ČESKÁ A SLOVENSKÁ FEDERATIVNÍ REPUBLIKA
(19)

FEDERÁLNÍ ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

270 236

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.[4]
A 01 H 1/06

(21) PV 1183-88.D
(22) Přihlášeno 24 02 88

(40) Zveřejněno 13 10 89
(45) Vydáno 04 03 91

(72) Autor vynálezu FÖGLEIN FERENC dr., BUDAPEŠŤ
OSVÁTH ZOLTÁN, SZERENCS
BALOGH JÓZSEF, SZÉKESFEHÉRVÁR (HU)

(73) Majitel patentu NOVOTRADE RT, BUDAPEŠŤ (HU)

(54) Způsob produkce bramborových minihlíz z rostlin množených in vitro tkáňovou kulturou

(57) Účinný způsob produkce bramborových minihlíz in vitro - in vivo, při kterém se indukuje in vitro navozené vytváření hlíz na in vitro zakořeněné rostliny a tyto rostliny se pak pěstují ve sklenících, růst stonku se omezuje ošetřením antigibberellovými chemikáliemi, minihlízy se shromažďují a rostliny se opět zasazují, vhodně se ošetří a minihlízy produkované v průběhu vegetace se periodicky shromažďují.

CS 270236 B2

Vynález se týká účinného způsobu produkce bramborových minihlíz in vitro - in vivo.

Je znám způsob hromadné výroby bramborového množitelského materiálu prostého virů a viroidů kultivací rostlinné tkáně, při kterém se tkáňové buňky výhonku kultivují a množí in vitro na živném prostředí, pak se výhonky zakořeňují nebo se na nich navozuje vytváření minihlíz, in vitro zakořeněné rostliny se vysázejí do skleníku k růstu in vivo jakožto mateřských rostlin, nebo se na nich in vitro může navozovat vytváření minihlíz, z těchto minihlíz se mohou pěstovat další mateřské rostliny a z nich se mohou získávat semenáčky nebo malé hlízy jakožto množitelský materiál, nebo se jakožto množitelského materiálu může používat minihlíz. Vytváření semenáčků nebo hlíz se může řídit ovlivňováním patatinové syntézy mateřských rostlin.

Rychlost pomnožení bramborového množitelského materiálu tradičními způsoby je nízká, maximálně 10 až 12 násobně ročně, takže je nutno udržovat tradiční kultivar 8 až 12 let. Současně dostupné kultivary brambor jsou citlivé na různé houbové, bakteriální a virová onemocnění. Uchování tradičního kultivaru je možné jen v oblastech, kde je úroveň onemocnění dostatečně nízká pro příznivé ekologické faktory.

Obsah vody v bramborovém množitelském materiálu je přibližně 90 %, takže pro dopravu a skladování jsou nutné zvláštní podmínky. V určitém případě náklady na dopravu mohou být vyšší než je cena brambor v místě pěstování.

Známý způsob je vhodný pro eliminování shora uvedených obtíží. Za použití popsaného způsobu je rychlost množení vysoká, doba potřebná pro uchovávání kultivaru se může snížit na 1 až 2 roky, je možno produkovat zdravý množitelský materiál, naklady na dopravu a skladování se mohou podstatně snížit množením minihlíz.

Podle shora uvedeného způsobu se bramborový množitelský materiál může produkovat v laboratoři nebo ve skleníku. Jelikož investiční a údržbové náklady jsou vysoké v obou případech, je výnosnost způsobu závislá na množství produkovaného množitelského materiálu na jednotku plochy. Založení skleníku je nákladnější nežli zřízení laboratoře.

Přesazování rostlin vyprodukovaných v laboratoři potřebuje dobrou technickou úroveň ve skleníku (zařízení k přesnému vyhřívání půdy, regulace vlhkosti, přídavné osvětlování). Nutno vzít v úvahu, že rostliny přesazené z laboratoře do skleníku mají růst ekonomicky a to se může zajistit v případě produkce minihlíz jedině nejlepším využitím skleníku. Podle dřívějších procesů autorů bylo možno produkovat 400 a 800 minihlíz na m^2. Tato skutečnost omezuje využitelnost skleníku pro produkci minihlíz. Nyní byl vypracován způsob k podstatnému zvýšení účinnosti produkce minihlíz na jednotku plochy. Při způsobu podle vynálezu - což ze známého stavu techniky není zřejmé - se může účinnost dřívějšího způsobu zvýšit alespoň o 300 až 500 %.

