



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

231242

(11)

(B1)

(22) Prihlášené 31 12 82

(21) PV 10069-82

(40) Zverejnené 15 03 84

(45) Vydané 15 09 88

(51) Int. Cl.⁴

A 01 N 43/86

C 07 D 277/64

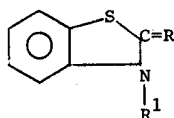
(75)

Autor vynálezu

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

(54) Spôsob usmernenej dediferenciačnej transformácie bôbovitých rastlín

Vynález sa týka spôsobu usmernenej dediferenciačnej transformácie bôbovitých rastlín. Podstata spôsobu podľa vynálezu spočíva v tom, že na rastlinný organizmus sa pôsobí derivátmi kyseliny 2-oxo-3-benzotiazolín octovej všeobecného vzorca I



(I)

kde R je kyslík

R¹ je metylester kyseliny octovej, etylester kyseliny octovej, 2-chlóretyl-ester kyseliny octovej, alylester kyseliny octovej, hydrazid kyseliny octovej o koncentrácii 10⁻⁴ až 10⁻³ mol.dm⁻³.

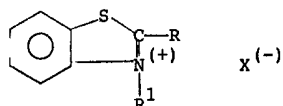
Látky všeobecného vzorca I aplikované podľa vynálezu spôsobujú analogické, morfogénne procesy a morfológické efekty ako fytohormonálne látky, a to v podmienkach in vivo aj in vitro. Čerstvá hmotnosť biomasy v procese dediferenciácie sa zvyšuje o 25 až 35 %.

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-naftyl-octová (NAA), kyselina indolylmaslová (IBA), kyselina 2,4-dichlórfenoxycetová (2,4-D), deriváty kinínu, giberelíny, retardanry 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 explantátu ve šlechtění*, Sbor. mezinár. symp. ČSAV, Praha 1977, p. 650; Butenko, R. G. /Edit./: *Kultura kletok rasteníj*, Kyjev 1978, p. 384), ktoré stimulujú meristenizáciu diferencovaných 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., Gandhí, V.: *Biomass*, 2, 5-15, 1982).

V posledných rokoch však 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. N.: *Z. Pflanzenphysiol.*, 66.206, 1972).

Podstata spôsobu usmernenej dediferenciačnej transformácie bôbovitých rastlín spočíva v tom, že na rastlinný organizmus sa pôsobí derivátmi 2-R-3-R¹-substituovaných benzotiazolínových solí všeobecného vzorca



kde R je vodík
 R¹ je alyl, metoxykarbonylmetyl, ethoxykarbonylmetyl, propoxykarbonylmetyl, alyl-oxykarbonylmetyl, pentoxykarbonylmetyl, izopropoxykarbonylmetyl, butyl, propargyl, propyl
 X⁻ je bróm, chlór, jód,
 o koncentrácii 10⁻⁴ až 5.10⁻³ mol.dm⁻³.

Preukazná transformácia rastlinných pletív a buniek nastáva pri koncentráciách 10⁻⁴ až 5.10⁻³ mol.dm⁻³. 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 dediferenciačnej transformácie, kalus zachováva typický neorganizovaný rast. Čerstvá hmotnosť biomasy v procese dediferenciačnej transformácie sa zvyšuje o 28-30 %. Pri koncentrácii 10⁻⁷ až 10⁻⁹ mol.dm⁻³ je zvýšenie 7 až 10 % hmot.

Zlúčeniny aplikované podľa vynálezu spôsobujú analogické morfogenné procesy a morfológické efekty ako horeuvedené fytohormóny, a to v podmienkach in vivo aj in vitro.

