

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 244491 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433731**

(22) Data zgłoszenia: **2020.04.28**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.11.02 BUP 31/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.02.05 WUP 06/2024**

(51) MKP:

A01H 4/00 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

A01N 59/16 (2006.01)

A01N 59/20 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA BYDGOSKA
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH,
Bydgoszcz, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ALICJA TYMOSZUK, Bydgoszcz, PL
MAGDALENA TOMASZEWSKA-SOWA,
Łochowo, PL
PIOTR WOJEWÓDZKI, Bydgoszcz, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Jankowski, Bydgoszcz, PL

(54) Tytuł:

Sposób dezynfekcji powierzchniowej eksplantatów wierzchołkowych i węzłowych roślin

PL 244491 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób powierzchniowej dezynfekcji eksplantatów wierzchołkowych i węzłowych roślin ozdobnych rozmnażanych w warunkach *in vitro*, z wykorzystaniem środka zawierającego nanocząstki srebra lub srebra i miedzi. Sposób znajduje zastosowanie w inicjacji kultur *in vitro* ważnych gospodarczo roślin ozdobnych jak m.in.: chryzantema, trykrotka, begonia, fikus, anturium, róża, sępolia, skrzydłokwiat, storczyki.

Produkcja sadzonek wielu gatunków roślin ozdobnych odbywa się w kulturze *in vitro* i polega na wegetatywnym rozmnażaniu (mikrorozmnażaniu) roślin na specjalnych pożywkach, w ściśle kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. Techniki *in vitro* są powszechnie stosowane w celu szybkiego uzyskania wielu roślin z niewielkiej, początkowej ilości wyjściowego materiału roślinnego. Wzrost lub regeneracja roślin potomnych odbywa się z niewielkich fragmentów organów i tkanek roślinnych nazywanych eksplantatami.

Do zainicjowania kultury *in vitro* roślin ozdobnych wykorzystuje się najczęściej eksplantaty w postaci wierzchołków pędu lub odcinków pędu zawierających węzeł, z którego wyrasta liść. Eksplantaty te zawierają młode (juwenilne) tkanki merystematyczne, które *in vitro* szybko podejmują dalszy wzrost prowadząc do uzyskania roślin potomnych. Ponadto stosowanie eksplantatów merystematycznych daje gwarancję stabilności genetycznej, co pozwala uzyskiwać rośliny potomne (klony) wiernie odtwarzające wszystkie cechy rośliny macierzystej.

Mikrorozmnażanie odbywa się w sterylnych warunkach, z tego względu, aby zainicjować kulturę *in vitro* z eksplantatów pobranych z roślin matecznych uprawianych w warunkach niesterylnych (na polu, w ogrodzie lub w szklarni) należy przeprowadzić ich dezynfekcję powierzchniową. Zabieg ten usuwa mikroorganizmy (bakterie i grzyby) pochodzące z powietrza, wody czy gleby, które znajdują się na powierzchni organów i tkanek roślinnych. W standardowych procedurach dezynfekcji eksplantatów wierzchołkowych i węzłowych roślin ozdobnych wykorzystywane są znane preparaty jak podchlorynu sodu lub wapnia, alkohol etylowy, woda utleniona, woda bromowa, formaldehyd, sublimat rtęci czy chloramina T, a także środki chemiczne (np. detergenty) obniżające napięcie powierzchniowe, co ułatwia środkom dezynfekującym penetrację trudno dostępnych miejsc na powierzchni eksplantatów. Następnie eksplantaty przekłada się do sterylnej wody destylowanej, aby wypłukać pozostałości środka dezynfekującego mogącego uszkodzić tkanki roślinne. Zazwyczaj wykonuje się trzykrotne płukanie, każde po 10 min.

