

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201900286 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.11.26

(51) Int. Cl. A01N 3/00 (2006.01)  
A01N 4/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.06.13

(54) СПОСОБ КРИОСОХРАНЕНИЯ МЕРИСТЕМАТИЧЕСКИХ ВЕРХУШЕК ПОБЕГОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ IN VITRO

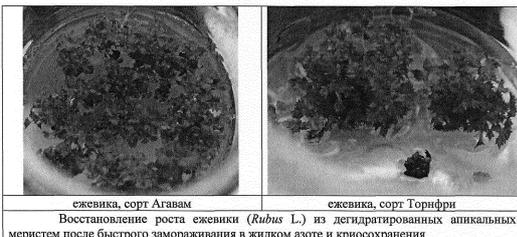
(96) 2019000060 (RU) 2019.06.13

(72) Изобретатель:

(71) Заявитель:  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ  
РАСТЕНИЙ ИМ. К.А. ТИМИРЯЗЕВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(RU)**

**Высоцкая Ольга Николаевна (RU)**

(57) Изобретение относится к биотехнологии, а именно к криосохранению меристем из растений in vitro, и может быть использовано для пополнения криобанков клонами растений. Задачей, на решение которой направлено изобретение, является разработка комплексного способа криосохранения, который позволит эффективно восстанавливать рост меристем без использования программируемых замораживателей и инкапсуляции. Поставленная задача решается тем, что используются комплекс модификаций разработанного ранее протокола криосохранения меристем, заключающийся в подготовке растений in vitro к замораживанию, изолировании и предкультивировании апикальных меристем, погружении криоампул с апексами в жидкий азот и их хранении при температуре -196°C, посткриогенном восстановлении роста меристем, причём растения - доноры меристем - готовят 2-12 недель в присутствии 6-10% сахарозы и 1,0-5,0 мг/л паклобутразола ([1-(4-хлорофенил)-4,4-диметил-2-(1,2,4-триазол-1-ил)пентан-3-ол]), а предкультивирование апексов проводят на 0,8 М сахарозы, 2700 мг/л глюконата кальция и 1,0-5,0 мг/л паклобутразола. Использование предложенного способа криосохранения, обеспечивающего посткриогенную регенерацию растений из 63-100% меристем, позволяет отказаться от программируемых замораживателей и инкапсуляции альгинатом кальция.

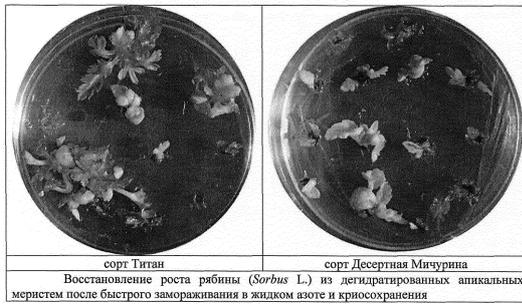
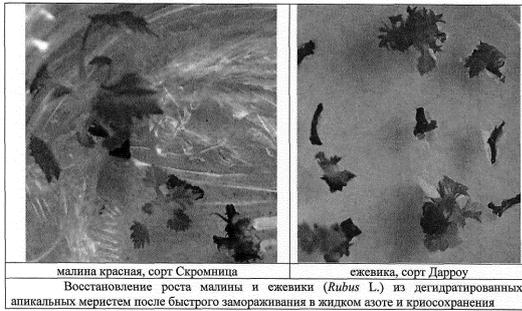


A1

201900286

201900286

A1



## Способ криосохранения меристематических верхушек побегов, изолированных из растений *in vitro*

### Область применения

Изобретение относится к биотехнологии и растениеводству, а именно, к сохранению при ультранизких температурах растительного материала размножаемого вегетативно и может быть использовано для формирования в криобанках коллекций ценных клонов и сортов растений культивируемых *in vitro*.

### Уровень техники

Сохранение при ультранизких температурах (от  $-136^{\circ}\text{C}$  до  $-196^{\circ}\text{C}$ ) образцов криоустойчивого растительного материала является одним из перспективных методов долговременного сохранения генетических ресурсов вегетативно размножаемых растений, в том числе оздоровленных клонов ценных сортов ягодных и плодовых культур. Важнейшим этапом организации и эксплуатации криобанков растительного материала является разработка эффективных и современных методов криосохранения меристематических тканей, которые позволяют отказаться от использования программируемых замораживателей и токсичных криопротекторов.

Известен способ криосохранения верхушек побегов ежевики ( Gupta S., Reed B. Cryopreservation of shoot tips of blackberry by encapsulation-dehydration and vitrification// CryoLetters, 2006 V.27, №1, P. 29 – 42.), в котором заключенные в альгинатные капсулы меристематические апексы, замораживали в криоампулах погружением в жидкий азот.

