

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **239922**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **431456**

(51) Int.Cl.
A01H 4/00 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **14.10.2019**

(54) **Sposób otrzymywania pędów na drodze embriogenezy somatycznej z fragmentów blaszek liściowych u Echinacea purpurea L. (Moench.)**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
19.04.2021 BUP 08/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
24.01.2022 WUP 04/22

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNO-
-PRZYRODNICZY IM. JANA I JĘDRZEJA
ŚNIADECKICH W BYDGOSZCZY,
BYDGOSZCZ, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

JUSTYNA LEMA-RUMIŃSKA, Bydgoszcz, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Jankowski

PL 239922 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania pędów *Echinacea purpurea* z fragmentów blaszek liściowych drogą embriogenezy somatycznej w kulturach *in vitro* z przeznaczeniem do dalszej uprawy szklarniowej, upraw ogrodniczych, produkcji ogrodniczej, produkcji metabolitów wtórnych lub hodowli twórczej nowych odmian.

Echinacea purpurea jest zarówno rośliną ozdobną jak i leczniczą. Może być rozmnażana tradycyjnie w warunkach *in vivo*, poprzez nasiona, podział karpki czy sadzonkowanie, jednak rośliny rozmnażane z nasion często nie tworzą kwiatów w drugim roku uprawy (Harbage 2001), a pozostałe metody, przeprowadzane w warunkach *in vivo*, są mało wydajne.

Z tego względu do celów produkcyjnych konieczne jest opracowanie wydajnej metody multiplikacji w oparciu o techniki *in vitro*. Do najbardziej wydajnych metod należy embriogeneza somatyczna. Jest to metoda mikrorozmnażania, w której potencjalnie każda żywa komórka somatyczna eksplantatu może zregenerować zarodek somatyczny z którego rozwinię się nowa roślina (pęd).

Znane są sposoby mikrorozmnażania *Echinacea purpurea* np.: ze zgłoszenia patentowego CN103858772A, znane jest rozwiązanie pt. „Metoda kultury tkankowej u *Echinacea purpurea* (L.) Moench odmiany Double Decker” (ang. Tissue culture method of *Echinacea purpurea* (L.) Moench ‘Double Decker’) jednak rodzaj eksplantatu w postaci ogonka liściowego, a także uzyskane zregenerowane struktury w postaci pędów przybyszowych oraz dodatek do pożywki MS auksyny NAA (kwasu α-naftyllooctowego) oprócz cytokininy BA (6-benzyladeniny), podanych w tym rozwiązaniu różni się od istoty rozwiązania w przedmiotowym zgłoszeniu wynalazku.

Ze zgłoszenia CN105052745A, znana jest metoda promowania wzrostu zregenerowanych pąków u *Echinacea purpurea* (ang. „Method for promoting growth of *Echinacea purpurea* regeneration buds”) dotycząca pobudzenia do wzrostu pąków przybyszowych w zależności od ich długości, poprzez dodatek do pożywki MS regulatora wzrostu DA-6 (diethylaminoethanol hexanoate), która różni się istotnie od celu rozwiązania w przedmiotowym zgłoszeniu wynalazku, który dotyczy zregenerowania pędów drogą embriogenezy somatycznej z fragmentów blaszek liściowych. Także kompozycja regulatorów wzrostu istotnie różni się od rozwiązania w przedmiotowym zgłoszeniu wynalazku.

Znana jest również metoda mikrorozmnażania *Echinacea purpurea* L. Moench w warunkach *in vitro* (ang. „Process for micropropagation of *Echinacea purpurea* L. Moench *in vitro*”), w których skład pożywki oraz dodatek do pożywki MS glikozydu steroidowego (Melongoside) uzyskanego z nasion *Solanum melongena* lub glikozydów steroidowych uzyskanych z korzeni *Solanum melongena*, różni się istotnie od proponowanego rozwiązania.

Ponadto znana jest metoda uzyskiwania korzeni przybyszowych *Echinacea purpurea* w kulturze bioreaktora (ang. „Method of bioreactor culture of *Echinacea purpurea* adventitious roots”) ze zgłoszenia WO08100016A1. Metoda ta służy jednak do namnażania w bioreaktorze korzeni przybyszowych i produkcji z nich aktywnych składników, co istotnie różni ją od istoty proponowanego rozwiązania.

