

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **233253**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **421579**

(51) Int.Cl.

**A01H 4/00 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **12.05.2017**

---

(54) **Sposób otrzymywania pędów przybyszowych kaktusa *Astrophytum myriostigma* 'Fukuryu Hakuyo' pochodzących z kultur *in vitro***

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**19.11.2018 BUP 24/18**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**30.09.2019 WUP 09/19**

(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  
KRZYSZTOF PIETRZYKOWSKI,  
Przygodzice, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzec. pat. Piotr Jankowski**

---

**PL 233253 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania pędów przybyszowych kaktusa *Astrophytum myriostigma* 'Fukuryu Hakuyo' pochodzących z kultur *in vitro* z przeznaczeniem do dalszej uprawy szklarniowej, upraw ogrodniczych, produkcji ogrodniczej lub upraw hobbystycznych.

Mikrorozmnażanie kaktusów jest nowoczesną metodą ich mnożenia na sterylnych pożywkach w laboratoriach. Jednak metoda opracowana dla jednego gatunku lub odmiany kaktusa (w szczególności unikalna kompozycja regulatorów wzrostu) nie nadaje się do rozmnażania innego gatunku lub odmiany kaktusa. To skłania badaczy do opracowywania składów pożywek dla poszczególnych gatunków i odmian kaktusów.

Podstawową pożywką dla mikrorozmnażania roślin (także kaktusów) jest pożywka MS (Murashige i Skoog, 1962). Jednak sama pożywka nie zapewnia odpowiednich warunków do regeneracji kaktusów, gdyż konieczny jest dodatek odpowiednich regulatorów wzrostu w optymalnym stężeniu, które są odpowiedzialne za procesy morfogenetyczne zachodzące w roślinie. Stąd istotne jest opracowanie składu regulatorów wzrostu dodawanego do pożywki MS dla każdego gatunku lub odmiany kaktusa *de novo*.

Znane są sposoby rozmnażania kaktusów, np.: ze zgłoszenia patentowego CN1413453 znane jest rozwiązanie pn. „Szybka metoda reprodukcji i uprawy dla kaktusów” (ang. „Quick reproducing and cultivating method for cactus”) jednak rodzaj eksplantatu w postaci fragmentu 1 cm<sup>2</sup> z licznymi pąkami bocznymi oraz dodatek do pożywki MS pojedynczego regulatora wzrostu – wyłącznie 6-BA w stężeniu 2–3 mg/L, podanych w tym rozwiązaniu różni się od istoty rozwiązania w przedmiotowym zgłoszeniu wynalazku.

Ze zgłoszenia WO2007/043851, znany jest „Proces mikrorozmnażania odpowiedni dla rodziny kaktusowatych” (ang. „Micropropagation proces which is suitable for the cactus family”) dotyczący pobudzenia do wzrostu merystemów w istniejących areolach na pędzie który różni się istotnie od rozwiązania w przedmiotowym zgłoszeniu wynalazku, który dotyczy regeneracji pędów przybyszowych z komórek kalusa zregenerowanego na eksplantatach. Ponadto różnice dotyczą także zastosowanych regulatorów wzrostu: BA, KIN i 2iP w stężeniu 2–10 mg/L w kombinacji z AIA w stężeniu 0,02–2 mg/L, a dla *Turbinicarpus pseudomacrolele* cytokininy w stężeniu 1–4 mg/L.

Znana jest również metoda szybkiego rozmnażania kaktusów, (ang. „Rapid propagation method for cactus”) w której skład pożywki oraz dodatek regulatorów wzrostu różni się istotnie od proponowanego rozwiązania. Do namnażania pędów użyto pożywki ¼ MS z dodatkiem kombinacji regulatorów wzrostu: 1 mg/L ZT + 0,5 mg/L NAA, dodatkowo jako cukru użyto glukozy zamiast sacharozy, a stężenie agaru wynosiło 5 g/L. pH pożywki ustalono na 5,4–5,6. Dodatkowe różnice: uzyskiwane pędy to pędy boczne nie przybyszowe, co także stanowi istotną różnicę proponowanego rozwiązania. Proces sterylizacji eksplantatów (75% alkohol 5 sekund, 0,1% chlorku rtęci przez 30 sekund oraz 4–5 krotne płukanie w sterylnej wodzie destylowanej) także różni się istotnie od proponowanego rozwiązania.