Do wad standardowych procedur dezynfekcji zalicza się m.in.: (1) szkodliwość wykorzystywanych środków dezynfekujących dla środowiska i zdrowia personelu laboratorium, a także ich niekorzystny wpływ na materiał roślinny (nieodwracalne uszkodzenia tkanek), (2) wieloetapowość, praco- i czasochłonność, (3) konieczność eksperymentalnego doboru stężenia i czasu działania czynnika dezynfekującego dla różnych eksplantatów, (4) możliwość występowania wtórnych zakażeń dezynfekowanych eksplantatów związana z wieloetapowością procedury (trzykrotne płukanie po dezynfekcji właściwej).

Z dokumentu PL 172955 znany jest sposób odkażania i preparat składający się z płynów odkażających (A i B) stosowanych m.in. do odkażania części roślin (cebule, bulwy, sadzonki, nasiona), których składnikami są podchloryn sodu, kwas mlekowy, octan miedzi i cynku, kwas borowy, molibdenian sodu, potasu lub amonu, azotan srebra, zmiażdżony czosnek oraz zwilżacz. Istotą sposobu jest moczenie części roślin w czasie 30 min do 3 godzin w płynach odkażających i następnie wysadzanie ich do podłoża.

Dokument PL 180374 opisuje agrochemiczny środek do ochrony roślin przed zakażeniami grzybiczymi i owadami oraz sposób ochrony roślin przed takimi zakażeniami. Preparat stanowi kombinację benzylienoazoliometylocykloalkanu i związku owadobójczego, natomiast sposób ochrony roślin przed zakażeniami polega na wprowadzaniu do gleby, zwłaszcza w bruzdy, granulatu składającego się z opisanego wyżej preparatu.

W patencie PL 189890 zastrzeżono preparat do ochrony roślin przed chorobami, którego podstawowym składnikiem jest chitozan. Wskazany preparat, według tego wynalazku, pozwala na ekologiczną ochronę roślin przed infekcjami wirusowymi, bakteryjnymi i grzybowymi przy zachowaniu trwałości efektu w zmiennych warunkach atmosferycznych. Preparat przeznaczony jest do ochrony roślin w warunkach produkcji ogrodniczej i polowej.

W patencie PL 223425 zastrzeżono sposób wyjaławiania powierzchni nasion za pomocą suspenzji wodnej metalicznych cząstek srebra i miedzi. Zastrzeżony sposób, polegający na jednoetapowym

procesie wyjąłowania, trwającym 1–10 minut, dotyczy nasion przeznaczonych do kiełkowania w warunkach *in vitro*.

Znane są również przykłady stosowania, w ochronie roślin oraz elementów drewnianych, roztworów zawierających sole srebra bądź nanocząstki srebra.

W dokumencie US 2010203157 (A1) (2010-08-12, Bylemans Dany Leopold Jozefien; Hendrik Jan Peter; Van Der Flaas Mark Arthur Josepha [BE]), pt. „Combinations of pyrimethanil and silver compounds” (tłumaczenie PL 2200438), wskazano wykorzystanie kombinacji pirymetanilu i związków srebra. Pirymetanil stanowi znany składnik aktywny fungicydów hamujący wytwarzanie zarodników oraz syntezę enzymów przez patogeny. Związki srebra przywołane w przedmiotowym opisie to sole srebra (octan srebra, alginian srebra, azydek srebra, cytrynian srebra, mleczan srebra, azotan srebra, siarczan srebra, chlorek srebra, tiocyjanian srebra, fosforan srebrowo-sodowo-wodorowo-cykonowy, sulfadiazyna srebra, sól srebrowa kwasu cykloheksanoacetylooctowego oraz disrebowy 2,5-dichloro-3,6-dihydroxy-2,5-cykloheksadieno-1,4-dion) oraz nanocząstki srebra o wymiarach 1–1000 nm. Przywołany dokument stanowi opis zastosowania, który odnosi się do patentu nr US 8,852,647 B2 z dnia 07.10.2014 r. Przedmiotowy patent zawiera sześć zastrzeżeń, z czego 4 dotyczą składu i kompozycji preparatu, a 2 zastrzeżenia dotyczą sposobu (metody) jego stosowania. Zastrzeżone sposoby dotyczą: ograniczania wzrostu mikroorganizmów na drewnie oraz materiałach biodegradowalnych (zastrzeżenie nr 3 US 8,852,647 B2), metody ograniczania wzrostu mikroorganizmów na materiałach konstrukcyjnych (zastrzeżenie nr 4 US 8,852,647 B2).

Dokument CN 103302307 (A), pt. „Preparation method of silver nano particles and method for facilitating germination of cucumber seeds and growth and development of seedlings with silver nano particles”, opisuje wynalazek należący do dziedziny techniki wytwarzania materiału nano i badań jego skuteczności, ujawnia także sposób wytwarzania nanocząstek srebra i sposób ułatwienia kiełkowania nasiona ogórka oraz wzrost i rozwój siewek przy zastosowaniu nanocząstek srebra. Zgłoszenie zawiera 9 zastrzeżeń, w szczególności zastrzeżenia nr 1–4 dotyczą metody wytwarzania nanocząstek srebra z materiału wyjściowego, którym jest azotan srebra (AgNO_3), natomiast zastrzeżenia nr 5–9 dotyczą sposobu wykorzystania nanocząstek w celu pobudzania kiełkowania nasion ogórka.

Dokument CN 110402819 (A), pt. „Amur corktree tissue culture method”, opisuje wynalazek należący do dziedziny techniki roślinnych kultur tkankowych, ujawnia metodę prowadzenia hodowli tkankowej drzewa korkowca do celu pozyskiwania dużej ilości materiału szkółkarskiego. Zgłoszenie zawiera 10 zastrzeżeń, w szczególności zastrzeżenie nr 6 charakteryzuje sposób dezynfekcji eksplantatów korkowca z wykorzystaniem 5% roztworu alkoholu etylowego i nanosrebra oraz sterylizacji roztworem chlorku rtęci, po których następuje 4 lub 5 kolejnych kroków płukania materiału.

Nie jest znany w dostępnym stanie techniki sposób dezynfekcji eksplantatów wierzchołkowych i węzłowych roślin ozdobnych, z wykorzystaniem preparatu zawierającego nanokoloidy srebra lub srebra i miedzi.

Istotą rozwiązania według wynalazku jest sposób dezynfekcji powierzchniowej eksplantatów wierzchołkowych i węzłowych roślin ozdobnych rozmnażanych w warunkach *in vitro* polegający na tym, że w pierwszym etapie eksplantaty płucze się pod bieżącą wodą, następnie umieszcza w 70% roztworze alkoholu etylowego na 5–15 sekund, kolejno inkubuje przez 5–10 min w preparacie dezynfekującym złożonym z nanocząstek srebra lub srebra i miedzi, o stężeniu nanometali 15–30 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, korzystnie 20 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, o wymiarach nanocząstek 20–50 nm, korzystnie 30 nm, przy czym preparat nanokoloidowy jest ustabilizowany za pomocą sterylnej roztworu surfaktantów niwelujących koagulację nanocząstek, takiego jak poliwinylpirolidon – PVP, o masie cząsteczkowej 5000–10000, korzystnie 6000, w ilości 0,05–1%, korzystnie 0,4%, oraz zawiera dodatek sterylnej hydroksyetylocelulozy w ilości 150 mg – 250 mg na 100 ml preparatu, korzystnie 200 mg, celem zapewnienia gęstości i lepkości, a także wyeliminowania konieczności zamaczania eksplantatów w środkach powierzchniowo czynnych. Gęstość preparatu wynosi 1,40–1,80 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, korzystnie 1,60 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, a absorbancja mierzona spektrofotometrem UV-VIS przy 200, 300 i 400 nm wynosi 3,900–4,100 dla 200 nm, 0,030–0,150 dla 300 nm i 0,020–0,140 dla 400 nm. Następnie eksplantaty umieszcza się na wyjąłowanej standardowej pożywce MS (Murashige i Skoog, 1962) zestawionej 0,6% agarą w pozycji polarnej. Wyłożenie eksplantatów na pożywkę nie wymaga ich uprzedniego płukania w wodzie destylowanej.

Zaletami rozwiązania wg wynalazku są: skrócenie czasu dezynfekcji, uproszczenie procedury dezynfekcji, stosowanie środka dezynfekującego w niskim stężeniu, eliminacja użycia agresywnych środków chemicznych, wysoka skuteczność w eliminacji zakażeń mikrobiologicznych, brak uszkodzeń

dezynfekowanego materiału w przeciwieństwie do klasycznych środków odkażających, brak konieczności dodatkowego stosowania środków obniżających napięcie powierzchniowe (detergentów), brak konieczności końcowego płukania dezynfekowanego materiału, co skraca czas procedury oraz eliminuje możliwość występowania zakażeń wtórnych wywoływanych obecnością form przetrwalnikowych mikroorganizmów, które mogą uaktywniać się w konwencjonalnych metodach sterylizacji.

Sposób według wynalazku przedstawiono bliżej w przykładach realizacji.

Przykład 1

Sposób dezynfekcji powierzchniowej eksplantatów węzłowych trzykrotki (*Tradescantia* L), pochodzących z warunków *ex vitro*, przebiega w następujących etapach:

1. Wyizolowane z rośliny matecznej jednowęzłowe fragmenty pędu o długości 1 cm oczyszcza się wstępnie poprzez płukanie pod bieżącą wodą.
2. W sterylnych warunkach, w komorze z laminarnym przepływem sterylnego powietrza, eksplantaty inkubuje się w 70% roztworze etanolu przez 5 sekund, a następnie przenosi się do roztworu preparatu dezynfekującego zawierającego nanocząstki srebra w stężeniu $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, PVP (M=6000, 0,05%) oraz hydroksyetylocelulozę w ilości 150 mg na 100 ml preparatu, na okres 5 minut.
3. Eksplantaty wykłada się w pozycji polarnej na wyjąłowionej standardowej pożywce MS (Murashige i Skoog, 1962) zestalanej 0,6% agarem i umieszcza w pokoju wzrostowym.

Przykład 2

Sposób dezynfekcji powierzchniowej eksplantatów węzłowych trzykrotki (*Tradescantia* L), pochodzących z warunków *ex vitro*, przebiega w następujących etapach:

1. Wyizolowane z rośliny matecznej jednowęzłowe fragmenty pędu o długości 1 cm oczyszcza się wstępnie poprzez płukanie pod bieżącą wodą.
2. W sterylnych warunkach, w komorze z laminarnym przepływem sterylnego powietrza, eksplantaty inkubuje się w 70% roztworze etanolu przez 10 sekund, a następnie przenosi się do roztworu preparatu dezynfekującego zawierającego nanocząstki srebra i miedzi w stężeniu $20 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, PVP (M=6000, 0,5%) oraz hydroksyetylocelulozę w ilości 200 mg na 100 ml preparatu, na okres 7 minut.
3. Eksplantaty wykłada się w pozycji polarnej na wyjąłowionej standardowej pożywce MS (Murashige i Skoog, 1962) zestalanej 0,6% agarem i umieszcza w pokoju wzrostowym.