В этом способе растения из рода *Rubus* L. размножали *in vitro* на специализированной питательной среде, дополненной 30 г/л сахарозы; 2 мг/л 6-бензиламинопурина; 0,1 мг/л индолилмасляной кислоты; 0,1 мг/л гибберелловой кислоты; 3,5 г/л агара и 1,45 г/л гелриты. В ходе культивирования растительного материала в условиях 16-часового дня при освещении в  $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  и температуре  $+25^{\circ}\text{C}$  смену питательной среды проводили каждые 3 недели. Размноженные *in vitro* растения адаптировали к холоду с использованием специальных климатических камер, которые обеспечивали в течение суток смену режимов от 8-часового дня при освещении в  $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  и температуре  $+22^{\circ}\text{C}$  до 16 часов темноты при температуре в  $-1^{\circ}\text{C}$ . Верхушки длиной около 1 мм изолировали от адаптированных к холоду побегов и помещали в питательную среду Мурасиге и Скуга, дополненную 3% альгината натрия. Затем, проводили процедуру инкапсуляции с использованием среды Мурасиге и Скуга, дополненной 0,1М хлорида кальция и 0,4М сахарозы. Инкапсулированные апексы сначала дегидратировали в жидкой среде Мурасиге и Скуга, дополненной 0,75М сахарозы,

на качалке со скоростью 50 rpm в течение 20 часов, а затем в течение 6 часов подсушивали на фильтровальной бумаге в стерильных условиях ламинар-бокса (скорость воздушного потока 0,6 м/сек, температура +25°C, относительная влажность воздуха  $35 \pm 2\%$ ) до  $20.74 \pm 3.41$  содержания воды. После этого дегидратированные альгинатные капли с апексами помещали в 1,2 мл криопробирки (10 капсул в 1 пробирку) и погружали в жидкий азот на 1 час. После криосохранения растительный материал в криопробирках оттаивали в воде в течение 1 минуты при +45°C и затем, 2 мин при +25°C. После оттаивания капсулы с апексами извлекали из криоампул и помещали для регидратации сначала в жидкую питательную среду Мурасиге и Скуга на 15 минут. Затем каждый апекс в альгинатной капсуле переносили на пластинки ("Costar, Cambridge, Mass.") в отдельные лунки, заполненные специализированной питательной средой для восстановления *in vitro*. Использование данного протокола для криосохранения верхушек побегов растений из рода *Rubus* L., размноженных *in vitro*, позволило авторам после жидкого азота восстанавливать рост 60 – 100% апексов. На этапе подсушивания образцов растительного материала перед погружением в жидкий азот 20% меристем теряли свою жизнеспособность.

С нашей точки зрения, определённым технологическим недостатком данного способа является необходимость применения инкапсуляции апексов альгинатом кальция. Процедура создания защитного альгинатного покрытия представляет собой длительный трудоемкий процесс, требующий дорогостоящих реактивов и дополнительных трудовых затрат.

Кроме того, опубликован протокол криосохранения апексов побегов боярышника (Kami D., Shi L., Sato T., Suzuki T., Oosawa K. Cryopreservation of shoot apices of hawthorn *in vitro* cultures originating from East Asia // Scientia Horticulturae. 2009. 120. P. 84 – 88 ), в котором, также, использовали приём инкапсуляции-дегидратации.

В этом способе растения боярышника (*Crataegus pinnatifida* Vge.) в течение 4 лет культивировали *in vitro* на питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 30 г/л сахарозы, 1 мг/л 6-бензиламинопурина и 7 г/л агар-агара при +25°C, 16 часовом дне и освещении люминесцентными лампами в  $60 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . От побегов, сформированных за 1 месяц культивирования и адаптированных к холоду в темноте при +5°C течение 2 недель, использовали верхушки длиной около 1 мм, которые были использованы для криосохранения. Перед замораживанием апексы сначала предкультивировали 24 часа на питательной среде без гормонов, дополненной 40 г/л сахарозы, и, затем, инкапсулировали альгинатом кальция в присутствии 40 г/л сахарозы. После этого апексы в альгинатных капсулах диаметром около 5 мм культивировали в жидкой питательной среде Мурасиге и

Скуга, дополненной 0,8М сахарозы при +25°C и 16 часовом дне. После этого капсулы с апексами подсушивали на силикагеле при +25°C в течение 6 часов. Дегидратированный материал помещали в 5 мл криоампулы и погружали в жидкий азот на 1 час. После криосохранения ампулы с апексами оттаивали в воде при +38°C в течение 2 минут и помещали на питательную среду для восстановления роста. Через два месяца оценивали жизнеспособность растительного материала. Использование данного протокола замораживания позволяло восстанавливать не более  $65.5 \pm 9.6\%$  апексов боярышника.

