



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006127713/12, 31.07.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
31.07.2006

(45) Опубликовано: 10.03.2008 Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SALINAS J.M. Spray system for re-attachment of *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Born. et Thuret (Gelidiales, Rhodophyta), *Hydrobiologia* 221:107-117, 1991; PETEIRO C., SALINAS J.M., FREIRE O., FUERTES C. Cultivation of the autoctonous seaweed *Laminaria saccharina* off the Galician coast (NW Spain): production and features of the sporophytes for an annual (см. прод.)

Адрес для переписки:

690041, Приморский край, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17, Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, пат. пов. Ю.Ю. Кравцовой, рег. № 540

(72) Автор(ы):

Титлянов Эдуард Антонинович (RU),  
Титлянова Тамара Викторовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (статус государственного учреждения) (RU)

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ ГЕЛИДИУМ (GELIDIUM) С РИЗОИДАМИ (ВАРИАНТЫ)

(57) Реферат:

Изобретения относятся к биотехнологии и марикультуре, в частности к промышленному культивированию посадочного материала красных водорослей с ризоидами. Способ включает отбор верхушечных фрагментов слоевища водоросли и культивирование их в жидкой питательной среде, предварительно затенив их нижнюю часть. Культивирование ведут в течение не менее 5-ти недель при постоянном перемешивании и аэрировании с еженедельной сменой питательной среды. Для культивирования берут верхушечные фрагменты длиной не более 1 мм. Во втором способе перед культивированием в жидкой питательной среде верхушечные фрагменты

подвергают глубокой заморозке в течение 10-30 мин. Затем оттаивают при комнатной температуре и выдерживают в жидкой питательной среде 1-2 недели, после чего отбирают живые верхушки ветвей. Культивирование ведут в течение не менее 6-ти недель при периодическом освещении, постоянном перемешивании и аэрировании с еженедельной сменой питательной среды. Изобретения позволяют быстро получить проростки из красных водорослей с ризоидами без закрепления их на субстрат в интенсивно перемешиваемой жидкой культуре для экстенсивного, плантационного и интенсивного культивирования красных водорослей в любое время года. 2 н. и 1 з.п. ф-лы, 2 ил., 2 табл.

(56) (продолжение):

and biennial harvest, THALASSAS, 2006, 22 (1). SU 1136770 A1, 30.01.1985. АНДРЕЕВА И.И., РОДМАН Л.С. Ботаника. - М.: Колос, 1999, с.52-56, 260-261.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 318 374** (13) **C1**

(51) Int. Cl.  
**A01G 33/02** (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2006127713/12, 31.07.2006**

(24) Effective date for property rights: **31.07.2006**

(45) Date of publication: **10.03.2008 Bull. 7**

Mail address:

**690041, Primorskij kraj, g.Vladivostok, ul.  
Pal'chevskogo, 17, Institut biologii morja  
im.A.V.Zhirmunskogo Dal'nevostochnogo  
otdelenija RAN, pat.pov. Ju.Ju.Kravtsovoj,  
reg.№ 540**

(72) Inventor(s):

**Titljanov Ehdvard Antoninovich (RU),  
Titljanova Tamara Viktorovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Institut biologii morja imeni A.V.  
Zhirmunskogo Dal'nevostochnogo otdelenija  
Rossijskoj akademii nauk (status  
gosudarstvennogo uchrezhdenija) (RU)**

(54) **METHOD OF OBTAINING PLANTING STOCK OF RED ALGAE GELIDIUM WITH RHIZOIDS (VARIANTS)**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology and mariculture.

SUBSTANCE: invention is directed to culturing planting stock of red algae with rhizoids in industrial scale. Method comprises taking top fragments of the frond of alga and culturing them in liquid nutrient medium, the lower part of the fragments being preliminarily shaded. Cultivation is carried out over an at least 5-week period at continuous stirring and aeration, while weekly renewing nutrient medium. For cultivation, top fragments no larger than 1 mm in length are taken. In second embodiment of the method, prior to be cultured in liquid nutrient medium, top

fragments are subjected to deep freezing for 10-30 min. Fragments are then thawed out at room temperature and kept in liquid nutrient medium during 1-2 weeks, whereupon living tops of branches are selected and cultured over an at least 5-week period at sporadic illumination, continuous stirring and aeration, while weekly renewing nutrient medium.

