



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 3755

(51) C12N 5/04 (2006.01)

A01H 4/00 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2018/0703.2

(22) 03.10.2018

(45) 07.03.2019, бюл. №10

(72) Хапилина Оксана Николаевна; Райзер Олеся Борисовна; Котухов Юрий Андреевич; Данилова Алевтина Николаевна; Новаковская Анна Петровна; Раманкулов Ерлан Мирхайдарович

(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Национальный центр биотехнологии" Республики Казахстан Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(56) RU 2027757 C1, 27.01.1995

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ ЛУКА АЛТАЙСКОГО (ALLIUM ALTAICUM) В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

(57) Изобретение относится к области биотехнологии растений, микрочлонированию редких и эндемичных растений семейства Allium. Предлагаемое изобретение является уникальным решением для получения стерильных (свободных от инфекции) растений редкого вида лука алтайского Allium altaicum Pall, для последующего

использования их в культуре in vitro с целью размножения и возобновления природных популяций.

Основная задача изобретения - разработать способ получения растений регенерантов лука алтайского в культуре in vitro для размножения с целью сохранения и возобновления природных популяций.

Технический результат заключается в том, что с использованием данного способа могут быть получены стерильные (свободные от инфекции) жизнеспособные растения лука алтайского Allium, для дальнейшего их использования с целью возобновления и сохранения биоразнообразия природных популяций.

Разработанный способ получения растений лука алтайского (Allium altaicum) позволит существенно упростить процедуры по введению в культуру in vitro и других эндемичных видах луков, у которых семенной тип размножения превалирует над вегетативным, либо для редких и исчезающих видов, популяции которых малочисленны.

(19) KZ (13) U (11) 3755

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области биотехнологии растений, микроклонированию редких и эндемичных растений семейства *Allium*. Предлагаемое изобретение является уникальным решением для получения стерильных (свободных от инфекции) растений редкого вида лука алтайского *Allium altaicum* Pall, для последующего использования их в культуре *in vitro* с целью размножения и возобновления природных популяций.

Лук алтайский *A. altaicum*, или каменный лук, является одним из реликтовых растений ледникового периода, которое повсеместно сокращает численность из-за массового сбора населением для пищевого назначения. Этот вид занесен в Красные книги России, Монголии и Китая. На территории казахстанского Алтая вид представлен в виде малочисленных естественных популяций, имеющих спорадическое (одиночное) распространение на каменистых склонах Юго-Западного Алтая. В естественных условиях лук алтайский имеет низкую вегетативную и семенную продуктивность семян. Длительный период покоя семян, густой растительный покров, ограничивающий вегетативное размножение - являются лимитирующими факторами для возобновления природных популяций.

Бесконтрольные массовые заготовки уничтожают маточные растения, что значительно сокращает семенное возобновление этого вида и приводит к снижению их численности и ареалов распространения.

В связи с сокращением природных популяций технологии *in vitro* позволяют не только сохранить биоразнообразие представителей редкой и эндемичной флоры, но и получить достаточное количество ценного материала, свободного от вирусных и грибных инфекций.

Малочисленные природные популяции, низкая семенная продуктивность обуславливают необходимость разработки альтернативных путей их размножения и сохранения, в частности на основе метода культуры тканей *in vitro*.

Существуют примеры эффективного использования биотехнологических приемов для размножения и сохранения биоразнообразия у других представителей семейства Лилейных *Liliaceae*, куда входит и род Луки *Allium*. Однако, аналоги способа получения регенерантов лука алтайского *Allium altaicum* из семян нам не известны. Имеющиеся сведения об использовании методов культуры *in vitro* не позволяют в полной мере представить эффективный способ получения растений из семян редкого эндемичного вида лука *Allium altaicum*, что сдерживает применение современных биотехнологий в сохранении и возобновлении биоразнообразия.

Известен способ получения *in vitro* микроклубнелуковиц крокуса алатауского, редкого представителя эндемичной флоры Казахстана, заключающийся в использовании сегментов

клубнелуковиц с почкой, которые помещали на питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением регуляторов роста (Патент на полезную модель №1643, заявка №2015/0503.2 от 15.12.2015). Указанный способ позволяет размножать редкий эндемичный вид крокуса из микроклубнелуковиц. Недостатком данного способа является длительность процесса и его многостадийность. Кроме того, в качестве эксплантов используются сегменты луковиц, что предьявляет определенные требования к этапу стерилизации.