Istotą rozwiązania według wynalazku jest sposób otrzymywania pędów przybyszowych kaktusa *Astrophytum myriostigma* 'Fukuryu Hakuyo' pochodzących z kultur *in vitro* z przeznaczeniem do uprawy szklarniowej, upraw ogrodniczych, produkcji ogrodniczej, lub upraw hobbystycznych, w którym materiał roślinny w postaci pędów rośliny matecznej sterylizuje się wstępnie płucząc w wodzie destylowanej z dodatkiem 10–100 µl detergentu, następnie płucze się pod bieżącą wodą, kolejno oczyszcza się z włosków i moczy przez 17–18 godzin w środkach grzybobójczych, a następnie w procesie sterylizacji właściwej pędy płucze się w 60–80% etanolu, moczy w podchlorynie sodu o stężeniu 1–2% przez 20–40 minut, następnie wysterylizowane pędy płucze się 3 krotnie po 5–10 minut w sterylnej wodzie destylowanej i osusza na sterylnej bibule w komorze laminarnej. Tak przygotowane pędy tną się skalpelem na plastry o grubości 1–10 mm i umieszcza się w sposób polarny na sterylnej pożywce MS (Murashige i Skoog, 1962), przy czym znaną pożywkę MS, modyfikuje się poprzez zmianę zawartości chelatu żelaza do 41,7 mg·dm<sup>-3</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O i 61,95 mg·dm<sup>-3</sup> Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O oraz chlorku wapnia do 990 mg·dm<sup>-3</sup> CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, oraz dodanie regulatorów wzrostu: cytokininy BAP (6-benzylaminopuryny) w stężeniu 1–5 mg·dm<sup>-3</sup> oraz auksyny NAA (kwas α-naftylooctowego) w stężeniu 0,1–0,2 mg·dm<sup>-3</sup>, z dodatkiem agaru w ilości 6–12 g·dm<sup>-3</sup> oraz sacharozy w ilości 20–50 g·dm<sup>-3</sup> o pH w zakresie 5,2–6,0, ustalonym przed sterylizacją pożywki. Następnie kultury *in vitro* ustawia się w pokoju wzrostowym w temperaturze 24°C ± 2°C o wilgotności względnej powietrza 60–80, naświetlając lampami jarzenio-

wymi o świetle dziennym i natężeniu napromienienia kwantowego  $20\text{--}60 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , przez 16 godzin dziennie. Po 12–16 tygodniach od inicjacji kultury, uzyskuje się pędy przybyszowe. W kolejnym etapie pędy przybyszowe ukorzenia się w warunkach *in vitro* lub *in vivo* i aklimatyzuje do warunków szklarniowych.

Zalety rozwiązania

Kaktus *Astrophytum myriostigma* 'Fukuryu Hakuyo' nie wytwarza nasion, nie można go więc rozmnażać w sposób generatywny. Można natomiast rozmnażać go poprzez pędy boczne w warunkach *in vivo* (w szklarni lub tunelu foliowym), jednak proces wzrostu i rozwoju pędów jest bardzo powolny i trwa lata.

Zaletą rozwiązania według wynalazku jest uzyskanie dużej liczby pędów przybyszowych kaktusa *Astrophytum myriostigma* 'Fukuryu Hakuyo' w ciągu zaledwie 12–16 tygodni w warunkach kultury *in vitro*. W kolejnych pasażach uzyskana liczba nowych pędów przybyszowych powiększa się w tempie geometrycznym, dając nieograniczone możliwości produkcji tych oryginalnych form kaktusa. Proponowane rozwiązanie pozwala uzyskać pędy przybyszowe gotowe do dalszego ukorzenia, aklimatyzacji i uprawy szklarniowej, upraw ogrodniczych, produkcji ogrodniczej, upraw hobbystycznych.

Sposób według wynalazku przedstawiono bliżej w przykładach realizacji wynalazku.

#### Przykład 1

Sposób otrzymywania pędów przybyszowych kaktusa *Astrophytum myriostigma* 'Fukuryu Hakuyo' pochodzących z kultur *in vitro* według wynalazku przebiega w kilku etapach:

Etap I.

W procesie sterylizacji wstępnej oderwane od rośliny matecznej pędy moczy się 5 minut w wodzie destylowanej z dodatkiem  $10 \mu\text{l}$  detergentu. Następnie oczyszcza się je wstępnie przy pomocy płukania pod bieżącą wodą, usuwa włoski oraz moczy przez 17 godzin w środkach grzybobójczych.

Etap II.

Proces sterylizacji właściwej przeprowadza się w sterylnych warunkach w komorze z laminarnym przepływem powietrza, pędy płucze się w 60% etanolu, następnie moczy w podchlorynie sodu o stężeniu 1% przez 20 minut, następnie wysterylizowane pędy płucze się 3 krotnie po 5 minut w sterylnej wodzie destylowanej i osusza na sterylnej bibule w komorze laminarnej.

Etap III.

Kolejno pędy tną się skalpelem na plastry o grubości 1 mm i umieszcza się je w sposób polarny na zmodyfikowanej pożywce MS z dodatkiem agaru w ilości  $6 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  o pH 5,2, przy czym modyfikacja pożywki polega na zmianie zawartości chelatu żelaza do  $41,7 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $61,95 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  oraz chlorku wapnia do  $990 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{CaCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , oraz dodatkowi do pożywki regulatorów wzrostu: cytokininy BAP (6-benzyloaminopuryny) w stężeniu  $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  oraz auksyny NAA (kwas  $\alpha$ -naftylooctowego) w stężeniu  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Do pożywki dodaje się także sacharozę w ilości  $20 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

Etap IV.

Po inokulacji eksplantatów na pożywkach, kultury *in vitro* ustawia się w pokoju wzrostowym w temperaturze  $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , o wilgotności względnej powietrza 60% i natężeniu napromienienia kwantowego  $20 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  emitowanego przez lampy jarzeniowe o świetle dziennym przez 16 godzin dziennie.

