙ. // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013, Т. 17, № 4/1, С. 765-771]. Вид обладает низкой семенной продуктивностью, поэтому для массового производства посадочного материала и расширения ареалов его возделывания необходима разработка способа вегетативного размножения. Современные способы клонального микроразмножения в культуре *in vitro* позволяют получать оздоровленный, генетически однородный, посадочный материал для производства в массовом количестве и закладке промышленных плантаций.

Основой клонального микроразмножения *in vitro* является активация развития уже существующих меристем, что позволяет получать генетически идентичный сорту материал. Мискантус - это типичный злак, имеющий в узлах стебля интеркалярные (вставочные) меристемы. Технология микроклонального размножения мискантуса хорошо разработана для сортов созданных на основе видов *M. giganteus*, *M. sinensis Anderss* и активно используется в мировой практике стран Европы, США, а также в индо-китайском регионе - Китае, Японии, Корее. Отмечается, что регенерационная активность в каждом случае определяется особенностями генотипа и типом экспланта. Сорта этих видов обладают высокой продуктивностью биомассы и качеством продукции, но в то же время, являются очень чувствительными к холоду. В качестве эксплантов используются незрелые соцветия, или его части, апикальные и пазушные меристемы, что значительно повышает выход растений регенерантов, по сравнению с технологией размножения, основанной на делении корневищ, укоренения зеленых черенков. В литературе имеются данные о клональном размножении *Miscantus sacchariflorus (Maxim)*, с использованием незрелых соцветий или его частей для клонального микроразмножения. Отмечалось эффективность использования фитогормона БАП различной концентрации на разных этапах культивирования для стимуляции образования микропобегов из незрелых метелок (соцветий) мискантуса

[Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Ceraży-Waliszewska J., et al. Effective and simple in vitro regeneration system of *Miscanthus sinensis*, *M. × giganteus* and *M. sacchariflorus* for planting and biotechnology purposes. // *Biomass and Bioenergy*. - 2017. - Vol. 107. - P. 219-226]. Данный способ размножения посадочного материала зависит от времени года. Стадия каллусообразования в процессе культивирования незрелых соцветий или же частей соцветия не исключает появления соматоклональных вариантов, отклоняющихся от исходного генотипа, что требует контроля полученных микроклонов.

Компоненты питательных сред для микроразмножения различных видов мискантуса, включающие среду Мурасиге и Скуга, а также концентрации фитогормонов БАП и индолилмасляной кислоты являются наиболее близкими к предлагаемому изобретению.

Технический результат изобретения заключается в повышении выхода нормально сформированных микрорастений (клонов) генетически идентичных исходному сорту, а также ускорению получения клонов в одном пассаже, за счет повторного культивирования конгломерата микропобегов на среде для мультипликации.

Использование узлов побегов мискантуса (вегетативной части растения) в качестве эксплантов для массового размножения сорта Сорановский, позволяет проводить работы круглогодично.

Для инициации регенерации побегов из интеркалярных меристем, расположенных в узлах стеблей, экспланты помещаются на питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением на первом этапе культивирования, фитогормона 6-бензил-аминопурина (БАП) в концентрации 5 мг/л, аминокислоты L-цистеина -50 мг/л, сахарозы -30 г/л, инозитола - 100 мг/л, 7 г/л агара. На этапе мультипликации экспланты помещаются на среду того же основного состава, но с уменьшенной концентрацией фитогормона БАП- 3 мг/л и 0,45 мг/л индолил-3- масляной кислоты (ИМК). На данном этапе отбираются клоны с множеством микропобегов, часть микропобегов отделяют от экспланта, разделяют на «пучки» по 3-4 микропобега и пассируют вновь на среду для культивирования, таким образом, повышая коэффициент мультипликации, а остальные микропобеги разделяют и помещают на среду для укоренения. Для укоренения используют 1/2 среды МС содержащую 0,4 мг/л индолил-3-масляной кислоты. Весь процесс культивирования эксплантов проводится в световой комнате с интенсивностью освещения 2500 люкс, 16 часовом фотопериоде и температурном режиме 21-22°C. Укорененные микрорастения высаживают в горшочки с вермакулитно-перлитной смесью с целью дальнейшего развития и высадки в открытый грунт.