В данном протоколе криосохранения авторы использовали тот же трудоёмкий приём защиты апексов альгинатом кальция. Без сомнения использование в данном техническом решении сложной процедуры подготовки растительного материала к замораживанию приводит к существенному увеличению стоимости метода.

Наиболее близким технологическим решением к заявляемому нами техническому решению является способ криосохранения ( патент РФ №2302107: О.Н. Высоцкая, С.А. Данилова, А.С. Попов “Способ криосохранения *in vitro* меристем, изолированных из растений земляники садовой, *Fragaria L.*” ), где изолированные из растений *in vitro* дегидратированные на воздухе меристематические апексы в криоампулах замораживали погружением в жидкий азот.

Данный способ замораживания меристем отличается тем, что предкультивирование апексов, изолированных из растений земляники садовой (*Fragaria L.*), проводят *in vitro* в присутствии 0,79 – 0,81М сахарозы и 0,5 – 1,0 мг/л паклобутразола ([1-(4-хлорофенил)-4, 4-диметил-2(1,2,4-триазол-1-ил) пентан-3-ол]) перед подсушиванием и погружением в жидкий азот с целью длительного криосохранения. Протокол этого способа состоит из последовательно выполняемых этапов: 1) размножение растений земляники *in vitro* на агаризованной питательной среде, дополненной 3% сахарозой, 1 мг/л бензиламинопурина и 0,1 мг/л индолилуксусной кислоты; 2) адаптация растений – доноров к холоду в течение 1 – 4 месяцев на агаризованной питательной среде, дополненной 5 – 10 % сахарозой; 3) предкультивирование изолированных меристематических апексов на агаризованной питательной среде, дополненной 0,79 – 0,81 М сахарозы и 0,5 – 1,0 мг/л паклобутразола в течение 46 – 50 часов; 4) подсушивание апексов до 70 – 80% потери веса; 5) быстрое замораживание апексов в криоампулах погружением в жидкий азот (–196°C); 6) криогенное хранение образцов растительного материала; 7) оттаивание криоампул с образцами растительного материала в течение на 1 – 2 сек в водяной бане при +38°C; 8) регидратация оттаянного растительного материала в стерильных условиях ламинар-бокса на поверхности

агаризованной питательной среды, дополненной 3% сахаров и 0,5 мг/л бензиламинопурина; 9) посткриогенное восстановление растений из меристем на агаризованной питательной среде с 2% сахарозы, 1% глюкозы и 0,5 мг/л бензиламинопурина при +18°C, 16-ти часовом дне и освещенности 0,5 – 1 клк. Применение данного протокола позволяет восстанавливать растения различных сортов земляники из 75 – 100% меристем после хранения при ультранизких температурах. Однако существенным недостатком этого протокола является то, что он не был рассчитан на использование для криосохранения меристематических тканей других культивируемых *in vitro* растений.

#### Задача изобретения

Задачей, на решение которой направлено настоящее изобретение, является создание комплексного способа криосохранения растительного материала, использование которого позволит стабильно восстанавливать *in vitro* рост верхушек побегов, принадлежащих к различным клонам вегетативно размножаемых растений (из каждой криоампулы, содержащей не менее 20 апикальных верхушек) без применения программируемого замораживателя и альгината кальция.

#### Решение задачи

Поставленная задача решается тем, что в способе криосохранения меристематических верхушек побегов, изолированных из растений *in vitro*, используют комплекс модификаций разработанного ранее протокола быстрого замораживания в жидком азоте дегидратированных меристем земляники (*Fragaria L.*), заключающимся в размножении *in vitro* растительного материала, адаптации к холоду растений – доноров меристем, изолировании меристематических верхушек от побегов, предкультивировании изолированных апексов, погружении криоампул с апексами в жидкий азот, хранении ампул с меристемами в жидком азоте, оттаивании растительного материала, регидратации меристематических верхушек и посткриогенном восстановлении роста меристем, который состоит из последовательно выполняемых этапов: размножение *in vitro* растительного материала на агаризованных питательных средах, дополненных 3% сахарозой, 1 – 2 мг/л 6-бензиламинопурина и 0,1 – 0,5 мг/л индолилмасляной кислоты; адаптация растений – доноров к холоду на твердой агаризованной питательной среде, дополненной 6 – 10% сахарозой и 1 – 5 мг/л паклобутразола фирмы Sigma-Aldrich – [1-(4-хлорофенил)-4, 4-диметил-2(1,2,4-триазол-1-ил) пентан-3-ол] в течение 2 – 12 недель; предкультивирование апексов 46 – 50 часов на агаризованной питательной среде, дополненной 0,8М сахарозы,

