



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A01H 4/00 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019138744, 29.11.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
29.11.2019

Дата регистрации:  
16.09.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.11.2019

(45) Опубликовано: 16.09.2020 Бюл. № 26

Адрес для переписки:

127276, Москва, ул. Ботаническая, 4, м.н.с.  
лаборатории биотехнологии растений ГБС  
РАН Раева-Богословская Е.Н.

(72) Автор(ы):

Раева-Богословская Екатерина Николаевна  
(RU),  
Молканова Ольга Ивановна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Главный ботанический  
сад им. Н.В. Цицина Российской академии  
наук (ГБС РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: ВЫСОЦКИЙ, В.А.,

Биотехнологические методы в системе  
производства оздоровленного посадочного  
материала и селекции плодовых и ягодных,  
автореферат диссертации, Москва, 1998.  
ХРОМОВ Н.В, Оценка генофонда ирги по  
хозяйственно-биологическим признакам и  
технология размножения в условиях  
Тамбовской области, автореферат  
диссертации, Мичуринск, 2007. (см. прод.)

(54) Способ клонального микроразмножения сортов ирги ольхолистной (*Amelanchier alnifolia* (Nutt.) Nutt. Ex M.Roem.)

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой способ размножения в культуре *in vitro* сортов *Amelanchier alnifolia* (Nutt.) Nutt. Ex M.Roem., включающий стерилизацию апикальных и латеральных почек с последующим культивированием на питательной среде, размножение микропобегов, их дальнейшее укоренение, адаптацию растений-регенерантов к

условиям *ex vitro*. После адаптации к нестерильным условиям и последующего дорастивания получают стандартные саженцы сортов ирги ольхолистной с закрытой корневой системой. Предлагаемый способ клонального микроразмножения ирги ольхолистной позволяет получить высокий коэффициент размножения и, как следствие, необходимое количество саженцев. 5 ил.

(56) (продолжение):

PRUSKI K., et al, Micropropagation of four cultivars of Saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990, Vol,21,p. 103-109. YANG F.,et al, In vitro proliferation of Saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt) is affected by plant growth regulators and their concentrations but less by carbon source, Indian Journal of Biotechnology, 2017, Vol. 16, p. 648-654.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*A01H 4/00 (2020.02)*

(21)(22) Application: **2019138744, 29.11.2019**

(24) Effective date for property rights:  
**29.11.2019**

Registration date:  
**16.09.2020**

Priority:

(22) Date of filing: **29.11.2019**

(45) Date of publication: **16.09.2020** Bull. № 26

Mail address:

**127276, Moskva, ul. Botanicheskaya, 4, m.n.s.  
laboratorii biotekhnologii rastenij GBS RAN  
Raeva-Bogoslovskaya E.N.**

(72) Inventor(s):

**Raeva-Bogoslovskaya Ekaterina Nikolaevna  
(RU),  
Molkanova Olga Ivanovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki Glavnyj botanicheskij sad  
im. N.V. Tsitsina Rossijskoj akademii nauk (GBS  
RAN) (RU)**

(54) **METHOD FOR CLONAL MICROREPRODUCTION OF WESTERN SERVICEBERRY VARIETIES  
(AMELANCHIER ALNIFOLIA (NUTT\_) NUTT\_ EX M\_ROEM\_)**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention represents a method of reproduction in culture in vitro of Amelanchier alnifolia (Nutt.) varieties Nutt. Ex M.Roem., including sterilization of apical and lateral kidneys with subsequent cultivation on nutrient medium, multiplication of micro-races, their further rooting, adaptation of plants-regenerants to conditions ex vitro.

After adaptation to non-sterile conditions and further growing, standard seedlings of western serviceberry with closed root system are obtained.

EFFECT: proposed method of clonal microreproduction of western serviceberry allows obtaining high reproduction coefficient and, consequently, required number of seedlings.

