



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A01H 4/00 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019138745, 29.11.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.11.2019

Дата регистрации:
12.08.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.11.2019

(45) Опубликовано: 12.08.2020 Бюл. № 23

Адрес для переписки:

127276, Москва, ул. Ботаническая, 4, М.н.с.
лаборатории биотехнологии растений ГБС
РАН, Ширнина И.В.

(72) Автор(ы):

Молканова Ольга Ивановна (RU),
Ширнина Ирина Васильевна (RU),
Коновалова Татьяна Юрьевна (RU),
Горбунов Юрий Николаевич (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: RU 2180165 С2, 10.03.2002.

МОКШИН Е.В., Морфо-физиологические
особенности клонального микроразмножения
in vitro различных сортов лилий и
гладиолусов, автореферат диссертации,
Москва, 2016, 16 с. DICKENS, et al, In vitro
propagation of Gladiolus flanaganii, South
African J. of Bot., 1986, V. 55. p. 485-487.

(54) Способ клонального микроразмножения шпажника болотного (*Gladiolus palustris* Gaudin)

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой способ размножения растений шпажника болотного *Gl. palustris* методом культуры in vitro, включающий стерилизацию семян, высаживание на питательные среды, размножение микролуковиц, их последующее укоренение, адаптацию растений-регенерантов к условиям ex

vitro. После адаптации к нестерильным условиям и доращивания получают стандартные саженцы шпажника болотного с закрытой корневой системой. Изобретение позволяет получить большое количество выровненного экологически чистого посадочного материала шпажника болотного. 6 ил.

RU
2 7 2 9 8 2 8
C 1

RU
2 7 2 9 8 2 8
C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A01H 4/00 (2020.02)

(21)(22) Application: **2019138745, 29.11.2019**

(24) Effective date for property rights:
29.11.2019

Registration date:
12.08.2020

Priority:

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

(45) Date of publication: **12.08.2020 Bull. № 23**

Mail address:

**127276, Moskva, ul. Botanicheskaya, 4, M.n.s.
laboratorii biotekhnologii rastenij GBS RAN,
Shirnina I.V.**

(72) Inventor(s):

**Molkanova Olga Ivanovna (RU),
Shirnina Irina Vasilevna (RU),
Konovalova Tatyana Yurevna (RU),
Gorbunov Yuriy Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD FOR CLONAL MICRO MULTIPLICATION OF A MARSH GLADIOLUS (GLADIOLUS PALUSTRIS GAUDIN)**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention represents a method for multiplication of marsh gladiolus *Gl. palustris* plants by culture method in vitro, involving seed sterilization, planting on nutrient media, multiplication of micro bulbs, their subsequent rooting, adaptation of plants-regenerants to conditions ex vitro. After adapting to

non-sterile conditions and growing, standard seedlings of marsh gladiolus with closed root system are obtained.

EFFECT: invention enables to obtain a large amount of ecologically clean planting material of a marsh gladiolus.

1 cl, 6 dwg

C 1
2 7 2 9 8 2 8
R U

R U
2 7 2 9 8 2 8
C 1

Изобретение относится к области биотехнологии растений и может быть использовано для массового получения качественного посадочного материала шпажника болотного (*Gladiolus palustris* Gaudin), растения, занесенного в Красную Книгу РФ и находящегося под угрозой исчезновения (статус редкости - 0) [1].

5 Полученные растения могут использоваться для ландшафтного озеленения и пополнения интродукционных коллекций ботанических садов, а также для возвращения в природные места обитания. Изобретение позволяет получить большое количество выровненного экологически чистого посадочного материала.

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

Шпажник болотный - многолетнее травянистое растение высотой 30-60 см, имеющее яйцевидный клубень. Соцветие - колос. Цветки розоватые или ярко розовые. Цветет с мая по июнь. Плод - сухая коробочка. Лимитирующими факторами являлись нарушение гидрологического режима в местах исчезновения вида и сбор цветущих растений в декоративных целях [1]. Все это делает необходимым проведение исследований по разработке методики клонального размножения и определяет актуальность данной работы [2, 3, 4].

15 Применение клонального микроразмножения позволяет получить однородный посадочный материал, сократить период размножения культуры, а также предоставляет возможность проведения работ в течение года и экономию площадей, необходимых для выращивания посадочного материала *Gl. palustris* [5, 6, 7].

В настоящее время в культуру *in vitro* введены некоторые представители рода *Gladiolus* L. - виды *Gladiolus dalenii*, *Gl. tristis*, *Gl. flanaganii* и различные сорта этого таксона [8, 9].

25 Наиболее близким способом является клональное микроразмножение сортов гладиолуса из одной апикальной почки путем пролиферации экспланта, образования побегов и боковых почек (коэффициент размножения (Кр) равен 9) [10].

30 Шпажник болотный является редким растением, что не позволяет использовать в качестве экспланта клубнелуковицу, так как это приведет к уменьшению популяции, поэтому предпочтительно использовать в качестве первичного экспланта семена.