2700 мг/л глюконата кальция ( $C_{12}H_{22}CaO_{14}$ ) и 1,0 – 5,0 мг/л паклобутразола; подсушивание в воздушной фазе апексов в течение 3 – 6 часов для удаления 70 – 80% воды; замораживание криоампул с апексами путём погружения в жидкий азот ( $-196^{\circ}C$ ) на срок не менее часа; оттаивание сначала при  $+38 - 40^{\circ}C$  1 – 5 сек в водяной бане, а затем при комнатной температуре на стерильной фильтровальной бумаге; регидратация растительного материала на агаризованной питательной среде для восстановления роста; посткриогенное восстановление растений из оттаявших меристем, на модифицированной питательной среде с 0,5 мг/л бензиламинопурина и 3% сахаров (сахароза + глюкоза) при  $+19 - 20^{\circ}C$ , 16-ти часовом дне и освещенности 0,5 – 1 клк.

#### Перечень иллюстративных материалов

Таблица 1. Питательные среды, использованные в протоколе криосохранения меристематических верхушек, изолированных из *in vitro* растений.

Таблица 2. Восстановление роста дегидратированных меристем ягодных и плодовых культур после быстрого замораживания в жидком азоте и криосохранения.

Фиг.1. Восстановление роста земляники (*Fragaria* L.) из дегидратированных апикальных меристем после быстрого замораживания в жидком азоте и криосохранения.

Фиг.2. Восстановление роста ежевики (*Rubus* L.) из дегидратированных апикальных меристем после быстрого замораживания в жидком азоте и криосохранения.

Фиг.3. Восстановление роста малины и ежевики (*Rubus* L.) из дегидратированных апикальных меристем после быстрого замораживания в жидком азоте и криосохранения.

Фиг.4. Восстановление роста рябины (*Sorbus* L.) из дегидратированных апикальных меристем после быстрого замораживания в жидком азоте и криосохранения.

#### Новизна изобретения

Новизной заявляемого изобретения является комплекс модификаций разработанных ранее протоколов криосохранения, где в питательных средах для адаптации растений к холоду используют 1 – 5 мг/л паклобутразола, а среда для предкультивирования изолированных меристематических верхушек содержит 1 – 5 мг/л паклобутразола и 2700 мг/л глюконата кальция ( $C_{12}H_{22}CaO_{14}$ ).

### Сущность изобретения

Сущность настоящего изобретения состоит в том, что предлагаемый способ представляет собой комплекс модификаций разработанного ранее протокола криосохранения меристем, где с целью увеличения криоустойчивости клонированного *in vitro* растительного материала паклобутразол включают в состав специализированных питательных сред для холодной адаптации растений – доноров меристем и для предкультивирования изолированных меристематических апексов перед их подсушиванием и замораживанием, что позволяет восстанавливать рост 63 – 100% криосохраненных меристем ( в каждой криоампуле не менее 20 меристем ).

### Технический результат

Техническим результатом настоящего изобретения является то, что патентованный ранее протокол замораживания дегидратированных меристем земляники (патент РФ № 2302107) был адаптирован и усовершенствован для криосохранения ценных клонов разных растений, культивируемых *in vitro* (табл. 2).

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

#### Пример 1.

Растения земляники садовой (сорта Алая зорька, Кокинская поздняя и Reine des Vallees) размножают *in vitro* на агаризованной питательной среде СР (табл. 1), дополненной 3% сахарозой, 1 мг/л бензиламинопурина и 0,1 мг/л индолилуксусной кислоты. Побеги, полученные в результате размножения, помещают на модифицированную питательную среду (СП) с 6% сахарозой и 1 мг/л паклобутразола (табл. 1) для адаптации к холоду. Затем изолированные из них апексы 46 – 50 часов предкультивируют на агаризованной питательной среде (СО), дополненной 2700 мг/л глюконата кальция ( $C_{12}H_{22}CaO_{14}$ ), 0,8М сахарозы и 1 мг/л паклобутразола (табл. 1), подсушивают до 70 – 80% потери веса и переносят в криоампулы, которые быстро погружают в жидкий азот ( $-196^{\circ}C$ ). После криогенного хранения не менее часа ампулы с меристемами на 1 – 2 сек помещают в водяную баню ( $+38^{\circ}C$ ). Размороженные меристемы извлекают из ампул на сухую стерильную фильтровальную бумагу, а затем помещают на свежую полужидкую питательную среду (СВ), дополненную 3% сахаров (сахароза + глюкоза) и 0,5 мг/л бензиламинопурина (табл. 1) для регидратации и рекультивирования при  $+18^{\circ}C$ , 16-ти часовом дне и освещенности 0,5 – 1 клк. После месяца культивирования *in vitro* 75 – 100% меристем восстановили рост (табл. 2). В результате дальнейшего культивирования в

стерильных условиях были получены растения земляники с листьями и корнями, пригодные для высадки в грунт (фиг. 1).