1 cl, 5 dwg

**1 C 1  
2 7 3 2 4 5 0  
R U**

**R U  
2 7 3 2 4 5 0  
C 1**

Изобретение относится к области биотехнологии растений, в частности к способам размножения и может быть использовано для массового получения качественного посадочного материала. Полученные растения могут быть использованы в таких отраслях сельского хозяйства как: плодоводство, питомниководство, лекарственное растениеводство и в качестве посадочного материала при создании объектов ландшафтной архитектуры.

Предлагаемое изобретение является новым, так как в патентной и научно-технической литературе не найдено решения с заявленной совокупностью отличительных признаков.

Иргу выращивают в качестве плодовой и декоративной культуры. В ирге обнаружены полезные для человека биологически активные вещества, что делает перспективным применение различных частей данного растения в лечебных целях [2, 3].

Известны генеративный и вегетативный способы размножения данной культуры. Генеративный способ размножения не приемлем для получения сортового посадочного материала ирги вследствие генотипической неоднородности потомства. У ирги отмечена специфическая особенность: прорастание семян на второй год после их посева, что усложняет быстрое получение высококачественного посадочного материала.

Из вегетативных способов размножения применяют: деление куста, выкапывание корневых отпрысков, черенкование и клональное микроразмножение. Деление куста позволяет получить от 4 до 6 дочерних растения, чего недостаточно для коммерческого использования данного метода размножения. Некоторые сорта ирги не формируют корневые отпрыски или формируют их в ограниченном количестве.

Получение посадочного материала видовых представителей *A. alnifolia* и *A. canadensis* (L.) Medik. зеленым черенкованием было изучено Н.В. Хромовым (2007) и А.В. Степановой (2017). По данным исследования Н.В. Хромова выход укорененных черенков составил 60% [5]. Из опытов А.В. Степановой получения посадочного материала ирги зелеными черенками в условиях подогрева субстрата и искусственного тумана укореняемость варьировала в пределах от 65 до 75% [4]. Данный способ размножения зависит от времени года и многих других факторов, что также затрудняет стабильное получение посадочного материала.

В зарубежной литературе имеются сообщения о культивировании тканей некоторых представителей рода *Amelanchier* Medik. *in vitro*. Отмечалась эффективность использования питательной среды Мурасиге-Скуга (1962) (MS) и фитогормона 6-бензиламинопурина (6-БАП) в сравнении с тидиазуроном, зеатином и кинетином для клонального микроразмножения данной культуры [6, 7].

Наиболее близким предлагаемому изобретению в отечественной литературе является способ размножения *Amelanchier canadensis* (L.) Medik. в культуре *in vitro*, описанный в диссертации А.В. Высоцкого (1995). Максимальный коэффициент размножения был достигнут через 1,5 месяца на питательной среде MS с добавлением 10 мг/л 2-изопентиладенина (2-ИП) и составил  $7,0 \pm 0,8$ . Наибольшее число укоренившихся микропобегов было получено при замачивании на 18 часов в растворе  $\beta$ -индолилмасляной кислоты (ИМК) 25 мг/л и составил 87% [1]. Недостатками данного метода является требование существенных затрат дорогостоящего реактива (2-ИП) и трудоемкость процесса. При разработке методики клонального микроразмножения для каждого вида и генотипа требуется индивидуальный подбор регуляторов роста и их концентраций.

Изобретение представляет собой способ размножения в культуре *in vitro* сортов *Amelanchier alnifolia*, включающий стерилизацию апикальных и латеральных почек с последующим культивированием на питательной среде, размножение микропобегов,

их дальнейшее укоренение, адаптацию растений-регенерантов к условиям *ex vitro*. После адаптации к нестерильным условиям и последующего доращивания получают стандартные саженцы сортов ирги ольхолистной с закрытой корневой системой.

#### Ход работы

5 В ходе наших исследований разработана методика клонального микроразмножения сортов *Amelanchier alnifolia* (Nutt.) Nutt. Ex M.Roem.

