



Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования
**«Крымский федеральный университет
имени В.И. Вернадского»**

295007 Республика Крым, г. Симферополь,
проспект Академика Вернадского, 4

Отдел интеллектуальной собственности

Начальник отдела:
Бондаренко Даниил Владимирович
Тел. раб. +7(3652)51 08 69
Тел. моб. +7(978) 618 63 17
[E-mail:work.daniil@mail.ru](mailto:work.daniil@mail.ru)

г. Симферополь, ул. Ялтинская, 20, каб. 308

**КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ В.И. ВЕРНАДСКОГО**



*Отдел интеллектуальной
собственности*

**БИОТЕХНОЛОГИЯ
№3**

2025 г.

Патент на изобретение № 2851711

Авторы:

Сидякин Андрей Иванович

Способ освобождения растительных тканей от эндофитной инфекции для введения в культуру in vitro

Изобретение относится к области биотехнологии, лесного и сельского хозяйства, медицинской и пищевой промышленности, растениеводства и культивированию растительных тканей in vitro. Задачей изобретения является разработка модифицированного способа освобождения растительных тканей от эндофитной инфекции для введения в культуру in vitro и дальнейшего культивирования растительных тканей.

Технический результат заключается в повышении фактического выхода асептических жизнеспособных культур для дальнейшего культивирования in vitro до 60%, снижении затрат на подбор стерилентов, возможности использовать ткани не пригодные для традиционных методов введения. Способ реализуется следующим образом.

Растительный материал (мясистые листья, стебли, не однолетние или не ювенильные части растений: 2-3 летние побеги, корневища, черешки листьев, стебли промывают мягкой щеткой или поролоновой губкой под струей холодной водопроводной воды, очищая от налета пыли или частиц почвы, разрезают на части длиной не менее 4-5 см и раскладывают в емкости с крышками для последующей отмывки и стерилизации.

Для более полного освобождения от частиц грязи растительный материал отмывают моющими средствами: заливают в емкостях 1% мыльным раствором любого бытового моющего средства, ставят на шейкер, и встряхивают на шейкере 15 минут.

Растительный материал от мыльного раствора отмывают в водопроводной воде (3-5 смен водопроводной воды).

Проводят поверхностную стерилизацию растительного материала известными способами (например, с

использованием препаратов, содержащих ионы тяжелых металлов (ртути, алюминия); перекиси водорода; этилового спирта; коммерческими отбеливателям, растворами гипохлоритов) и отмывают растительный материал от стерилентов трех- или пятикратной сменой стерильной дистиллированной воды (Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев. Наук. Думка. 1980 г. 488 с.).

Растительный материал нарезают на части - экспланты применяя известные методические приемы: листья разрезают на части 2,5-5,0×5,0 мм с крупными жилками; стебли разрезают на узлы с 1-3 почками; из корневищ выделяют части содержащие боковые или апикальные почки (Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев. Наук. Думка. 1980 г. 488 с.).

Экспланты, подготовленные для введения в культуру in vitro раскладывают в культуральные сосуды на поверхности первой фазы - агаризованных (плотных) известных питательных сред (например: Мурасиге-Скуга, Гамборга В-5 или другие) следующего состава: макро-, микроэлементы, витамины, источники углерода, фитогормоны, и на поверхность плотной среды с эксплантами наслаивают второй слой (вторую фазу) жидкой питательной среды, который отличается от известного состава, тем, что в жидкую питательную среду для освобождения от инфекции (бактериальной или смешанной -бактериально-дрожжевой) кроме макро-, микроэлементов, витаминов, источников углерода, фитогормонов вводится один из антибиотиков в вариантах и концентрациях указанных ниже в Таблице 1. Толщина слоя первой фазы (плотной питательной среды) в культуральном сосуде не должна превышать 1 см; а толщина слоя второй фазы (наслаиваемого раствора жидкой питательной среды с антибиотиком/антибиотиками) - подбирается визуально, контролируя процесс наслаивания с таким расчетом, чтобы слой жидкой питательной среды, содержащей антибиотик не превышал 2-3 мм на поверхности агаризованной питательной среды. Таким образом, создается двухфазная система культивирования эксплантов, состоящая из первой фазы - (плотной) агаризованной среды без антибиотика,

стимулирующая рост тканей, и второй фазы - (жидкой) не агаризованной среды с антибиотиком, действующей бактерицидно или бактерицидно и фунгицидно на эндофитную микрофлору.

Формула изобретения

Способ освобождения растительных тканей от эндофитной микрофлоры для получения асептической культуры in vitro, включающий поверхностную стерилизацию эксплантов дезинфицирующими средствами, нарезку эксплантов и помещение их на агаризованную питательную среду без антибиотика, отличающийся тем, что на поверхность агаризованной питательной среды без антибиотика толщиной, не превышающей 1 см, наслаивают жидкую питательную среду такого же состава, что и агаризованная среда, но с добавлением антибиотиков хлорамфеникола в количестве 100-150 мг/л или хлорамфеникола+флуконазола в количестве 75-175 мг/л, при этом слой жидкой питательной среды, содержащей антибиотик, не должен превышать толщину 2-3 мм на поверхности агаризованной питательной среды, проводят инкубацию эксплантов в течение 24-72 часов с последующим переносом эксплантов на свежие питательные среды без антибиотиков.