Při způsobu podle vynálezu se chorob prosté množitelské rostliny produkují známými způsoby kultivace tkání a zakořeňováním v kapalném prostředí in vitro za sterilních laboratorních podmínek, jakmile rostlina vyvine kořeny, vymění se živné prostředí obsahující antigibberellové chemikálie pro indukování hlíz a rostlina se inkubuje v tomto prostředí. Po navození vzniku hlíz se rostliny ošetří chemikálií, která podporuje zakořeňování a rostliny se vysázejí do pevného prostředí ve skleníku. Vegetativní růst rostlin se omezuje snižováním obsahu gibberellinu na obsah cytokininu periodicky a pravidelně a produkované minihlízy se sbírají z kořenů, rostlina se pak ošetří zakořeňovacím hormonem a přesadí se zpět do pevného prostředí a ošetřuje se pravidelně a periodicky antigibverellovou chemikálií a pak se opět produkované minihlízy sesbírají.

Při způsobu podle vynálezu se produkují chorob prosté rostliny z tkáňové kultury o sobě známými způsoby. Virů a nemocí prosté rostliny se mohou množit jakýmkoliv známým způsobem pro pěstování tkání. Rostliny, množené tkáňovou kulturou, se zakoře-

ňují v kapalném prostředí. Po vytvoření kořenů, když již rostliny mají kořeny, se zakořeňovací proces změní za prostředí navozující vytváření hlíz, což je hlavně prostředí MS (Murashige and Skoog: Physiol. Plant. 15, 473 až 397 /1962/) a toto prostředí je odlišné v množství zdroje anorganického dusíku (10 % původního prostředí) a požadavek rostlin na dusík se zajišťuje přidáním zdroje organického dusíku (glutamin, asparagin) v průběhu navozování vzniku hlíz. Koncentrace sacharózy v navozovacím prostředí je vyšší než v prostředí MS, s výhodou se používá sacharózy 40 g/l.

Prostředí, používané pro navozování vzniku hlíz, obsahuje cytokininy ve vysoké koncentraci, vhodné je množství 5 až 10 mg/l. Podstatné části prostředí používaného pro navozování vzniku hlíz jsou různé antigibberelliny. Takovými chemikáliemi jsou kumarin a jeho deriváty, chlorcholinchlorid (CCC), s výhodou dichloracetykhexamethylenimi. Dichloracetylhexamethylenimin má růst omezující a antidotové působení. V rostlinách navozuje vznikání hlíz snižováním obsahu gibberellinu v poměru k cytokinimům a má výhodné působení na strukturu buněčných membrán rostlin. Při způsobu podle vynálezu se může používat dichloracetylhexamethyleniminu v koncentraci 6 až 20 mg/l.

Rostliny se inkubují v prostředí navozujícím vznik hlíz za teploty 18 až 20 °C při osmihodinovém osvětlování po dobu 10 až 14 dní.

Po navození se hlízy brambor vyvíjejí v pevném prostředí ve sklenících. Před přesazením do skleníku se navozující prostředí z kořenů vymyje a k podpoření zakořeňování a k předcházení infikování rostlin Rhizoctonia se rostliny ponoří do kapaliny obsahující indol-octovou kyselinu v množství 0,05 mg/l a 0,2% Previcur-N/propyl-N-/3--dimethylaminopropyl/karbamáthydrochlorid/.

Po zakořenění rostlin ve sklenících - tři týdny po přesazení - se rostliny postříkají roztokem obsahujícím kumarinu 10 mg/l a/nebo dichloracetylhexamethyleniminu 5 až 10 mg/l jednou týdně. Tak rostliny zůstávají malé, avšak jejich fyziologický stav je vhodný pro vytváření hlíz. Je důležité, že se rostliny mohou zbrzdit k předcházení delšího růstu.

Po přesazení do skleníku (za 1,5 až 2 měsíce) se rostliny vyjmou z půdy a hlízy větší než 0,5 cm se z kořenů seberou. Může se získat přibližně 1000 hlíz z m^2 z rostlin pěstovaných tímto způsobem při prvním oddělování hlíz.

Při vyjmutí rostliny z půdy a při sbírání hlíz se kořeny mohou poškodit. Stonek rostliny se opět ponoří do roztoku obsahujícího indol-acetonovou kyselinu v množství 0,05 mg/l a 0,2 % Previcur-N a pak se rostlina zasadí do původní nebo do nové půdy. Po fázi zakořeňování se opakuje předchozí opatření (10 mg/l kumarinu a/nebo 6 mg/l dichloracetylhexamethyleniminu). Odstranění hlíz, ošetření shora popsaným roztokem a přesazení rostlin se může opakovat po 3 až 4 týdnech. Při druhé sklizni se může získat hlíz 2000 až 3000/m^2. Když jsou rostliny staré - 4 měsíce po zasazení - vyjmou se z půdy a zničí se. Rostliny, ošetřované shora popsaným způsobem, mohou vytvořit 2500 až 4000 hlíz/m^2 v závislosti na kultivaru a toto množství je 3 až 4 krát větší než bylo možné získat známým způsobem.

