



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012147452/10, 08.11.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.11.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 08.11.2012

(43) Дата публикации заявки: 27.07.2013 Бюл. № 21

(45) Опубликовано: 20.07.2014 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RYUNANEN L., Effect of Abscisic Acid, Cold Hardening, and Photoperiod on Recovery of Cryopreserved in Vitro Shoot Tips of Silver Birch, Cryobiology 36, 1998, p. 32-39. **МОХАММЕД АБДУЛВАСИ ИБРАХИМ**, Микроразмножение, длительное депонирование и криосохранение in vitro малины красной, автореферат диссертации, Москва, 1998, с.12-16. ЦУПИКОВА Л.А., (см. прод.)

Адрес для переписки:

117997, Москва, ГСП-7 ул. Миклухо-Маклая, 16/
10 ИБХ РАН, патентный отдел

(72) Автор(ы):

Видягина Елена Олеговна (RU),
Шестибратов Константин Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) (RU)

(54) СПОСОБ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ IN VITRO РАСТЕНИЙ ОСИНЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии растений. Изобретение представляет собой способ хранения растений осины в условиях in vitro, включающий культивирование микропобегов осины на питательной среде WPM с добавлением сахарозы 10-20 г/л, агар-агара 9 г/л и витаминов MS 1 мл/л, сорбитола 5-10 г/л и маннитола 5-10 г/л, причем

хранение растений осуществляют при температуре +4°C в режиме освещения 8 ч день/16 ч ночь с интенсивностью 2000 люкс. Изобретение позволяет повысить сохранность in vitro культур ценных селекционных генотипов и генетически модифицированных клонов осины. 1 з.п. ф-лы, 1 ил., 3 табл.

(56) (продолжение):

Депонирование и рекультивирование сахарной свеклы в культуре in vitro, Рамонь, 2002, с.29-30, с.32, 64-75, 127-129. RU 2076482 C1, 27.03.1997. LLOYD G. and McCOWN B., Commercially-feasible micropropagation of mountain Laurel, Ralmla latifolia, by use of shoot-tip culture, The international plant propagators society, Combined Proceedings, Vol. 30, 1980, p. 421-427



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 522 823**⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.
A01H 4/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2012147452/10, 08.11.2012**

(24) Effective date for property rights:
08.11.2012

Priority:

(22) Date of filing: **08.11.2012**

(43) Application published: **27.07.2013** Bull. № 21

(45) Date of publication: **20.07.2014** Bull. № 20

Mail address:

**117997, Moskva, GSP-7 ul. Miklukho-Maklaja, 16/10
IBKh RAN, patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Vidjagina Elena Olegovna (RU),
Shestibratov Konstantin Aleksandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Institut bioorganicheskoj
khimii im. akademikov M.M. Shemjakina i Ju.A.
Ovchinnikova Rossijskoj akademii nauk (IBKh
RAN) (RU)**

(54) **METHOD OF LONG STORAGE IN VITRO OF ASPEN PLANTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention is a method of storing aspen plants under conditions in vitro, comprising culturing the microshoots of aspen on the nutrient medium WPM supplemented with sucrose of 10-20 g/l, agar-agar 9 g/l and vitamins MS of 1 ml/l, sorbitol 5-10 g/l, and mannitol 5-10 g/l. Storage of plants is carried out

at a temperature of +4°C under conditions of light of 8 h during the day/16 h at night with the intensity of 2000 lux.

EFFECT: invention enables to improve the safety in vitro of cultures of valuable selective genotypes and genetically modified aspen clones.

2 cl, 1 dwg, 3 tbl

C 2
2 5 2 2 8 2 3
R U

R U
2 5 2 2 8 2 3
C 2

Изобретение относится к области биотехнологии растений и лесному хозяйству, и может быть использовано для беспересадочного хранения особо ценных и трансформированных клонов растений осины в условиях *in vitro*.

5 В современной биотехнологии сохранение *in vitro* культур растений используется для снижения затрат на пересадку трансгенных и нетрансгенных клонов, и для сохранения особо ценных генотипов. Наиболее приемлемым способом депонирования является хранение *in vitro* культур при положительных температурах (+4°C).