EFFECT: enabled rapid obtaining of germs from red algae with rhizoids without fixation of them on substrate in intensively stirred liquid culture for extensive, plantational, and intensive cultivation of red algae in any year period.

3 cl, 2 dwg, 2 tbl, 4 ex

RU 2 3 1 8 3 7 4 C 1

RU 2 3 1 8 3 7 4 C 1

Изобретения относятся к биотехнологии и марикультуре, в частности к способам получения посадочного материала в виде проростков с ризоидами красной водоросли гелидиум, и могут быть использованы для его промышленного культивирования.

5 Получение проростков как посадочного материала красной водоросли гелидиум, широко используемой для получения агара, очень актуально в связи с ее плантационным культивированием в ряде стран Европы и Америки и отсутствием в мировой практике быстрых и экономичных способов получения проростков, несущих ризоиды, с помощью которых растения прикрепляются к субстрату.

10 Известно несколько способов получения посадочного материала для плантационного (растение прикрепляется к субстрату) способа культивирования гелидиума. Техника получения проростков с ризоидами из спор зрелых дикорастущих растений один раз в году описана в работе Rojas R.H., Leon N.M., Rojas R.O. Practical and descriptive techniques for *Gelidium rex* (Gelidiales, Rhodophyta) culture. *Hydrobiologia* 1996. Vol. 326/327. P. 367-370. Выход спор стимулировался искусственно, споры оседали на 15 мертвые раковины моллюсков и прикреплялись к ним ризоидами. Посадочный материал представлял собой проростки гелидиума, прикрепленные к раковинам. При высадке материала на плантации раковины фиксировались к субстрату.

Однако данный способ не только технически сложен, но и имеет временные ограничения, поскольку водоросли спорносятся только один раз в году.

20 Другим способом получения проростков гелидиума является использование фрагментов длиной 4 см из верхней части слоевища, закрепление их на твердом субстрате, богатом карбонатом магния и кальция, и выращивание на этих фрагментах ризоидов в увлажняющей культуре с распылением среды (Salinas J.M. Spray system for re-attachment of *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Born. et Thuret (Gelidiales, Rhodophyta). 25 *Hydrobiologia* 221: 107-117, 1991).

Способ не нашел широкого применения в плантационном культивировании гелидиума из-за дороговизны и сложности, поскольку требует не только закрепления фрагментов на твердом субстрате, но и постоянного орошения.

30 Задача изобретения - разработка способов быстрого и массового получения проростков гелидиума с ризоидами в любое время года за счет проведения процесса выращивания в постоянно перемешиваемой и аэрируемой культуре.

Поставленная задача решается тем, что в известный способ получения посадочного материала красной водоросли гелидиум с ризоидами, включающий отбор верхушечных фрагментов слоевища водоросли и культивирование в питательной среде, согласно 35 изобретению вносят следующие изменения, верхушечные фрагменты помещают в жидкую питательную среду, предварительно затенив их нижнюю часть, а культивирование ведут по меньшей мере в течение 5-ти недель, постоянном перемешивании и аэрировании с еженедельной сменой питательной среды.

40 Получение проростков гелидиума с ризоидами в жидкой перемешиваемой культуре без прикрепления к субстрату значительно упрощает и ускоряет не только способ культивирования посадочного материала, но и, как следствие, значительно снижает трудоемкость всего цикла плантационного культивирования водоросли. Получение проростков с ризоидами в постоянно перемешиваемой и аэрируемой культуре авторами заявляемого изобретения предложено впервые.

45 Установлено, что именно затенение нижней части верхушечных фрагментов способствует росту ризоидов у водоросли.

Культивирование в течение не менее 5-ти недель позволяет получить проростки с ризоидами. Проведение процесса менее пяти недель не обеспечивает достижения роста проростков с ризоидами, достаточного для использования их в качестве посадочного 50 материала для дальнейшего использования в плантационной культуре.

Ведение процесса культивирования при постоянном перемешивании и аэрировании способствует нормальному развитию и росту культуры, обеспечивая таким образом получение жизнеспособного готового конечного продукта, а именно проростков гелидиума

с ризоидами.

Еженедельная смена питательной среды во время культивирования дает возможность получать бактериологически относительно чистую культуру, а также поддерживает в жидкой среде оптимальную концентрацию ингредиентов, обеспечивающих оптимальные условия роста проростков с ризоидами.