Помимо этого, разработана методика получения растений-регенерантов через каллусную культуру (Кр равен от 14 до 19) [7]. Так как регенерация через каллус часто приводит к соматоклональной изменчивости, этот способ не желательно применять для размножения шпажника болотного.

35 Однако до настоящего времени так и не определен оптимальный состав питательной среды, обеспечивающей интенсивное формирование клубнелуковиц *Gl. palustris* [8, 9, 10].

Изобретение представляет собой способ размножения растений шпажника болотного *Gl. palustris* методом культуры *in vitro*, включающий стерилизацию семян, высаживание на питательные среды, собственно размножение (Кр до 12), последующее укоренение и адаптацию клубнелуковиц к условиям *ex vitro*. После адаптации к нестерильным условиям и дорастивания получают стандартные саженцы шпажника болотного с закрытой корневой системой. Результатом изобретения является получение выровненного и оздоровленного посадочного материала - 150000 штук в течение года.

45 **Ход работы**

В ходе исследований разработана методика клонального микроразмножения шпажника болотного.

Способ реализуют следующим образом.

В качестве первичных эксплантов использовали семена.

Оптимальная система стерилизации: 1.) фунгицид - 30 минут; 2.) 70% этанол - 2 минуты; 3.) 7% гипохлорит кальция - 20 минут.

На этапе собственно микроразмножения исследовали влияние регуляторов роста и их концентраций на коэффициент размножения. Наибольшие значения морфометрических показателей были получены на питательных средах, содержащих 10 мг/л 6-БАП с добавлением 0,1 мг/л НУК. Дальнейшее увеличение концентрации регуляторов роста не дало положительного эффекта (фиг. 1). Максимальный коэффициент размножения *Gl. palustris*, равный 7.25 ± 1.33 , достигается при культивировании на питательной среде, содержащей 6-БАП (10 мг/л) и НУК (0,1 мг/л) (фиг. 2).

В условиях лаборатории микропобеги *Gl. palustris* выращивали при искусственном освещении (3000 лк) и фотопериоде 16/8 ч., температуре 23-25°C и влажности 70%.

Максимальный процент укореняемости ($76,5 \pm 1,2$) был получен на питательной среде, содержащей $\frac{1}{4}$ MS, 0,3 мг/л НУК и 20 г/л сахарозы, при температуре 16-18°C и освещенности 500 лк. Уменьшение концентрации солей до $\frac{1}{4}$ MS приводило к снижению укореняемости (фиг. 3)

Растения-регенеранты при адаптации высаживали в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85-90°C в течение 1-2 ч. Субстрат состоял из смеси верхового торфа, песка и перлита (1:1:1).

Различные стадии клонального микроразмножения шпажника болотного показаны на фиг. 4-6: фиг. 4 - стадия инициации, фиг. 5 - стадия собственно микроразмножения, фиг. 6 - стадия укоренения.

Источники информации

1. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). - М.: Товарищество научных изданий КМК. - 2008. - 855 с.
2. De Bruyn, M.H., and Ferreira, D.I. In vitro corm production of *Gladiolus dalenii* and *G. tristis* // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* - 1992. - V. 31. - P. 123-128.
3. Dickens, Ch., Kelley, K., Manning, J.C., and Van Staden, J. In vitro propagation of *Gladiolus flanaganii*. *South African J. of Bot.* - 1986. - V. 55. - P. 485-487.
4. Ruffoni B. *Gladiolus* micropropagation in temporary immersion system // *Propagation of Ornamental Plants.* - 2008. - V. 8. - P. 102-104.
5. Kamo K. Effect of phytohormones on plant regeneration from callus of *Gladiolus* cultivar 'Jenny Lee' / *J. In vitro plants.* - 1994. - V. 30. - P. 26-31.
6. Molkanova O.I., Shirnina, I.V., and Mitrofanova, I.V. Conservation and micropropagation of rare and endemic species in genepool collections of the Russian Federation. *J. of Biotechnology.* - 2018. - P. 83-84.
7. Prasad V. S. S., Dutta Gupta E. S. In vitro shoot regeneration of gladiolus in semi-solid agar versus liquid cultures with support systems // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* - 2006. -V. 8. - P. 263-271.
8. Ахмед А.К. Создание высокоэффективной системы микроклонального размножения генетически стабильных растений гладиолуса: автореф. дис. канд. биол. наук. М., 2000. 16 с.
9. Мокшин Е.В. Морфо-физиологические особенности клонального микроразмножения in vitro различных сортов лилий и гладиолусов: автореф. дис. канд. биол. наук. Саранск, 2005. 20 с.
10. Пат. 2180165 Российская Федерация МПК. А01Н 4/00. Способ микроклонального размножения гладиолуса / А.К. Гапоненко, А.А. Абукамель, С.Г. Бабаева; заявитель

и патентообладатель А.К. Гапоненко, А.А. Абукамель, С.Г. Бабаева. - заявл. 31.01.2000, опубл. 10.03.2002.