Przykład 3

Sposób dezynfekcji powierzchniowej eksplantatów wierzchołkowych chryzantemy (*Chrysanthemum*), pochodzących z warunków *ex vitro*, przebiega w następujących etapach:

1. Wyizolowane z rośliny matecznej wierzchołki pędu o długości 3 cm oczyszcza się wstępnie poprzez płukanie pod bieżącą wodą.
2. W sterylnych warunkach, w komorze z laminarnym przepływem sterylnego powietrza, eksplantaty inkubuje się w 70% roztworze etanolu przez 15 sekund, a następnie przenosi się do roztworu preparatu dezynfekującego zawierającego nanocząstki srebra i miedzi w stężeniu $30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, PVP (M=6000, 1%) oraz hydroksyetylocelulozę w ilości 250 mg na 100 ml preparatu, na okres 10 minut.
3. Eksplantaty wykłada się w pozycji polarnej na wyjąłowionej standardowej pożywce MS (Murashige i Skoog, 1962) zestalanej 0,6% agarem i umieszcza w pokoju wzrostowym.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób dezynfekcji powierzchniowej eksplantatów wierzchołkowych i węzłowych roślin ozdobnych rozmnażanych w warunkach *in vitro*, **znamienny tym**, że eksplantaty płucze się pod bieżącą wodą, następnie moczy w 70% alkoholu etylowym przez 5–15 sekund, kolejno inkubuje przez 5–10 min w preparacie dezynfekującym w postaci wodnego roztworu nanokoloidowych cząstek srebra o stężeniu nanometalu $15\text{--}30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, korzystnie $20 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, o wymiarach nanocząstek $20\text{--}50 \text{ nm}$, korzystnie 30 nm , przy czym preparat jest ustabilizowany za pomocą sterylnego roztworu surfaktantów niwelujących koagulację nanocząstek, takiego jak poliwinylpirolidon – PVP, o masie cząsteczkowej $5000\text{--}10000$, korzystnie 6000 , w ilości $0,05\text{--}1\%$, korzystnie $0,4\%$, oraz zawiera dodatek sterylnej hydroksyetylocelulozy w ilości

- 150 mg – 250 mg, korzystnie 200 mg, na 100 ml preparatu, gęstość preparatu wynosi $1,40\text{--}1,80\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, korzystnie $1,60\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, a jego absorbancja $3,900\text{--}4,100$ dla 200 nm, $0,030\text{--}0,150$ dla 300 nm i $0,020\text{--}0,140$ dla 400 nm, następnie tak przygotowany eksplantat, bez uprzedniego płukania w wodzie destylowanej, wyklada się na wyjałowioną uniwersalną pożywkę MS.
2. Sposób dezynfekcji powierzchniowej eksplantatów wierzchołkowych i węzłowych roślin ozdobnych rozmnażanych w warunkach *in vitro*, **znamienny tym**, że eksplantaty płucze się pod bieżącą wodą, następnie moczy w 70% alkoholu etylowym przez 5–15 sekund, kolejno inkubuje przez 5–10 min w preparacie dezynfekującym w postaci wodnego roztworu nanokoloidowych cząstek srebra i miedzi o stężeniu nanometali $15\text{--}30\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, korzystnie $20\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, o wymiarach nanocząstek $20\text{--}50\text{ nm}$, korzystnie 30 nm , przy czym preparat jest ustabilizowany za pomocą sterylnego roztworu surfaktantów niwelujących koagulację nanocząstek, takiego jak poliwinylpirolidon – PVP, o masie cząsteczkowej $5000\text{--}10000$, korzystnie 6000 , w ilości $0,05\text{--}1\%$, korzystnie $0,4\%$, oraz zawiera dodatek sterylnej hydroksyetylocelulozy w ilości $150\text{ mg} \text{--} 250\text{ mg}$, korzystnie 200 mg , na 100 ml preparatu, gęstość preparatu wynosi $1,40\text{--}1,80\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, korzystnie $1,60\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, a jego absorbancja $3,900\text{--}4,100$ dla 200 nm, $0,030\text{--}0,150$ dla 300 nm i $0,020\text{--}0,140$ dla 400 nm, następnie tak przygotowany eksplantat, bez uprzedniego płukania w wodzie destylowanej, wyklada się na wyjałowioną uniwersalną pożywkę MS.