10 Стерилизацию эксплантов проводили в три этапа: обработка раствором фунгицида комплексного действия 10 минут, обработка 70% раствором этанола ( $C_2H_6O$ ) 1 минута, обработка 7% раствором гипохлорида кальция ( $Ca(ClO)_2$ ) 7 минут с добавлением Tween 20.

На стадии собственно размножения используется питательная среда MS, дополненная менее дорогостоящим, чем 2-ИП, регулятором роста 6-БАП (6-бензиламинопурин) в различных концентрациях (0,2; 0,3; 0,5; 1,0 мг/л). Через 30 дней измеряли высота микропобегов и рассчитан коэффициент размножения.

15 Наибольшую высоту микропобегов наблюдали на питательной среде, содержащей 6-БАП в концентрации 0,3 мг/л и составила у сорта Красноярская  $19,1 \pm 1,4$  мм, у сорта Mandan  $18,0 \pm 1,5$  мм. Максимальный коэффициент размножения был отмечен на питательной среде, содержащий 1,0 мг/л 6-БАП: у сорта Красноярская  $10,1 \pm 1,4$ , у сорта Mandan  $7,6 \pm 0,6$ , высота микропобегов составляла  $14,7 \pm 1,4$  и  $14,0 \pm 1,3$  соответственно (фиг. 1). Для более успешного прохождения этапов укоренения было установлено, что  
20 (фиг. 1). Для более успешного прохождения этапов укоренения было установлено, что высота растений-регенерантов должна превышать 15 мм. Из этого следует, что для достижения оптимальной высоты микропобегов перед стадией ризогенеза требуется предварительное культивирование эксплантов на питательной среде, содержащей 0,3  
25 мг/л 6-БАП. В условиях лаборатории микропобеги сортов *Amelanchier alnifolia* Nutt. культивировали при искусственном освещении (3000 лк) и фотопериоде 16/8 ч., температуре 23-25°C и влажности 70%.

На этапе укоренения использовали агаризированную среду  $1/2$  MS, содержащую 20 мг/л сахарозы. Были испытаны такие регуляторы роста как  $\beta$ -индолилмасляная кислота (ИМК) и индолилуксусная кислота (ИУК) в различных концентрациях. Наилучшие  
30 результаты были достигнуты на питательной среде, содержащей 1 мг/л ИМК, укореняемость сорта Красноярская - 90%, сорта Mandan - 71% (фиг. 3). Растения с хорошо развитой корневой системой высаживают на смесь песка, торфа и дерновой листовой земли в соотношении 1:1:1.

35 Этапы пролиферации, ризогенеза и адаптированные растения-регенеранты представлены на Фиг. 2; 4; 5.

#### Источники информации

1. Высоцкий, В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений /  
40 В.А. Высоцкий: Автореферат дисс. на соискание учен, степени д-ра с.-х. наук - М., 1998. - 44 с.

2. Горбунов, А.Б. Изучение видов ирги (*Amelanchier Medik.*) с целью использования в селекции. / А.Б. Горбунов, В.С. Симагин, С.В. Асбаганов, А.Г. Куклина // Плодоводство и Ягодководство России - М., - 2009. - Т. 21. - С. 92-102.

45 3. Лаксаева, Е.А. Плоды растений рода Ирги (*Amelanchier Medik.*) как источник биологически активных веществ и минералов. / Е.А Лаксаева, // Российский медико-биологический вестник им. Академика И.П. Павлова. - Рязань. - 2018. - Т. 26. - №2. - С. 296-304.



4. Степанова А.В. Технология размножения ирги методом укоренения зеленых черенков в условиях искусственного тумана с применением подогрева субстрата / А.В. Степанова // Успехи современной науки и образования.: Издательство Ключев Сергей Васильевич - 2017. - Т. 2. - №3. - С .82-84.

5 5. Хромов Н.В. Оценка генофонда ирги по хозяйственно-биологическим признакам и технология размножения в условиях Тамбовской области / Н.В. Хромов: Автореферат дисс. на соискание учен, степени канд. с.-х. наук. - Мичуринск, 2007. - 22 с.

6. Pruski K., Nowak J., Grainger G. Micropropagation of four cultivars of Saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. - 1990. - Vol. 21-P. 103-109.

7. Yang F., Du B. In vitro proliferation of Saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt) is affected by plant growth regulators and their concentrations but less by carbon source // Indian Journal of Biotechnology. - 2017. - Vol. 16. - P. 648-654.

(57) Формула изобретения

15 Способ клонального микроразмножения сортов *Amelanchier alnifolia* Nutt. включает вычленение апикальных и латеральных почек, трехступенчатую стерилизацию (раствор фунгицида комплексного действия 10 минут, 70%  $C_2H_6O$  1 минута, 7%  $Ca(ClO)_2$  7 минут), помещение эксплантов на питательную среду MS (Murashige and Skoog (1962)) с  
20 добавлением 1,0 мг/л 6-БАП, размножение микропобегов, пересадка на питательную среду MS с добавлением 0,3 мг/л 6-БАП с целью достижения оптимальной для укоренения высоты микропобегов, их последующее укоренение на среде  $1/2$  MS, содержащей 20 мг/л сахарозы и ИМК в концентрации 1 мг/л, адаптацию растений-регенерантов к условиям *ex vitro* посредством высаживания на смесь песка, торфа и  
25 дерновой листовой земли в соотношении 1:1:1.

30

35

40

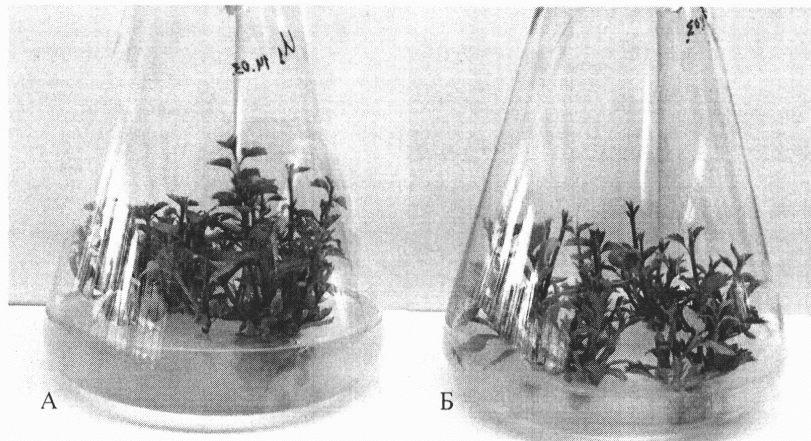
45

На Фиг. 1. Влияние концентраций 6-БАП на морфогенетические показатели сортов *Amelanchier alnifolia*

Концентрация 6-БАП, мг/л	Высота микропобегов, мм		Коэффициент размножения	
	Сорта		Сорта	
	Красноярская	Mandan	Красноярская	Mandan
Контроль	10,0	10,0	1,0	1,0
0,2	17,3±2,1	16,4±1,7	1,8±0,3	2,1±0,4
0,3	19,1±1,4	18,0±1,5	1,9±0,3	1,9±0,4
0,5	16,2±2,9	16,7±2,9	6,5±0,7	5,4±0,9
1,0	14,7±1,4	14,0±1,3	10,1±1,4	7,6±0,6

