



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 246 314 A1

4(51) C 12 N 5/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 284 406 7

(22) 16.12.85

(44) 03.06.87

(71) VEB Pharmazeutisches Werk Halle, 4020 Halle, Leninallee 128, DD

(72) Mertinat, Heide Lore, Dipl.-Pharm.; Dittrich, Beate, Dr. rer. nat. Dipl.-Pharm.; Luckner, Martin, Prof. Dr. sc. nat.; Hannig, Hans-Jürgen, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Herold, Manfred, Dr. rer. agr. Dipl.-Landw., DD

(54) Verfahren zur virusfreien vegetativen Vermehrung und Erhaltung von *Foeniculum vulgare* – Hochleistungspflanzen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur pathogenfreien Vermehrung und Erhaltung von *Foeniculum vulgare*-Hochleistungspflanzen *in vitro*, das über eine lange Zeit einen innerhalb der Population gleichmäßig hohen und in seiner Zusammensetzung konstanten Gehalt an etherischem Öl bewirkt. Weiterhin wird ermöglicht, ausgelesene einjährige *Foeniculum vulgare*-Pflanzen schnell zu vermehren und einjährige Sorten zu erhalten. Dazu werden aus Meristemen, Meristemanlagen bzw. Sproßspitzen, Stengelstücken, Seitenknospen oder Blüten mit Meristemen oder Meristemanlagen unter sterilen Bedingungen auf üblichen Nährmedien, die Cytokinine und/oder Auxine enthalten können, Sprosse und Meristemgewebe angezogen, diese von den Ausgangsexplantaten abgetrennt, weiter vermehrt und vereinzelt und auf Nährlösung ohne Phytohormone zur Bewurzelung gebracht. Die so erhaltenen Pflanzen werden isoliert, in Gesteinsmehl pikiert und unter Folietunnel an Gewächshaus- bzw. Freilandbedingungen adaptiert. Die Pflanzen dienen der weiteren vegetativen Vermehrung oder der Saatgutgewinnung. Zur Erhaltung des genetisch hochwertigen Ausgangsmaterials werden sterile Pflanzen bei minimalen Entwicklungsbedingungen oder sterile Meristeme bei Ultratieftemperaturen konserviert und bei Bedarf rekultiviert.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur virusfreien vegetativen Vermehrung und Erhaltung von *Foeniculum vulgare*-Hochleistungspflanzen durch Verklonung meristematischer Gewebe *in vitro* in einem für Gewebekulturen üblichen Nährmedium, **dadurch gekennzeichnet**, daß man aus den Pflanzen Meristeme oder Meristemanlagen bzw. Sproßspitzen, Stengelstücke, Seitenknospen oder Blüten mit Meristemen oder Meristemanlagen gewinnt, diese sterilisiert und auf einem Cytokinine enthaltenden Nährmedium bis zur Neubildung von Sprossen und Meristemgewebe kultiviert, diese von den Ausgangsexplantaten abtrennt, vereinzelt und in an sich bekannter Weise auf einem Cytokinine enthaltenden Nährmedium vermehrt, anschließend auf hormonfreiem modifizierten MS-Medium mit der halben Stickstoffkonzentration oder fehlendem Cytokinin-Gehalt, bis zur Bewurzelung kultiviert, die so erhaltenen Pflanzen isoliert, durch Pikieren in Gesteinsmehl unter Folietunneln an Gewächshaus- bzw. Freilandbedingungen adaptiert und sterile Pflanzen bei minimalen Entwicklungsbedingungen oder sterile Meristeme in Anwesenheit von Kryoprotektoren bei Temperaturen von unter -100°C konserviert.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man für die Adaptationsphase Gesteinsmehl aus Aluminiumsilikaten mit einer Korngröße von 0,5–3 mm, vorzugsweise 1–2 mm, wie z. B. das Aluminiumsilikatmehl Perlit, anwendet.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß *in vitro* angezogene Pflanzen im sterilen Zustand bei 0 bis 4°C und 500–1000 Lux auf einem hormonfreien mit Agar oder Gesteinsmehl aus Aluminiumsilikaten, vorzugsweise Perlit, verfestigtem Nährmedium verschlossen, d. h. bei einer relativen Luftfeuchtigkeit nahe 100% aufbewahrt werden.
4. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß *in vitro* angezogene Meristeme nach Kryoprotektorbehandlung entweder sehr langsam (ca. 0,5 bis $5^{\circ}\text{C}/\text{Min}$) auf -100°C oder sehr schnell durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren und dann in oder über flüssigen Stickstoff gelagert, bei Bedarf möglichst schnell wieder aufgetaut und auf einem geeigneten Nährboden weiter kultiviert werden.
5. Verfahren nach Punkt 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Pflanzen vor Entnahme der Meristeme für Zeiten bis zu 4 Wochen bei Temperaturen von 4°C aufbewahrt werden.
6. Verfahren nach Punkt 1 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Kryoprotektoren Mischungen von 5–10% Dimethylsulfoxid und 90–95% Wasser oder von 5–10% Dimethylsulfoxid, 1–10% Glycerol sowie 5–10% Saccharose und 70–85% Wasser eingesetzt werden.
7. Verfahren nach Punkt 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Einleitung der Konservierung die Kryoprotektoren bis zu 48 Stunden auf die Meristeme einwirken.
8. Verfahren nach Punkt 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Auftauen durch Erwärmen mit Wasser von etwa 40°C erfolgt.
9. Verfahren nach Punkt 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Kryoprotektor nach dem Auftauen aus den Meristemen langsam in das umgebende Medium diffundiert und durch Austausch des Mediums entfernt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Das zur Gewinnung von etherischen Ölen benutzte Pflanzenmaterial von *Foeniculum vulgare* wird unter Feldbedingungen in verschiedenen Ländern angebaut. Die Erfindung ermöglicht die Gewinnung von gesundem und einheitlichem Pflanzenmaterial aus ausgelesenen Hochleistungspflanzen. *Foeniculum vulgare* ist eine vorwiegend zweijährige Pflanze. Vorkommende einjährige Pflanzen können durch Anwendung der Erfindung erhalten und vermehrt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Durch aufwendige Screeningverfahren ausgesessene Exemplare von *Foeniculum vulgare* mit hohem Gehalt an etherischen Ölen, gutem Wachstum, Resistenz gegenüber Schädlingen, Krankheiten und ungünstigen Umweltbedingungen werden gegenwärtig durch Saatgut generativ vermehrt. Das Verfahren begünstigt jedoch die Übertragung von Krankheiten, insbesondere Virose, von der Mutter- auf die Tochterpflanzen und ist hinsichtlich der erzielbaren Vermehrungsraten nur wenig produktiv. Auch die Regeneration von *Foeniculum vulgare*-Pflanzen aus Zellkulturen hat sich nicht bewährt, da das Verfahren zu aufwendig ist und ein heterogenes Pflanzenmaterial erhalten wird.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die effektive Nutzung von *Foeniculum vulgare*-Hochleistungspflanzen, insbesondere einjähriger, für die Pflanzenvermehrung bei gleichzeitiger qualitativer Verbesserung der hergestellten Tochterpflanzen und einer beträchtlichen Senkung des für die Vermehrung notwendigen Aufwandes.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung bestand darin, die Mängel der bisher bekannten Verfahren zur Erhaltung und Vermehrung von hochwertigem Pflanzenmaterial von *Foeniculum vulgare* zu überwinden und ein Verfahren zu entwickeln, welches