Для культивирования берут верхушечные фрагменты длиной не более 1 мм.

Использование фрагментов длиной не более 1 мм обеспечивает в нем максимальное содержание количества меристематической ткани, что оказывает влияние на скорость роста проростков на начальной их стадии культивирования и, как следствие, позволяет получить проростки с ризоидами достаточных размеров и хорошего качества за меньшее время культивирования.

Способ осуществляется следующим образом.

Пример 1

Верхние части растений (фиг.1а) очищались от эпифитов жесткой волосяной щеткой и промывались под струей стерилизованной морской воды. Затем от них отрезались верхушки ветвей длиной не более 1 см (в основном от 0,5 до 1 мм) (фиг.1б). Нижняя половина верхушечных фрагментов обворачивалась несколькими слоями черной пластиковой сетки, которая закреплялась на фрагменте силиконовой трубкой (фиг.1в). Фрагменты, завернутые в сетку, помещались в сосуды с жидкой питательной средой, где перемешивались и аэрировались пузырьками воздуха. Питательная среда заменялась на новую еженедельно. Растения выдерживались при температуре 14-15°C, освещенности около 120 мкмоль/м<sup>2</sup> × сек, фотопериоде 12:12 (свет: темнота), солёности 27.7‰ и рН 8.1. Растения культивировались в течение 5 недель.

Пример 2

Выполняют аналогично Примеру 1, только растения культивируют в течение 6 недель.

Морфофизиологические характеристики проростков, выращенных из верхних ветвей растений в перемешиваемой и аэрируемой культуре, согласно примерам 1 и 2 по сравнению с контролем без затенения представлены в табл.1, а рост и развитие ризоидов наглядно демонстрируется фиг.1, где а) верхушечные части гелидиума; б) фрагменты гелидиума длиной до 1 мм, отрезанные для культивирования; в) затененные сеткой и закрепленные на носителе фрагменты гелидиума; г) образцы гелидиума через 6 недель культивирования, имеющие пролификации в базальной части фрагмента; д) образование ризоидов на базальных пролификациях, е) внешний вид ризоидов.

Как видно из табл.1 и фиг.1, за это время длина растений увеличилась в 2.5 раза, а их вес - в 3 раза. Средняя скорость роста составляла 1.5% в день (табл. 1). В верхней (свободной от сетки) части фрагментов на ветвях второго порядка появились пролификации в виде ветвей третьего порядка. В нижней (закрытой сеткой) части фрагментов пролификации были обнаружены только в области среза (фиг.1е). В верхней половине пролификации в 90% случаев появились ризоиды (фиг.1д, е, табл. 1). Таким образом, за 5-6 недель культивирования верхушечных частей гелидиума в перемешиваемой и культивируемой культуре с затенением базальной части фрагментов были получены проростки, имеющие ризоиды, которые могут быть использованы как посадочный материал для дальнейшего плантационного культивирования.

Заявляемый изобретением технический результат достигается также тем, что в известном способе получения посадочного материала красной водоросли гелидиум с ризоидами, включающем отбор верхушечных фрагментов слоевища водоросли и культивирование в жидкой питательной среде, согласно изобретению перед культивированием в жидкой питательной среде верхушечные фрагменты подвергают глубокой заморозке в течение 10-30 мин, затем оттаивают при комнатной температуре и выдерживают в жидкой питательной среде 1-2 недели с ежедневной ее заменой. Для культивирования отбирают у оттаивших водорослей верхушки ветвей, а культивирование ведут в течение не менее шести недель при постоянном перемешивании и аэрировании с еженедельной сменой питательной среды.

Глубокая заморозка значительно позволяет упростить отбор жизнеспособного материала для дальнейшего получения проростков с ризоидами. Кроме того, в этом жизнеспособном материале - верхушечных микрофрагментах, полученных после размораживания, живыми остаются только клетки меристематической ткани, что существенно повышает впоследствии скорость роста проростков, а мертвая паренхиматозная ткань затеняет часть проростков.

Заморозку ведут в течение 10-30 минут. Ведение заморозки менее 10 минут не обеспечивает глубокого промораживания исходного материала и в результате не позволяет получить качественный исходный материал для культивирования, а это в свою очередь приводит к увеличению длительности процесса получения посадочного материала с ризоидами необходимых размеров. Проведение процесса заморозки более 30 минут нецелесообразно, поскольку это никоим образом не сказывается на качестве получения исходного материала для культивирования.