Осина (*Populus tremula*) и ее гибриды широко используются в биотехнологии как модель для изучения различных аспектов генетики лесных древесных растений по ряду 10 причин: относительно небольшой размер генома и возможность его эффективной трансформации, быстрый рост, простота клонального микроразмножения и выращивания *in vitro*. В лесном хозяйстве осина начинает занимать приоритетное направление для использования в целлюлозно-бумажной промышленности и получении стройматериалов. Поэтому беспересадочное депонирование *in vitro* культур на 15 длительный период рассматривается как способ сохранения растений, обладающих ценными свойствами.

Известно несколько способов хранения растений при положительных температурах, в частности известен способ депонирования растений винограда «Способ длительного сохранения *in vitro* растений винограда» (патент России №2110172). Он включает перенос 20 фрагментов растений длиной 10-12 мм на твердую питательную среду, в которую добавляют тонкоизмолотые зерна винограда. Возможность использования данного способа для других растений не описана и, очевидно, потребует дополнительных модификаций метода и финансовых затрат.

Известен также состав питательной среды для длительного хранения растений *in vitro* (патент России №94011805). Новым в питательной среде является совместное 25 введение в ее состав сорбита в концентрации 1-10 г/л и 6-бензиламинопурина в концентрации 0,1-1,0 мг/л. Влияние на культуру древесных растений, в частности осины, не оценивалось.

Наиболее близким техническим решением из описанных является «Effect of abscisic acid, cold hardening, and photoperiod on recovery of cryopreserved *in vitro* shoot tips of silver birch» (Ryynänen L. // Cryobiology, 1998, №36, PP.32-39). В статье описывается методика 30 предварительного кратковременного хранения перед криоконсервацией почек микрорастений березы серебристой. Для введения в состояние покоя использовалось добавление абсцизовой кислоты в концентрации 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М в питательную среду 35 для укоренения и хранения MS (Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962. 15 (3): P.473-497), а также изменялись условия инкубации - понижение температуры до +4°C и режим освещения (8 ч день/16 ч ночь). Однако при таких условиях растения долго не хранили, а лишь вводили в состояние покоя *in vitro* для последующих манипуляций. Пригодность метода 40 введения в состояние покоя для других древесных растений в данной работе не оценивали.

Целью предлагаемого изобретения является повышение сохранности микрорастений осины в условиях *in vitro* при хранении на +4°C, без пересадок культур в течение 12 45 месяцев.

Поставленная цель достигается за счет того, что используются оптимальные концентрации минеральных и органических компонентов питательной среды и изменяется режим освещения (длительность и интенсивность).

Суть изобретения заключается в том, что для пассажа на укоренение и последующее

хранение используют среду WPM (Lloyd G., McCown B., Commercially feasible micropropagation of mountain laural (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip cultures. *Csmb Proc Intl Soc* 1980. 30: PP.421-427.) с добавлением к легко метаболизируемой сахарозе (10-20 г/л) таких осмолитиков, как сорбитол (5-10 г/л) и маннитол (5-10 г/л), а также агар-агара (9 г/л) и витаминов MS 1 мл/л. После инкубации растений в течение 2 недель при интенсивном (примерно 5000 люкс) длиннодневном режиме освещения (16 ч день/8 ч ночь) при температуре +22°C растения переносятся в условия хранения на +4°C при пониженном освещении (примерно 2000 люкс) и режиме короткого дня (8 ч день/16 ч ночь). В результате использование осмолитиков в составе питательной среды и подбор правильного освещения во время хранения способствуют постепенному переходу растений в состояние покоя, что повышает до 100% их сохранность в течение года. Способ подходит для хранения *in vitro* культур осины как генетически модифицированных клонов, так и ценных селекционных генотипов, отобранных в природе.

Анализ известных способов хранения микрорастений трансгенной и нетрансгенной осины при температуре +4°C в условиях *in vitro*, проведенный по научно-технической и патентной документации, показал, что совокупность существенных признаков заявляемого способа неизвестна из уровня техники, следовательно, он соответствует такому условию патентоспособности изобретения, как «новизна».

Предлагаемый способ реализуется следующим образом.