Istotą rozwiązania według wynalazku jest sposób otrzymywania pędów *Echinacea purpurea* ze sterylnych fragmentów blaszek liściowych drogą embriogenezy somatycznej w kulturach *in vitro* z przeznaczeniem do ukorzeniania, dalszej uprawy szklarniowej, upraw ogrodniczych, produkcji ogrodniczej lub hodowli twórczej nowych odmian tego gatunku, w którym materiał roślinny w postaci sterylnych fragmentów blaszek liściowych umieszcza się na zmodyfikowanej poprzez zwiększenie o zawartości chelatu żelaza i chlorku wapnia, pożywce MS (1962). Kluczowym jest dodatek do pożywki regulatorów wzrostu w postaci cytokininy BAP (6-benzylaminopuryny) w stężeniu 0,5–1 mg/L oraz auksyny: IAA (kwas 3-indoliloctowy) w stężeniu 0,5–1 mg/L.

Eksplantaty w postaci prostokątów o boku 0,5–1 cm umieszcza się na pożywce w sposób horyzontalny, abaksjalnie. Przez pierwsze 2 tygodnie kultury *in vitro* konieczne jest zapewnienie ciemności, następnie kultury rosną w pokoju wzrostowym o wilgotności względnej powietrza 60–80%, w świetle dziennym emitowanym przez lampy jarzeniowe TLD 54/36 W, natężenie napromienienia kwantowego 30–50 μM²s⁻¹, fotoperiodzie 16/8 (dzień/noc), w temperaturze 24 ± 2 stopni C, przez 8–10 tygodni. Do pożywki dodaje się agar w ilości 6–12 g/L oraz sacharozę w ilości 20–40 g/L o pH ustalonym przed sterylizacją pożywki w zakresie 5,5–6,2. Pędy po konwersji zarodków somatycznych uzyskuje się po 10–12 tygodniach od inicjacji kultury. W kolejnym etapie pędy można dalej namnażać do uzyskania pożądanej ilości lub je ukorzenić i aklimatyzować do warunków szklarniowych.

Zaletą rozwiązania według wynalazku jest uzyskanie dużej liczby pędów *Echinacea purpurea* po konwersji zarodków somatycznych z fragmentów blaszek liściowych w warunkach kultury *in vitro* w ciągu zaledwie 10–12 tygodni. Proponowane rozwiązanie pozwala uzyskać pędy gotowe do dalszego namnażania, ukorzeniania, aklimatyzacji i uprawy szklarniowej, upraw ogrodniczych, produkcji ogrodniczej, produkcji metabolitów wtórnych lub hodowli twórczej nowych odmian tego gatunku.

Sposób według wynalazku przedstawiono bliżej w przykładach realizacji wynalazku.

Przykład 1

Sposób otrzymywania pędów *Echinacea purpurea* z fragmentów blaszek liściowych drogą embriogenezy somatycznej w kulturach *in vitro* według wynalazku przebiega w kilku etapach:

Etap I.

Sterylnie blaszki liściowe pobrane z rośliny uprawianej w kulturze *in vitro* przy pomocy sterylnych narzędzi, w komorze laminarnej, tną się na prostokąty (eksplantaty) o boku 0,5 cm x 0,5 cm.

Etap II.

Następnie eksplantaty umieszcza się na sterylnej, zmodyfikowanej pożywce MS (1962) z dodatkiem agaru w ilości 8 g/L i sacharozy w ilości 20 g/L; pH 5,6; z dodatkiem regulatorów wzrostu: cytokininy BAP (6-benzylaminopuryny) w stężeniu 0,5 mg/L oraz auksyny IAA (kwas 3-indoliloctowy) w stężeniu 0,5 mg/L.

Etap III.

Po inokulacji eksplantatów na pożywkach, kultury *in vitro* umieszcza się w pokoju wzrostowym w temperaturze 24 stopnie C $\pm$ 2 stopnie C, o wilgotności względnej powietrza 60% w ciemności przez 14 dni.

Etap IV.

Następnie kultury *in vitro* ustawia się na regałach w pokoju wzrostowym w temperaturze 24 stopnie C $\pm$ 2 stopnie C, o wilgotności względnej powietrza 60% i natężeniu napromienienia kwantowego 30 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ emitowanego przez lampy jarzeniowe o świetle dziennym przez 16 godzin dziennie.

Etap V.