Выдержка оттаивших водорослей в питательной среде в течение одной-двух недель позволяет не только подрасти оставшейся жизнеспособной меристематической ткани, но и способствует визуальному проявлению четких контуров между живой меристематической тканью и мертвой паренхиматозной тканью слоевищ, которая за это время обесцвечивается. Выдержка менее одной недели не обеспечивает достижение вышеуказанного эффекта и, как следствие, осложняет отделение меристематической ткани и замедляет способ получения жизнеспособного материала, а выдержка более двух недель не оказывает влияния на процесс разделения живой и мертвой ткани. Ежедневная смена питательной среды в процессе оттаивания позволяет получить бактериологически относительно чистую культуру.

Культивирование посадочного материала осуществляют путем выдержки в жидкой питательной среде в течение не менее 6-ти недель при постоянном перемешивании и аэрировании. Именно данное время выдержки позволяет получить проростки с ризоидами достаточных размеров, которые в дальнейшем могут использоваться как посадочный материал.

Проведение культивирования проростков гелидиума и получение на них ризоидов в интенсивно перемешиваемой культуре авторами предложено впервые. Постоянное аэрирование необходимо для поддержания жизнедеятельности и роста проростков.

Еженедельная смена жидкой питательной среды в процессе культивирования дает возможность избежать массового появления бактерий, а также поддерживает в жидкой питательной среде оптимальную концентрацию ингредиентов, обеспечивающих оптимальные условия роста проростков.

#### Пример 3

Верхнюю часть талломов гелидиума очищают от эпифитов, как описано в примере 1.

Затем от верхних частей растений отрезают фрагменты длиной 2-3 см, имеющие наибольшее количество ветвей второго и третьего порядков (фиг.2а). Фрагменты промокают фильтровальной бумагой и заворачивают в алюминиевую фольгу. Пакет с водорослями помещают в цилиндр, сделанный из папье-маше, цилиндр закрывают с обеих сторон пробками и помещают в шкаф глубокого охлаждения (-80°C) на 10 мин. После глубокого охлаждения водоросли размораживают при комнатной температуре. Водоросли после оттаивания помещают в чашки с жидкой питательной средой на 1 неделю.

Питательную среду в чашках меняют ежедневно. Замораживание водорослей приводит к гибели всех клеток слоевища, кроме меристематических. Через две недели выдерживания водорослей в питательной среде погибшие клетки обесцвечиваются, а клетки меристемы продолжают делиться, оставаясь яркоокрашенными, что дает возможность идентифицировать живую ткань в верхушечной части ветвей (фиг.2б). Затем отрезаются верхушки ветвей, содержащие живую и мертвую части (фиг.2в), помещают в сосуды с жидкой питательной средой и культивируют в перемешиваемой и аэрируемой культуре в течение 6 недель, как сказано в примере 1.

#### Пример 4

Верхнюю часть талломов гелидиума очищают от эпифитов, как описано в примере 1. Затем от верхних частей растений отрезают фрагменты длиной 2-3 см, имеющие наибольшее количество ветвей второго и третьего порядков (фиг.2а). Фрагменты промокают фильтровальной бумагой и заворачивают в алюминиевую фольгу. Пакет с водорослями помещают в цилиндр, сделанный из папье-маше, цилиндр закрывают с обеих сторон пробками и помещают в шкаф глубокого охлаждения (-80°C) на 30 мин. После глубокого охлаждения водоросли размораживают при комнатной температуре. Водоросли после оттаивания помещают в чашки с жидкой питательной средой на 2 недели.

Питательную среду в чашках меняют ежедневно. Замораживание водорослей приводит к гибели всех клеток слоевища, кроме меристематических. Через две недели выдерживания водорослей в питательной среде погибшие клетки обесцвечиваются, а клетки меристемы продолжают делиться, оставаясь яркоокрашенными, что дает возможность идентифицировать живую ткань в верхушечной части ветвей (фиг.2б). Затем отрезаются верхушки ветвей, содержащие живую и мертвую части (фиг.2в), помещают в сосуды с жидкой питательной средой и культивируют в перемешиваемой и аэрируемой культуре в течение 8 недель, как сказано в примере 3.