#### Пример 2.

Растения малины ( сорт Скрамница) и ежевики ( сорта: Agawan, Thornfree и Thornfree) размножают *in vitro* на агаризованной питательной среде СР (табл. 1), дополненной 3% сахарозой, 2 мг/л бензиламинопурина и 0,5 мг/л индолилуксусной кислоты. Побеги ежевики, полученные в результате размножения, адаптируют к холоду в течение 2 – 12 недель на модифицированной питательной среде (СП) с 8% сахарозой и 3 мг/л паклобутразола (табл. 1). Затем изолированные из них апексы 46 – 50 часов предкультивируют на агаризованной питательной среде (СО), дополненной 2700 мг/л глюконата кальция ( $C_{12}H_{22}CaO_{14}$ ), 0,8М сахарозы и 3,0 мг/л паклобутразола (табл. 1), подсушивают до 70 – 80% потери веса и переносят в криоампулы, которые быстро погружают в жидкий азот ( $-196^{\circ}C$ ). После криогенного хранения не менее часа ампулы с меристемами на 1 – 2 сек помещают в водяную баню при  $+38^{\circ}C$ . Размороженные меристемы извлекают из ампул на сухую стерильную фильтровальную бумагу, а затем помещают на свежую полужидкую питательную среду (СВ), дополненную 3% сахаров (сахароза + глюкоза) и 0,5 мг/л бензиламинопурина (таблица 1) для регидратации и рекультивирования при  $+18^{\circ}C$ , 16-ти часовом дне и освещенности 0,5 – 1 клк. После месяца культивирования 63 – 85% меристем восстановили рост (табл. 2) и сформировали в асептических условиях побеги малины и ежевики с листьями и корнями, пригодные для размножения *in vitro* и культивирования *ex vitro* (фиг. 2, 3).

#### Пример 3.

Растения рябины 2 сортов (Титан, Десертная Мичурина) размножают *in vitro* на агаризованной питательной среде СР (табл. 1), дополненной 3% сахарозой, 2 мг/л бензиламинопурина и 0,5 мг/л индолилуксусной кислоты. Побеги, полученные в результате размножения, помещают на модифицированную питательную среду (СП) с 10% сахарозой и 5 мг/л паклобутразола (табл. 1) для адаптации к холоду. Затем изолированные из них апексы 46 – 50 часов предкультивируют на агаризованной питательной среде (СО), дополненной 2700 мг/л глюконата кальция ( $C_{12}H_{22}CaO_{14}$ ), 0,8М сахарозы и 5 мг/л паклобутразола (табл. 1), подсушивают до 70 – 80% потери веса и переносят в криоампулы, которые быстро погружают в жидкий азот ( $-196^{\circ}C$ ). После криогенного хранения не менее часа ампулы с меристемами на 1 – 2 сек помещают в водяную баню при  $+38^{\circ}C$ . Размороженные меристемы

извлекают из ампул на сухую стерильную фильтровальную бумагу, а затем помещают на свежую полужидкую питательную среду (СВ), дополненную 3% сахаров (сахароза+глюкоза) и 0,5 мг/л бензиламинопурина (табл. 1) для регидратации и рекультивирования при +18<sup>0</sup>С, 16-ти часовом дне и освещенности 0,5 – 1 клк. После месяца культивирования *in vitro* 79 – 83% меристем восстанавливали рост (табл. 2, фиг. 4) и затем формировали в асептических условиях побеги с листьями. После высадки в грунт из этих побегов были сформированы корнесобственные растения, которые цветут и плодоносят *ex vitro*.

#### Результаты изобретения

Заявленный способ предназначен для криосохранения меристематических верхушек побегов разных клонированных *in vitro* растений и отличается от прототипа тем, что растения – доноры меристем проходят адаптацию к холоду в присутствии 1,0 – 5,0 мг/л паклобутразола, а питательная среда для предкультивирования изолированных апексов содержит 1,0 – 5,0 мг/л паклобутразола и 2700 мг/л глюконата кальция (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>CaO<sub>14</sub>).

Данная модификация протокола криосохранения дегидратированных меристематических верхушек, изолированных из растений *in vitro*, позволяет отказаться от токсичных криопротекторов, дорогостоящих программируемых замораживателей и может быть использована для пополнения коллекций криобанков образцами вегетативно размножаемых растений, в том числе, ценными клонами ягодных и плодовых культур.

