



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

231241

(11) (B1)

(22) Prihlášené 31 12 82
(21) (PV 10062-82)

(51) Int. Cl.³

A 01 N 43/86
C 07 D 277/64

(40) Zverejnené 15 03 84

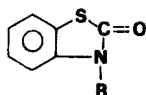
(45) Vydané 15 06 86

(75)
Autor vynálezu

SEKERKA VLADIMÍR doc. RNDr. CSc., SUTORIS VIKTOR prof. RNDr. CSc.,
BRATISLAVA

(54) Spôsob usmernenej dediferenciačnej transformácie
bôbovitých rastlín

Spôsob usmernenej dediferenciačnej transformácie bôbovitých rastlín vyznačujúci sa tým, že na rastlinný organizmus sa pôsobí derivátmi kyseliny 2-oxo-3-benzotiazolín-octovej všeobecného vzorca I



/I/

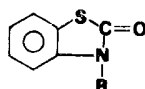
kde R je metoxykarbonylmetyl, etoxykarbonylmetyl, 2-chloretoxykarbonylmetyl, allykarbonylmetyl alebo hydrazinokarbonylmetyl, o koncentrácii 10^{-4} až 10^{-3} mol/l.

Vynález sa týka spôsobu usmernenej dediferenciačnej transformácie bôbovitých rastlín.

K indukcii dediferenciačnej transformácie buniek a pletív rastlín sú najčastejšie používané syntetické auxinoidy, ako je kyselina beta-indolyloctová /IAA/, kyselina alfa-naftyloctová /NAA/, kyselina indolylmaslová /IBA/, kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová /2,4-D/, deriváty kinínu, giberelíny, retardanty a iné /Kruse, P. F., Petterson, M. K.: Tissue culture, Methods and Applications, Academic Press New York and London 1973, p. 868; Novák F. J. /Edit./: Využití kultur rostlinných explantů ve šlechtění, Sbor mezinár. symp. ČSAV, Praha 1977, p. 650; Butenko R. G. /Edit./: Kultura kletok rastenij, Kyjev 1978, p. 384/, ktoré stimulujú meristemizáciu diferenciovanych buniek a sú nevyhnutné pre udržanie neorganizovaného rastu pletivovej kultúry. Táto ich vlastnosť môže byť využitá pri zvyšovaní produkcie biomasy pomocou pletivových kultúr /Venketeswaran, S., Gandhi, V.: Biomasa, 2, 5 - 15, 1982/.

V posledných rokoch boli dokázané analogické účinky aj niektorých iných syntetických auxinoidov indolylového radu. Niektoré z nich, napríklad benazolín/4-chlór-2-oxo-benzotiazolín-3-octová kyselina/ alebo benzotiazolilooctová kyselina sú rovnako aktívne v iniciácii a raste kalusov mnohých rastlín ako 2,4-D, alebo ju dokonca prevyšujú /Ingram D. S., Butcher D. Z. Pflanzenphysiol., 66, 206, 1972/.

Podstata spôsobu usmernenej dediferenciačnej transformácie bôbovitých rastlín podľa vynálezu spočíva v tom, že sa na rastlinný organizmus posobí derivátmi všeobecného vzorca I



/I/,

kde R je metoxykarbonylmetyl, etoxykarbonylmetyl, 2-chlóretoxykarbonylmetyl, allylkarbonylmetyl alebo hydrazinokarbonylmetyl
o koncentrácii 10^{-4} až 10^{-3} mol/l.

Zlúčeniny všeobecného vzorca I podľa vynálezu spôsobujú analogické morfogénne efekty ako horeuvedené fytohormonálne látky, a to v podmienkach in vivo aj in vitro.

Preukazná transformácia rastlinných pletív a buniek nastáva pri koncentrácii 10^{-4} mol/l. Dediferenciačnými procesmi dochádza k vytvoreniu kalusu krémovo žltej farby. V štádiu primokalusu pletivo sa rozpadáva na bunky. Po preočkovaní na čerstvé médium analogického zloženia, ako bolo médium počas dediferenciácie, kalus zachováva typický neorganizovaný rast. Čerstvá hmotnosť biomasy v procese dediferenciácie sa zvyšuje o 25 až 35 %.

Stupeň účinnosti predmetných látok závisí od použitej koncentrácie, a od charakteru substituentov viazaných na jadro.

Uvedené biologické vlastnosti, ale aj ekonomický aspekt, relatívne nízke náklady na syntézu benzotiazolov, zvyrazňujú ich význam ako potencionálnych induktorov usmernenej dediferenciačnej transformácie rastlinného organizmu za účelom biotechnologických manipulácií.

