



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 120 741** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК⁶ **A 01 H 4/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96112871/13, 27.06.1996

(46) Дата публикации: 27.10.1998

(56) Ссылки: Nichterlein K., et al. *New methods and recent progress in the breeding of flax/Flax as a fibre and oil bearing crop. Proceedings of the FAO European regional workshop on flax.* - Brno, Czechoslovakia, 18-20 June 1991. p. 175-183. Nichterlein K., Umbrach H., Friedt W. *Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from anther callus of linseed (Linum usitatissimum L).* Euphytica, 1991. 58. p. 157-164.

(71) Заявитель:

Всероссийский научно-исследовательский институт льна

(72) Изобретатель: Поляков А.В.,

Пролетова Н.В.

(73) Патентообладатель:

Всероссийский научно-исследовательский институт льна

(54) ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЫЛЬНИКОВ ЛЬНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, предназначено для культивирования *in vitro* пыльников льна и может быть использовано для получения нового исходного материала для создания сортов льна. Предлагаемая питательная среда содержит, мг/л: кальций хлористый двухводный - 435; калий фосфорнокислый однозамещенный - 170; калий азотнокислый - 1900; магний сернокислый семиводный - 370; аммоний азотнокислый - 1650; железо сернокислое семиводное - 27,8; этилендиамин-тетрацитат натрия (ЭДТА) одноводный - 37,3; кобальт хлористый шестиводный - 0,025; медь сернокислая пятиводная - 0,025; кислота

борная - 6,2; калий иодистый - 0,75; марганец сернокислый одноводный - 22,3; натрий молибденовокислый двухводный - 0,25; цинк сернокислый семиводный - 8,6; мезоинозит - 100; тиамин - 0,1; глутамин - 25; пантотенат кальция - 4,0; кислота никотиновая - 0,5; пиридоксин - 0,5; аспарагин - 250; глицин - 2,0; серин - 125; сахароза - 50000; агар-агар - 7000; 6-бензиладенин - 1,0; кислота нафтилуксусная - 0,5; кислота индолилуксусная - 0,3 и бидистиллированная вода - до 1 л. Использование питательной среды обеспечивает увеличение каллусогенеза относительно известных питательных сред минимум в 2 раза. 1 табл.

RU 2 1 2 0 7 4 1 C 1

RU 2 1 2 0 7 4 1 C 1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 120 741** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.⁶ **A 01 H 4/00**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 96112871/13, 27.06.1996

(46) Date of publication: 27.10.1998

(71) Applicant:
Vserossiiskij nauchno-issledovatel'skij institut l'na

(72) Inventor: Poljakov A.V.,
Proletova N.V.

(73) Proprietor:
Vserossiiskij nauchno-issledovatel'skij institut l'na

(54) **NUTRIENT MEDIUM FOR FLAX ANTHERS CULTURING**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE:
invention proposes a medium containing the following components, mg/l: calcium chloride dihydrate, 435; potassium dihydrogen phosphate, 170; potassium nitrate, 1900; magnesium sulfate heptahydrate, 370; ammonium nitrate, 1650; iron sulfate heptahydrate, 27.8; ethylenediaminetetraacetate sodium monohydrate, 37.3; cobalt chloride hexahydrate, 0.025; copper sulfate pentahydrate, 0.025; boric acid, 6.2; potassium iodide, 0.75; manganese sulfate monohydrate, 22.3; sodium molybdate

dihydrate, 0.25; zinc sulfate heptahydrate, 8.6; meso-inositol, 100; thiamine, 0.1; glutamine, 25; calcium pantothenate, 4.0; nicotinic acid, 0.5; pyridoxine, 0.5; asparagine, 250; glycine, 2.0; serine, 125; sucrose, 50 000; agar-agar, 7 000; 6-benzyladenine, 1.0; naphthylacetic acid, 0.5; indolylacetic acid, 0.3; and bidistilled water, the balance up to 1 l. Medium can be used in flax selection. The use of this nutrient medium provides increase of callusogenesis by 2-fold as compared with the known ones. EFFECT: enhanced effectiveness of medium. 1 tbl, 2 ex

RU 2 1 2 0 7 4 1 C 1

RU 2 1 2 0 7 4 1 C 1

Изобретение находится к биотехнологии, в частности к культивированию *in vitro* льна, и может быть использовано при культивировании пыльников растений для получения нового исходного материала.