Способ криосохранения меристематических верхушек побегов, изолированных из растений *in vitro*

Таблица 1. Питательные среды, использованные в протоколе криосохранения меристематических верхушек, изолированных из *in vitro* растений

Вещество, мг/л	Питательные среды			
	СР	СП	СО	СВ
Аммоний азотнокислый $\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	825	825	1650
Калий азотнокислый $\text{KNO}_3$	1900	950	950	1900
Магний сернокислый $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	370	370
Калий фосфорнокислый $\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	170	170	170
Кальций хлористый $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	–	–	440
Кальций азотнокислый $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	–	708	–	–
Кальций глюконат $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{CaO}_{14}$	–	–	2700	–
Железо сернокислое $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	55.6	27.8	27.8	55.6
Трилон Б $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	74.6	37.3	37.3	74.6
Марганец сернокислый $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	370	370
Натрий молибденовокислый	0.25	0.25	0.25	0.25
Борная кислота $\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	6.2	6.2	6.2
Цинк сернокислый $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	8.6	8.6	8.6
Калий иодистый $\text{KI}$	0.83	0.83	0.83	0.83
Кобальт хлористый $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025	0.025
Медь сернокислая $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025	0.025
Тиамин	0.5	0.5	0.5	0.5
Пиридоксин	0.5	0.5	0.5	0.5
Никотиновая кислота	0.5	0.5	0.5	0.5
Аскорбиновая кислота	1.0	1.0	1.0	1.0
Глицин	2.0	2.0	2.0	2.0
Мезоинозитол	100	100	100	100
Глюкоза	–	–	–	10000
Сахароза	30000	60000–100000	277425	20000
6-бензиламинопурин (БАП)	1.0–2.0	–	–	0,5
Индолил-масляная кислота (ИМК)	0,1–0.5	–	–	–
Паклобутразол	–	1,0–5,0	1,0–5,0	–
Агар-агар	7000	9000	7000	7000
Бидистиллированную воду добавляли до 10000 мл, pH = 5,6, до автоклавирования				

Способ криосохранения меристематических верхушек побегов, изолированных из растений *in vitro*

Таблица 2. Восстановление роста дегидратированных меристем ягодных и плодовых культур после быстрого замораживания в жидком азоте и криосохранения

вид	сорт	% меристем, восстановивших рост после хранения в жидком азоте
<i>Fragaria L.</i> , земляника	Кокинская поздняя	80
	Алая зорька	100
	Reine des Vallees	75
<i>Rubus L.</i> , ежевика	Agawam	65
	Thornfree	63
	Darrow	85
<i>Rubus idaeus L.</i> , малина	Скромница	69
<i>Sorbus L.</i> , рябина	Титан	83
	Десертная Мичурина	79