Pr í k l a d 1

V prvej sérii pokusov v podmienkach in vivo k indukcii dediferenciácie boli použité klíčence bôbovitých rastlín /Pisum sativum L. var. Smaragd/. Po imbibícii 6 hodín v destilovanej vode. semená klíčili v tme v termostate 72 hodín. Potom klíčence boli po omytí od perlitu osušené papierovou vatou, selektované a na ďalšie testy boli použité klíčence s koreňom dlhým $25 - 30 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$. Súborny klíčencov /5 ks/ boli vysadené v horizontálnej

polohe na navlhčený filtračný papier do Petriho misiek priemernej veľkosti 17 cm. Filtračný papier bol nasýtený účinnou látkou v koncentráciách 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} mol.dm⁻³. Kontrolná séria klíčencov bola inkubovaná na filtračnom papieri, ktorý bol nasýtený destilovanou vodou. Indukcia dediferenciácie sa uskutočnila v termostate v tme pri $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ počas 72 - 96 hodín. Efekt dediferenciačnej transformácie bol stanovený vizuálne pomocou mikroskopickej lupy. Maximálnu transformačnú účinnosť spôsobuje 3-Etyl-ester kyseliny 2-oxo-3-benzotiazolín octovej pri koncentrácii 10^{-3} mol.dm⁻³. Ostatné deriváty boli taktiež najúčinnnejšie pri koncentrácii 10^{-3} mol.dm⁻³.

Pr í k l a d 2

V druhej sérii pokusov v podmienkach in vitro kalogenéza bola indukovaná na apikálnych segmentoch primárnych koreňov bôbovitej rastliny /*Vicia sativa* L. var. Solarka/.

Selektované semená /približne rovnakej veľkosti a farby osemenia/ boli sterilizované roztokom 5 % chloramínu 1 hodinu a niekoľkokrát opláchnuté sterilnou destilovanou vodou. Sterilné semená klíčili v Petriho miskách na 0,8 % agarovom médiu 48 hodín v tme pri $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. K indukci kalogenézy boli použité sterilné klíčence $25 - 30 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$ dlhé. Z nich boli dekapitované apikálne segmenty primárnych koreňov v dĺžke 10 - 15 mm, ktoré boli vysadené do Petriho misiek v horizontálnej polohe na 0,6 % modifikované pevné agarovo médium podľa Murashige-Skooga. V pokusných variantoch médium obsahovalo účinné látky v koncentráciách $10^{-3} - 10^{-9}$ mol.dm⁻³. V kontrolnej variante médium obsahovalo vyššie uvedené známe fytohormonálne látky.

Po stanovení čerstvej hmotnosti apikálnych segmentov primárnych koreňov kalogenéza bola indukovaná pri teplote $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ v tme počas 14 dní. Príprava modelového materiálu, ako aj kultivácia boli robené v aseptických podmienkach. Nárast čerstvej hmotnosti počas kalogenézy bol stanovený gravimetricky. Maximálna dediferenciačná účinnosť bola zistená u 3-Etylesteru kyseliny 2-oxo-3-benzotiazolín octovej pri koncentrácii $5 \cdot 10^{-4}$ mol. dm⁻³ (cca 30 % hmot. . Ostatné deriváty boli najúčinnnejšie taktiež pri koncentrácii $5 \cdot 10^{-4}$ mol.dm⁻³. Pri koncentrácii 10^{-7} až 10^{-9} mol/l bolo zvýšenie čerstvej hmotnosti 5 až 8 %.

Pr í k l a d 3

V tretej sérii pokusov v podmienkach in vitro kalogenéza bola indukovaná na intaktných klíčencoch a klíčencoch s amputovanou stonkou a koreňom bôbovitej rastliny /*Vicia faba* L., var. Solarka/.

Podmienky sterilizácie semien boli zachované ako v testoch uvedených v príklade 2. Sterilné semená boli vysadené do skúmaviek v A. variante na 0,6 % modifikované pevné agarovo médium podľa Murashige-Skooga s obsahom účinných látok ako v pokusoch uvedených v príklade 2.

V B. variante sterilné semená klíčili v Petriho miskách na 0,8 % agarovom médiu. Po vyklíčení zo semien boli extirpované stonky a korene. Semeno bolo znova vysadené na médium analogického zloženia ako v A. variante. Kalogenéza bola sledovaná počas 7 - 14 dní v tme pri teplote 25°C v termostate. Maximálna účinnosť kalogenézy bola zistená u 3-Etyl-esteru kyseliny 2-oxo-3-benzotiazolín octovej v A. variante pri koncentrácii 10^{-3} mol.dm⁻³ a v B. variante v koncentrácii $5 \cdot 10^{-4}$ mol.dm⁻³. Ostatné deriváty v A. a B. variante boli najúčinnnejšie pri analogických koncentráciách.

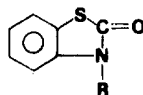
Zlúčeniny aplikované podľa vynálezu:

1. 3-Metyléster kyseliny 2-oxo-3-benzotiazolín octovej
2. 3-Etyléster kyseliny 2-oxo-3-benzotiazolín octovej
3. 3/2-Chlóretylester/kyseliny 2-oxo-3-benzotiazolín octovej

4. 3-Alylester kyseliny 2-oxo-3-benzotiazolín octovej
5. Hydrazid kyseliny 2-oxo-3-benzotiazolín octovej

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob usmernenej dediferenciačnej transformácie bôbovitých rastlín vyznačujúci sa tým, že na rastlinný organizmus sa pôsobí derivátmi kyseliny 2-oxo-benzotiazolín octovej všeobecného vzorca I



/I/,

kde R je metoxykarbonylmetyl, etoxykarbonylmetyl, 2-chlóretoxykarbonylmetyl, allylkarbonylmetyl alebo hydrazinokarbonylmetyl,
o koncentrácii 10^{-3} mol/l.