Sebrané hlízy se nechávají zkorkovatět po dobu dvou týdnů za difuzního světla a 70% vlhkosti, pak se roztřídí a skladují se při teplotě 2 až 5 °C.

Způsob podle vynálezu se může opakovat dva a půl krát ročně, to znamená, že se účinnost produkce minihlíz zvýší 4 až 5 krát ve srovnání se známým způsobem. Následující příklad vynález objasňuje a uvádí nejlepší způsob provádění vynálezu.

Příklad

Bramborový kultivar "Somogy Gyöngye" se množí tkáňovou kulturou o sobě známým způsobem. Po očíslování se výhonky zakoření v kapalném prostředí. Po dvoutýdenním zakořeňování se kapalné prostředí vymění za jiné prostředí k navozování vzniku hlíz. Prostředí pro navozování vzniku hlíz má toto složení: základní prostředí Murashige

a Skoog (MS), 1/10 koncentrace, dusičnan amonný a dusičnan draselný, 20 mg/l glutamové kyseliny, 40 g/l sacharózy, 5 mg/l benzyladeninu, 25 mg/l kumarinu a 6 mg/l dichloracetylhexamethyleniminu. Rostliny se inkubují v tomto prostředí k navození vzniku hlíz po dobu 10 dní za 8 hodinového osvitu 200 lux/m^2 a při teplotě 18 ^{o}C. Po navození vzniku hlíz se svazky rostlin vyjmou z kultivační baňky, rostliny se omyjí ve vodě z vodovodu, oklepou se k odstranění nadbytku vody a ponoří se do roztoku obsahujícího 0,08 mg/l indol-octové kyseliny a 0,2% Previcur N, pak se vysázejí do rašelinové směsi, 50 rostlin/m^2. Po zakořenění rostlin se vytvoří malé brázdičky (2 cm), pak od druhého týdnu po vysázení rostlin se rostliny postřikají roztokem obsahujícím 10 mg/l kumarinu a 6 mg/l dichloracetylhexamethyleniminu jednou týdně. Po vysázení - za 1,5 až 2 měsíce - rozkošatělé rostliny se vyjmou z půdy. Hlízy větší než 0,5 cm se oddělí ručně hřebenem vyrobeným pro tento účel. Rašelina a hlína se setřepe z rostlin, které se ponoří do roztoku obsahujícího 0,08 mg/l indol-octové kyseliny a 0,2% Previcur-N a pak se zpět zasází do původní půdy a zavlaží se. V ošetření rostlin se pokračuje postřikáním roztokem obsahujícím 10 mg/l kumarinu a 6 mg/l dichloracetylhexamethyleniminu. Po 2 až 4 týdnech se sběr hlíz a zasazení rostlin opakuje. Rostliny se ošetří seříznutím k udržení vhodného malého vzrůstu rostlin. Získané řízky bez kořenů se mohou použít pro další množení a vytváření hlíz.

Rostliny 'Somogy Gyöngye' pěstované a množené tímto způsobem vytvářejí 3500 minihlíz/m^2 za 4 měsíce.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob produkce bramborových minihlíz z rostlin množených in vitro tkáňovou kulturou v kapalném prostředí, vyznačený tím, že vytváření hlíz se navozuje in vitro na zakořeněných rostlinách, rostliny s navozeným vytvářením hlíz se zasadí do pevného prostředí ve skleníku a hlízy se vyvíjí ve sklenících, zatímco růst rostlinných stonků se omezuje postřikem antigibberelliny jako jsou kumarin a jeho deriváty nebo chlorcholinchlorid pravidelně alespoň třikrát během jejich vývoje, vyvinuté minihlízy se sbírají, rostliny se zasázejí zpět do půdy, růst stonků se dále omezuje a vyjímání rostlin z půdy a opětné zasazování se periodicky opakuje v průběhu vegetační periody rostlin.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se vytváření hlíz navozuje použitím základního prostředí Murashige a Skoog obsahujícího dusičnan amonný a dusičnan draselný v koncentraci 1/10, 20 mg/l glutamové kyseliny, 40 g/l sacharózy, 5 mg/l benzyladeninu, 25 mg/l kumarinu a 6 mg/l dichloracethylhexamethyleniminu.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se před zasazením do skleníku rostliny opatří chemikálií, která navozuje zakořeňování a popřípadě prostředkem k předcházení infikování Rhizoctonia.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačený tím, že se rostliny před zasazením do skleníku ošetřují indol-octovou kyselinou a popřípadě propyl-N-/3-dimethylaminopropyl/karbamát-hydrochloridem ve formě roztoku.