- die Erhaltung des genetischen Materials einmal ausgelesener insbesondere einjähriger *Foeniculum vulgare*-Hochleistungspflanzen für einen langen Zeitraum über das natürliche Lebensalter hinaus ermöglicht,
- die vegetative Vermehrung dieser Pflanzen in einer sehr hohen Zahl und mit praktischer Eignung für den Feldanbau erlaubt, wobei die erhaltenen Tochterpflanzen einen Klon mit gleichmäßig hohen und in seiner Zusammensetzung einheitlichen Gehalt an ätherischen Ölen bilden.

Durch Anbau geeigneter pathogenfreier Klone in Mischung kann in der Folge ein Hybridsaatgut erhalten werden, aus dem sich Pflanzen entwickeln, die durch Heterosiseffekt dem verklonten Ausgangsmaterial in den genannten Merkmalen noch überlegen sind.

Es wurde ein Verfahren zur virusfreien vegetativen Vermehrung und Erhaltung genetisch hochwertiger Individuen von *Foeniculum vulgare*-Hochleistungspflanzen gefunden, wonach meristematische Gewebe unter sterilen Bedingungen auf ein cytokininhaltiges Medium übertragen und bis zur Bildung von Sprossen oder neuem Meristemgewebe kultiviert werden. Diese Neubildungen werden von den Ausgangsexplantaten abgetrennt, vereinzelt und in an sich bekannter Weise vermehrt, wobei der Vermehrungszyklus sich nach Bedarf wiederholen kann. Die Bewurzelung der Sprosse erfolgt unter ebenfalls sterilen Bedingungen durch Kultivierung auf Bewurzelungsmedium. Die so erhaltenen Pflanzen werden isoliert, aus dem sterilen Milieu in Gesteinsmehl überführt und unter Folietunneln an Gewächshaus- bzw. Freilandbedingungen adaptiert.

Die pathogenfreien Pflanzen können wiederum wie oben beschrieben vegetativ vermehrt oder zur Saatgutgewinnung herangezogen werden. Die Erhaltung des Materials erfolgt durch Konservierung entweder in Form von sterilen Pflanzen als Arbeitskonserven oder in Form von sterilen Meristemen als Langzeitdepot. Als Ausgangsmaterial für die Sterilkultur dienen erfindungsgemäß Meristeme oder Meristemanlagen bzw. Sproßspitzen, Stengelstücke, Seitenknospen oder Blüten mit Meristemen oder Meristemanlagen. Zur Bildung bzw. Vermehrung von Sprossen oder Meristemen wird für das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt das Kulturmedium nach Murashige und Skoog (MS-Medium, Tabelle 1) in modifizierter Zusammensetzung verwendet.

Zur Bewurzelung werden die angezogenen Sprosse erfindungsgemäß auf hormonfreies MS-Medium überführt. Die anschließende Adaptation an Gewächshaus- und Freilandbedingungen erfolgt auf Gesteinsmehl aus Aluminiumsilikaten einer Korngröße von 0,5–3 mm, das mit einer 1%igen handelsüblichen Wopii^(R)-Nährsalzmischung durchfeuchtet wird.

Zur Konservierung des Materials werden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren entweder die sterilen Pflanzen auf einem wuchsstofffreien Substrat bei 0 bis 4°C und 500–1 000 Lux aufbewahrt oder die sterilen Meristeme nach Vorbehandlung mit Kryoprotektoren, insbesondere Mischungen von Dimethylsulfoxid und Wasser oder Dimethylsulfoxid, mehrwertigen Alkoholen, vorzugsweise Glycerol, sowie Saccharose mit Wasser langsam oder sehr schnell Temperaturen von unter –100°C ausgesetzt, in diesen Bereich gelagert und zur Rekultivierung schnell aufgetaut.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht somit die Erhaltung von genetisch wertvollem Zuchtmaterial von *Foeniculum vulgare*-Arten über einen langen Zeitraum, führt zu pathogenfreien, genetisch einheitlichen Pflanzen (Klonen) mit hoher Vitalität und qualitativ sowie quantitativ einheitlichem Gehalt an ätherischen Ölen und gewährleistet die reproduzierbare Vermehrung dieses Pflanzenmaterials über lange Zeiträume, in beliebiger Menge und unabhängig von den natürlichen Vegetationsbedingungen.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können hierbei unter produktionsmäßigen Bedingungen ausgehend von einer *Foeniculum vulgare*-Hochleistungspflanze mehrere zehntausend virusfreie Tochterpflanzen mit untereinander gleichen Eigenschaften erhalten werden.

Die Erfindung wird nachstehend anhand der Ausführungsbeispiele näher erläutert:

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

(Anzucht pathogenfreier Sprosse)

Sproßspitzen (Meristeme und nächstliegende Blattprimordien), Größe 0,3–0,5 mm, werden am Sproßende oder aus den Blattachsen sterilisierter Knospen von Pflanzen entnommen. Die Sproßspitzen werden auf einem Nährboden zur Entwicklung gebracht, der neben den Salzen der Tabelle 1, 0,5 mg Thiamin, 100 mg Inositol, 30 mg Saccharose, 3 mg Benzyladenin und 8 g Agar sowie 2,25 g pankreatisches Pepton, 0,1 g Glukose, 0,610 g Kaliumdihydrogenphosphat und 0,3 g Natriumchlorid pro Liter enthält. Die Kultivation erfolgt bei 25°C bei einer 16stündigen Belichtung, die durch 8stündige Dunkelperioden unterbrochen wird. Nach 4 Wochen bilden sich virusfreie Sprosse und es entwickeln sich an den Blattachsen neue Sproßspitzen.

