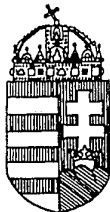


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

**SZABADALMI
LEÍRÁS**
SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

(21) A bejelentés száma: 4958/86

(22) A bejelentés napja: 1986. 12. 01.

(11) Lajstromszám:

206 012 B

(51) Int. Cl.⁵

A 01 G 1/00

A 01 G 31/00

C 12 N 5/04

(40) A közzététel napja: 1991. 06. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 08. 28. SZKV 92/08

(72) Feltalálók:

Balogh József 10%, Székesfehérvár (HU)

dr. Főglein Ferenc 80%, Budapest (HU)

Osváth Zoltán 10%, Miskolc (HU)

(73) Szabadalmaz:

NOVOTRADE Rt., Budapest (HU)

(54)

**Nagy hatékonyságú in vitro–in vivo eljárás
burgonya minigumók előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás burgonya minigumók előállítására szövettenyésztéssel szaporított és folyékony tápközegben in vitro gyökereztetett növényekről.

A találmány szerint a gyökereztetett növényeken in vitro gumóképződést indukálnak, a gumók indukálása után a növényeket gyökeresedést elősegítő szerrel kezelik, az indukált gumókkal rendelkező növényeket

növényházban kifejlesztik, miközben a növények zöldtömeg növekedését antigibberellin hatású szerrel való rendszeres és periodikus kezeléssel visszaszorítják, a képződött minigumókat begyűjtik, majd a növényeket a közegbe visszahelyezik, a zöldtömeg növekedést továbbra is gátolják, és a felszedést és visszaültetést a növények tenyészideje alatt célszerűen periodikusan ismételik.

A találmány tárgya nagy hatékonyságú in vitro-in vivo eljárás burgonya minigumók előállítására.

Jelen találmányunk bejelentési napja előtt számos sikeres kísérletet végeztünk burgonya minigumók előállítására. Eljárásunk vírus- és viroidmentes burgonya szaporítóanyag tömeges előállítására vonatkozik szövettenyéssel oly módon, hogy vírus- és viroidmentes burgonya hajtáscsúcs-szövetsejteket tápközegben in vitro neveljük, majd szaporítjuk, a hajtásokat gyökeresztjük vagy a gumóképződést indukáljuk, az in vitro gyökeresztett növényeket növényházba kiültetve in vivo anyanövényé neveljük, vagy in vitro gumóképződést indukálunk, a képződött minigumókból adott esetben anyanövényt nevelünk, és erről palánta vagy kiscumó szaporítóanyagot nyerünk, vagy magukat a minigumókat hasznosítjuk szaporítóanyagként. A palánta-, illetve gumóképződést célszerűen az anyanövény patatin-szintézisének befolyásolásával lehet irányítani.

A szakirodalomban napjainkig nem volt ismeretes olyan új hasznosítható információ, amellyel a burgonya szaporítóanyag tömeges és rugalmas előállítása megoldhatóvá vált volna.

A burgonya szaporítóanyag tömeges termesztését több, nagyon fontos – a növény természetéből adódó – körülmény teszi nehezzé:

- hagyományos módon szaporítva szaporodási sebessége nagyon alacsony (legfeljebb évi 10–12-szeres), ennek megfelelően a hagyományos fajtafenntartás 8–12 éves folyamat;

- a burgonya jelenleg használt fajtái igen érzékenyek a különböző gomba-, baktérium- és vírusbetegségekre. A hagyományos fajtafenntartás ezért csak olyan országokban volt megvalósítható, amelyekben az ökológiai környezet miatt a betegségek okozó fertőzési veszély viszonylag kicsi;

- a burgonya szaporítóanyag víztartalma körülbelül 90%, ezért tárolása és szállítása különleges körülményeket igényel. Adott esetben a szaporítóanyag szállítási költsége magasabb, mint értéke a termelés helyén.

Korábbi kísérleti eljárásunk szerint a burgonya szaporítóanyagot laboratóriumban és üvegházban kellett előállítani. Mindkét berendezés kivitelezési és üzemeltetési költsége igen magas volt. Bármilyen burgonya szaporítási eljárás gazdaságosságát alapvetően az egységnyi felületen előállítható szaporítóanyag mennyisége határozza meg. A laboratórium és a növényház létesítését mérlegelve megállapítható, hogy a növényházi szaporítás a költségesebb.