Также известен способ получения микролуковиц в условиях *in vitro* у еще одного вида, относящегося к роду *Allium* - чеснока *Allium sativum* (Патент США «Method for producing microbulbs of Garlic *Allium sativum* L. *in vitro*» №US006265217B1 от 24.07.2001 г.). С использованием данного способа возможно получать микролуковицы чеснока без увеличения себестоимости продукции. Метод заключается в изоляции меристематических тканей из луковиц чеснока, их культивировании на питательных средах с добавлением определенных фитогормонов и сахарозы, последующих пассировании образовавшихся побегов на средах с высокими концентрациями сахарозы (90-140 г/л) и регуляторами роста растений. Недостатками данного способа является использование в качестве эксплантов меристематических тканей, расположенных в донце. Кроме того, чеснок *Allium sativum* характеризуется высокой способностью к вегетативному размножению, поскольку имеет сложную луковицу, состоящую из нескольких дочерних луковиц (зубков), в отличие от лука алтайского, который образует всего 1 маточную луковицу.

Разработанный нами способ получения растений лука алтайского позволит существенно упростить способ воспроизведения естественных популяций редкого эндемичного вида.

Уровень техники

Нами не найдено патентов по способу получения растений лука алтайского *Allium altaicum* в культуре *in vitro* по патентному поиску (патенты Google, <http://www.google.com/patents/>; патентная документация Казахстана: <http://www.kazpatent.kz/index.php/ru/>; Евразийская патентная документация: <http://www.eapo.org/en/>; патентная документация Российской Федерации: патентная документация США: <http://patft.uspto.gov/>; патентная документация Европейского патентного ведомства, Великобритании, Германии, Франции, Швейцарии, Австрии, Австралии, Японии, Китая и т.д.: <http://www.epo.org/searching/free/espacenet.html>), по всемирной организации интеллектуальной собственности (ВОИС), национального института интеллектуальной собственности Республики Казахстан.

Аналог изобретения

Наиболее близким по поставленной задаче можно отметить патент на способ получения регенерантов лука в условиях *in vitro* (Патент РФ

№2027757, заявка №5039812/13 от 24.04.92). С использованием данного способа возможно получение растений-регенерантов лука с использованием в качестве эксплантов тканей донца луковиц лука. Способ позволяет размножить сорта и ценные селекционные образцы и гибриды с использованием технологии микроклонирования *in vitro*. Недостатками данного способа является использование в качестве эксплантов сегментов луковиц (донц) и использование токсичного соединения ацетона для индуцирования каллусогенеза и органогенеза.

Задача изобретения - разработать способ получения растений регенерантов лука алтайского в культуре *in vitro* для размножения с целью сохранения и возобновления природных популяций.

Сущность изобретения заключается в использовании метода культивирования *in vitro*, при котором семена лука алтайского после удаления примесей подвергают предварительной стерилизации последовательно в растворах детергента и 5% раствора гипохлорита натрия (каждый в течение 1 часа при постоянном перемешивании на магнитной мешалке). После удаления легковесных семян и примесей, осевшие на дно жизнеспособные семена подвергают кратковременной стратификации в течение 8-12 часов с последующей стерилизацией в стерильных условиях в растворе 20% гипохлорита натрия. После трехкратной промывки в стерильной дистиллированной воде семена помещают для проращивания на питательную среду МС, содержащую минеральные соли в 50%-ной концентрации, 10 мг/л гибберелловой кислоты (GA3), 0,1 мг/л ИУК, 30 г/л сахарозы и 0,7% агара. Стерильные проростки лука алтайского переносят для индукции адвентивного побегообразования и формирования микролуковиц на среду МС, содержащую витамины Гамборга В5, зеатин 0,5 мг/л, БАП 2,5 мг/л, сахарозу 30 г/л, агар 8 г/л. Культивирование проводят 8-10 недель при температуре 24°-26°С в условиях 16-часового дня. Сформировавшиеся микролуковицы диаметром 2-5 мм переносят для микроразмножения на среду МС, содержащую витамины Гамборга В5, 5 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИУК, 60 г/л сахарозы, 8 г/л агара. Культивирование на данном этапе проводят при 22-24°С в условиях 16-часового дня в течение 8-10 недель. После того, как диаметр микролуковиц достигает 6-8 мм, проводят их пассирование для индукции корнеобразования на безгормональную среду МС, содержащую 30 г/л сахарозы и 6 г/л агара. Микролуковицы с хорошо сформированной корневой системой пересаживают в сосуды с почвогрунтом для акклиматизации в лабораторных условиях. Сформировавшиеся в условиях *in vitro* растения лука алтайского могут быть использованы в качестве свободного от инфекции материала для высадки в места их естественного обитания. С использованием данного способа возможно восстановление природных популяций редкого эндемичного вида для их рационального использования.

Технический результат заключается в том, что с использованием данного способа могут быть получены стерильные (свободные от инфекции) жизнеспособные растения лука алтайского *Allium*, для дальнейшего их использования с целью возобновления и сохранения биоразнообразия природных популяций.

Отличие предлагаемого способа заключается в использовании в качестве эксплантов проростков из семян лука *Allium altaicum*, что повышает возможность сохранения биоразнообразия природных популяций редких и эндемичных видов, характеризующихся низкой способностью к вегетативному размножению.

Достижения технического результата позволяют существенно упростить процесс микроклонирования и получения регенерантов лука алтайского для сохранения и рационального использования естественных популяций редкого эндемичного растения.

Предлагаемый нами способ получения растения лука алтайского *in vitro* может быть использован и на других эндемичных видах луков, у которых семенной тип размножения превалирует над вегетативным, либо для редких и исчезающих видов, популяции которых малочисленны.

Пример 1. Стерилизация семян лука алтайского *Allium altaicum*.

Семена лука алтайского, собранные из естественных популяций, очищают от посторонних примесей, промывают в проточной водопроводной воде в течение 1 часа. После этого помещают на 1 час в 1% раствор детергента, при постоянном помешивании на лабораторных магнитных мешалках (скорость вращения ≈ 1000 об/мин). Затем раствор детергента аккуратно сливается, при этом удаляют примеси и легковесные (нежизнеспособные) семена. Осевшие на дно сосуда семена луков аккуратно промывают водой, и помещают в 5% раствор гипохлорита натрия на 1 час при постоянном помешивании в вышеуказанном диапазоне вращения. После промывки стерильной водой семена луков помещают в холодильник (+5°С) на 8-12 часов для набухания. По истечении указанного времени в стерильных условиях ламинар-бокса набухшие семена стерилизуют 20% раствором гипохлорита натрия в течение 10-20 мин с последующей трехкратной промывкой в стерильной дистиллированной воде.

Пример 2. Получение стерильных проростков лука алтайского *Allium altaicum* для введения в культуру *in vitro*.

Все манипуляции по получению стерильных проростков лука алтайского проводят в стерильных условиях ламинар-бокса. Поверхностно стерилизованные семена помещают в чашки Петри на поверхность питательной среды $1/2$ МС, содержащей минеральные соли по прописи Мурасиге и Скуга в 50%-ной концентрации, 10 мг/л гибберелловой кислоты (GA3), 0,1 мг/л ИУК, 30 г/л сахарозы и 0,7% агара. Культивирование стерильных семян лука алтайского проводится в

контролируемых условиях, обеспечивающих 16 часовой световой день при температуре 24°-26°С. Прорастание семян начинается на 7-10 сутки (фиг.1).

Прорастание семян начинается с пробивания кончика корня через семенную кожуру. Проростки лука в условиях *in vitro* имеют одну зеленую семядолю, дудчатый лист и 1 слабоветвящийся корешок.

Всхожесть семян увеличивается с течением периода культивирования, максимальное значение наблюдается на 7-10 сутки (фиг.2).

Пример 3. Формирование адвентивного побегообразования и микролуковиц лука алтайского *Allium altaicum* в условиях *in vitro*.

Полученные на первом этапе стерильные проростки лука алтайского пассируют на среду для пролиферации, содержащую минеральные соли по прописи Мурасиге и Скуга, витамины по прописи Гамборга В5, зеатина 0,5 мг/л, БАП (6-бензиламинопурин) 2,5 мг/л, сахарозу 30 г/л, агар 8 г/л. Культивирование проводят при условиях, описанных выше в течение 6-8 недель. Наблюдается формирование побегов второго порядка, их удлинение. Также у 65-83% проростков наблюдается формирование кластеров адвентивных побегов, количество которых варьирует от 3 до 17 на 1 эксплант. По истечении 6-8 недель примерно у 75% побегов наблюдается утолщение базальной части побегов, приводящее в дальнейшем к формированию микролуковиц диаметром 2-5 мм (фиг.3).

Пример 4. Микроразмножение лука алтайского в условиях *in vitro*.

Сформировавшиеся микролуковицы отделяют и пересаживают на среду для пролиферации и микроразмножения, содержащую минеральные соли по прописи Мурасиге и Скуга, витамины по прописи Гамборга В5, БАП (6-бензиламинопурин) в концентрации 5 мг/л, НУК 0,1 мг/л, сахарозу 60 г/л, агар 8 г/л. Культивирование проводится 8-10 недель при температуре 22-24°С, при 16-часовом дне. Повышенное содержание 6-бензиламинопурина в сочетании с НУК усиливает процессы формирования микролуковиц, а удвоенное содержание сахарозы компенсирует истощение среды при длительном культивировании.

Пример 5. Получение корнесобственных растений лука алтайского в условиях *in vitro*.

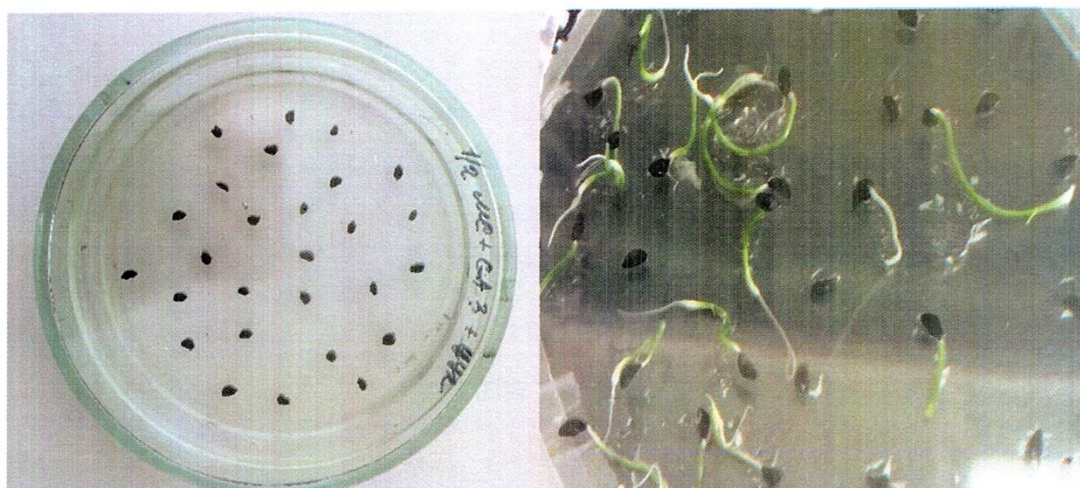
После того, как диаметр сформированных лукович достигают 5-10 мм, проводят их пассирование на безгормональную среду Мурасиге и Скуга, содержащую 30 г/л сахарозы и 6 г/л агара. При культивировании на безгормональной среде прекращается формирование адвентивных побегов,

происходит усыхание и некроз покровных чешуй. Корнеобразование наблюдается у 85-92% регенерантов лука алтайского (фиг.4).