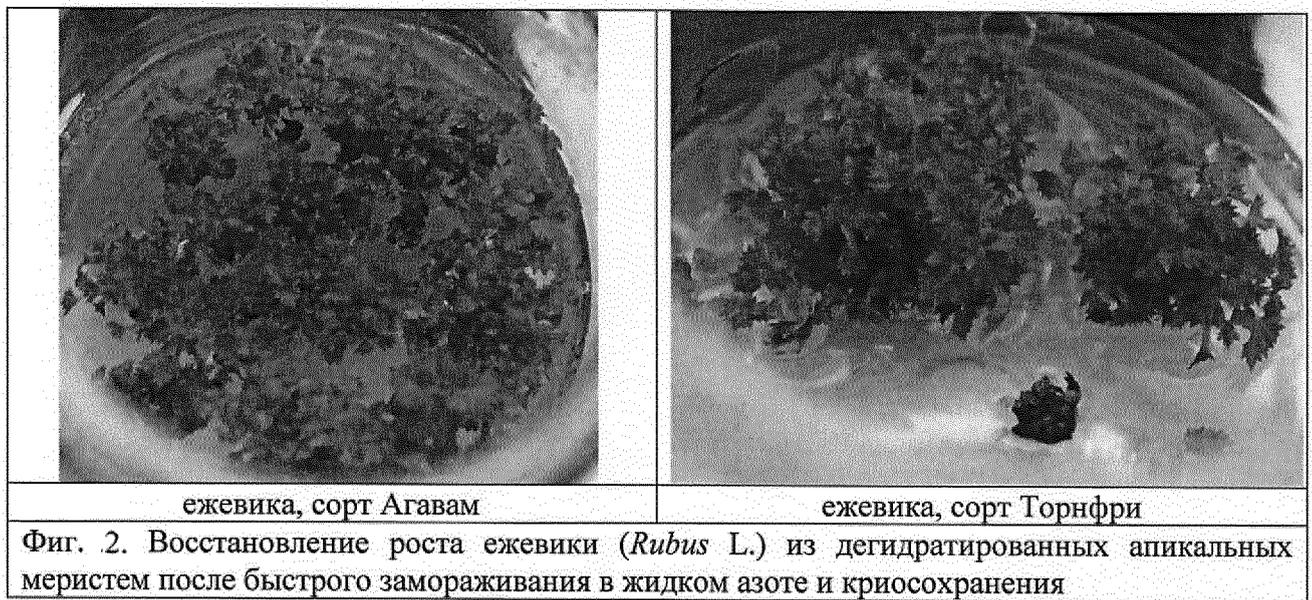
## Формула изобретения

Способ криосохранения меристем, изолированных из растений *in vitro*, заключающийся в подготовке растений – доноров меристем к замораживанию, выделении апексов, предкультивировании апексов, погружении криоампул с апексами в жидкий азот, хранении ампул с меристемами в жидком азоте, оттаивании апексов, регидратации апексов и посткриогенной регенерации растений из меристем, отличающийся тем, что растения – доноры меристем адаптируют к холоду 2 – 12 недель на агаризованной питательной среде, дополненной 6 – 10% сахарозы и 1 – 5 мг/л паклобутразола – [1-(4-хлорофенил)-4, 4-диметил-2(1,2,4-триазол-1-ил) пентан-3-ол], а предкультивирование изолированных из них апексов проводят в присутствии 0,8М сахарозы, 2700 мг/л глюконата кальция –  $C_{12}H_{22}CaO_{14}$  и 1,0 – 5,0 мг/л паклобутразола перед подсушиванием и быстрым замораживанием в жидком азоте.

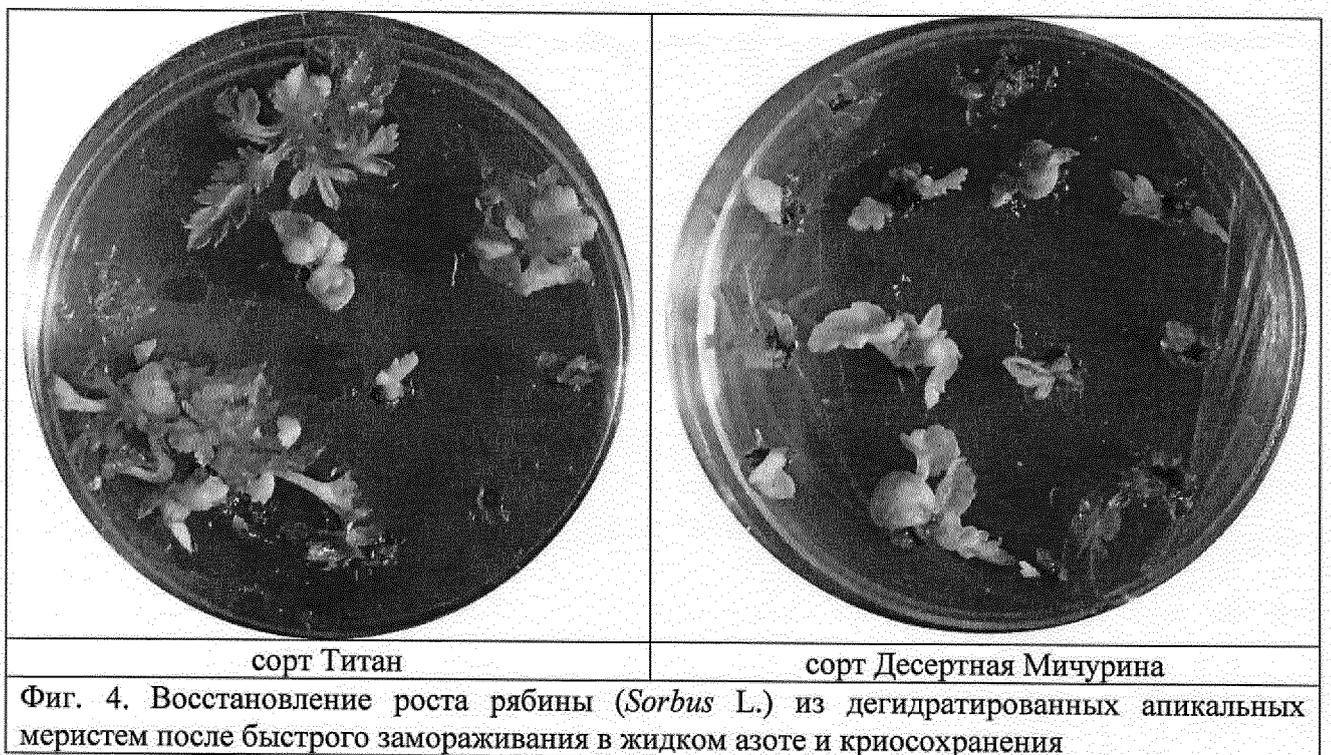
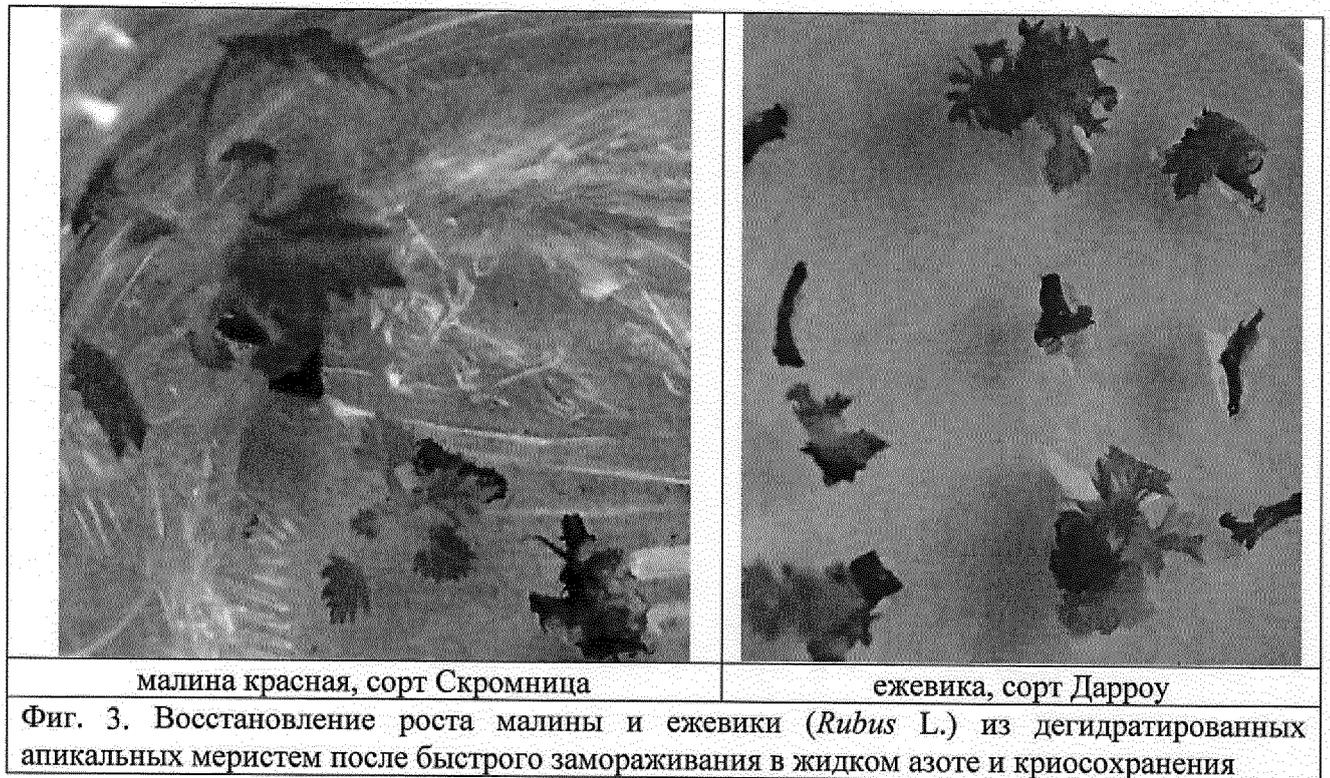
Авторы:

О.Н.Высоцкая

Способ криосохранения меристематических верхушек побегов, изолированных из растений *in vitro*



Способ криосохранения меристематических верхушек побегов, изолированных из растений *in vitro*



**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**(статья 15(3) ЕАПК  
и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**201900286****А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

A01N 3/00 (01/01/2006)

A01N 4/00 (01/01/2006)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A01N 3/00, A01N 4/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	GUPTA S. et al. "Cryopreservation of shoot tips of blackberry and raspberry by encapsulation-dehydration and vitrification", Cruoletters, 2006, V. 27, N1, p. 29-42	1
A	RU 2302107 C1 (ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ ИМ. К.А. ТИМИРЯЗЕВА РАН) 10.07.2007	1
A	RU 2565803 C2 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК) 20.10.2015	1
A	SU 1524479 A1 (ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ ИМ. К.А. ТИМИРЯЗЕВА и др.) 15.10.1990	1
A	WO 1996/039812 A2 (PHYTON, INC.) 19.12.1996	1
A	US 2016/0281055 A1 (DOW AGROSCIENCES LLC.) 29.09.2016	1

 последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

"А" документ, определяющий общий уровень техники

"D" документ, приведенный в евразийской заявке

"E" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

"O" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

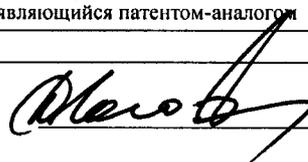
"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

"&amp;" документ, являющийся патентом-аналогом

Дата проведения патентного поиска: 11/02/2020

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы

Д.Ю. Рогожин