A laboratóriumból kikerült anyagok fogadására – jellegükénél fogva – nagyon pontos és felkészült növényházi műszaki technikára van szükség (pontos talajfűtési lehetőségek, páratartalom szabályozása, pótvilágítás stb.). Figyelembe véve a laboratóriumból növényházba kiültetett növényanyag előállításának gazdaságosságát, a korábbi eljárásunkkal a növényházi minigumók előállítása csak a legtokéletesebb kihasználás mellett tehető gazdaságossá. Korábbi eljárásunk szerint az előállítható minigumók száma négyzetméte-

renként 400–800 db. Ez a körülmény jelentős mértékben gátolja a növényházak hasznosításának terjedését minigumó termesztésére.

Az egységnyi területen megvalósítható minigumó előállítás hatékonyságának lényeges fokozására új eljárást dolgozunk ki. A jelen találmányunk szerinti eljárással – az ismert szakirodalmi adatok alapján nem nyilvánvaló módon – legalább 300–500%-kal növelhető a korábbi módszer hatékonysága.

Találmányunk lényege az, hogy szövettenyésztés révén ismert módon fertőzésmentesített és szaporított növényeket laboratóriumi körülmények között folyékony tápközegben in vitro gyökeresztünk, megfelelő gyökérszövet kifejlődése után a tápközeget antigibberellin tartalmú gumóindukciós tápközegre kicseréljük, a növényeket ebben inkubáljuk, a gumóindukció megtörténte után a növényeket – gyökeresedést elősegítő szerrel való kezelést követően – növényházban szilárd tápközegbe kiültetjük, a növények vegetatív növekedését a gibberellin szintnek a citokinin szinthez való csökkentésével rendszeresen és periodikusan visszaszorítjuk, a képződött minigumókat a gyökérszövetről eltávolítjuk, majd a növényeket a szilárd közegbe visszaültetjük gyökereztető hormon alkalmazása mellett, majd antigibberellin hatású vegyülettel ismét rendszeres és periodikus kezelést végzünk, és a képződött minigumókat ismét begyűjtjük.

A találmány szerinti eljárást úgy valósítjuk meg, hogy ismert módon, szövettenyéssel betegségmentesítjük a növényeket. A vírus és egyéb betegségektől mentes növényeket bármilyen ismert szövettenyésztési módszer révén szaporítjuk. A szövettenyéssel szaporított növényeket folyékony tápközegben gyökeresztjük.

A gyökereztetés befejezésével, miután a növények összefüggő gyökérszöveteket fejlesztettek, a gyökereztető tápközeget a növényekről leöntjük, és gumóindukciós tápközeggel cseréljük ki.

A gumóindukciós tápközeg alapvetően MS táptalajt [Murashige és Skoog: *Physiol. Plant* 15. 473–497 (1962)] tartalmaz a különbséggel, hogy a szerves nitrogénforrás az eredeti 1/10-e, a növények nitrogén szükségletét az indukció alatt szerves nitrogénforrással (például glutamin, aszparagin) biztosítjuk. Az MS táptalajhoz képest az indukciós táptalaj cukorkoncentrációja nagyobb. Előnyös a 40% g/liter cukorkoncentráció.

Az indukciós táptalaj nagy koncentrációban tartalmaz citokinineket, általában megfelelő az 5–10 mg/liter koncentráció.

Az indukciós tápközeg lényeges alkotóelemei a különböző antigibberellinek. Ilyen vegyületek a kumarin és származékai, klór-kolin-klorid, legelőnyösebb a diklór-acetil-hexametilén-imin. Utóbbi vegyületnek növekedésgátló és antidotáló hatása van. A növényekben a citokininekhez viszonyítva a gibberellin szintet csökkentő hatása révén gumóindukciós hatást fejt ki, és a növények sejtmembrán-szerkezetét is előnyösen befolyásolja. A találmány szerinti eljárásban a diklór-acetil-hexametilén-imint célszerűen 6–20 mg/l koncentrációban alkalmazhatjuk.

A növényeket az indukciós tápközegekben 18–20 °C-on napi 8 órás megvilágítás mellett 10–14 napig inkubáljuk.