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

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

P r í k l a d 1

V prvej sérii pokusov v podmienkach in vivo k indukcii dediferenciačnej transformácie boli použité klíčence bôbovitej rastliny (*Pisum sativum* L., var. Smaragd). Po imbibícii (6 h) v destilova-

nej vode semená klíčili v tme v termostate 72 hodín. Potom boli klíčence po omytí od perlitu osušené papierovou vatou, selektované a na ďalšie testy boli použité klíčence s koreňom dlhým 25-30 mm $\pm$ 1 mm. Súborné 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 $5 \cdot 10^{-3}$, 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} mol. $\cdot$ 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 °C $\pm$ 1 °C počas 72 až 96 hodín. Efekt dediferenciačnej transformácie bol stanovený vizuálne pomocou mikroskopickej lupy. Maximálnu transformačnú účinnosť spôsobuje 3-Etoxykarbonylmetylbenzotiazóliumbromid pri koncentrácii $5 \cdot 10^{-3}$ mol. $\cdot$ dm $^{-3}$. Ostatné deriváty boli najúčinnšie taktiež pri koncentrácii $5 \cdot 10^{-3}$ mol. $\cdot$ dm $^{-3}$.

P r 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 °C $\pm$ 1 °C. K indukci kalogenézy boli použité sterilné klíčence 25-30 $\pm$ 1 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 $5 \cdot 10^{-3}$ - 10^{-9} mol. $\cdot$ 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 °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-Etoxykarbonylmetylbenzotiazóliumbromidu pri koncentrácii 10^{-3} mol. $\cdot$ dm $^{-3}$. Ostatné deriváty boli najúčinnšie taktiež pri koncentrácii 10^{-3} mol. $\cdot$ dm $^{-3}$.

P r 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 sativa* 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 $\pm$ 1 °C v termostate. Maximálna účinnosť kalogenézy bola zistená u 3-Etoxykarbonylmetylbenzotiazóliumbromidu v A. variante v koncentrácii $5 \cdot 10^{-3}$ mol. $\cdot$ dm $^{-3}$ a v B. variante v koncentrácii 10^{-3} mol. $\cdot$ dm $^{-3}$. Ostatné deriváty v A. a B. variante testov boli najúčinnšie pri analogických koncentráciách.

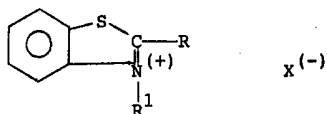
Zlúčeniny aplikované podľa vynálezu:

1. 3-Alylbenzotiazóliumbromid
2. 3-Metoxycarbonylmetylbenzotiazóliumbromid
3. 3-Etoxykarbonylmetylbenzotiazóliumbromid
4. 3-Propoxykarbonylmetylbenzotiazóliumbromid
5. 3-Alyloxykarbonylmetylbenzotiazóliumbromid

6. 3-Pentoxykarbonylmetylbenzotiazóliumbromid
7. 3-Izopropoxykarbonylmetylbenzotiazóliumbromid
8. 3-Butylbenzotiazóliumbromid
9. 3-Propargylbenzotiazóliumbromid
10. 3-Propoxykarbonylmetylbenzotiazóliumchlorid
11. 3-Metoxykarbonylmetylbenzotiazóliumchlorid
12. 3-Butylbenzotiazóliumjodid
13. 3-Propylbenzotiazóliumjodid

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 2-R-3-R¹-substituovaných benzotiazóliových solí všeobecného vzorca



kde R je vodík
 R¹ je alyl, metoxykarbonylmetyl, etoxykarbonylmetyl, propoxykarbonylmetyl, alyloxykarbonylmetyl, pentoxykarbonylmetyl, izopropoxykarbonylmetyl, butyl, propargyl, propyl
 X⁻ je bróm, chlór, jód,
 o koncentrácii 10⁻⁴ až 5.10⁻³ mol.dm⁻³.

20. října 1986

(práva ve vytištěných copyrech vynálezů)

poplatek vynálezu k auto. nároku označením . 31 242 (P 10063) - 3.)
dotazem vynález k obyčejnému vytištění obsahu poplatek částí 1. předmětu
vynálezu. Správa bude provedena přetiskem celého nákladu.

Tisk

lig