(57) Формула изобретения

5 Способ клонального микроразмножения шпажника болотного (*Gladiolus palustris*
Gaudin) включает стерилизацию семян 7%-ным гипохлоритом кальция (экспозиция 20
минут), инициацию культуры на питательной среде MS, содержащей до 5 мг/л 6-БАП
и 0.1 мг/л НУК, собственно размножение на питательных средах MS, содержащих 10
10 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л НУК, их последующее укоренение на среде 1/4 MS, 0,3 мг/л НУК
и 20 г/л сахарозы при температуре 16-18°C и освещенности 500 лк, адаптацию растений-
регенерантов к условиям *ex vitro*.

15

20

25

30

35

40

45

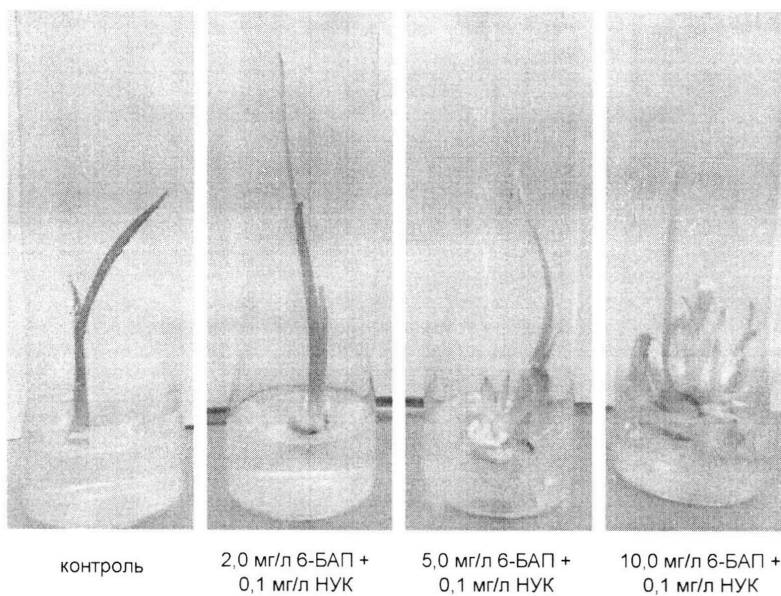
1

На фиг.1. Влияние концентрации регуляторов роста на морфометрические показатели *Gl.palustris*

| Концентрация регулятора роста, мг/л | | Коэффициент размножения | Длина листа, мм |
|-------------------------------------|-----|-------------------------|-----------------|
| 6-БАП | НУК | | |
| без гормонов | | 1.0±0 | 25±7.07 |
| 2 | 0.1 | 2.4±0.47 | 33±17.67 |
| 5 | 0.1 | 5.3±1.25 | 18.33±4.71 |
| 10 | 0.1 | 7.25±1.33 | 18.33±2.36 |

Фиг.1

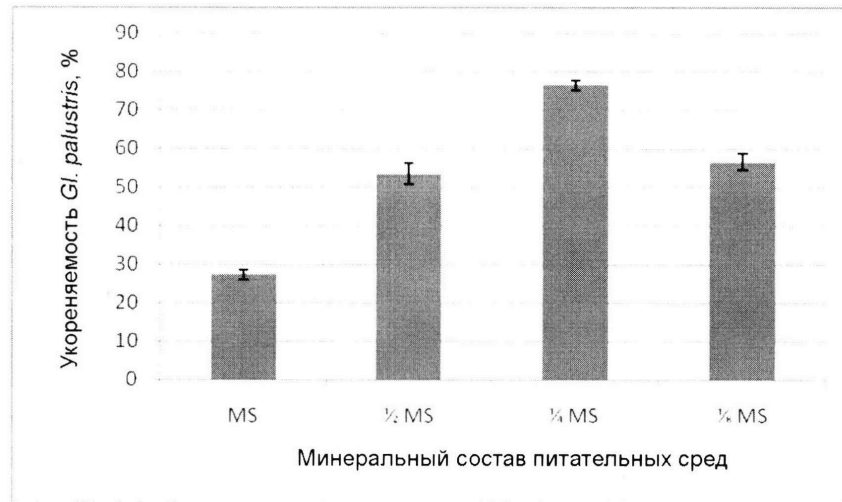
На фиг. 2. Влияние различных концентраций регуляторов роста на коэффициент размножения *Gl. palustris*



Фиг.2

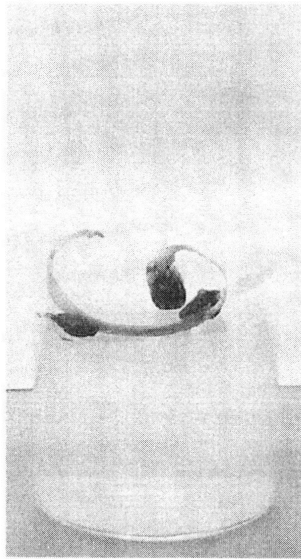
2

На фиг. 3 Влияние минерального состава питательной среды на укореняемость *Gl. palustris*.



Фиг.3

На фиг. 4 Стадия инициации *Gl. palustris*.



Фиг.4

На фиг. 5 Стадия собственно микроразмножения *Gl. palustris*.



Фиг.5

На фиг. 6 Стадия укоренения *Gl. palustris*.



Фиг.6