1. В нестерильных условиях готовится питательная среда для укоренения и последующего хранения. В нее добавляются необходимые количества макро-, микроэлементов, хелата железа, мио-инозита, объем доводится дистиллированной водой, pH 5,6-5,8. Растворяются необходимые количества сахарозы, сорбитола и маннитола. После этого добавляется навеска агара. Среда разливается по колбам; автоклавирование проводится при 1 атм (=1 изб. атм) в течение 25 минут. В охлажденную до 55°C среду в ламинар-боксе добавляются стерильные растворы витаминов. Полученный раствор разливается по стерильным культуральным сосудам. Все манипуляции с растительным материалом производятся в ламинар-боксе в условиях стерильного воздуха. Число эксплантов в одном сосуде составляет 20 штук.

2. После переноса растительного материала на среду для укоренения и последующего хранения инкубацию побегов проводят 2 недели при интенсивном (5000 люкс) длиннодневном (16 ч день/8 ч ночь) режиме освещения, при температуре +22°C.

3. Укорененные микрорастения затем переносят в условия хранения. Режим освещения на протяжении всего периода хранения короткодневный - 8 часов «день», 16 часов «ночь», интенсивность освещения должна не превышать 2000 люкс. Температура хранения +4°C.

4. Пересадку верхушечной почки растений на среду для восстановления (WPM с добавлением сахарозы 30 г/л, агар-агара 9 г/л, гиббереллиновой кислоты 0,5 мг/л) необходимо провести через год депонирования. Восстановление осуществляется при длиннодневном режиме освещения 16 часов «день», 8 часов «ночь» интенсивностью 5000 люкс, при температуре +22°C. Процент выживания оценивается после 2 недель инкубации на среде для восстановления.

В таблицах 1-2 представлены результаты выживаемости растений осины в зависимости от условий хранения. Для подтверждения неочевидности представленного изобретения нами были проведены исследования роли каждого из основополагающих, по нашему мнению, факторов для хранения культуры осины *in vitro* (таблица 1).

Для сравнения была использована методика кратковременного хранения,

предложенная Ruynänen L. (1998). Показано, что абсцизовая кислота действительно ускоряет процесс перехода в состояние покоя, но после переноса на среду для восстановления образуются витрифицированные побеги с измененной формой листа, что не происходит при использовании разработанного нами способа (таблица 2).

5 Данный способ хранения подходит как для растений дикого типа, так и для трансформированных растений осины. Было проведено хранение разных нетрансформированных генотипов осины (Pt, f2, PtV22) и трансгенных растений осины с разными рекомбинантными генами (GFP, Gus, Bar, Xeg, GS). Сохранность и трансгенных, и нетрансгенных клонов всех генотипов после года хранения составляла 10 100% (таблица 3). Сохранение экспрессии рекомбинантных генов в трансгенных растениях осины после года хранения при температуре +4°C, интенсивностью освещения 2000 люкс и режиме 8 день/16 ночь подтверждено методом ОТ-ПЦР (рисунок 1).

Преимуществом предложенного способа хранения при температуре +4°C является сохранение параметров микрорастений и увеличение доли жизнеспособных эксплантов 15 (микрорастений) после хранения.

Предложенный способ хранения при температуре +4°C не является затратным, так как требует лишь добавления осмолитиков и инкубации при разработанных режимах освещения. Поэтому способ может быть успешно использован для научных исследований, сохранения ценных генотипов осины или при производстве посадочного 20 материала растений в лесном хозяйстве.

Таблица 1

Процент выживших растений осины при разных условиях инкубации после месяца, полугода и года хранения при температуре +4°C

Опыт	Состав сахаров в питательной среде (г/л)	Интенсивность освещения (люкс)	Режим освещения (день/ночь)	Выживание после хранения (%)		
				1 мес	6 мес	12 мес
1	сахароза - 30	5000	16/8	42	0	0
2	сахароза - 15 сорбитол - 7,5 маннитол - 7,5	5000	16/8	56	0	0
3	сахароза - 15 сорбитол - 7,5 маннитол - 7,5	2000	16/8	73	0	0
4	сахароза - 15 сорбитол - 7,5 маннитол - 7,5	2000	12/12	100	57	0
5	сахароза - 15 сорбитол - 7,5 маннитол - 7,5	2000	8/16	100	100	100

Таблица 2

Процент выживших растений осины при добавлении в среду разных концентраций абсцизовой кислоты (АВА) и менее усвояемых сахаров после месяца, полугода и года хранения при температуре +4°C, интенсивностью освещения 2000 люкс и режиме 8 день/16 ночь

