

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243383 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **434303**

(22) Data zgłoszenia: **2020.06.15**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.12.20 BUP 38/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.08.21 WUP 34/2023**

(51) MKP:

A01C 1/08 (2006.01)

A01G 22/35 (2018.01)

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ALICJA TYMOSZUK, Bydgoszcz, PL
JACEK WOJNAROWICZ, Kaczorowy, PL**

(74) Pełnomocnik:

Piotr Jankowski, Bydgoszcz, PL

(54) Tytuł:

**Sposób stymulacji kiełkowania nasion cebuli z wykorzystaniem tlenku cynku lub
nanocząstek tlenku cynku w suspensji wodnej**

PL 243383 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób stymulacji kiełkowania *in vitro* nasion cebuli zwyczajnej z wykorzystaniem tlenku cynku lub nanocząstek tlenku cynku w suspensji wodnej, mający zastosowanie w mikrorozmnażaniu oraz hodowli tego gatunku.

Mikrorozmnażanie to proces polegający na szybkim i wydajnym wegetatywnym rozmnażaniu roślin na specjalnie przygotowanych pożywkach zawierających niezbędne składniki odżywcze, w sterylnych i ściśle kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. Uzyskane w ten sposób rośliny charakteryzują się wysoką jakością (są juwenilne oraz wolne od chorób i szkodników).

Klonowanie roślin *in vitro* ma duże znaczenie w produkcji materiału rozmnożeniowego, który wykorzystywany jest do dalszej uprawy w warunkach naturalnych, jak i też pod osłonami (szklarnie, tunele).

Kultury *in vitro*, jako narzędzie biotechnologii, pełnią także ważną rolę w hodowli zachowawczej i twórczej roślin. Jednym z kluczowych etapów mikrorozmnażania jest inicjacja, czyli zapoczątkowanie kultury z eksplantatów w postaci nasion lub fragmentów organów, tkanek, komórek pochodzących z rośliny wyjściowej. Etap ten związany jest z przeprowadzeniem dezynfekcji powierzchniowej eksplantatów. Uzyskana pula sterylnych i wykazujących prawidłowy wzrost roślin rzutuje na wynik ilościowy dalszego procesu namnażania.

Nasiona warzyw powinny prezentować odpowiednio wysoką energię i zdolność kiełkowania. Osiągnięcie wysokich i szybkich wschodów związane jest często z wykonywaniem specyficznych zabiegów na nasionach przed siewem w celu stymulacji ich kiełkowania (moczenie, kondycjonowanie w roztworach regulatorów wzrostu, traktowanie promieniami lasera, działanie polem magnetycznym, stratyfikacja, skaryfikacja) (Legańska i Balcerzak, 2000. Warzywnictwo. Hortpress Warszawa).

Cynk, jako pierwiastek chemiczny i mikroelement, pełni ważną rolę we wzroście i rozwoju roślin, ponieważ bierze udział w wielu różnorodnych procesach enzymatycznych i fizjologicznych. Oddziałuje jako metaliczny komponent wielu enzymów lub jako kofaktor enzymów zaangażowanych w biosyntezę białek, węglowodanów, kwasów nukleinowych, chlorofilu, a także metabolizm białek, węglowodanów i tłuszczów (Eisvand et al. 2018. Chlorophyll fluorescence, yield and yield components of bread wheat affected by phosphate-bio-fertilizer, zinc and boron under late-season heat stress. Photosynthetica 56 (4), 1287–1296).

Opis patentowy PL 168691 przedstawia sposób zwiększenia zdolności kiełkowania nasion ogórków poprzez oddziaływanie promieniowaniem mikrofalowym o częstotliwości od 37,88 do 39,04 GHz i gęstości mocy od 1 mW/cm² do 10 mW/cm², przez okres 30–45 minut.

Z opisu patentowego PL 207240 znany jest sposób przyspieszania kiełkowania nasion buraka cukrowego, polegający na mieszaniu nasion z zeolitem naturalnym lub sztucznym, bądź mieszaniną zeolitów i wodą.

Przedmiotem wynalazku PL 229664 jest z kolei sposób stymulacji kiełkowania nasion z zastosowaniem plazmy nietermicznej pod ciśnieniem atmosferycznym, otrzymanej z użyciem gazu procesowego w postaci azotu, generowanej w reaktorze typu glidearc. Stymulacja kiełkowania dotyczy nasion gatunków roślin należących do rodzin ślazowatych, jasnotowatych, szarłatowatych, różowatych, astrowatych, dyniowatych, psiankowatych, kapustowatych, a także konopiowatych.

Do stymulacji kiełkowania nasion tychże gatunków odnosi się opis patentowy PL 229665, przy czym mowa jest w nim o użyciu plazmy nietermicznej pod ciśnieniem atmosferycznym, otrzymanej z użyciem gazu procesowego w postaci helu z domieszką azotu, generowanej w reaktorze typu dysza o częstotliwości radiowej, a także opis patentowy PL 229666, w którym jako sposób stymulacji kiełkowania wskazane jest zastosowanie plazmy nietermicznej pod ciśnieniem atmosferycznym, otrzymanej z użyciem gazu procesowego w postaci helu z domieszką azotu, generowanej w reaktorze typu dysza z wyładowaniem barierowym.

Wynalazek zaprezentowany w patencie PL/EP 2002702 dotyczy wstępnego sposobu kiełkowania materiału siewnego, w którym pokryte masą otoczkową nasiona suszy się i następnie przechowuje do zainicjowania procesu kiełkowania lub wstępnego kiełkowania.

Opis patentowy PL/EP 2161978 przedstawia sposób przyspieszenia kiełkowania lub zwiększenia plonów canoli lub rzepaku poprzez nanoszenie na nasiona gibereliny 4/7 w stężeniu $5 \pm 10\%$ ppm do $50 \pm 10\%$ ppm, przy czym giberelinę można aplikować łącznie z innymi środkami agrochemicznymi.

W opisie patentowym PL 216317 mowa jest o doglebowym, mikroelementowym nawozie cynkowym w formie zawiesiny zawierającej tlenek cynku oraz rozpuszczalne w wodzie związki cynku i substancje pomocnicze oraz jego zastosowaniu w uprawie roślin, zwłaszcza kukurydzy (korzystnie w fazie

rozwojowej roślin do 2 liści) i ziemniaków (korzystnie w fazie krzewienia, przed przykryciem redlin). Nawóz ten zawiera organiczne składniki cynkowe, które stanowią produkt współkompleksowania cynku z tlenku cynku przynajmniej jedną solą kwasu EDTA, kwasem EDTA i kwasem cytrynowym w roztworze wodnym nieorganicznej soli cynku, najlepiej siarczanu, przy czym nawóz zawiera także substancje pomocnicze, w tym organiczne emulgatory i stabilizatory, chlorek magnezu i mocznik.

Nie jest znany w dostępnym stanie techniki sposób stymulacji kiełkowania *in vitro* nasion cebuli zwyczajnej z wykorzystaniem tlenku cynku lub nanocząstek tlenu cynku w suspensji wodnej, będący analogicznym do przedstawionego przedmiotu wynalazku.

Istotą rozwiązania według wynalazku jest sposób stymulacji kiełkowania *in vitro* nasion cebuli zwyczajnej z wykorzystaniem tlenku cynku lub nanocząstek tlenku cynku w suspensji wodnej polegający na tym, że najpierw nasiona płucze się pod bieżącą wodą, a następnie w komorze laminarnej inkubuje w 70% roztworze alkoholu etylowego przez 30–60 sekund, po czym umieszcza na czas 10–12 min w preparacie dezynfekującym w postaci podchlorynu sodu o stężeniu 1–1,5%, kolejno płucze 2 razy po 5–10 min w sterylnej wodzie bidestylowanej, po czym osusza na sterylnej bibule i następnie wyklada na sterylną standardową pożywkę MS (Murashige i Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497).

Na przygotowane w ten sposób nasiona aplikuje się, w objętości 0,2 ml na każde nasiono, z wykorzystaniem pipety automatycznej, przygotowaną zawiesinę wodną o stężeniu 50–800 mg · dm⁻³ tlenku cynku o średnim rozmiarze 240 ± 30 nm (rozmiar wyznaczono poprzez przeliczenie gęstości i powierzchni właściwej), $p = 5,59 \pm 0,03$ g · cm⁻³, SSA (BET) = $4,5 \pm 0,5$ m² · g⁻¹ lub nanocząstek tlenku cynku o średnim rozmiarze 30 ± 2 nm (rozmiar wyznaczono poprzez przeliczenie gęstości i powierzchni właściwej), $p = 5,24 \pm 0,05$ g · cm⁻³, SSA (BET) = $39 \pm 1,0$ m² · g⁻¹.

Zawiesiny przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem rozpuszczając tlenek cynku lub nanocząstki tlenku cynku przez okres 30 minut w myjce ultradźwiękowej o częstotliwości ultradźwięków 37 kHz i ultradźwiękowej wydajności skutecznej 150 W. Następnie kultury *in vitro* przenosi się do pokoju wzrostowego o temperaturze $24 \pm 2^\circ\text{C}$ i utrzymuje przez 1 tydzień w ciemności, a przez kolejne 2 tygodnie w warunkach 16-godzinnej doby z natężeniem napromienienia kwantowego światła na poziomie $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Zaletami rozwiązania wg wynalazku są:

- wzrost zdolności kiełkowania nasion cebuli zwyczajnej do około 20% w porównaniu do nasion nie traktowanych suspensją wodną tlenku cynku lub nanocząstek tlenku cynku;
- brak negatywnego wpływu aplikacji tlenku cynku lub nanocząstek tlenku cynku na dalszy wzrost i rozwój części pędowej oraz korzeni siewek cebuli zwyczajnej;
- możliwość przyspieszenia i zintensyfikowania technologii mikrorozmnażania i programów hodowlanych cebuli zwyczajnej.

Sposób według wynalazku przedstawiono bliżej w przykładach realizacji.

Przykład 1

Sposób stymulacji kiełkowania *in vitro* nasion cebuli zwyczajnej przebiega w kilku następujących po sobie etapach:

1. Nasiona oczyszcza się wstępnie poprzez płukanie pod bieżącą wodą.
2. W sterylnych warunkach, w komorze z laminarnym przepływem sterylnego powietrza, nasiona inkubuje się w 70% roztworze alkoholu etylowego przez 30 sekund, a następnie moczy w dezynfekującym roztworze 1% podchlorynu sodu przez 10 minut i kolejno płucze 2 razy po 5 minut w sterylnej wodzie bidestylowanej, po czym osusza na sterylnej bibule i następnie wyklada na sterylną standardową pożywkę MS.
3. Na każde nasiono nanosi się, używając pipety automatycznej, po 0,2 ml zawiesiny wodnej tlenku cynku o średnim rozmiarze 240 nm (rozmiar wyznaczono poprzez przeliczenie gęstości i powierzchni właściwej), $p = 5,59 \pm 0,03$ g · cm⁻³, SSA (BET) = $4,5 \pm 0,5$ m² · g⁻¹ i o stężeniu 50 mg · dm⁻³.
4. Przygotowane kultury *in vitro* przenosi się do pokoju wzrostowego o temperaturze 24°C i utrzymuje przez 1 tydzień w ciemności, a przez kolejne 2 tygodnie w warunkach 16-godzinnej doby z natężeniem napromienienia kwantowego światła na poziomie $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Przykład 2

Sposób stymulacji kiełkowania *in vitro* nasion cebuli zwyczajnej przebiega w kilku następujących po sobie etapach:

1. Nasiona oczyszcza się wstępnie poprzez płukanie pod bieżącą wodą.

2. W sterylnych warunkach, w komorze z laminarnym przepływem sterylnego powietrza, nasiona inkubuje się w 70% roztworze alkoholu etylowego przez 30 sekund, a następnie moczy w dezynfekującym roztworze 1,5% podchlorynu sodu przez 10 minut i kolejno płucze 2 razy po 5 minut w sterylnej wodzie bidestylowanej, po czym osusza na sterylnej bibule i następnie wyklada na sterylną standardową pożywkę MS.
3. Na każde nasiono nanosi się, używając pipety automatycznej, po 0,2 ml zawiesiny wodnej tlenku cynku o średnim rozmiarze 270 nm (rozmiar wyznaczono poprzez przeliczenie gęstości i powierzchni właściwej), $p = 5,59 \pm 0,03 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $\text{SSA (BET)} = 4,5 \pm 0,5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ i o stężeniu $800 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.
4. Przygotowane kultury *in vitro* przenosi się do pokoju wzrostowego o temperaturze 26°C i utrzymuje przez 1 tydzień w ciemności, a przez kolejne 2 tygodnie w warunkach 16-godzinnego dnia z natężeniem napromienienia kwantowego światła na poziomie $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Przykład 3

Sposób stymulacji kiełkowania *in vitro* nasion cebuli zwyczajnej przebiega w kilku następujących po sobie etapach:

1. Nasiona oczyszcza się wstępnie poprzez płukanie pod bieżącą wodą.
2. W sterylnych warunkach, w komorze z laminarnym przepływem sterylnego powietrza, nasiona inkubuje się w 70% roztworze alkoholu etylowego przez 60 sekund, a następnie moczy w dezynfekującym roztworze 1% podchlorynu sodu przez 12 minut i kolejno płucze 2 razy po 10 minut w sterylnej wodzie bidestylowanej, po czym osusza na sterylnej bibule i następnie wyklada na sterylną standardową pożywkę MS.
3. Na każde nasiono nanosi się, używając pipety automatycznej, po 0,2 ml zawiesiny wodnej nanocząstek tlenku cynku o średnim rozmiarze 30 nm (rozmiar wyznaczono poprzez przeliczenie gęstości i powierzchni właściwej), $p = 5,24 \pm 0,05 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $\text{SSA (BET)} = 39 \pm 1,0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ i o stężeniu $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.
4. Przygotowane kultury *in vitro* przenosi się do pokoju wzrostowego o temperaturze 24°C i utrzymuje przez 1 tydzień w ciemności, a przez kolejne 2 tygodnie w warunkach 16-godzinnego dnia z natężeniem napromienienia kwantowego światła na poziomie $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Przykład 4

Sposób stymulacji kiełkowania *in vitro* nasion cebuli zwyczajnej przebiega w kilku następujących po sobie etapach:

1. Nasiona oczyszcza się wstępnie poprzez płukanie pod bieżącą wodą.
2. W sterylnych warunkach, w komorze z laminarnym przepływem sterylnego powietrza, nasiona inkubuje się w 70% roztworze alkoholu etylowego przez 60 sekund, a następnie moczy w dezynfekującym roztworze 1,5% podchlorynu sodu przez 12 minut i kolejno płucze 2 razy po 10 minut w sterylnej wodzie bidestylowanej, po czym osusza na sterylnej bibule i następnie wyklada na sterylną standardową pożywkę MS.
3. Na każde nasiono nanosi się, używając pipety automatycznej, po 0,2 ml zawiesiny wodnej nanocząstek tlenku cynku o średnim rozmiarze 32 nm (rozmiar wyznaczono poprzez przeliczenie gęstości i powierzchni właściwej), $p = 5,24 \pm 0,05 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $\text{SSA (BET)} = 39 \pm 1,0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ i o stężeniu $800 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.
4. Przygotowane kultury *in vitro* przenosi się do pokoju wzrostowego o temperaturze 26°C i utrzymuje przez 1 tydzień w ciemności, a przez kolejne 2 tygodnie w warunkach 16-godzinnego dnia z natężeniem napromienienia kwantowego światła na poziomie $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób stymulacji kiełkowania *in vitro* nasion cebuli zwyczajnej z wykorzystaniem tlenku cynku w suspensji wodnej, **znamienny tym**, że nasiona płucze się pod bieżącą wodą, a następnie inkubuje w 70% roztworze alkoholu etylowego przez 30–60 sekund, po czym umieszcza na czas 10–12 min w preparacie dezynfekującym w postaci podchlorynu sodu o stężeniu 1–1,5%, kolejno płucze 2 razy po 5–10 min w sterylnej wodzie bidestylowanej, po czym osusza na sterylnej bibule i wyklada na sterylną standardową pożywkę MS, kolejno na nasiona aplikuje się, w objętości 0,2 ml na każde nasiono, przygotowaną zawiesinę wodną o stężeniu $50\text{--}800 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ tlenku cynku o średnim rozmiarze $240 \pm 30 \text{ nm}$, $p = 5,59 \pm 0,03 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$,

- SSA (BET) = $4,5 \pm 0,5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ i następnie kultury *in vitro* przenosi się do pokoju wzrostowego o temperaturze $24 \pm 2^\circ\text{C}$ i utrzymuje przez 1 tydzień w ciemności, a przez kolejne 2 tygodnie w warunkach 16-godzinnego dnia z natężeniem napromienienia kwantowego światła na poziomie $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.
2. Sposób stymulacji kiełkowania *in vitro* nasion cebuli zwyczajnej z wykorzystaniem nanocząstek tlenku cynku w suspensji wodnej, **znamienny tym**, że nasiona płucze się pod bieżącą wodą, a następnie inkubuje w 70% roztworze alkoholu etylowego przez 30–60 sekund, po czym umieszcza na czas 10–12 min w preparacie dezynfekującym w postaci podchlorynu sodu o stężeniu 1–1,5%, kolejno płucze 2 razy po 5–10 min w sterylnej wodzie bidestylowanej, po czym osusza na sterylnej bibule i wyklada na sterylną standardową pożywkę MS, kolejno na nasiona aplikuje się, w objętości 0,2 ml na każde nasiono, przygotowaną zawiesinę wodną o stężeniu $50\text{--}800 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ nanocząstek tlenku cynku o rozmiarze $30 \pm 2 \text{ nm}$, $\rho = 5,24 \pm 0,05 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, SSA (BET) = $39 \pm 1,0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ i następnie kultury *in vitro* przenosi się do pokoju wzrostowego o temperaturze $24 \pm 2^\circ\text{C}$ i utrzymuje przez 1 tydzień w ciemności, a przez kolejne 2 tygodnie w warunkach 16-godzinnego dnia z natężeniem napromienienia kwantowego światła na poziomie $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.