Po 3 tygodniach kultury na eksplantatach pojawiają się zarodki somatyczne, które rozwijają się w kolejnych tygodniach kultury. Pędy po konwersji zarodków somatycznych uzyskuje się po 10 tygodniach od inicjacji kultury.

Etap VI.

W kolejnym etapie pędy przeznacza się do: namnażania, ukorzeniania, aklimatyzacji i uprawy szklarniowej, upraw ogrodniczych, produkcji ogrodniczej, produkcji metabolitów wtórnych lub hodowli twórczej nowych odmian tego gatunku.

Przykład 2

Sposób otrzymywania pędów *Echinacea purpurea* z fragmentów blaszek liściowych drogą embriogenezy somatycznej w kulturach *in vitro* według wynalazku przebiega w kilku etapach:

Etap I.

Uprzednio wysterylizowane i wypłukane (wysterylizowane przy pomocy 0,4% podchlorynu sodu przez 10 minut; wypłukane 3-krotnie po 10 minut w sterylnej wodzie destylowanej) blaszki liściowe pobrane z rośliny uprawianej w warunkach *in vivo* przy pomocy sterylnych narzędzi, w komorze laminarnej, tną się na prostokąty, eksplantaty o boku 1 cm x 1 cm.

Etap II.

Następnie eksplantaty umieszcza się na sterylnej, zmodyfikowanej pożywce MS (1962) z dodatkiem agaru w ilości 10 g/L i sacharozy w ilości 40 g/L; pH 6,0; z dodatkiem regulatorów wzrostu: cytokininy BAP (6-benzylaminopuryny) w stężeniu 1 mg/L oraz auksyny: IAA (kwas 3-indoliloctowy) w stężeniu 1 mg/L.

Etap III.

Po inokulacji eksplantatów na pożywkach, kultury *in vitro* umieszcza się w pokoju wzrostowym w temperaturze 24 stopni C $\pm$ 2 stopnie C, o wilgotności względnej powietrza 60% w ciemności przez 14 dni.

Etap IV.

Następnie kultury *in vitro* ustawia się na regałach w pokoju wzrostowym w temperaturze 24 stopnie C $\pm$ 2 stopnie C, o wilgotności względnej powietrza 80% i natężeniu napromienienia kwantowego 50 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ emitowanego przez lampy jarzeniowe o świetle dziennym przez 16 godzin dziennie.

Etap V.

Po 3 tygodniach kultury na eksplantatach pojawiają się zarodki somatyczne, które rozwijają się w kolejnych tygodniach kultury. Pędy po konwersji zarodków somatycznych uzyskuje się po 12 tygodniach od inicjacji kultury.

Etap VI.

W kolejnym etapie pędy przeznacza się do: namnażania, ukorzeniania, aklimatyzacji i uprawy szklarniowej, upraw ogrodniczych, produkcji ogrodniczej, produkcji metabolitów wtórnych lub hodowli twórczej nowych odmian tego gatunku.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania pędów *Echinacea purpurea* z fragmentów blaszek liściowych drogą embriogenezy somatycznej w kulturach *in vitro* **znamienny tym**, że materiał roślinny w postaci sterylnych blaszek liściowych tnę się skalpelem w komorze laminarnej na prostokąty o boku 0,5 x 1 cm i umieszcza w sposób horyzontalny (abaksjalnie) na zmodyfikowanej pożywce MS z dodatkiem agaru w ilości 6–12 g/L oraz sacharozy w ilości 20–40 g/L o pH 5,5–6,2, następnie kultury *in vitro* utrzymuje się w ciemności przez 14 dni w temperaturze 24 stopni C $\pm$ 2 stopni C i wilgotność względnej powietrza 60–80%, a następnie ustawia się w pokoju wzrostowym przy natężeniu napromienienia kwantowego 30–50 $\mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ emitowanego przez lampy jarzeniowe o świetle dziennym, przez 16 godzin dziennie przez 8–10 tygodni.
2. Sposób według zastrz.1, **znamienny tym**, że pożywkę MS (1962) modyfikuje się poprzez zwiększenie o 1/2 zawartości chelatu żelaza i chlorku wapnia, oraz dodanie do pożywki regulatorów wzrostu w postaci cytokininy BAP (6-benzyloaminopuryny) w stężeniu 0,5–1 mg/L oraz auksyny IAA (kwas 3-indolilooctowy) w stężeniu 0,5–1 mg/L.