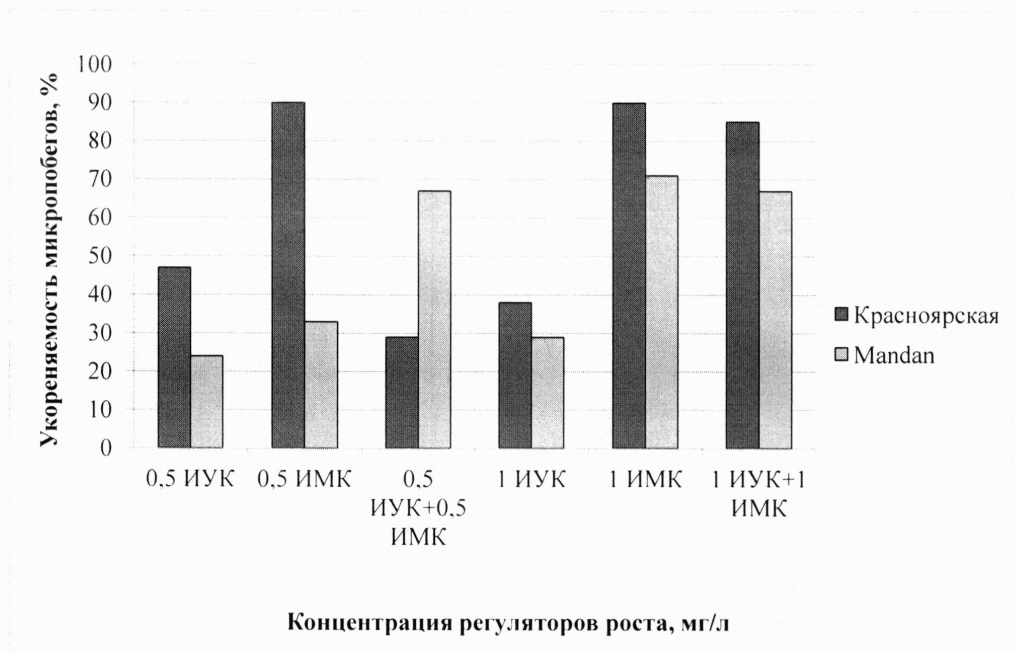
Фиг. 1

На Фиг. 2. Этап пролиферации сортов *Amelanchier alnifolia* на питательной среде, содержащей 1 мг/л 6-БАП: А – Красноярская; Б – Mandan



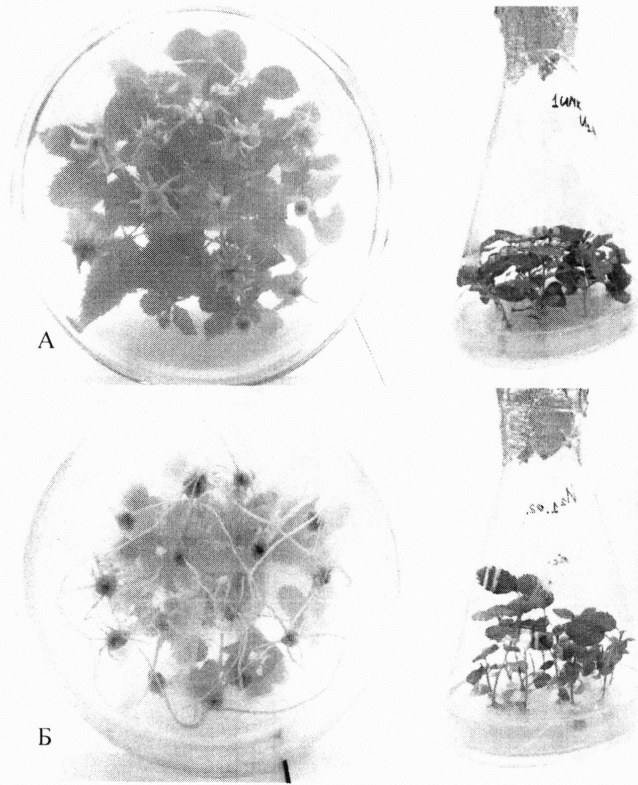
Фиг. 2.

На Фиг. 3. Влияние регуляторов роста на укореняемость сортов *Amelanchier alnifolia*



Фиг. 3.

На Фиг. 4. Этап ризогенеза сортов *Amelanchier alnifolia* на питательной среде, содержащей 1 мг/л ИМК: А – Красноярская; Б - Mandan





На Фиг. 5. Адаптированные растения сортов *Amelanchier alnifolia*



Фиг. 5.