Известны многочисленные питательные среды для культивирования пыльников растений, которые содержат необходимые компоненты для индуцирования процесса образования каллуса и эмбриоидов на их основе (Ф.А. Калинин и др. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. С. 238-242). Показано, что нет универсальной питательной среды позволяющей получить достаточный результат на разных растениях, в связи с чем разрабатываются среды для конкретных видов растений (Биотехнология растений: культура клеток /Пер. с англ. В.И. Негрука; с предисл. Р.Г. Бутенко. М.: Агропромиздат. 1989. 280 с. (с. 41-43)). Применение основных хорошо зарекомендовавших себя сред таких как N₆ (Cu C.C., 1978), MC (Murashige, Skoog, 1962), Монниера (Monnier M., 1978), B₅ (Gamborg O.L., 1965) и др. на льне сопровождалось образованием лишь отдельных случаев каллусирования пыльников или возникновения эмбриоидов на их основе.

Известна питательная среда (ближайший аналог) для культивирования пыльников льна, называемые A 22 (Nichterlein K., et al. New methods and recent progress in the breeding of flax / Flax as a fibre and oil bearing crop. Proceedings of the FAO European regional workshop on flax.-Brno, Czechoslovakia, 18-20 June 1991. P. 175-183; Nichterlein K., Umbach H., Friedt W. Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from anther callus of linseed (*Linum usitatissimum* L.). Euphytica. 1991. 58. P. 157-164), которая содержит (мг/л): кальций хлористый двухводный - 435; калий фосфорнокислый однозамещенный - 170; калий азотнокислый - 1900; магний сернокислый семиводный - 370; аммоний азотнокислый - 165; железо сернокислое семиводное - 27,8; этилендиамин-тетрацитат натрия ((ЭДТА) одноводный - 37,3; кобальт хлористый шестиводный - 0,025; медь сернокислую пятиводную - 0,025; кислоту борную - 6,2; калий иодистый - 0,75; марганец сернокислый одноводный - 22,3; натрий молибденовокислый двухводный - 0,25; цинк сернокислый семиводный - 8,6; мензоинозит - 100; тиамин - 0,1; глутамин - 750; сахарозу - 60000; агарозу - 4000; 6-бензиладенин - 2,0; нафтилукусную кислоту - 1,0.

Недостатком этих сред является низкий выход каллусирующих пыльников льна-долгунца и пыльников с эмбриоидами. Увеличение частоты образования капсулирующих пыльников у льна очень важно, так как технология культуры пыльников *in vitro* довольно дорогостоящая, к тому же селекционеры не всегда располагают достаточным количеством ценного растительного материала. Повышение же частоты каллусогенеза позволяет уменьшить объем приготовления среды, лабораторной техники, объем растительного материала, расход рабочего времени и создает базу для технологии массового получения регенерантов в культуре пыльников льна.

Заявляемое изобретение направлено на устранение вышеотмеченных недостатков и от его использования может быть получен следующий технический результат: увеличение выхода каллусирующих пыльников с 5,8% до 11,5% (или в два раза больше).

Указанный технический результат достигается за счет того, что в питательную среду, включающую следующие компоненты: кальций хлористый двухводный, калий фосфорнокислый однозамещенный, калий азотнокислый, магний сернокислый семиводный, аммоний азотнокислый, железо сернокислое семиводное, этилендиамин-тетрацитат натрия ((ЭДТА) одноводный, кобальт хлористый шестиводный, медь сернокислую пятиводную, кислоту борную, калий иодистый, марганец сернокислый одноводный, натрий молибденовокислый семиводный, мезоинозит, тиамин, глутамин, сахарозу, уплотнитель 6-бензиладенин, кислоту нафтилукусную и бидистиллированную воду, дополнительно вводят пантотенат кальция (4,0), кислоту никотиновую (0,5), пиридоксин (0,5), аспарагин (250), глицин (2,0), серин (125), кислоту индолилукусную (0,3) и в качестве уплотнителя она содержит агар-агар (700).

Способ иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Пыльники льна культивируют на среде, известной ранее, которую готовят по следующей технологии. В 400 мл бидистиллированной воды добавляют 7000 мг агар-агара и путем кипячения готовят агаровый гель. Затем в него добавляют растворенные в бидистиллированной воде ингредиенты (мг/л): кальций хлористый двухводный - 435; калий фосфорнокислый однозамещенный - 170; калий азотнокислый - 1900; магний сернокислый семиводный - 370; аммоний азотнокислый - 165; железо сернокислое семиводное - 27,8; этилендиамин-тетрацитат натрия ((ЭДТА) одноводный - 37,3; кобальт хлористый шестиводный - 0,025; медь сернокислую пятиводную - 0,025; кислоту борную - 6,2; калий иодистый - 0,75; марганец сернокислый одноводный - 22,3; натрий молибденовокислый двухводный - 0,24; цинк сернокислый семиводный - 8,6; мезоинозит - 100; тиамин - 0,1; глутамин - 750; сахарозу - 60000; агарозу - 4000; 6-бензиладенин - 2,0; нафтилукусную кислоту - 1,0. Общий объем приготавливаемой среды доводится до 1000 мл добавлением бидистиллированной воды. Затем среду тщательно перемешивают. Раствором NaOH устанавливают pH среды 5,5-5,6.

Горячую питательную среду разливают в большие биологические пробирки, которые закрывают алюминиевой фольгой и автоклавируют при 0,75 атм. два раза по 15 минут. Пыльники льна высаживают на застывшую агаризованную поверхность в стерильных условиях. Пробирки с пыльниками помещают в термостат при температуре 23-27°C и отсутствии света. Через 28 дней подсчитывают количество пыльников, давших каллус объемом более 5 мм³ (табл.).

Пример 2. Условия проведения эксперимента аналогичны описанным в

примере 1, но содержание компонентов в предлагаемой среде, следующее (мг/л): кальций хлористый двухводный - 435; калий фосфорнокислый однозамещенный - 170; калий азотнокислый - 1900; магний сернокислый семиводный - 370; аммоний азотнокислый - 1650; железо сернокислое семиводное - 27,8; этилендиамин-тетрацитат натрия ((ЭДТА) одноводный - 37,3; кобальт хлористый шестиводный - 0,025; медь сернокислая пятиводная - 0,025; кислота борная - 6,2; калий иодистый - 0,75; марганец сернокислый одноводный - 22,3; натрий молибденовокислый двухводный - 0,25; цинк сернокислый семиводный - 8,6; мезоинозит - 100; тиамин - 0,1; глутамин - 25; пантотенат кальция - 4,0; кислота никотиновая - 0,5; пиридоксин - 0,5; аспарагин - 250; глицин - 2,0; серин - 125; сахароза - 50000; агар-агар - 7000; 6-бензиладенин - 1,0; нафтилуксусная кислота - 0,5; кислота индолилуксусная - 0,3.

Как следует из экспериментальных данных, использование предлагаемого варианта питательной среды обеспечивает увеличение каллусогенеза относительно известных питательных сред минимум в 2 раза.

Формула изобретения:

Питательная среда культивирования пыльников льна, включающая кальций хлористый двухводный, калий фосфорнокислый однозамещенный, калий азотнокислый, магний сернокислый семиводный, аммоний азотнокислый, железо сернокислое семиводное, этилендиамин-тетрацитат натрия (ЭДТА) одноводный, кобальт хлористый шестиводный, медь сернокислую пятиводную, кислоту борную, калий иодистый, марганец сернокислый одноводный, натрий молибденовокислый двухводный, цинк

сернокислый семиводный, мезоинозит, тиамин, глутамин, сахарозу, уплотнитель, 6-бензиладенин, кислоту нафтилуксусную и бидистиллированную воду, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит

- 5 пантотенат кальция, кислоту никотиновую, пиридоксин, аспарагин, глицин, серин, кислоту индолилуксусную, и в качестве уплотнителя агар-агар при следующем соотношении компонентов, мг/л:
- 10 Кальций хлористый двухводный - 435
Калий фосфорнокислый однозамещенный - 170
Калий азотнокислый - 1900
Магний сернокислый семиводный - 370
Аммоний азотнокислый - 1650
- 15 Железо сернокислое семиводное - 27,8
Этилендиамин-тетрацитат натрия (ЭДТА) одноводный - 37,3
Кобальт хлористый шестиводный - 0,025
Медь сернокислая пятиводная - 0,025
Кислота борная - 6,2
- 20 Калий иодистый - 0,75
Марганец сернокислый одноводный - 22,3
Натрий молибденовокислый двухводный - 0,25
Цинк сернокислый семиводный - 8,6
Мезоинозит - 100
- 25 Пантотенат кальция - 4
Кислота никотиновая - 0,5
Пиридоксин - 0,5
Тиамин - 0,1
Аспарагин - 250
- 30 Глицин - 2
Глутамин - 25
Серин - 125
Сахароза - 50000
Агар-агар - 7000
6-Бензиладенин - 1
- 35 Кислота нафтилуксусная - 0,5
Кислота индолилуксусная - 0,3
Бидистиллированная вода - Остальное до 1 лл
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

Эффективность применения новой питательной среды - LMA-1. 1985 г.

Среда	Число пыльников		
	культивируемых	каллусирующих	
		шт.	шт.
Известная (Nichterlein, et al., 1991)	1360	79	5,8
LMA-1 (новая)	1360	156	11,5

RU 2120741 C1

RU 2120741 C1