Beispiel 2

(Vermehrung steriler Sprosse)

Nach Beispiel 1 erhaltene Sprosse werden in einem Nährmedium, das neben den Salzen der Tabelle 1, 0,5 mg Thiamin, 100 mg Inositol, 30 g Saccharose, 0,610 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1–3 mg Benzyladenin und 8 g Agar pro Liter enthält, im Hell-Dunkel-Wechsel, wie in Beispiel 1 beschrieben, kultiviert (1 Sproß auf 50 ml Medium in 100 ml Becherglas). Innerhalb von vier Wochen bilden sich 10 Tochter sprosse, die vereinzelt werden und entweder zur weiteren Vermehrung benutzt werden.

Beispiel 3

(Bewurzelung steriler Sprosse)

Nach Beispiel 2 erhaltene Sprosse werden auf einem Medium kultiviert, das 8 g Agar, 30 g Saccharose sowie die Salze des modifizierten MS-Mediums (Tabelle 1) enthält, wobei die Stickstoffkonzentration zur Förderung des Wurzelwachstums auf die Hälfte verringert ist. Innerhalb von etwa 6 Wochen hat sich eine für die Überführung aus dem sterilen Milieu ausreichende Wurzelmasse gebildet.

Beispiel 4

(Anpassung der steril vermehrten Pflanzen an Freilandbedingungen)

Die nach Beispiel 3 hergestellten sterilen Pflanzen werden in Gesteinsmehl, das aus Aluminiumsilikaten einer Korngröße von 0,5–3 mm entspricht, pikiert und unter Folietunneln kultiviert. Durch sich ständig verlängernde Lüftungszeiten wird die Luftfeuchtigkeit unter den Folietunneln vermindert, bis die Pflanzen an Gewächshausbedingungen und an Freilandbedingungen adaptiert sind.

Beispiel 5

(Konservierung von virusfreien sterilen Mutterpflanzen)

Nach Beispiel 4 hergestellte sterile Pflanzen werden auf einem hormonfreien, zur Verfestigung mit Agar oder Gesteinsmehl aus Aluminiumsilikaten mit einer Korngröße von 1–2 mm (z. B. Perlit) versetzten Medium bei 0 bis 4°C und einer Beleuchtung von ca. 500 Lux aufbewahrt. Die Sprosse dieser Pflanzen können für einen Zeitraum bis zu 12 Monaten zur erneuten Vermehrung nach Beispiel 3 herangezogen werden.

Beispiel 6

(Konservierung von Meristemen)

Sterile Meristeme, die nach Beispiel 2 oder 3 erhalten wurden, werden mit Kryoprotektoren in Form von Mischungen aus 5–10% Dimethylsulfoxid und 90–95% Wasser oder aus 5–10% Dimethylsulfoxid, 5–10% Glycerol sowie 5–10% Saccharose und 70–85% Wasser versetzt und nach 12stündiger Einwirkung dieser Kryoprotektoren entweder sofort in flüssigen Stickstoff überführt oder langsam (0,5 bis 1°C/min) auf etwa –100°C abgekühlt und danach in flüssigen Stickstoff überführt. Die Meristeme werden in oder über flüssigem Stickstoff beliebig lange gelagert. Bei Bedarf werden die Meristeme im Wasserbad bei +40°C schnell aufgetaut und wie in Beispiel 2 beschrieben kultiviert. Die sich entwickelnden Sprosse können nach Beispiel 3 zur weiteren Vermehrung benutzt werden.

Tabelle 1

Modifiziertes Nährmedium nach MURASHIGE und SKOOG (Physiol. Plant. 15 [1962] 479–497)

	mg/l
CaCl ₂ × 6 H ₂ O	661,0
KH ₂ PO ₄	170,0
Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O	37,3
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄	15,1
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	8,6
KJ	0,83
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,25
NH ₄ NO ₃	1 650,0
KNO ₃	1 900,0
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	370,0
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	50,0
Thiamin	0,5
Pyridoxin	0,5
Nicotinsäureamid	1,0
m-Inosit	100,0
Saccharose	30 000,0