Изменение биомассы и относительная скорость роста двух образцов замороженных-оттаянных верхушечных фрагментов ветвей слоевища гелидиума при культивировании в жидкой питательной среде, при перемешивании и аэрировании согласно примерам 3 и 4 представлены в таблице 2 (где первая цифра соответствует примеру 3, а вторая - примеру 4), а на фото 2 наглядно показано развитие проростков при культивировании, где на фиг.2а показан исходный материал, верхние части; 2б - точка роста слоевища после замораживания-оттаивания с живой меристематической и мертвой паренхиматозной тканями; 2в - верхушки ветвей слоевища гелидиума после замораживания-оттаивания и содержания в жидкой питательной среде в течение 2-х недель, являющегося исходным материалом для выращивания проростков с ризоидами; 2г - проросток гелидиума после 4-х недель культивирования, мертвая паренхиматозная ткань затеняет растущий проросток; 2д - проросток гелидиума с ризоидами после 8-ми недель культивирования; 2е - внешний вид ризоидов.

Как видно из представленных результатов, в течение первой недели культивирования рост фрагментов отсутствует. Наибольшая скорость роста фрагментов до 12% в сутки отмечена к четвертой неделе выращивания (табл. 2). В это время одна часть проростка покрыта (затеняется) мертвой тканью, другая находится вне нее (фиг.2г). В течение 8 недель культивирования биомасса образца растущих фрагментов увеличивается в 30-40 раз (табл. 2). В конце эксперимента проростки представляют собой молодые талломы длиной 3-5 мм, имеющие одну точку роста и один пучок ризоидов (фиг.2д, е). Эти молодые талломы могут быть использованы как посадочный материал в плантационной культуре.

Таким образом, заявляемые технические решения решают проблемы массового и быстрого получения проростков из красных водорослей с ризоидами для экстенсивного, плантационного и интенсивного культивирования красных водорослей в любое время года. Авторами впервые предложено получать проростки гелидиума с ризоидами без закрепления их на субстрат в интенсивно перемешиваемой жидкой культуре.

Таблица 1				
Затенение ветвей	Средняя биомасса одной ветви, мг	Средняя длина одной ветви, см	Средняя скорость роста ветвей, % × день <sup>-1</sup>	Относительное количество ветвей с ризоидами
Пластиковой черной сеткой (примеры 1-2)	21.6±4.3	2.5×0.6	1.5×0.4	92%
Контроль: без затенения	23.3×3.6	2.6×0.7	1.7×0.4	0%
Таблица 2				
Продолжительность культивирования	Номер примера	Биомасса образца, г		Относительная скорость роста, % в сутки
1-я неделя	3	100		-
	4	90		-
2-я неделя	3	150		5.8

	4	160	8.2
3-я неделя	3	362	11.0
	4	410	11.7
4-я неделя	3	1014	12.8
	4	380	10.8
5-я неделя	3	1617	6.7
	4	1430	5.4
6-я неделя	3	2292	4.9
	4	1840	3.6
7-я неделя	-	-	-
	4	2660	6.1
8-я неделя	-	-	-
	4	3111	2.23

#### Формула изобретения

15 1. Способ получения посадочного материала красной водоросли гелидуим с ризоидами, включающий отбор верхушечных фрагментов слоевища водоросли и культивирование в питательной среде, отличающийся тем, что верхушечные фрагменты помещают в жидкую питательную среду, предварительно затенив их нижнюю часть, культивирование ведут в течение не менее 5 недель при постоянном перемешивании и аэрировании с еженедельной сменой питательной среды.

20 2. Способ по п.1, отличающийся тем, что для культивирования берут верхушечные фрагменты длиной не более 1 мм.

25 3. Способ получения посадочного материала красной водоросли гелидуим с ризоидами, включающий отбор верхушечных фрагментов слоевища водоросли и культивирование в жидкой питательной среде, отличающийся тем, что перед культивированием в жидкой питательной среде верхушечные фрагменты подвергают глубокой заморозке в течение 10-30 мин, затем оттаивают при комнатной температуре и выдерживают в жидкой питательной среде 1-2 недели, после этого отбирают живые верхушки ветвей, а культивирование ведут в течение не менее 6 недель при периодическом освещении, постоянном перемешивании и аэрировании с еженедельной сменой питательной среды.

35

40

45

50