Az indukció megtörténte után a burgonyagumókat növényházi körülmények között szilárd tápközegekben neveljük fel. A növényházba való kiültetés előtt azonban a gyökérzetből kimossuk az indukciós közeget, és a talajban való gyökeresedés elősegítésére, valamint a palánták Rhizoctoniás fertőzésének elkerülésére a növényeket 0,05 mg/l indol-ecetsavat és 0,2% Previcur N-t tartalmazó folyadékba mártjuk [Previcur N = propil-N-(3-dimetil-amino-propil)-karbamát-hidroklorid].

A növényeket az üvegházban történő eredés után – a kiültetéstől számított 3. héttől – hetente egyszer 5–10 mg/liter diklór-acetil-hexametilén-imint és/vagy 10 mg/liter kumarint tartalmazó oldattal permetezzük. Ezzel elérhető, hogy a növények kicsik maradnak, fiziológiai állapotuk azonban alkalmas a gumófejlesztéshez. Ha szükséges, a burgonyanövényeket a továbbnövekedés megakadályozására visszacsípjuk.

A növényházi kiültetés után 1,5–2 hónap elteltével a növényeket a szilárd tápközegekből csomókban kiemeljük, és a gyökérzet körül kiszedjük a már kifejlődött, 0,5 cm-nél nagyobb átmérőjű gumókat. Az ily módon nevelt növényekről első alkalommal négyzetméterenként kb. 1000 gumó gyűjthető be.

A növények kiemelése és a gumók eltávolítása következtében a gyökérzet megsérülhet. A növénycsomókat ismételt 0,05 mg/liter indol-ecetsavat és 0,2%-os Previcur N-t tartalmazó oldatba mártjuk, majd az eredeti közegbe vagy másik közegbe visszaültetjük. Gyökeresedés után a korábbi kezeléseket rendszeresen tovább folytatjuk (10 mg/liter kumarin és/vagy 6 mg/liter diklór-acetil-hexametilén-imin).

A növénycsomók kiemelése, a gumók eltávolítása, a fenti oldattal való kezelés és a növények visszaültetése 3–4 hét múlva megismételhető. A második gumótermés négyzetméterenként 2–3000 db is lehet. A növényeket előregedésükkor, azaz az ültetés után kb. 4 hónap múlva felszedjük és megsemmisítjük. Az eljárással a kezelt növények fajtájuktól függően négyzetméterenként 2500–4000 db gumót szolgáltatnak, ez a mennyiség 3–4-szerese a korábbi eljárással elérhető négyzetméterenkénti gumószámnak.

A felszedett gumókat rekeszekben, szórt fényen, 70%-os relatív páratartalom mellett 2 hétig parásítjuk, majd méretek szerint osztályozzuk, és felhasználásig rekeszekben 2–5 °C-on tároljuk.

A találmány szerinti eljárás évente átlagosan 2,5-ször ismételhető meg, ez azt jelenti, hogy a korábbiakhoz képest a minigumó előállítás hatékonysága 4–5-szörösére növekszik.

A találmány szerinti eljárást a következő példán mutatjuk be.

1. példa

A „Somogy gyöngye” burgonyafajtát ismert módon szövettenyésztés segítségével szaporítjuk. A megfelelő növényszám elérése után a burgonyahajtásokat folyékony táptalajon gyökereztetjük. Két hetes gyökerezte-

tés után a növények alatt a táptalajt gumóindukciós médiummal cseréljük fel. A gumóindukciós médium összetétele: Murashige és Skoog (MS) alapmédium, 1/10 koncentrációjú ammónium-nitrát és kálium-nitrát, 20 mg/l glutaminsav, 40 g/l szacharóz, 5 mg/l benziladenin, 25 mg/l kumarin és 6 mg/l diklór-acetil-hexametilén-imin. A gumóindukciós médiumban 10 napig inkubáljuk a növényeket, 8 órás 200 lux/m² megvilágításban, 18 °C hőmérsékleten.

Az indukálás után a növénycsomókat a tenyészedenyekből kiszedjük, folyó csapvízben a kultúrát lemosuk, majd az egész csomót a felesleges víz eltávolítására lerázzuk, leitatjuk, 0,08 mg/l indol-ecetsav és 0,2%-os Previcur N tartalmú oldatba mártjuk, majd tőzeg alapú közegbe ültetjük, 50 tenyészedeny tartalmát nettó m²-enként.

A növényeket eredés után kissé (2 cm) feltöltjük, majd az ültetéstől számított két hét után hetente egyszer 10 mg/l kumarin és 6 mg/l diklór-acetil-hexametilén-imin tartalmú oldattal permetezzük.