Способ тиражирования микроклонов в процессе культивирования, деление микроклонов на «пучки» и дальнейшее их культивирование на питательной среде, увеличивает количество микроклонов на выходе в одном пассаже. Снижение концентрации БАП в сочетании с ИМК ведет в процессе культивирования к усилению пролиферации, а в дальнейшем к увеличению числа микропобегов на одном экспланте.

Предлагаемый способ клонального микроразмножения позволяет производить микроклоны круглогодично, т.к. используются вегетативные части растений. Для массового получения микроклонов используются интеркалярные меристемы, гарантирующие генетическую идентичность исходного генотипа. Для стерилизации эксплантов используется доступный коммерческий отбеливатель «Domestos», с добавлением нескольких капель TWEEN-20. Одноэтапная процедура стерилизации заданной концентрации не приводит к повреждению тканей эксплантов. Данный способ стерилизации показал свою эффективность, степень инфицируемости эксплантов на этапе введения в культуру составляла 5-7 %.

Предлагаемое изобретение является новым в отношении мискантуса сорта

Сорановский, так как в отечественной научной литературе не найдено решения с заявленной совокупностью отличительных признаков. Способ включает в себя стерилизацию узлов побегов с их дальнейшим культивированием на питательной среде, размножением микропобегов, укоренением и адаптацией к условиям *ex vitro* в горшочках.

5 Пример 1. Реализация способа клонального микроразмножения

Из собранных в теплице молодых побегов мискантуса, с растений 5-6 месячного возраста, вырезаются два верхних узла с фрагментом стебля сверху и снизу размером около 5-7 мм и помещаются в раствор «Domestos» в концентрации 15 % с экспозицией 20 минут. После чего, экспланты трехкратно по 5 мин промывают стерильной водой, 10 подсушивают на стерильной фильтровальной бумаге. Далее стерильные экспланты помещают по 5-6 штук в сосуды объемом 400 мл на питательную среду для активации меристем узлов следующего состава: 6-бензил-аминопурина (6-БАП) в концентрации 5 мг/л, аминокислоты L-цистеина -50 мг/л, сахарозы -30 г/л, инозитола - 100 мг/л, 7 г/л агара. После активации меристем - появления первых микропобегов экспланты 15 пассируют на среду для мультипликации побегов того же основного состава, но с уменьшенной концентрации 6-БАП - 3 мг/л и добавлением 0,45 мг/л индолил-3-масляной кислоты (ИМК). Начало культивирования узлов стеблей (а) и активация интеркалярных меристем (б) на среде, содержащей 6-БАП -5 мг/л, изображены на фиг. 1.

После массового образования побегов на экспланте, часть эксплантов делят на 20 «пучки» и вновь культивируют на среде для мультипликации, таким образом, увеличивая получение микроколонов в одном пассаже, часть разделяют на отдельные микропобеги высотой до 5 см и помещают среду для укоренения в пробирки. Среднее количество микроклонов формирующихся на один эксплант у сорта мискантуса Сорановский составил 20-22 побега на данной среде для культивирования. Пролиферация у сорта 25 Сорановский на среде культивирования, содержащей 6-БАП- 3мг/л и ИМК 0,45 мг/л (а) и разделение конгломерата на "пучки" для дальнейшего тиражирования (б), изображены на фиг. 2.

Для укоренения микропобегов в пробирках используют 1/2 среды МС содержащую L-цистеина - 50 мг/л, сахарозы - 15 г/л, инозитола - 100 мг/л, 7 г/л агара и добавляют 30 0,4 мг/л индолил-3-масляной кислоты. Укоренение микроклонов мискантуса происходит в течение 2-4 недель. Ризогенез у сорта Сорановский на питательной среде, содержащей 0,4мг/л ИМК, изображен на фиг. 3.

Растения с длиной корней 1,5-2 см помещают в горшочки объемом 0,5 л с вермакулитно-перлитной смесью, первоначально сеянцы закрывают пластиковыми 35 стаканчиками, а после адаптации снимают, и дорастивают до момента высадки в поле. На фиг. 4 показана адаптация микроклонов к росту в теплице.

Весь цикл получения микроклонов у сорта мискантуса Сорановский составляет 4-4,5 месяца.

40 (57) Формула изобретения

Способ клонального микроразмножения в культуре *in vitro* сорта мискантуса «Сорановский», включающий сбор молодых побегов мискантуса с растений 5-6- 45 месячного возраста, вырезание двух верхних узлов с фрагментом стебля сверху и снизу размером около 5-7 мм и размещение в растворе «Domestos» в концентрации 15% с экспозицией в течение 20 минут с последующим трехкратным промыванием по 5 минут стерильной водой, подсушиванием на стерильной фильтровальной бумаге и расположением по 5-6 штук в сосуды объемом 400 мл на питательную среду следующего состава: 6-бензил-аминопурина (БАП) в концентрации 5 мг/л, аминокислоты L-цистеина

- 50 мг/л, сахарозы - 30 г/л, инозитола - 100 мг/л, 7 г/л агара с последующим пассированием эксплантов на среду того же основного состава, но с уменьшенной концентрацией БАП - 3 мг/л и добавлением 0,45 мг/л индолилмасляной кислоты, микропобеги высотой до 5 см помещают в пробирки со средой для укоренения, растения с длиной корней 1,5-2 см помещают в горшочки объемом 0,5 л с вермакулитно-перлитной смесью, первоначально сеянцы закрывают пластиковыми стаканчиками, а после адаптации снимают и доращивают до момента высадки в поле.

10

15

20

25

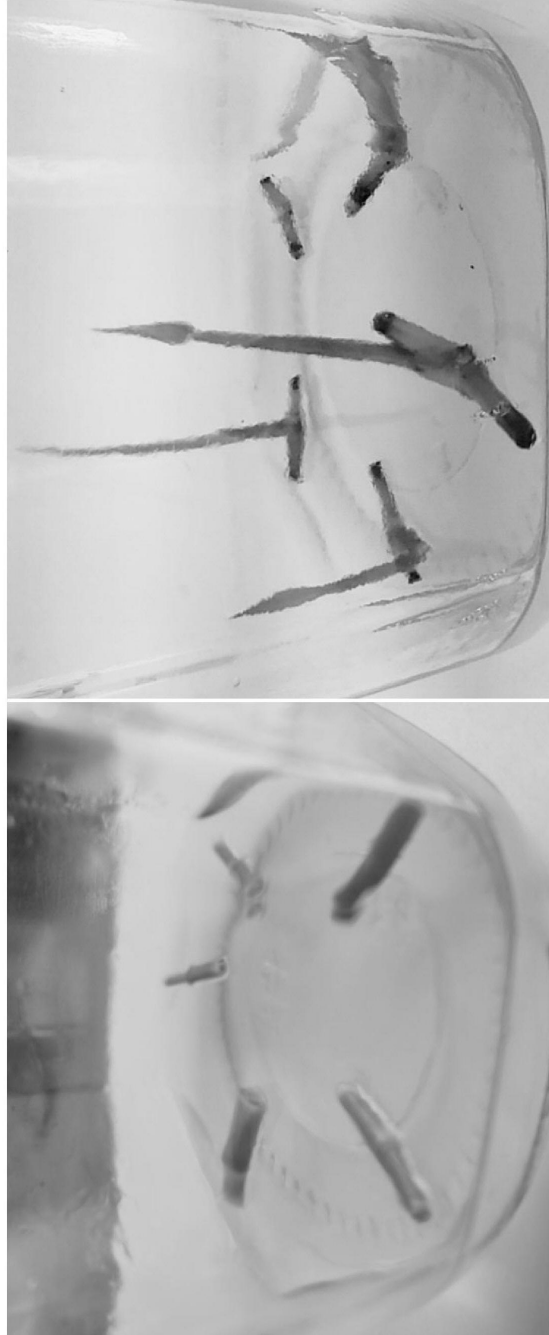
30

35

40

45

1

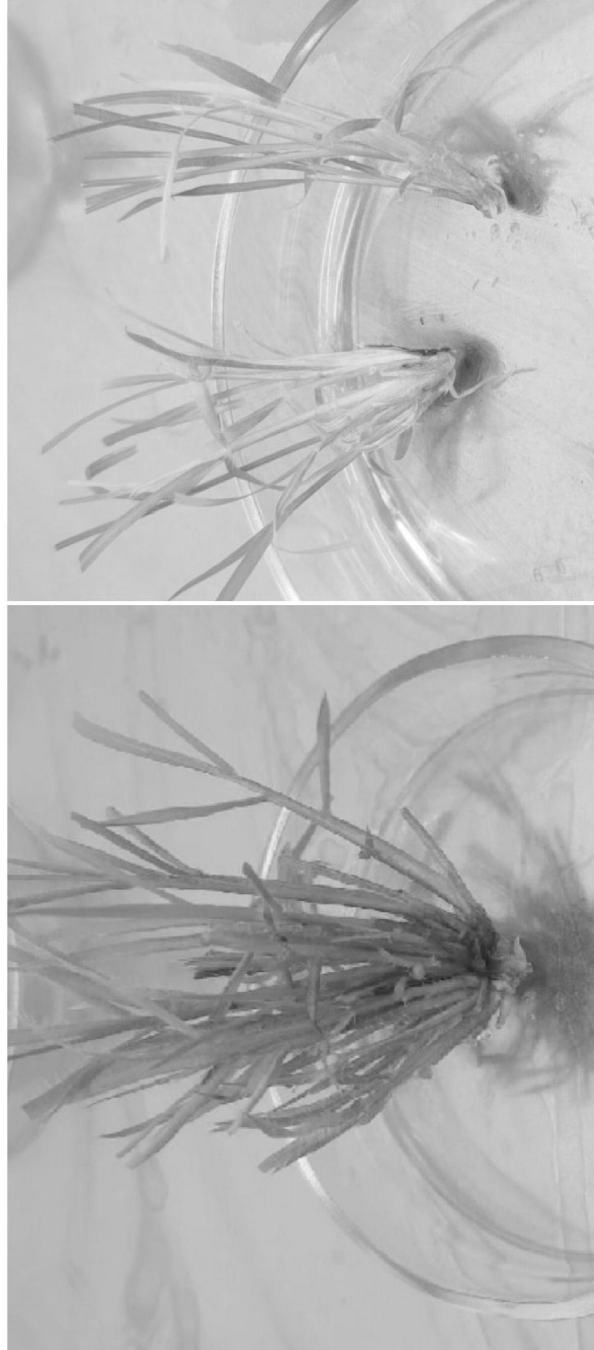


б)

а)

Фиг. 1

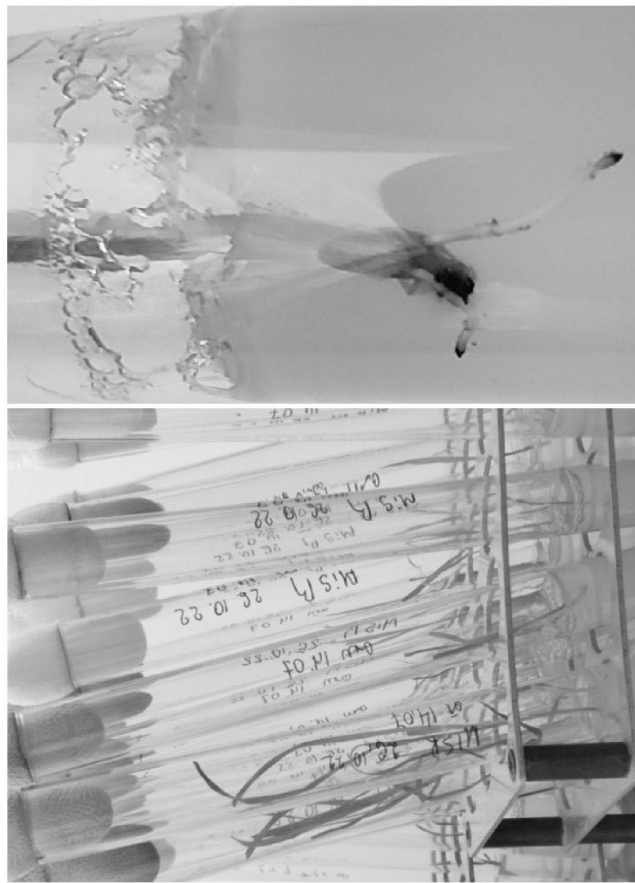
2



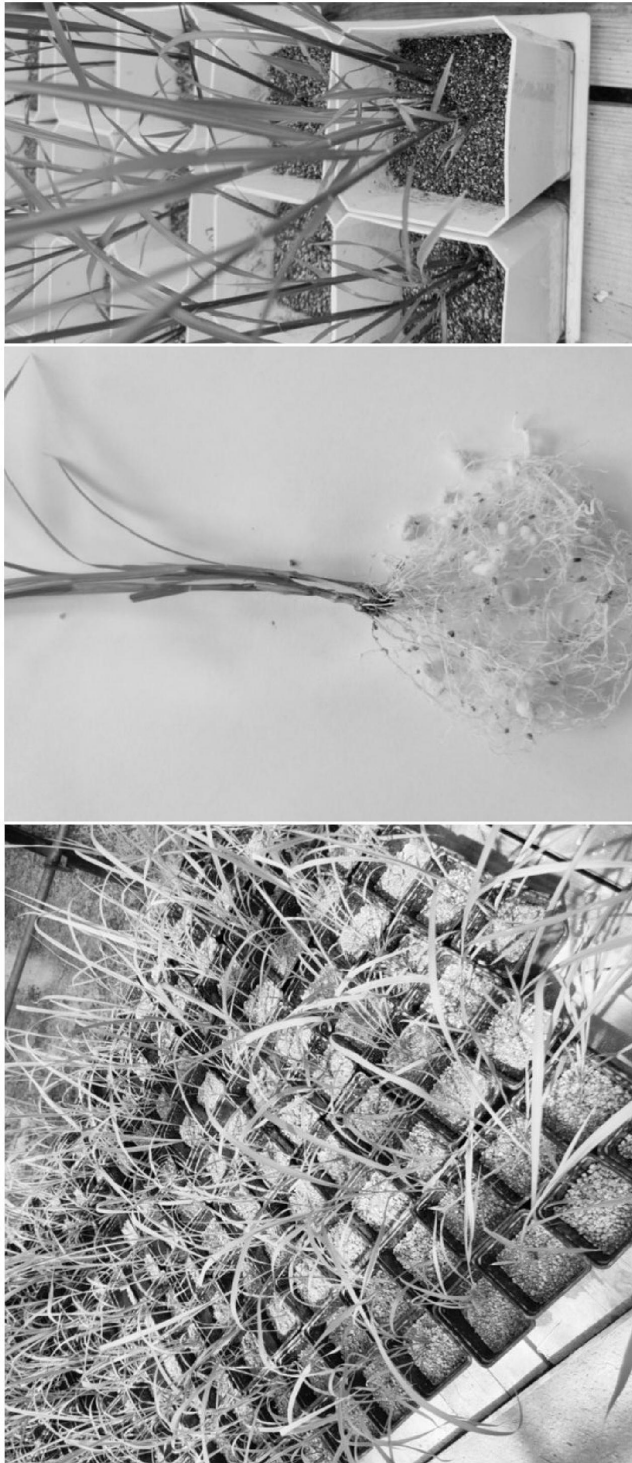
б)

а)

Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4