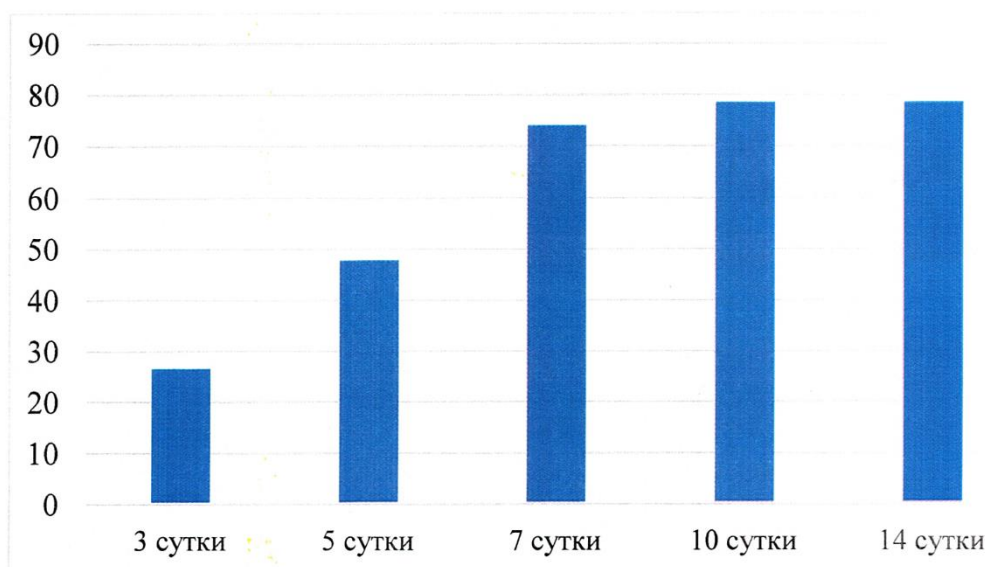
Микролуковицы с хорошо сформированной корневой системой пересаживают в сосуды с почвогрунтом для акклиматизации в лабораторных условиях. В дальнейшем, сформировавшиеся луковичи могут быть высушены и использованы в качестве свободного от инфекции материала для высадки в места их естественного обитания. С использованием данного способа возможно восстановление природных популяций редкого эндемичного вида для их рационального использования.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ получения растений лука алтайского (*Allium altaicum*) в культуре *in vitro*, включающий предварительную стерилизацию эксплантов, стратификацию, получение стерильных проростков, их пролиферацию, микроразмножение и индукцию корнеобразования с последующей высадкой в сосуды с почвогрунтом, *отличающийся* тем, что в качестве первичных эксплантов используют семена, которые стерилизуют в растворе детергента и гипохлорита натрия при постоянном перемешивании на магнитной мешалке, затем осевшие семена подвергают стратификации в течение 8-12 часов, с последующей стерилизацией в асептических условиях, затем проводят их проращивание на питательной среде МС, содержащей ½ нормы минеральных солей, 10 мг/л глутаровой кислоты (GA3), 0,1 мг/л ИУК, 30 г/л сахарозы и 0,7% агара, после чего проростки переносят на среду МС для пролиферации без добавления ацетона, содержащую витамины Гамборга В5, зеатин 0,5 мг/л, БАП 2,5 мг/л, сахарозу 30 г/л, агар 8 г/л, культивирование проводят в течение 8-10 недель при температуре 24°-26°С в условиях 16-часового дня, после чего сформировавшиеся микролуковицы диаметром 2-5 мм переносят для микроразмножения на среду МС без ацетона, содержащую витамины Гамборга В5, 5 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИУК, 60 г/л сахарозы, 8 г/л агара, культивирование на данном этапе проводят при 22°-24°С в условиях 16-часового дня в течение 8-10 недель, далее микролуковицы диаметром 6-8 мм пассируют для индукции корнеобразования на безгормональную среду МС, содержащую 30 г/л сахарозы и 6 г/л агара, затем микролуковицы с хорошо сформированной корневой системой пересаживают в сосуды с почвогрунтом.



Фиг.1 – Получение стерильных проростков лука алтайского *Allium altaicum* в условиях *in vitro*



Фиг.2 – Всхожесть (%) семян лука алтайского *Allium altaicum* в условиях *in vitro*



Фиг.3 – Проллиферация и формирование адвентивных побегов лука алтайского в условиях *in vitro*



Фиг.4 – Индукция корнеобразования у растений лука алтайского в культуре *in vitro*