



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **250 949 A1**

4(51) C 12 N 5/00

A 01 H 5/00

A 01 H 1/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 292 335 5

(22) 10.07.86

(44) 28.10.87

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

(72) Donath, Per, Dipl.-Pharmazeut; Diettrich, Beate, Dipl.-Pharmazeut; Luckner, Martin, Prof. Dr. sc. nat.; Han-
nig, Hans-Jürgen, Dipl.-Chem.; Herold, Manfred, Dipl.-Landw., DD(54) **Verfahren zur virusfreien vegetativen Vermehrung und Erhaltung von Kamille-Hochleistungspflanzen**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur pathogenfreien Vermehrung und Erhaltung von Matricaria chamomilla-Hochleistungspflanzen in vitro, das über eine lange Zeit einen innerhalb der Population gleichmäßig hohen und in seiner Zusammensetzung konstanten Gehalt an pharmazeutisch wichtigen Verbindungen bewirkt. 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 entweder 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 Kamille-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 MS-Medium mit 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 zur Konservierung von Hochleistungspflanzen nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß in vitro angezogene Pflanzen im sterilen Zustand bei 0 bis 4°C und 500–1.000 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 zur Konservierung von Hochleistungspflanzen 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 vier 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, 5–10% 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 pharmazeutisch wichtigen Verbindungen benutzte Pflanzenmaterial von *Matricaria chamomilla* wird unter Feldbedingungen in verschiedenen Ländern angebaut. Die Erfindung ermöglicht die Gewinnung von gesundem und einheitlichem Pflanzenmaterial aus ausgelesenen Hochleistungspflanzen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Durch aufwendige Screeningverfahren ausgelesene Exemplare von *Matricaria chamomilla* mit hohem Gehalt an pharmazeutisch wichtigen Verbindungen, gutem Wachstum, Resistenz gegenüber Schädlingen, Krankheiten und ungünstigen Umweltbedingungen werden gegenwärtig durch Saatgut generativ vermehrt. Das Verfahren begünstigt jedoch die Übertragung von Krankheiten, insbesondere Viren, von der Mutter- auf die Tochterpflanzen und ist hinsichtlich der erzielbaren Vermehrungsraten nur wenig produktiv. Auch die Regeneration von Kamille-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 Kamille-Hochleistungspflanzen 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 hochwertigen Kamille-Pflanzen zu überwinden und ein Verfahren zu entwickeln, welches

- die Erhaltung des genetischen Materials einmal ausgelesener Kamille-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 hohem und in seiner Zusammensetzung einheitlichen Gehalt an pharmazeutisch wichtigen Verbindungen 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 ist.

Es wurde ein Verfahren zur virusfreien vegetativen Vermehrung und Erhaltung genetisch hochwertiger Individuen von Kamille 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. Das für die Adaption an Freiland- oder Gewächshausbedingungen verwendete Gesteinsmehl aus Aluminiumsilikaten wird mit 1%iger handelsüblicher Wopli®-Nährlösung durchfeuchtet.

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 diesem Bereich gelagert und zur Rekultivierung schnell aufgetaut.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht somit die — Erhaltung von genetisch wertvollem Zuchtmaterial von Kamille-Arten über einen langen Zeitraum, führt zu pathogenfreien, genetisch einheitlichen Pflanzen (Klonen) mit hoher Vitalität und qualitativ sowie quantitativ einheitlichem Gehalt an pharmazeutisch wichtigen Verbindungen 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 Kamille-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 0,02–0,05 mg Benzyladenin, 610 mg Kaliumdihydrogenphosphat und 8 g Agar pro Liter enthält.

Die Kultivierung erfolgt bei 22°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 0,05 mg Benzyladenin, 610 mg Kaliumdihydrogenphosphat und 8 g Agar pro Liter enthält, im Hell-Dunkel-Wechsel, wie in Beispiel 1 beschrieben, kultiviert (1 Sproß auf 60 ml Medium in 100 ml Becherglas). Innerhalb von vier Wochen bilden sich 10–20 Tochter sprosse, die vereinzelt werden und entweder zur weiteren Vermehrung benutzt oder zu Pflanzen regeneriert werden.

Beispiel 3

(Bewurzelung steriler Sprosse)

Nach Beispiel 2 erhaltene Sprosse werden auf einem phytohormonfreien MS-Medium (Tabelle 1) kultiviert. Innerhalb von etwa 3 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 mit 1%iger handelsüblicher Wopii®-Nährsalzlösung durchfeuchtet ist, pikiert und unter Folietunnel kultiviert. Durch sich ständig verlängernde Lüftungszeiten wird die Luftfeuchtigkeit unter den Folietunneln vermindert, bis die Pflanzen an Gewächshausbedingungen und später 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 und 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)

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