Az ültetéstől számított másfél-két hónap után a növényházi asztalon lévő sűrűn benőtt burgonyacsomókat a talajból kiemeljük. A fél centiméter átmérőjűnél nagyobb gumókat egy erre a célra elkészített fésűvel vagy kézzel leszedjük.

A felszedett növényekről a tőzeget és a földet lerázzuk. A növénycsomót 0,08 mg/l indol-ecetsav és 0,2% Previcur N-t tartalmazó oldatba mártjuk, és a növényeket eredeti helyükre visszaültetjük és öntözzük.

A növények kezelését tovább folytatjuk 10 mg/l kumarin és 6 mg/l diklór-acetil-hexametilén-imin tartalmú oldattal. Három-négy hét után a felszedést és visszaültetést újra megismételjük. A növények kisméretű állapotban tartása érdekében a növényeket alkalmanként vissza kell törni. A sima, gyökér nélküli dugványok további szaporítás és gumófogas céljára felhasználhatók.

Az ily módon indukált és nevelt „Somogy gyöngye” növények négyzetméterenként 3500 minigumót teremnek kb. négy hónap alatt.

2. példa

Az 1. példában leírtak szerint dolgozunk, azzal az eltéréssel, hogy somogyi sárga kifliburgonya fajtát alkalmazunk, és az indukciós közegbe kumarint nem adunk, és a diklór-acetil-hexametilén-imin koncentrációját 10 mg/l-re emeljük.

3. példa

Az 1. példában leírtak szerint dolgozunk, azzal az eltéréssel, hogy Kennebec burgonyafajtát alkalmazunk, és az in vitro tenyészetek indukálása után m²-enként 80 tenyészedeny tartalmát ültetjük ki.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás burgonya minigumók előállítására szövettenyésztéssel szaporított és folyékony tápközegekben in vitro gyökereztetett növényekről, azzal jellemezve,

hogy a gyökereztetett növényeken in vitro gumóképződést indukálunk, a gumók indukálása után a növényeket gyökeresedést elősegítő szerrel kezeljük, az indukált gumókkal rendelkező növényeket – kívánt esetben fertőzést gátló szerrel végzett kezelés után – növényházban szilárd közegbe ültetjük ki, a gumókat növényházban kifejlesztjük, miközben a növények zöldtömeg növekedését antigibberellin hatású szerrel való rendszeres és periodikus kezeléssel visszaszorítjuk, a képződött minigumókat begyűjtjük majd a növényeket – kívánt esetben fertőzésgátló szerrel és gyökeresedést elősegítő szerrel végzett kezelés után – a közegbe visszahelyezzük, a zöldtömeg növekedést antigibberellin hatású szerrel végzett kezeléssel továbbra is gátoljuk, és a felszedést és visszaültetést a növények tenyészideje alatt célszerűen peridokusan ismételjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a gumóképződést Murashige és Skoog-féle olyan alapközzel indukáljuk, amely ammónium-nitrátot és kálium-nitrátot 1/10 koncentrációban, továbbá 20 mg/liter glutaminsavat, 40 g/liter szacharózt, 5 mg/liter benzil-adenint, 25 mg/liter kumarint és 6 mg/liter diklór-acetil-hexametilén-imint tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*,

hogy a növényeket növényházba való kiültetés előtt szükséges esetben Rhizoctoniás fertőzést gátló szerrel kezeljük.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kezelést indol-ecetsavat és szükséges esetben 0,05–0,4% propil-N-(3-dimetil-amino-propil)-karbamát-hidrokloridot tartalmazó oldattal végezzük.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kiültetett növényeket antigibberellin hatású szerrel pl. 0,5–10 mg/l diklór-acetil-hexametilén-iminnel és/vagy 1–30 mg/l kumarinnal kezeljük.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a minigumók begyűjtését követően ismét gyökeresedést elősegítő szerrel és szükséges esetben Rhizoctoniás fertőzést gátló szerrel végzünk kezelést, mielőtt a növényeket visszaültetjük.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a visszaültetett növényeket antigibberellin hatású szerrel pl. diklór-acetil-hexametilén-iminnel és/vagy kumarinnal kezeljük.

8. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a növények felszedését, a minigumók begyűjtését és a visszaültetést a növények tenyészideje alatt többször ismételjük.