Опыт	Концентрация АВА, М	Выживание после хранения (%)		
		1 мес	6 мес	12 мес
1	10 ⁻⁴	100	24*	0
2	10 ⁻⁵	100	100	62*
3	10 ⁻⁶	100	100	100*
4	0	100	100	100

* - образование витрифицированных побегов с измененной формой листа

Таблица 3

Процент выживших растений осины разных генотипов при добавлении в среду менее усвояемых сахаров после месяца, полугода и года хранения при температуре +4°C, интенсивностью освещения 2000 люкс и режиме 8 день/16 ночь

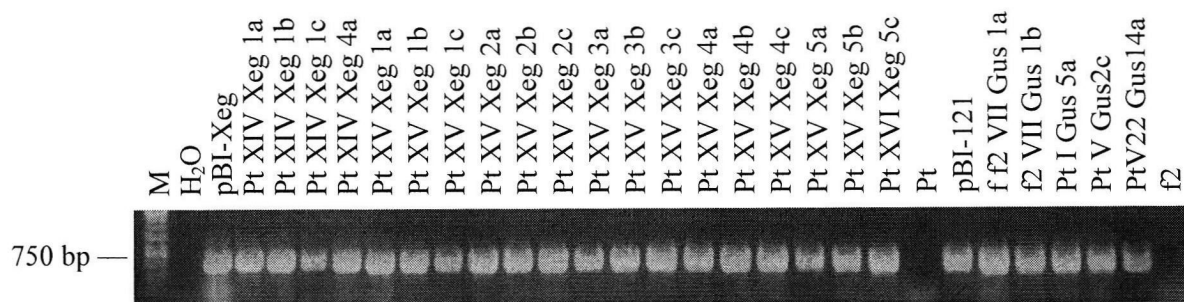
Название клонов	Количество посаженных растений	Выживание после хранения (%)		
		1 мес	6 мес	12 мес
Pt	200	100	100	100
f2	200	100	100	100
PtV22	200	100	100	100
Pt III GFP 3c*	200	100	100	100
Pt III GFP 5b*	200	100	100	100
Pt III GFP 5c*	200	100	100	100
f2 VII Gus 1a*	200	100	100	100
f2 VII Gus 1b*	200	100	100	100
Pt I Gus 5a*	200	100	100	100
Pt V Gus 2c*	200	100	100	100
PtV22 V Gus 14a*	200	100	100	100
f2 XI Bar 2a*	200	100	100	100
Pt XI Bar 24a*	200	100	100	100
PtXIV Xeg 1a*	200	100	100	100
PtXIV Xeg 1b*	200	100	100	100
Pt XV Xeg 1a*	200	100	100	100
PtXV Xeg 2b*	200	100	100	100
Pt XV Xeg 3a*	200	100	100	100
Pt XV Xeg 3b*	200	100	100	100
PtXV Xeg 4a*	200	100	100	100
Pt XV Xeg 4c*	200	100	100	100
PtXV Xeg 5a*	200	100	100	100
PtXVI Xeg 5c*	200	100	100	100

* трансгенные клоны осины с рекомбинантными генами GFP, Gus, Bar, Xeg, полученные на основе растений дикого типа генотипов Pt, f2, PtV22.

Формула изобретения

1. Способ хранения растений осины в условиях *in vitro*, включающий культивирование микропобегов осины на питательной среде WPM с добавлением сахарозы 10-20 г/л, агар-агара 9 г/л, витаминов MS 1 мл/л, сорбитола 5-10 г/л и маннитола 5-10 г/л, причем хранение растений осуществляют при температуре +4°C в режиме освещения 8 ч день/16 ч ночь с интенсивностью 2000 люкс.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что пригоден для хранения растений генетически модифицированной осины с рекомбинантными генами.



ОТ-ПЦР линий растений осины после года хранения при температуре +4 °С, интенсивностью освещения 2000люкс и режиме 8день/16ночь. Ген *xeg*, размер ампликона ~750 bp. А – ген *gus*, размер ампликона ~750 bp., М – маркер длин ДНК 1 kb (Евроген), H₂O – отрицательный контроль реакции, pBI-Xeg и pBI-121 – плазмидная ДНК (положительный контроль), F2 и Pt– нетрансгенные линии.

Рис.1