Etap V.

Po 2 tygodniach kultury na eksplantatach pojawia się tkanka kalusowa, która rozrasta się intensywnie w kolejnych tygodniach kultury. Pędy przybyszowe uzyskuje się po 12–16 tygodniach od inicjacji kultury.

Etap VI.

W kolejnym etapie pędy przybyszowe ukorzenia się w warunkach *in vitro* i aklimatyzuje do warunków szklarniowych z przeznaczeniem do dalszej uprawy szklarniowej, upraw ogrodniczych, produkcji ogrodniczej, upraw hobbystycznych.

#### Przykład 2

Sposób otrzymywania pędów przybyszowych kaktusa *Astrophytum myriostigma* 'Fukuryu Hakuyo' pochodzących z kultur *in vitro* według wynalazku przebiega w kilku etapach:

Etap I.

W procesie sterylizacji wstępnej oderwane od rośliny matecznej pędy moczy się 10 minut w wodzie destylowanej z dodatkiem  $100 \mu\text{l}$  detergentu. Następnie oczyszcza się je wstępnie przy pomocy płukania pod bieżącą wodą, usuwa włoski oraz moczy się przez 18 godzin w środkach grzybobójczych.

Etap II.

Proces sterylizacji właściwej przebiega w sterylnych warunkach w komorze z laminarnym przepływem powietrza, pędy płucze się w 80% etanolu oraz moczy w podchlorynie sodu o stężeniu 2% przez

40 minut, następnie wysterylizowane pędy płucze się 3 krotnie po 10 minut w sterylnej wodzie destylowanej i osusza na sterylnej bibule w komorze laminarnej.

Etap III.

Kolejno pędy tnie się skalpelem na plastry o grubości 10 mm i umieszcza się je w sposób polarny na zmodyfikowanej pożywce MS z dodatkiem agaru w ilości  $12 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  o pH 6,0, przy czym modyfikacja pożywki polega na zmianie zawartości chelatu żelaza do  $41,7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $61,95 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  oraz chlorku wapnia do  $990 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , oraz dodatkowi do pożywki regulatorów wzrostu: cytokiny BAP (6-benzyloaminopuryny) w stężeniu  $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  oraz auksyny NAA (kwas  $\alpha$ -naftylooctowego) w stężeniu  $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Do pożywki dodaje się także sacharozę w ilości  $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Etap IV.

Po inokulacji eksplantatów na pożywkach, kultury *in vitro* ustawia się w pokoju wzrostowym w temperaturze  $26^\circ\text{C}$ , o wilgotności względnej powietrza 80% i natężeniu napromienienia kwantowego  $60 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  emitowanego przez lampy jarzeniowe o świetle dziennym przez 16 godzin dziennie.

Etap V.

Po 2 tygodniach kultury na eksplantatach pojawia się tkanka kalusowa, która rozrasta się intensywnie w kolejnych tygodniach kultury. Pędy przybyszowe uzyskuje się po 12–16 tygodniach od inicjacji kultury.

Etap VI.

W kolejnym etapie pędy przybyszowe ukorzenia się w warunkach *in vivo* i aklimatyzuje do warunków szklarniowych z przeznaczeniem do dalszej uprawy szklarniowej, upraw ogrodniczych, produkcji ogrodniczej, upraw hobbystycznych.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania pędów przybyszowych kaktusa *Astrophytum myriostigma* 'Fukuryu Hakuyo' pochodzących z kultur *in vitro*, **znamienny tym**, że pędy rośliny matecznej sterylizuje poprzez moczenie 5–10 minut w wodzie destylowanej z dodatkiem 10–100  $\mu\text{l}$  detergentu, kolejno płucze się pod bieżącą wodą, oczyszcza z włosków, moczy w środkach grzybobójczych przez 17–18 godzin, a następnie płucze w 60–80% etanolu oraz moczy w podchlorynie sodu o stężeniu 1–2% przez 20–40 minut, następnie płucze się 3 krotnie po 5–10 minut w sterylnej wodzie destylowanej i osusza na sterylnej bibule w komorze laminarnej, kolejno pędy tnie się skalpelem na plastry o grubości 1–10 mm i umieszcza w sposób polarny na pożywce MS z dodatkiem agaru w ilości  $6\text{--}12 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  oraz sacharozy w ilości  $20\text{--}50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  o pH 5,2–6,0, następnie kultury *in vitro* ustawia się w pokoju wzrostowym w temperaturze  $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  i wilgotności względnej powietrza 60–80%, naświetlając lampami jarzeniowymi o świetle dziennym i natężeniu napromienienia kwantowego  $20\text{--}60 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , przez 16 godzin dziennie.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pożywkę MS modyfikuje się poprzez zmianę zawartości chelatu żelaza do  $41,7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $61,95 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  oraz chlorku wapnia do  $990 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , oraz dodanie regulatorów wzrostu: cytokiny BAP (6-benzyloaminopuryny) w stężeniu  $1\text{--}5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  oraz auksyny NAA (kwas  $\alpha$ -naftylooctowego) w stężeniu  $0,1\text{--}0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ .