



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 06 367 T2 2004.08.12**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 164 831 B1**

(51) Int Cl.7: **A01H 4/00**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 06 367.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA00/00305**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 912 286.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/57690**

(86) PCT-Anmeldetag: **24.03.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **05.10.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **05.11.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.08.2004**

(30) Unionspriorität:

2267012	25.03.1999	CA
151045 P	27.08.1999	US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

University of Guelph, Guelph, Ontario, CA

(72) Erfinder:

**SAXENA, K., Praveen, Guelph, CA; MURCH, J.,
Susan, Cambridge, CA; KRISHNARAJ, Sankaran,
Guelph, CA; SLIMMON, Y., Tannis, Guelph, CA**

(74) Vertreter:

Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(54) Bezeichnung: **MIKROPROPAGATION UND HERSTELLUNG VON PHYTOPHARMAZEUTISCHEN PFLANZEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Mikrovermehrung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen. Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Anreicherung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen mit Nährstoffen, Mineralien oder anderen Verbindungen sowie Pflanzen, die durch Verwendung dieses Verfahrens erhalten wurden.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Medizinische Pflanzen spielen in der Gesundheitsvorsorge auf der ganzen Welt eine wichtige Rolle – besonders in nicht industrialisierten Kontinenten wie Afrika, Südamerika und Teilen Asiens. Eine Anzahl von traditionellen Pflanzen werden von der Mehrheit der Bevölkerung selbst in vielen industrialisierten Ländern zur Selbst-Medikation kleinerer und mittlerer Erkrankungen des Alltags verwendet.

[0003] Obwohl viele traditionelle medizinische Pflanzenheilmittel keinen umfangreichen wissenschaftlichen Tests unterzogen wurden, sind sie sehr beliebt und ihr Verkauf ist nicht durch Zulassungsbehörden der Regierung eingeschränkt. Einige medizinische Pflanzen wurden in Labor und Klinik umfangreich untersucht, und Pflanzen, die zu dieser Kategorie gehören, werden als Phytopharmazeutika bezeichnet.

[0004] Eines der mit Zubereitungen pharmazeutisch nutzbarer Pflanzen verbundenen Hauptprobleme ist die Variabilität des Gehalts der medizinisch aktiven Bestandteile. Dies Problem wurde 1997 in Belgien deutlich, als bei mehr als 100 Menschen eine völlige Zerstörung ihrer Nieren durch irreversible interstitielle Fibrose diagnostiziert wurde, die durch eine falsch bestimmte chinesische Medizinpflanze verursacht wurde (Betz, 1998). Dies hat zu strikten Regierungskontrollen von Reinheit und Gehalten an aktiven Bestandteilen in phytopharmazeutischen Produkten in Europa geführt. Solche strikten Regulierungen sind jedoch momentan in den meisten Ländern, einschließlich Kanada und den Vereinigten Staaten nicht vorhanden.

[0005] Die Variabilität im medizinischen Gehalt pharmazeutisch nutzbarer Pflanzen ist vermutlich das Ergebnis einer Vielfalt von Faktoren, die Jahr-zu-Jahr- und Pflanze-zu-Pflanze-Variabilität im medizinischen Gehalt, Verfälschung von medizinischen Präparaten mit falsch identifizierten Pflanzenarten, Fehlen von geeigneten Verfahren zur Erzeugung und Standardisierung der Ernte, fehlendes Verständnis der besonderen Pflanzenphysiologie oder Effektivität bei menschlichem Verzehr und Verbrauchertäuschung beinhalten. Zudem werden Zubereitungen pharmazeutisch nutzbarer Pflanzen typischerweise aus Feldfrüchten hergestellt und sind daher gegenüber Befall durch Bakterien, Pilze und Insekten anfällig, die den medizinischen Gehalt der Zubereitungen verändern können.

[0006] Vergangene und gegenwärtige Bemühungen sind darauf gerichtet zu gewährleisten, dass Zubereitungen von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen das richtige Pflanzenmaterial enthalten, dass das Pflanzenmaterial entsprechend einem standardisierten Protokoll bearbeitet wird und dass das fertige Produkt spezifische Mengen einer spezifischen Markersubstanz enthält. Ein anderer Ansatz liegt in der Anwendung traditioneller pharmazeutischer Entwicklungsverfahren zur Isolierung einer einzelnen "aktiven" Komponente und zur Synthese von Abwandlungen des sogenannten "Medikaments". Dieses Verfahren beinhaltet gewöhnlich die Zerlegung der Pflanze in chemische Bestandteile und Versuche, einen einzelnen, für die Auslösung der gewünschten Wirkung in Säugetieren verantwortlichen Bestandteil zu identifizieren. Die meisten Zubereitungen pharmazeutisch nutzbarer Pflanzen werden aus ganzen Pflanzen gewonnen und enthalten eine Vielfalt von Verbindungen, die bei der Hervorrufung der gewünschten Wirkung synergistisch wirken können. Obwohl für verschiedene Zubereitungen medizinische Identifizierungsnummern ("drug identification numbers", DIN) auf der Grundlage einer Standardkonzentration einer Markerverbindung vergeben wurden, kann es im Menschen physiologische Wirkungen geben, die dieser Markerverbindung nicht direkt zugeordnet werden können. Das Fehlen einer tatsächlichen Wissensgrundlage für die phytopharmazeutische Industrie hat zu der jetzigen Situation geführt, in welcher der Verkauf von Zubereitungen pharmazeutisch nutzbarer Pflanzen hauptsächlich von Enthusiasmus anstelle zuverlässiger wissenschaftlicher Forschung angetrieben wird. Daher gibt es mit den gegenwärtig verfügbaren Verfahren keine Möglichkeit, die Qualität, Effizienz oder Sicherheit von Zubereitungen pharmazeutisch nutzbarer Pflanzen zu gewährleisten.

[0007] Mangel an Spurenelementen in Menschen kann als Folge unzureichender Aufnahme des Minerals in die Ernährung oder verminderter oder gestörter Absorption in Gegenwart von ausreichender Nahrungszufuhr auftreten (Whittaker, 1998). Das Problem des Mineralienmangels ist in Entwicklungsländern am meisten verbreitet, wo es ein diätisches Ungleichgewicht in der Nahrungsmittelzusammensetzung geben kann. Es wird geschätzt, dass weltweit mehr als 2 Millionen Menschen unter Mineralienmangel leiden, die in Form von gewöhnlichen Erkrankungen und Krankheiten auftritt (z. B. kann Zinkmangel zu erniedrigter Fruchtbarkeit führen, Jodmangel kann als Muskel- und Schilddrüsen-betreffende Erkrankungen auftreten, Vitamin C-Mangel macht gegenüber gewöhnlichen Viren und Erkältungen empfänglich). Faktoren, welche die Absorption von Mineralien

und Nährstoffen verringern oder verschlechtern, schließen Nahrungsmittelbestandteile, wie Phytat oder Faser, Medikamente oder andere Chemikalien, die mit den lebensnotwendigen Spurenmineralien interagieren können, und Interaktionen zwischen essentiellen Nährstoffen ein (Whittaker, 1998).

[0008] Die üblichen Ansätze zur Überwindung dieser durch Mängel verursachten Erkrankungen sind Nahrungsmittelzusätze (z. B. Vitamin C-Tabletten, Zink-Bonbons), und Verzehr von angereicherter Nahrung (mit Eisen angereicherte Babynahrung, Vitamin D-angereicherte Milch, jodiertes Salz). Nahrungsmittel, die gewöhnlich mit mineralischen Nährstoffen angereichert sind, schließen Mehl, Backwaren, Reis, Makkaroni-Produkte, Frühstückscerealien und Säuglingsnahrung ein (Whittaker, 1998). Die Wirksamkeit der Anreicherung von Nahrungsmitteln mit anorganischen Mineralverbindungen, z. B. $Zn(SO_4)_2$, wird durch die niedrige Bioverfügbarkeit der Ionen und dem hohen Grad des Verlusts durch Ausscheidung eingeschränkt. Neueste Studien zur Bioverfügbarkeit angereicherter Nährstoffe und Vitamine in Menschen haben gezeigt, dass mehr als 2/3 der Nährstoffe und Zusatzstoffe nicht durch das menschliche Gastrointestinalsystem absorbiert werden können, da sie nicht in bioverfügbarer Form vorliegen. 1993 schlug die Beratungsgruppe Internationale Agrarforschung ("Consultant Group on International Agricultural Research", CGIAR) vor, dass eine Steigerung der pflanzlichen Mineralienaufnahme genutzt werden könnte, um den mit einem Mangel an Zink und anderen Nährstoffen verbundenen Problemen zu begegnen (Ruel und Bouis, 1998).

[0009] Echinacea-Produkte gehören momentan zu den bestverkauften Kräuterheilmitteln in Nordamerika und waren dies seit mehreren Jahren (Schardt, 1998). Zubereitungen von Echinacea sp. wurden historisch für die Behandlung von gewöhnlichen menschlichen Erkrankungen wie Erkältungen und Grippe verwendet (Kindscher, 1992). Kommerziell hergestellte Extrakte und Zubereitungen ganzer getrockneter Gewebe werden aus der Wurzel einer Echinacea-Art hergestellt, einer Feldfrucht, die ungefähr drei Jahre braucht, um ein verkäufliches Produkt herzustellen.

[0010] Kommerziellen Zubereitungen von Echinacea wird häufig anorganisches Zink zugesetzt, um die medizinische Wirkung zu erhöhen. Zinkzusätze werden zur Erhaltung einer guten Gesundheit, für verbesserte Funktion des Immunsystems, verringerte Ausbildung viraler Symptome, Gewebsbildung und für den Metabolismus von Proteinen, Fetten und Kohlenhydraten empfohlen (Gison et al., 1998). In käuflichen Zubereitungen wird Zink dem Echinacea-Wurzelmateriale während der Verarbeitung in der anorganischen Form $Zn(SO_4)_2$ zugegeben. Daher ist die Absorbierbarkeit des zugegebenen Zn durch die niedrige Bioverfügbarkeit begrenzt. Forscher haben berichtet, dass bestimmte Aminosäuren, Cystein-enthaltende Peptide und organische Säuren, die während der Verdauung freigesetzt werden, die Zinkabsorption erhöhen können, wahrscheinlich durch die Bildung löslicher Liganden mit Zink oder durch Verhinderung einer Bildung des unlöslichen Zink-Phytat-Komplex (Gibson et al., 1998).

[0011] Zinkmangel ist eine der Hauptgründe in Säugetieren für eingeschränkte Wachstumsrate, Appetitverlust, Hautläsionen, verzögerte Wundheilung, Hypogonadismus, verzögerte sexuelle Reife und gestörte Immunantworten (Whittaker, 1998).

[0012] Der Prozess der Zinkstatuskontrolle ist ein straff reguliertes Gleichgewicht von Absorption- und Exkretionsprozessen. Zink wird in kleinen Mengen effizienter als in höheren Konzentrationen absorbiert und andere diätetische Faktoren wie Faser und Phytat inhibieren die Zinkabsorption. Zusätzlich kann die Praxis einer Anreicherung von Nahrungsmitteln mit Eisen einen negativen Einfluss auf den Zinkstatus haben (Whittaker, 1998). Daher ermutigen die Empfehlungen der amerikanischen "Food and Drug Administration" zur besonnenen Verwendung von Nährstoffen als Nahrungsmittelergänzung, ermutigen aber nicht zur Anreicherung von Nahrungsmittelhaupterzeugnissen.

[0013] Gleichermaßen wird die Zinkanreicherung von Tierfutter nach den Richtlinien der "Agriculture and Agri-Food Canada" überwacht und auf weniger als 250 ppm beschränkt. In den USA haben laufende Forschungen angedeutet, dass Ergänzung von Tierfutter mit 3000 ppm anorganischem Zink zu schnellerem Muskel- und Proteinzuwachs und einer allgemeinen Beschleunigung der Wachstumsrate führen.

[0014] Eine der beliebtesten medizinischen Pflanzen in Nordamerika ist Johanniskraut (*Hypericum perforatum*). Basierend auf der in zahlreichen klinischen Versuchen gezeigten Wirksamkeit (Linde et al., 1996) benutzten 1998 7,5 Millionen Amerikaner Johanniskraut zur Behandlung von neurologischen Störungen und Depressionen (Greenwald, 1998). 1997 investierte das Büro für alternative Medizin des nationalen Gesundheitsamts 4,3 Million Dollar in einen dreijährigen klinischen Versuch, um die Wirkungen von Johanniskraut, einem Placebo und einem Standard-Antidepressivum bei Patienten zu vergleichen, die unter milder Depression litten (NIH, 1997). Der Standard für Johanniskrautzubereitungen ist "die gesamte frische oder getrocknete Pflanze oder ihre Bestandteile, einschließlich nicht weniger als 0,04% Naphthodianthron der Hyperizingruppe, berechnet als Hyperizin" (Johanniskraut-Monographie, 1997), jedoch zeigte ein neuerer klinischer Versuch, dass die therapeutische Wirkung von Johanniskraut mit der Konzentration von Hyperforin als zweiter Verbindung korreliert war (Laakmann et al., 1998). Vergleichbar mit synthetischen Antidepressiva wurde festgestellt, dass die Aktivität von Hyperforin eine Inhibierung der Aufnahme von Serotonin, Dopamin, Noradrenalin, GABA und L-Glutamat in tierischen Zellkulturen verursacht (Chatterjee et al., 1998). Zur weiteren Verwirrung der Situation haben Untersuchungen der besonderen Physiologie von Johanniskraut mehr als 25 zusätzliche Verbindungen

identifiziert, die medizinische Aktivität haben könnten (Miller, 1998; Nahrstedt und Butterweck, 1997; Evans und Morgenstern, 1997), einschließlich des kürzlichen Berichts über das Vorkommen von relativ hohen Gehalten des Säugetierneurohormons Melatonin (Murch et al., 1997). Daher ist es verständlich, dass für die neurologische Wirksamkeit Gesamtpflanzenzubereitungen von Johanniskraut benötigt werden.

[0015] Lithium ist ein ebenfalls in der Behandlung von Depression und neurologischen Störungen verwendetes Mineralelement. Häufig können traditionelle pharmazeutische Antidepressiva-Therapien in Situationen, in denen die Depression eines Patienten entweder behandlungsresistent oder nur teilweise und/oder ungenügend auf die Behandlung anspricht, mit Lithium verbessert werden (Schweitzer & Tuckwell, 1998). Lithiumbehandlung ist seit mehr als 40 Jahren eingesetzt worden und stellte sich in 60–80 aller Patienten als effektiv heraus, obwohl die Art der Wirkung unklar ist. Toxizität von Lithiumsalzen kann auftreten, wenn das Blutlithium als Ergebnis von Fieber, Diabetes, Gewichtsverlustdiäten, Salz-beschränkter Diäten oder Diarrhö erhöht ist.

[0016] Es ist wichtig, das Problem der Variabilität im medizinischen Gehalt von Zubereitungen pharmazeutisch nutzbarer Pflanzen zu lösen, so dass sie verlässlich und effektiv verwendet werden können. Eine Lösung zur Herstellung einer verlässlichen Quelle pharmazeutisch nutzbarer Pflanzen ist die Entwicklung und Anwendung von in vitro-Mikrovermehrungsverfahren auf diese Pflanzen. Jedoch gibt es bis heute kein bekanntes allgemeines Verfahren für die in vitro-Mikrovermehrung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen.

[0017] Darüber hinaus ist die Phytoanreicherung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen erwünscht, um Pflanzen herzustellen, die gewünschte Zusatzstoffe, Nährstoffe und andere ausgewählte Verbindungen, die in einer biokompatiblen Form erhältlich sind, umfassen.

[0018] Daher besteht in der Industrie für pharmazeutisch nutzbare Pflanzen ein Bedarf für die Entwicklung eines in vitro-Systems für die zuverlässige und reproduzierbare Vermehrung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen, und, wenn die erwünscht ist, für die Phytoanreicherung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen mit gewünschten, ausgewählten Verbindungen.

[0019] Die Überwindung der Nachteile des Standes der Technik ist ein Ziel dieser Erfindung.

[0020] Das oben genannte Ziel wird durch Kombinationen der Merkmale aus den Hauptansprüchen erreicht, die Unteransprüche offenbaren weitere vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung.

Zusammenfassung der Erfindung

[0021] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Mikrovermehrung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Anreicherung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen mit Nährstoffen, Mineralien oder anderer Verbindungen, und Pflanzen, die durch Anwendung dieses Verfahrens hergestellt werden.

[0022] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren (A) zur in vitro-Mikrovermehrung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen zur Verfügung, Schritte umfassend, bei denen man:

- a) ein steriles Explantat der pharmazeutisch nutzbaren Pflanze auf einem Induktionsmedium zieht, das mindestens einen Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität umfasst, um regeneriertes Gewebe zu bilden; und
- b) das regenerierte Gewebe auf ein Grundmedium überführt und kultiviert, um Pflänzchen zu bilden.

[0023] Die Erfindung ist ferner auf das Verfahren (A) wie oben definiert gerichtet, bei dem die pharmazeutisch nutzbare Pflanze aus Johanniskraut (*Hypericum perforatum* cv. Anthos), Huang-qin (*Scutellaria baicalensis*), Echinacea sp., Mutterkraut (*Tanacetum parthenium*) und Knoblauch (*Allium* sp.) ausgewählt ist.

[0024] Die Erfindung betrifft das Verfahren (A) wie oben definiert, bei dem der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität natürlich oder synthetisch sein kann und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Thidiazuron (TDZ, N-Phenyl-N'-(1,2,3-thidiazolyl)harnstoff), Benzylaminopurin (BAP), Zeatin, CPPU (N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N-(phenylharnstoff) und 2-i-P(N6-(2-Isopentenyl)-adenin oder 6-gamma, gamma-Dimethylallylaminopurin).

[0025] Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren ihrer Aspekte ein Verfahren (B) zur in vitro-Mikrovermehrung einer pharmazeutisch nutzbaren Pflanze, Schritte umfassend, bei denen man:

- a) ein steriles Explantat der pharmazeutisch nutzbaren Pflanze auf einem Induktionsmedium zieht, das eine geeignete Konzentration von mindestens einem Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität umfasst, um regeneriertes Gewebe zu bilden;
- b) das regenerierte Gewebe auf ein Grundmedium überführt und subkultiviert, um die Bildung von regeneriertem Gewebe zu optimieren; und
- c) das regenerierte Gewebe auf ein Grundmedium überführt und kultiviert, um Pflänzchen zu bilden.

[0026] Diese Erfindung betrifft ferner das Verfahren (B) wie oben definiert, bei dem die pharmazeutisch nutzbare Pflanze ausgewählt ist aus Johanniskraut (*Hypericum perforatum* cv. Anthos) Huangqin (*Scutellaria baicalensis*), Echinacea sp., Mutterkraut (*Tanacetum parthenium*) und Knoblauch (*Allium* sp.).

[0027] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner das Verfahren (B) wie oben definiert, bei dem der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität natürlich oder synthetisch sein kann und aus der Gruppe bestehend aus Thidiazuron (TDZ, N-Phenyl-N'-(1,2,3-thidiazol-yl)harnstoff), Benzylaminopurin (BAP), Zeatin, CPPU (N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N-(phenylharnstoff)und 2-i-P(N6-(2-Isopentenyl)adenin oder 6-gamma, gamma-Dimethylallylaminopurin) ausgewählt ist.

[0028] In einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren (C) zur Anreicherung einer in vitro angezogenen pharmazeutisch nutzbaren Pflanze zur Verfügung, Schritte umfassend, bei denen man:

- a) einen sterilen Sämling, ein Explantat oder regeneriertes Gewebe kultiviert, um ein Pflänzchen zu bilden; und
- b) das Pflänzchen auf einem Grundmedium subkultiviert, welches mindestens einen ausgewählten Zusatzstoff enthält und die Aufnahme und Anreicherung des mindestens einen ausgewählten Zusatzstoffes in einer bioverfügbaren Form in dem Pflänzchen ermöglicht.

[0029] Bevorzugt wird das sterile Explantat in Schritt (a) von Verfahren (c) auf einem Medium, das mindestens einen Wachstumsregulator mit Zytokinaktivität umfasst, unter Bedingungen kultiviert, die geeignet sind, regeneriertes Gewebe zu bilden.

[0030] In einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ferner ein Verfahren (D) für die in vivo-Anreicherung einer pharmazeutisch nutzbaren Pflanze zur Verfügung, Schritte umfassend, bei denen man:

- a) ein Pflänzchen oder Sämling unter Verwendung des Verfahrens (A) wie oben beschrieben unter Bedingungen kultiviert, die für klonale Mikrovermehrung und Wachstum des Pflänzchens oder Sämlings ausreichend sind; und
- b) das Pflänzchen oder den Sämling an eine Hydrokulturumgebung mit einer Recyclinglösung anpasst, die mindestens einen ausgewählten Zusatzstoff enthält, um Aufnahme und Anreicherung des mindestens einen ausgewählten Zusatzstoffes in einer bioverfügbaren Form innerhalb des Pflänzchens zu ermöglichen.

[0031] Die pharmazeutisch nutzbare Pflanze, die in einem der Verfahren (A), (B), (C) und (D) verwendet wird, kann ausgewählt werden aus:

Achillea millefolium
 Achyranthes bidentata
 Aconium napellus
 Adonis aestivalis
 Agastache mexicana
 Agrimonia eupatoria
 Agathosma betulina
 Allium sp
 Anchusa officinalis
 Anemopsis californica
 Angelica dahurica
 Angelica polymorpha sinensis (A. sinensis)
 Arnica montana
 Ammi visnaga
 Arctostaphylos uva-ursi
 Asclepias tuberosa
 Astragalus membranaceus
 Astragalus chinensis
 Baphicacanthus cusia
 Bixa orellana
 Bupleurum falcatum
 Brugmansia (Datura) spp.
 Campanula rapunculoides
 Carum roxburianum
 Carum copticum
 Cassia tora
 Chamaelirium luteum
 Chimaphila umbellata
 Commiphora africana
 Conium maculatum
 Crithium maritimum
 Datura metel (Datura alba)
 Datura innoxia

Dracocephalum moldavica
 Echinacea sp.
 Eclipta alba (E. prostrata)
 Ephedra nevadensis
 Eriodictyon californicum
 Eucommia ulmoides
 Eupatorium perfoliatum
 Filipendula vulgaris (F. hexapetala)
 Gaultheria procumbens
 Geum urbanum
 Houlttuynia cordata
 Hydrocotyle asiatica (Centella asiatica)
 Hypericum perforatum cv. Anthos
 Inula helenium
 Jastropa curcas
 Leptospermum scoparium
 Lespedeza capitata
 Ligusticum porteri
 Ligustrum lucidum
 Lithospermum officinale
 Lycium barbarum
 Mucuna pruriens
 Mandragora officinarum
 Origanum dictamnus
 Patietaria judaica (P. officinalis)
 Phyllanthus emblica
 Picrasma excelsa
 Piniella ternate
 Pogostemon patchouli
 Polygonum multiflorum
 Porophyllum ruderale ssp. macrocephalum
 Prunella vulgaris
 Pueraria lobata (P. thunbergiana)
 Rauwolfia serpentina
 Rivea corymbosa
 Sanguinaria canadensis
 Satureja douglasii
 Schizonepeta tenuifolia
 Scutellaria baicalensis
 Solanum xanthocarpum (S. surattense)
 Sutherlandia frutescens
 Tabebuia impetiginosa
 Tanacetum parthenium
 Tribulus terrestris
 Trichosanthes kirilowii
 Turnera diffusa
 Voacanga africana
 Withania somnifera.

[0032] Der in Verfahren (C) oder (D) verwendete Nährstoff kann ausgewählt werden aus, ist aber nicht beschränkt auf Bor, Calcium, Chlor, Chrom, Kobalt, Kupfer, Eisen, Lithium, Iod, Magnesium, Mangan, Molybdän, Nickel, Phosphor, Kalium, Selen, Silicium, Natrium, Schwefel, Zinn, Vanadium und Zink.

[0033] Die Herstellung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen in vitro hat verschiedene Vorteile:

- Pflanzen werden unter sterilen, standardisierten Bedingungen angezogen;
- einzelne überlegene Pflanzen können identifiziert und klonal erzeugt werden;
- Pflanzenmaterial ist einheitlich und es kann daher eine genaue biochemische Charakterisierung erhalten werden; und
- letztendlich können Protokolle zur Verbesserung der Feldfrucht durch genetische Manipulation entwickelt werden.

[0034] Diese Zusammenfassung der Erfindung beschreibt nicht notwendigerweise alle notwendigen Merkma-

le der Erfindung, sondern das die Erfindung sich auch in einer Unterkombination der beschriebenen Merkmale befinden kann.

[0035] Diese und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung werden hier genauer weiter unten beschrieben.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

[0036] Die Merkmale der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung besser ersichtlich, in denen Bezug genommen wird auf die angehängten Zeichnungen, in denen:

[0037] **Fig. 1** eine Skizze eines Bioreaktorsystems darstellt, das geeignet zur Verwendung mit den Verfahren der Erfindung ist.

[0038] **Fig. 2** Johanniskraut darstellt, das entsprechend der vorliegenden Erfindung hergestellt wurde. **Fig. 2(a)** zeigt TDZ-induziertes regeneriertes Gewebe auf der Grundlage von etiolierten Hypokotylexplantaten von Johanniskraut mit $10 \mu\text{mol} \times 1^{-1}$ TDZ. An der Spitze von Johanniskrautsprossprimordien ist Pigmentierung sichtbar, die durch die Anwesenheit der Verbindung Hyperizin verursacht wird. (Balken = 1 mm). **Fig. 2(b)** zeigt die Entwicklung von regeneriertem Gewebe auf der Grundlage von Hypokotylexplantaten nach 9 Tagen Kultur auf TDZ-enhaltendem Induktionsmedium und 9 Tagen Subkultur auf Grundmedium. De novo-Triebe entwickelten sich in Johanniskraut aus allen Bereichen des Explantats ohne eine intermediäre Kallusphase (Balken = 0,75 cm).

[0039] **Fig. 2(c)** zeigt steril kultivierte Pflänzchen, die aus einem einzelnen Hypokotylanschnitt nach zwei Monaten auf Grundmedium in einer Magenta-Box auswuchsen. (Balken = 1,2 cm).

[0040] **Fig. 3** zeigt entsprechend der vorliegenden Erfindung erzeugtes Johanniskraut. **Fig. 3(a)** ist eine histologische Charakterisierung, welche de novo-Induzierung von Trieben des Johanniskrauts und meristematische Zonen, die an der hypodermalen Region des Hypokotylexplantats (Pfeile) gebildet wurden, nach 7 Tagen Kultur auf TDZ-enhaltendem Induktionsmedium zeigt. (Balken = 50 μm). **Fig. 3(b)** ist eine histologische Charakterisierung, welche die weitere Entwicklung des Meristems hin zu der Epidermis in auf TDZ-enhaltendem Induktionsmedium kultiviertem Johanniskrauthypokotyl zeigt. (Balken = 50 μm). **Fig. 3(c)** ist eine histologische Charakterisierung, welche die Entwicklung von Sprossprimordien und die Entwicklung einer Gefäßverbindung (Pfeil) in Johanniskrauthypokotyl, welches für zwei Wochen auf TDZ-enhaltendem Induktionsmedium kultiviert wurde, zeigt (Balken = 166 μm). **Fig. 3(d)** ist eine histologische Charakterisierung, die einen gut entwickelten Spross (Balken = 166 μm) und Gefäßverbindungen zwischen der Adventivknospe am Trieb und dem Parentalgewebe (Pfeil) in Johanniskrauthypokotyl zeigt, welches für 18 Tage auf TDZ-enhaltendem Induktionsmedium kultiviert wurde. (Balken = 166 μm).

[0041] **Fig. 4** zeigt verschiedene Aspekte von Echinacea, die entsprechend der hier beschriebenen Verfahren erzeugtem Echinacea. **Fig. 4(a)** stellt Kallusbildung und Triebregeneranten dar, die an der Kallusgrenzschicht auf Blattstielexplantaten von Echinacea purpurea erscheinen, die auf BAP-enhaltendem Induktionsmedium kultiviert wurden. **Fig. 4b** stellt einzelne Triebregeneranten mit gut definierten Blattinitialen auf Blattstielexplantaten von Echinacea purpurea nach 33 Tagen Kultur auf BAP-enhaltendem Induktionsmedium dar. **Fig. 4c** stellt einen Embryo im späten Keimblattstadium auf einem BAP-induzierten Blattstielexplantat von Echinacea purpurea dar. **Fig. 4(d)** stellt vollständige Pflänzchen dar, die aus Embryonen angezogen wurden, die aus Blattstielen von Echinacea purpurea regeneriert wurden, die auf BAP-enhaltendem Induktionsmedium kultiviert und für zwei Monate auf Grundmedium kultiviert wurden.

[0042] **Fig. 5** stellt verschiedene Aspekte von Echinacea dar, das entsprechend der Verfahren der vorliegenden Erfindung erzeugt wurde. **Fig. 5(a)** stellt eine histologische Charakterisierung dar, die perikline Zellteilung in den subepidermalen Schichten des Blattstielexplantats von Echinacea purpurea an Tag 3 der Kultur auf BAP-enhaltendem Kulturmedium zeigt. (Balken = 20 μm). **Fig. 5(b)** stellt eine histologische Charakterisierung dar, welche die Bildung von promeristematischen Zentren (Pfeile) in dem Kallusgewebe von Blattstielexplantaten von Echinacea purpurea am Tag 14 der Kultur auf BAP-enhaltendem Induktionsmedium zeigt. (Balken = 680 μm). **Fig. 5(c)** stellt eine histologische Charakterisierung dar, die promeristematische Zentren zeigt, die Zellen haben, die kleiner sind und ein dichtes Zytoplasma und einen hervortretenden Kern aufweisen (Pfeile), die in dem Kallusgewebe der Blattstielexplantate von Echinacea purpurea am Tage 14 der Kultur auf BAP-enhaltendem Induktionsmedium beobachtet wurden. (Balken = 50 μm). **Fig. 5(d)** stellt eine histologische Charakterisierung dar, die zeigt, wie sich die promeristematischen Zentren zur Bildung von kuppelförmigen Meristemzonen weiter entwickelten, die auf den Blattstielexplantaten von Echinacea purpurea am Tag 21 der Kultur auf BAP-enhaltendem Induktionsmedium gut definiert waren. (Balken = 50 μm). **Fig. 5(e)** ist eine histologische Charakterisierung, welche die Entwicklung eines Sprossmeristems und Blattprimordien auf Blattstielexplantaten von Echinacea purpurea nach 21 Tagen Kultur auf einem BAP-enhaltendem Induktionsmedium zeigen. (Balken = 320 μm). **Fig. 5(f)** ist eine histologische Charakterisierung, die eine gut entwickelte Sprossknospe umringt von Blattprimordien nach 25 Tagen Kultur auf einem BAP-enhaltendem Induktionsmedium zeigt, die auf Blattstielexplantaten von Echinacea purpurea gebildet wurde. Zu erwähnen ist, dass Trichome beobachtet wurden, die mit den Blattprimordien verbunden sind, und dass Xylemelemente an der Basis der Sprossknospe

vorhanden sind. (Balken = 166 µm).

[0043] **Fig. 6** stellt verschiedene Aspekte von Echinacea dar, das entsprechend der vorliegenden Erfindung erzeugt wurde. **Fig. 6(a)** stellt eine histologische Charakterisierung dar, die eine Serie von antiklinen und periklinen Teilungen am Tag 14 der Kultur auf einem BAP-enthaltendem Induktionsmedium zeigt, die zur Bildung eines gut definierten Protoderms führt, das aus Blattstielexplantaten von Echinacea purpurea regeneriert wurde. (Balken = 50 µm). **Fig. 6(b)** ist eine histologische Charakterisierung, die einen gut entwickelten herzförmigen somatischen Embryo mit einem voll entwickelten Protoderm nach 20 Tagen Kultur auf einem BAP-enthaltendem Induktionsmedium zeigt, der aus Blattstielexplantaten von Echinacea purpurea regeneriert wurde. (Balken = 320 µm).

[0044] **Fig. 7** stellt eine Balkengraphik des Einflusses der Zinkzugabe in das Kulturmedium auf die Zinkanreicherung in Echinacea-Pflänzchen nach 30 Tagen Kultur dar.

[0045] **Fig. 8** ist eine Balkengraphik, welche die Lithiumanreicherung in Johanniskrautpflänzchen zeigt, die für 30 Tage auf einem Medium kultiviert wurden, dem 0–200 mg/l Lithium zugegeben wurden.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung:

[0046] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Mikrovermehrung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen und Pflanzlingen, die durch Verwendung dieses Verfahrens erhalten werden. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Anreicherung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen mit Nährstoffen, Mineralien oder anderen Verbindungen und Pflanzlingen, die durch Verwendung dieser Verfahren erhalten werden.

[0047] Im folgenden wird eine bevorzugte Ausführungsform als Beispiel beschrieben und ohne Beschränkung auf die zur Verwirklichung der Erfindung notwendige Merkmalskombination.

[0048] Der Begriff pharmazeutisch nutzbare Pflanze, wie er hier benutzt wird, meint jede Pflanze, die eine heilsame oder medizinische Wirkung aufweist, wenn sie über einen beliebigen Weg einem Menschen oder einem Tier verabreicht wird. Die heilsame oder medizinische Wirkung der pharmazeutisch nutzbaren Pflanze kann durch Labor- oder klinische Studien verifiziert werden. Eine pharmazeutisch nutzbare Pflanze kann ferner einen oder mehrere aktive Wirkstoffe, deren Identität identifiziert wurde, umfassen. Bevorzugt ist die pharmazeutisch nutzbare Pflanze eine medizinische Pflanze, zum Beispiel, aber nicht beschränkt auf:

Achillea millefolium
 Achyrantes bidentata
 Aconitum napellus
 Adonis aestivalis
 Agastache mexicana
 Agrimonia eupatoria
 Agathosma betulina
 Allium sp
 Anchusa officinalis
 Anemopsis californica
 Angelica dahurica
 Angelica polymorpha sinensis (A. sinensis)
 Arnica montana
 Ammi visnaga
 Arctostaphylos uva-ursi
 Asclepias tuberosa
 Astragalus membranaceus
 Astragalus chinensis
 Baphicacanthus cusia
 Bixa orellana
 Bupleurum falcatum
 Brugmansia (Datura) spp.
 Campanula rapunculoides
 Carum roxburgianum
 Carum copticum
 Cassia tora
 Chamaelirium luteum
 Chimaphila umbellata
 Commiphora africana
 Conium maculatum
 Crithium maritimum
 Datura metel (Datura alba)

Datura innoxia
Dracocephalum moldavica
Echinacea sp.
Eclipta alba (*E. prostrata*)
Ephedra nevadensis
Eriodictyon californicum
Eucommia ulmoides
Eupatorium perfoliatum
Filipendula vulgaris (*F. hexapetala*)
Gaultheria procumbens
Geum urbanum
Houttuynia cordata
Hydrocotyle asiatica (*Centella asiatica*)
Hypericum perforatum cv. *Anthos*
Inula helenium
Jatropha curcas
Leptrospermum scoparium
Lespedeza capitata
Ligusticum porteri
Ligustrum lucidum
Lithospermum officinale
Lycium barbarum
Mucuna pruriens
Mandragora officinarum
Origanum dictamnus
Parietaria judaica (*P. officinalis*)
Phyllanthus emblica
Picrasma excelsa
Piniella ternate
Pogostemon patchouli
Polygonum multiflorum
Porophyllum ruderale ssp. *macrocephalum*
Prunella vulgaris
Pueraria lobata (*P. thunbergiana*)
Rauvolfia serpentina
Rivea corymbosa
Sanguinaria canadensis
Satureja douglasii
Schizonepeta tenuifolia
Scutellarias baicalensis
Solanum xanthocarpum (*S. surattense*)
Sutherlandia frutescens
Tabebuia impetiginosa
Tanacetum parthenium
Tribulus terrestris
Trichosanthes kirilowii
Turnera diffusa
Voacanga africana
Withania somnifera.

[0049] Besonders bevorzugt ist die Pflanze ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Johanniskraut (*Hypericum perforatum* cv. *Anthos*), Huang-qin (*Scutellaria baicalensis*), *Echinacea* sp., Mutterkraut (*Tanacetum parthenium*), Knoblauch (*Allium* sp.).

[0050] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner das Verfahren der pflanzlichen Anreicherung. Pflanzliche Anreicherung bezieht sich auf die Aufnahme eines oder mehrerer ausgewählter Zusatzstoffe in die Pflanze, z. B. einer der oben genannten Pflanze, wobei der eine oder die mehreren Zusatzstoff(e) in einer bioverfügbaren Form geeignet zum menschlichen oder tierischen Konsum bereitgestellt werden. Bevorzugt ist der eine oder sind die mehreren ausgewählten Zusatzstoff(e) ausgewählt aus, aber nicht beschränkt auf, einen essentiellen Nährstoff, Vitamin, Metabolit oder Kombinationen daraus. Pflanzliche Anreicherung nutzt die inhärente Fähigkeit einer Pflanze oder eines Pflänzchens zur Aufnahme eines oder mehrerer Zusatzstoffe aus einem Wachstumsmedium. Pflänzchen werden in einer kontrollierten Umgebung angezogen und reichern die Nährstoffe in

der konsumierbaren Biomasse an. Das Verfahren der pflanzlichen Anreicherung nutzt die natürlichen biologischen Prozesse aus, die anorganische Nährstoffe und andere Zusatzstoffe in komplexe organische Moleküle in den Pflanzengeweben umwandeln. Dieses Verfahren macht Nährstoffe und Zusatzstoffe einer effizienten Assimilation zugänglich und erhöhte die Effizienz einer Absorption durch den Verdauungstrakt von Menschen oder Vieh durch Verdauung von aus Pflanzen bezogenen Makromolekülen. Die Bioverfügbarkeit der pflanzenangereicherten Zusatzstoffe und Ergänzungsstoffe in den Pflanzenprodukten erleichtert die Nutzung der Nährstoffe für Ernährungs- und medizinische Prozesse.

[0051] Die vorliegende Erfindung stellt daher ein Verfahren für die pflanzliche Anreicherung von in vitro oder in vivo angezogenen pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen zur Verfügung.

[0052] Der Begriff "Zusatzstoff" schliesst Mineralelemente, Vitamine, Metaboliten und andere Nährstoffe, wie sie im Fachgebiet bekannt sind, ein. Beispiele für einen Zusatzstoff, die nicht als in irgendeiner Weise beschränkend angesehen werden, beinhalten die Mineralelemente, Bor, Calcium, Chlor, Chrom, Kobalt, Kupfer, Eisen, Lithium, Iod, Magnesium, Mangan, Molybdän, Nickel, Phosphor, Kalium, Selen, Silicium, Natrium, Schwefel, Zinn, Vanadium und Zink.

In vitro-Mikrovermehrung

[0053] Allgemein ausgedrückt umfasst eines der Verfahren dieser Erfindung das Erhalten eines sterilen Explantats einer pharmazeutisch nutzbaren Pflanze und sein Kultivieren auf einem Induktionsmedium, das eine geeignete Konzentration mindestens eines Pflanzenwachstumsregulators mit Zytokinaktivität umfasst, für eine geeignete Zeitspanne, um regeneriertes Gewebe zu bilden. Das Explantat kann von jedem Teil der Pflanze gewählt werden, einschließlich Samen, Blattstiel, Hypokotyl, Keimblatt, Stamm und Blätter. Wenn das Gewebe Hypokotyl ist, ist es bevorzugt etioliertes Hypokotyl.

[0054] Der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität kann ein bliebiger derartiger synthetischer oder natürlicher Pflanzenwachstumsregulator sein, einschließlich zum Beispiel, aber nicht limitiert auf, Tidiazuron (TDZ, N-phenyl-N'-(1,2,3-thiadiazolyl)-harnstoff), Benzylaminopurin (BAP), Zeatin, CPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-(phenylharnstoff) und 2-i-P(N6-(2-isopentenyl)adenin oder 6-gamma, gamma-Dimethylallylaminopurin). Bevorzugt wird der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität aus Tidiazuron (TDZ) und Benzylaminopurin (BAP) ausgewählt.

[0055] Die Konzentration des/der Pflanzenwachstumsregulator(en) mit Zytokinaktivität und die Dauer dessen/deren Einwirkung auf das sterile Explantat kann abhängig von der Art der Pflanze variieren. Der Fachmann kann die Konzentration des Wachstumsregulator und die Dauer der Einwirkung durch Kultivieren eines Explantats der pharmazeutisch nutzbaren Pflanze bei verschiedenen Konzentrationen des/der Pflanzenwachstumsregulators(en) und für verschiedene Einwirkzeiten ermitteln und die optimalen Bedingungen für die Erzeugung der gewünschten Menge regenerierten Gewebes bestimmen. Das regenerierte Gewebe kann in Form von Trieben, Kalli oder somatischen Embryonen vorliegen. Am häufigsten liegt das regenerierte Gewebe in Form von Trieben vor. Es ist erwünscht, eine Konzentration und Einwirkzeit des/der Pflanzenwachstumsregulators(en) mit Zytokinaktivität zu verwenden, die Störeffekte einschließlich einer Abnahme der Anzahl der regenerierten Gewebe, Vitrifizierung der Triebe und schlechte Bewurzelung der regenerierten Gewebe vermeiden.

[0056] Nach Kultur des Explantats der pharmazeutisch nutzbaren Pflanze auf dem mindestens einen Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität enthaltenden Medium kann das Explantat mit regeneriertem Gewebe auf Grundmedium überführt und unter Standardbedingungen, wie sie dem Fachmann bekannt sind, kultiviert werden, um Pflänzchen zu bilden. Alternativ kann das Explantat mit regenerierten Geweben auf Grundmedium überführt und für eine weitere Zeitspanne subkultiviert werden, um die gewünschte Menge gebildetes, regeneriertes Gewebes zu erhalten. Nach dieser Subkultivierung kann das regenerierte Gewebe auf entweder festes oder flüssiges Grundmedium überführt und unter Standardbedingungen kultiviert werden, um Pflänzchen zu bilden.

[0057] Beispiele für Medien, die für dieses Verfahren verwendet werden können und als nicht beschränkend betrachtet werden, sind in Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1

	Induktions- medium	Festes Grundmedium	Flüssiges Grundmedium
pH	5,7	5,8	5,8
MS-Salze (Muras- hige & Skoog, 1962)	+	+	+
B5-Vitamine (Gamborg, 1968)	+	+	+
Saccharose	3 %	3 %	3 %
Gellan	0,3 %	0,3 %	-
Wachstumsregulator	Zytokinin- aktivität	-	-

[0058] Sterile Explantate von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen können durch Verwendung von Standardverfahren erhalten werden, zum Beispiel, aber nicht beschränkt auf, von aus sterilen Samen auf Wasser-Agar in Dunkelheit in einer Wachstumskammer bei einer geeigneten Temperatur, z. B. im Bereich von ungefähr 22 bis ungefähr 28°C, bevorzugt bei ungefähr 24°C, für eine geeignete Zeitspanne, z. B. ungefähr 10 bis ungefähr 60 Tage, angezogenen Sämlingen. Samen können durch Eintauchen in Alkohol, z. B. ungefähr 70 bis ungefähr 95 Ethanol, für eine kurze Zeitspanne, z. B. 5 Sekunden bis ungefähr 5 Minuten, gefolgt von Tränkung in einer Lösung, die ungefähr 1 bis ungefähr 3%, bevorzugt 1,5% (v/v) Natriumhypochlorid (Javex) oder andere geeignete Bleichmittel enthält, für eine Zeitspanne, z. B., aber nicht beschränkt auf, ungefähr 15 bis ungefähr 25 min, bevorzugt ungefähr 17 bis ungefähr 22 min sterilisiert werden. Die Bleichmittellösung enthält bevorzugt außerdem ungefähr 1 bis ungefähr 10 Tropfen Tween-20 pro 100 ml der Lösung. Nach dieser Sterilisierungsprozedur werden die Samen sorgfältig mit sterilem deionisiertem oder destilliertem Wasser gespült.

[0059] Einige Samen von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen sind wegen einer großen Menge pilzlicher Kontaminierungen besonders schwer zu sterilisieren. In diesen Fällen kann ein biostatischer Wirkstoff wie "Plant Preservative Mixture" (PPM) dem Wasser-Agar während der Kultur zugegeben werden. Die Menge des zu verwendenden biostatistischen Wirkstoffs kann durch Kultivieren des Samens oder Explantats auf Wasser-Agar mit verschiedenen Mengen des biostatistischen Wirkstoffs und Bestimmung der niedrigsten Konzentration, die biostatisch für das Pilzwachstum wäre und dennoch Samenkeimung oder Explantatregeneration erlaubt, bestimmt werden.

[0060] Ein alternatives Verfahren für die Sterilisierung von Explantaten kann Oberflächensterilisierung von auf dem Feld oder im Gewächshaus angezogenem Pflanzenmaterial beinhalten. Bei diesem Verfahren wird Gewebe von der intakten Pflanze abgeschnitten und sofort in sterilem Wasser untergetaucht. Ein ähnliches Sterilisierungsprotokoll wird dann durchgeführt, bei dem das Gewebe mit einem Alkohol, von ungefähr 70 bis ungefähr 90, für 30 Sekunden bis 5 Minuten gespült wird, gefolgt von Untertauchen in einer Bleichmittellösung für 15–40 Minuten, die ungefähr 1 bis ungefähr 10 Tropfen Tween-20 pro 100 ml enthält. Der Alkohol ist bevorzugt Ethanol. Auf dieses Sterilisierungsprotokoll folgend sollte das Gewebe sorgfältig in sterilem deionisiertem oder destilliertem Wasser gespült und auf Induktionsmedium kultiviert werden.

[0061] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur in vitro-Mikrovermehrung von Johanniskraut zur Verfügung gestellt. De novo-Triebregenerierung kann im wirksamer Weise durch Kultur steriler Explantate von Johanniskraut auf einem Medium induziert werden, das mindestens einen Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokininaktivität wie oben definiert enthält. Bevorzugt ist TDZ der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokininaktivität. Die Gewebequelle für dieses verfahren kann jedes geeignete sterile Gewebe von Johanniskraut sein, zum Beispiel, aber nicht beschränkt auf Samen, Stiele, Blattstiele, Hypokotyl, Keimblatt und Blätter. Bevorzugt ist das Gewebe etio-1iertes Hypokotyl. Die Konzentration des Pflanzenwachstumsregulators mit Zytokininaktivität kann im Bereich von ungefähr 0,001 bis 25 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$, bevorzugt von ungefähr 1,5 bis ungefähr $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$, besonders bevorzugt ungefähr 3 bis ungefähr 15 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ und am bevorzugtesten ungefähr 4 bis ungefähr 10 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ sein. Das Explantat ist dem den Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokininaktivität umfassenden Induktionsmedium ungefähr 1 bis ungefähr 15 Tage, bevorzugt ungefähr 6 bis ungefähr 12 Tage, besonders bevorzugt ungefähr 8 bis ungefähr 10 Tage ausgesetzt.

[0062] Nach anfänglicher Kultur auf dem Induktionsmedium können die Explantate des Johanniskrauts ge-

benenfalls auf ein festes Grundmedium überführt und für eine weitere Zeitspanne subkultiviert werden, um die maximale Menge regenerierte Triebe/Explantate zu erhalten. Die Zeitspanne für die Subkultur wird von der Anzahl der gewünschten Triebe/Explantate und den Größenbeschränkungen des Kulturgefäßes abhängen. Die Explantate des Johanniskrautes können optimal für ungefähr 1 bis ungefähr 15 Tage, bevorzugt für ungefähr 5 bis ungefähr 12 Tage, und geeigneter für ungefähr 8 bis ungefähr 10 Tagen subkultiviert werden. Die regenerierten Triebe können dann auf geeignetes Kulturmedium überführt werden, um Wachstum der Wurzeln und Pflänzchen zu ermöglichen. Zum Beispiel können die Wurzeln in festes Grundmedium enthaltende Kulturboxen, oder in flüssiges Grundmedium enthaltende Kolben überführt werden. Mindestens 90% der regenerierten Gewebe entwickeln sich in vollentwickelte Pflänzchen, die morphologisch gleich mit aus Samen angezogenen Pflanzen sind, die in einem Gewächshaus angezogen wurden. Alternativ können die Explantate und/oder regenerierten Triebe direkt vom Induktionsmedium auf festes oder Grundmedium überführt und unter zur Bildung von Pflänzchen geeigneten Konditionen kultiviert werden.

[0063] Das Kultivieren von Johanniskrauthypokotylsegmenten auf Medium in Abwesenheit von exogenen Wachstumsregulatoren erzeugt eine große Anzahl von Explantaten, die eine oder zwei Adventivwurzeln bilden. Diese spontane Wurzelbildung ist wahrscheinlich bezeichnend für einen hohen Gehalt an endogenem Auxin in den etiolierten Hypokotylen. Ergänzung des optimierten Kulturmediums mit einem Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokininaktivität unterdrückt diese Reaktion. Ohne den Willen, an diese Theorie gebunden zu sein, kann diese Wirkung das Ergebnis einer Veränderung in dem Auxin/Zytokinin-Verhältnis in den Geweben sein.

[0064] Ferner wird hier ein Verfahren für die in vitro-Mikrovermehrung von *Echinacea* sp., besonders von *Echinacea purpurea*, beschrieben. Sterile Explantate von *Echinacea* können auf einem Induktionsmedium in Anwesenheit von mindestens einem Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokininaktivität wie oben definiert kultiviert werden. Der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokininaktivität wird bevorzugt aus TDZ und BAP ausgewählt. Die Konzentration des Pflanzenwachstumsregulators mit Zytokininaktivität kann im Bereich von ungefähr $0,001$ bis ungefähr $25 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$, bevorzugt von ungefähr $0,5$ bis ungefähr $20 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$, besonders bevorzugt ungefähr 1 bis ungefähr $15 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ liegen.

[0065] Die Gewebequelle für dieses Verfahren kann jedes geeignete sterile Gewebe von *Echinacea* sein, zum Beispiel, aber nicht beschränkt auf, Samen, Stiele, Blattstiele, Hypokotyl, Keimblatt und Blätter. Besonders bevorzugt ist das Gewebe Blattstiel.

[0066] Das Explantat wird dem den Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokininaktivität enthaltendem Induktionsmedium für ungefähr 1 bis ungefähr 50 Tage, bevorzugt für ungefähr 1 bis ungefähr 40 Tage, besonders bevorzugt für ungefähr 10 bis ungefähr 35 Tage ausgesetzt. Wenn das Induktionsmedium ferner ein Auxin enthält, könnte eine Dauer der Exponierung gegenüber dem Wachstumsregulator am oberen Ende dieses Bereiches benötigt werden, z. B. für bis zu ungefähr 25 bis ungefähr 40 Tage.

[0067] Histologische Beobachtungen deuteten an, dass Regenerierung in Blattstielkulturen von *Echinacea* unter den hier verwendeten Bedingungen vor allem als ein Ergebnis von de novo-Sprossbildung aus wuchernendem ("callusing") Gewebe eintrat. Andere Kulturbedingungen können regenerierte Triebe direkt hervorbringen. Histologische Befunde deuten an, dass ebenfalls einige somatische Embryonen während der Kultur von *Echinacea*-Blattstielexplantaten auf BAP-enthaltendem Induktionsmedium gebildet werden. Diese somatischen Embryonen können auf Grundmedium überführt und unter geeigneten Bedingungen zur Bildung von Pflänzchen kultiviert werden.

[0068] Nach der anfänglicher Kultur auf dem Induktionsmedium können die Explantate von *Echinacea* gegebenenfalls auf festes Grundmedium überführt und für eine weitere Zeitspanne subkultiviert werden, um die maximale Menge regenerierter Triebe/Explantate zu erhalten. Die Zeitspanne der Subkultur wird von der gewünschten Menge regenerierter Triebe/Explantate und den Größenbeschränkungen des Kulturgefäßes abhängen. Optimal können die Explantate von *Echinacea* für ungefähr 1 bis ungefähr 15 Tage, bevorzugt für ungefähr 5 bis ungefähr 12 Tage, besonders bevorzugt für ungefähr 8 bis ungefähr 10 Tage subkultiviert werden. Das regenerierte Gewebe kann dann auf geeignetes Kulturmedium überführt werden, um Wachstum von Wurzeln und Pflänzchen zu ermöglichen. Zum Beispiel können die Triebe oder somatischen Embryonen in festes Basalmedium enthaltende Kulturboxen oder in flüssiges Basalmedium enthaltende Kolben überführt werden. Unter den oben definierten Bedingungen entwickeln sich ungefähr 70% der regenerierten Gewebe in vollentwickelte Pflänzchen. Diese Pflänzchen sind morphologisch gleich mit aus Samen angezogenen Pflänzchen, die im Gewächshaus angezogen wurden. Alternativ können die Explantate oder das regenerierte Gewebe direkt vom Induktionsmedium auf festes oder Grundmedium überführt und unter zur Bildung von Pflänzchen geeigneten Konditionen kultiviert werden.

[0069] Indirekte Morphogenese ist die Bildung von Kallus aus Explantaten, die anschließend zu Trieben oder somatischer Embryogenese führt (Sharp 1980). Kallusbildung und Zellvergrößerung in Geweben kann auf hohe endogene Auxine hinweisen (Skoog & Miller, 1957). Ohne den Willen, durch eine Theorie eingeschränkt zu sein, scheint die Bildung von Kallus an den Schnittenden der Blattstiele auf den Kontrollplatten ebenso wie die Verlängerung der Explantate auf hohe Gehalte endogener Auxine in den Blattstielen von *Echinacea pur-*

purea hinzuweisen. In Echinacea-Blattstielkulturen werden benachbarte Zellen angeregt, in Anwesenheit des gleichen Zytokinins verschiedenen regenerativen Richtungen zu folgen. Ohne den Willen, durch eine Theorie gebunden zu sein, können diese Daten darauf hinweisen, dass die endogenen Metabolite und Wachstumsregulatoren in einzelnen Zellen unterschiedlich sein können, und dadurch entweder das Schicksal der Zellen während der Regenerierung vorherbestimmen oder auslösen.

[0070] Die vorliegende Erfindung stellt ferner ein Verfahren für die in vitro-Mikrovermehrung von Huang-qin (*Scutellaria baicalensis*) zur Verfügung. Sterile Explantate von Huang-qin können auf Induktionsmedium in Anwesenheit von mindestens einem Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität kultiviert werden. Der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität wird bevorzugt aus TDZ und BAP ausgewählt. Besonders bevorzugt ist TDZ der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität. Die Konzentration des Pflanzenwachstumsregulators mit Zytokinaktivität kann im Bereich von ungefähr $0,001$ bis ungefähr $25 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$, bevorzugt von ungefähr $0,05$ bis ungefähr $20 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$, besonders bevorzugt von ungefähr $1,5$ bis ungefähr $20 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ und am bevorzugtesten ungefähr $2,0$ bis ungefähr $20 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ liegen.

[0071] Die Gewebequelle für dieses Verfahren kann jedes geeignete sterile Gewebe von Huang-qin sein, z. B. Samen, Stiele, Blattstiele, Hypokotyl, Keimblatt und Blätter, bevorzugt ist das Gewebe Samen, Hypokotyl oder Stiel. Besonders bevorzugt ist das Gewebe Samen.

[0072] Das Explantat ist dem Induktionsmedium, das den Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität umfasst, für ungefähr 1 bis ungefähr 30 Tage, bevorzugt für ungefähr 10 bis ungefähr 25 Tage, besonders bevorzugt für ungefähr 14 bis ungefähr 20 Tage ausgesetzt.

[0073] Nach der anfänglicher Kultur auf Induktionsmedium können die Explantate von Huang-qin gegebenenfalls auf festes Grundmedium überführt und für eine weitere Zeitspanne zur Erlangung der maximalen Anzahl Triebe/Explantate subkultiviert werden. Die Zeitspanne für die Subkultur wird von der gewünschten Anzahl Triebe/Explantate und den Größenbeschränkungen des Kulturgefäßes abhängen. Optimal können die Explantate von Huang-qin für ungefähr 1 bis ungefähr 15 Tage, bevorzugt für ungefähr 5 bis ungefähr 12 Tage, besonders bevorzugt für ungefähr 8 bis ungefähr 10 Tagen subkultiviert werden. Die regenerierten Triebe können dann auf geeignetes Kulturmedium überführt werden, um Wachstum von Wurzeln und Pflänzchen zu ermöglichen. Zum Beispiel können die Triebe in festes Grundmedium enthaltende Kulturboxen oder flüssiges Grundmedium enthaltende Kolben überführt werden. Unter den hier beschriebenen Bedingungen entwickeln sich ungefähr 90 der regenerierten Gewebe in vollentwickelte Pflänzchen, die morphologisch gleich mit aus Samen angezogenen Pflänzchen sind, die in dem Gewächshaus angezogen wurden. Alternativ können die Explantate und/oder regenerierten Triebe direkt vom Induktionsmedium auf festes oder Grundmedium überführt und unter zur Bildung von Pflänzchen geeigneten Konditionen kultiviert werden.

[0074] Die Bereitstellung eines Verfahrens für die in vitro-Mikrovermehrung von Mutterkraut (*Tanacetum parthenium*) ist eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Sterile Explantate des Mutterkrauts können auf Induktionsmedium in Anwesenheit von mindestens einem Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität kultiviert werden. Bevorzugt ist TDZ der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität. Die Konzentration des Pflanzenwachstumsregulators mit Zytokinaktivität kann im Bereich von ungefähr $0,001$ bis ungefähr $25 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$, bevorzugt von $0,5$ bis ungefähr $20 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$, besonders bevorzugt von ungefähr $1,5$ bis ungefähr $15 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$, und am bevorzugtesten von ungefähr $2,0$ bis ungefähr $8 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ sein.

[0075] Die Gewebequelle für dieses Verfahren kann jedes geeignete sterile Gewebe des Mutterkrauts sein, z. B. Samen, Stiele, Blattstiele, Hypokotyl, Keimblatt und Blätter. Die Verwendung von Blatt, Stiel, Blattstiel und Hypokotyl wird bevorzugt.

[0076] Das Explantat wird dem Induktionsmedium, das den Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität umfasst, für ungefähr 1 bis ungefähr 50 Tage, bevorzugt für ungefähr 10 bis ungefähr 40 Tage, besonders bevorzugt für ungefähr 20 bis ungefähr 35 Tage ausgesetzt.

[0077] Nach anfänglicher Kultur auf dem Induktionsmedium können die Explantate des Mutterkraut gegebenenfalls auf festes Grundmedium überführt und für eine weitere Zeitspanne subkultiviert werden, um die maximale Anzahl von Triebe/Explantaten zu erhalten. Die Zeitspanne der Subkultur wird von der gewünschten Anzahl Triebe/Explantate und den Größenbeschränkungen des Kulturgefäßes abhängen. Optimal können die Explantate des Mutterkrauts für ungefähr 1 bis ungefähr 15 Tage, bevorzugt für ungefähr 5 bis ungefähr 12 Tage, besonders bevorzugt für ungefähr 8 bis ungefähr 10 Tage subkultiviert werden. Die regenerierten Triebe können dann auf geeignetes Kulturmedium überführt werden, um Wachstum von Wurzeln und Pflänzchen zu ermöglichen. Zum Beispiel können die Triebe in festes Grundmedium enthaltende Kulturboxen oder in flüssiges Grundmedium enthaltende Gefäße überführt werden. Unter diesen Bedingungen entwickeln sich ungefähr 90% der regenerierten Gewebe in vollentwickelte Pflänzchen, die morphologisch gleich mit aus Samen angezogenen Pflanzen sind, die in dem Gewächshaus angezogen wurden. Alternativ können die Explantate und/oder regenerierten Triebe direkt vom Induktionsmedium auf festes oder Grundmedium überführt und unter zur Bildung von Pflänzchen geeigneten Konditionen kultiviert werden.

[0078] Die hier entwickelten Verfahren für die in vitro-Mikrovermehrung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen sind ideal für eine Anpassung zur Benutzung in einem Bioreaktor-System, wie dem in **Fig. 1** gezeigtem.

Der Bioreaktor ist ein steriles Gefäß im Großmaßstab zur Anzucht von Pflanzenzellen und intakten Pflanzen in Kulturmedium in einer kontrollierten Umgebung. Üblicherweise wird das Wachstumsmedium durch das Kulturgefäß mittels einer Serie von peristaltischen Pumpen zirkuliert und das Medium wird belüftet, um rasches und proliferatives Wachstum des kultivierten Gewebes sicherzustellen. Auf diese Weise kann das Wachstum der Pflanzen oder Zellkulturen innerhalb des geschlossenen Systems auf Dauer erhalten werden. Das Bioreaktor-System kann optimiert werden, um intakte Pflänzchen für Gesamtpflanzenpräparationen zu erzeugen oder die Medienbestandteile können für eine effiziente Erzeugung von verschiedenen sekundären Metaboliten verändert werden, die als aktive Bestandteile in den pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen dienen. Die Verwendung des Bioreaktor-Systems wird Pflanzenpharmazeutikaherstellern mit einem ganzjährigen Angebot an hochqualitativem, einheitlichem Pflanzenmaterial versorgen.

Herstellung von angereicherten pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen

[0079] In allgemeinen Worten beinhaltet das Verfahren zur Herstellung von angereicherten pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen das Erhalten eines sterilen, schnellwachsenden Pflänzchens, Sämlings oder Explantats einer pharmazeutisch nutzbaren Pflanze und sein Subkultivieren auf einem mit einem Nährstoffmineralelement ergänztem Medium. Wenn ein Explantat verwendet wird, kann es von jedem regenerierendem Explantat oder Pflanzenteil einschließlich Samen, Blattstiele, Hypokotyl, Keimblatt, Stiel, Wurzeln und Blättern ausgewählt werden. Bevorzugt wird das sterile Explantat auf einem Medium, das mindestens einen Wachstumsregulator mit Zytokinaktivität enthält, unter Bedingungen kultiviert, die geeignet sind, regeneriertes Gewebe wie oben definiert zu bilden.

[0080] Die Konzentration und Dauer des Aussetzens des/der sterilen Pflänzchens oder Kultur dem/den Mineralien) oder Nährstoffelementen(en) wird von der Pflanzenart abhängig variieren. Durch Aussetzen einer schnell wachsenden Kultur der pharmazeutisch nutzbaren Pflanze verschiedenen Konzentrationen der/des Mineralelement(e)s oder Nährstoffelement(e)s gegenüber und für verschiedene Expositionszeiten kann der Fachmann diese Werte bestimmen und so die optimalen Bedingungen für die Erzeugung der maximalen Menge von angereicherter Gewebe bestimmen.

[0081] Beispiele für die Medien, die für das Verfahren verwendet werden können, die aber als nicht beschränkend betrachtet werden, sind in Tabelle 1 (siehe oben) angegeben.

[0082] Sterile Pflänzchen von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen können wie oben beschrieben erhalten werden. Dennoch schließt die vorliegende Erfindung ferner ein alternatives Verfahren für die Anreicherung von pharmazeutisch nutzbaren Pflanzen ein, das die Subkultur von Pflänzchen oder von im Gewächshaus angezogenem Pflanzenmaterial in einem Nährstoffrecyclingsystem mit kontrollierter Umgebung umfasst. Mit diesem Verfahren würden die Pflänzchen in auf einer standardisierten, mit dem Nährstoff/oder Mineralelement ergänzten Lösung wachsen.

[0083] Das Verfahren, wie es hier beschrieben ist, kann für die pflanzliche Anreicherung von Pflanzenarten mit jedem ausgewählten Zusatzstoff verwendet werden, zum Beispiel, aber nicht beschränkt auf Zink. Zinkmangel ist einer der Hauptgründe von eingeschränkter Wachstumsrate, Appetitverlust, Hautschäden, verzögerter Wundheilung, Hypogonadismus, verzögerter sexueller Reife und beeinträchtigten Immunantworten in Säugetieren (Whittaker, 1998). Die Herstellung eines pflanzlich angereicherten Produktes, das bioverfügbares Zink enthält, stellt eine neue Klasse von Nährstoffergänzungen zum Ausbalancieren und Erhalten optimaler Ernährungszustände für Anwendungen sowohl beim Menschen als auch beim Vieh zur Verfügung. Es ist selbstverständlich, dass jede pharmazeutisch nutzbare Pflanze durch Gebrauch des Verfahrens der vorliegenden Erfindung pflanzlich angereichert werden kann.

[0084] In einer bevorzugten Ausführungsform kann das hier beschriebene Pflanzenanreicherungsverfahren verwendet werden, um in einer gewünschten pharmazeutisch nutzbaren Pflanze, zum Beispiel, aber nicht beschränkt auf Echinacea während des Wachstumsprozesses Zink zu ergänzen. Das Zink kann entweder im Wachstumsmedium von in vitro-angezogenen Echinacea-Sämlingen oder Echinacea-Pflanzen, die in Gewächshaushydrokultursystemen angezogen wurden, zugeführt werden. Die Aufrechterhaltung eines optimierten Zinkgehaltes und eine Minimierung der Phytinsäure der Pflanzen gewährleisten die hohe Bioverfügbarkeit des mit Zink ergänzten Echinacea-Produktes.

[0085] Das unten beschriebene Beispiel 5 fasst die pflanzliche Anreicherung von Echinacea mit Zink zusammen. Das Verfahren beinhaltet die Vorbereitung von Echinacea-Blattstielexplantaten, die von einem Monat alten sterilen Sämlingen geerntet wurden, auf einem Medium, dem wie oben beschrieben ein Zytokin zugegeben wurde. Bei Verwendung von Flüssigkulturen werden Echinacea-Wurzeln mit einer Größe, die für kommerzielle Verwendung geeignet ist, in ungefähr vier Monaten erhalten, verglichen mit geschätzten drei Jahren Wachstum unter Feldbedingungen in Kanada. Zugabe von Zink in das flüssige Kulturmedium führt zur Anreicherung des Nährstoffs in Echinacea-Geweben über einen Zeitraum von 3 bis 4 Wochen.

[0086] Pflanzliche Anreicherung von Pflanzenarten mit Lithium wird hier ebenfalls beschrieben. In einer bevorzugten Ausführungsform kann das Verfahren verwendet werden, um Johanniskraut mit Lithium anzurei-

chern, jedoch können auch andere pharmazeutisch nutzbare Pflanzen wie hier beschrieben mit Lithium angereichert werden.

[0087] Die Kombination von Lithium mit Johanniskraut, einem Mediator des Säugetierserotoninmetabolismus, bietet einen neuen pharmazeutischen Ansatz für die Behandlung von Depression. Die Lithiumkonzentration in dem Produkt kann auf dem Pflanzenniveau sorgfältig kontrolliert werden. Durch Bereitstellung von Lithium in einer bioverfügbaren Form kann die Toxizität, die aus der Anreicherung und gestörten Exkretion von Lithiumsalzen herrührt, wenn diese allein verabreicht werden, verringert oder beseitigt werden.

[0088] Ein Protokoll für die Induzierung von Sprossorganogenese auf Johanniskrautexplantaten führt zur klonalen Produktion von mehr als 40 de novo-Trieben auf einem 1 cm-Gewebeabschnitt. Massen von genetisch einheitlichem, sterilem Pflanzenmaterial wurde in einer kontrollierten Umgebung für zwei Monate angezogen. Zugabe von Lithium in das Kulturmedium führt, wie in Beispiel 6 beschrieben, zu einer signifikanten Anreicherung des Minerals innerhalb von 3–4 Wochen.

[0089] Die obige Beschreibung soll nicht der Einschränkung der beanspruchten Erfindung in irgendeiner Weise dienen, ferner könnte die diskutierte Kombination von Merkmalen nicht absolut notwendig für die erfindnerische Lösung sein.

[0090] Die vorliegende Erfindung wird ferner in den folgenden Beispielen dargestellt. Dennoch ist es selbstverständlich, dass diese Beispiele nur für veranschaulichende Zwecke dienen, und nicht in irgendeiner Weise zur Beschränkung des Umfangs der vorliegenden Erfindung verwendet werden sollen.

Beispiele:

Allgemeine Verfahren:

Statistische Analysen:

[0091] Die Anordnung aller Experimente bestand aus einem vollständig randomisierten Feld und Behandlungen bestanden aus fünf Wiederholungen. Alle Experimente wurden mindestens zweimal wiederholt und die Daten durch Verwendung von SAS Version 6.12 (SAS Inc., 1995) analysiert. Signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden mittels "Student-Neuman-Keulls means Separation test" mit $P \leq 0,05$ berechnet.

Lichtmikroskopische Studien:

[0092] Die Explantate wurden im Verlauf der vierwöchigen Inkubationsperiode in wöchentlichen Intervallen geerntet und sofort in Formalin : Essigsäure : Alkohol (FAA: 5 : 5 : 90; V/V) fixiert und bei 4°C gelagert. Die Gewebe wurden mit einer abgestuften Alkoholserie dehydriert gefolgt von Paraffineinbettung. 8 µm dicke Schnitte wurden durch Verwendung eines Ultramikrotoms (Porter-Blu Ultramikrotom MT-1, Ivan Sorvall Inc., Connecticut, USA) geschnitten. Die Schnitte wurden mit Alziangrün gefärbt (Johnson, 1942) und mit Safranin gegengefärbt und unter einem Lichtmikroskop (Zeiss, Deutschland) betrachtet.

Beispiel 1: Mikrovermehrung von Johanniskraut

[0093] Johanniskrautsamen wurden durch Untertauchen für 5 s in einer 50 Ethanollösung sterilisiert, gefolgt von einem Untertauchen für 20 Minuten in einer 30% Lösung von 5,4% Natriumhypochlorid (Lilo Products, Hamilton, Ontario) in Wasser mit einem Tropfen Tween-20 pro 500 ml und einem dreimaligen Waschen in sterilem destillierten Wasser. Sterile Samen wurden gekeimt und auf Wasser-Agar ($8 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$) für 16 Tage in Dunkelheit in einer Wachstumskammer bei 24°C gehalten. Hypokotylschnitte wurden von sterilen etiolierten Sämlingen entnommen und auf einem MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962), B5-Vitamine (Gamborg et al., 1968), $30 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Saccharose und $3 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Gellan gum (Gelrite, Schweitzerhall Inc., South Plainfield, NJ, USA) enthaltendem Medium kultiviert. Unterschiedliche Gehalte (0, 5, 10, 15 und $20 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) an TDZ und BAP (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) waren in einer Serie von Experimenten in dem Grundkulturmedium enthalten. Jedes Experiment bestand aus sechs Explantaten pro Platte und 20 Platten pro Pflanzenwachstumsregulatorbehandlung. Fünf Platten jeder Behandlung wurden auf MS-Grundmedium an den Tagen 3, 6, 9 und 12 zur Bestimmung der optimalen Länge der Exposition der Explantate gegenüber dem TDZ-enthaltendem Medium subkultiviert. Alle Kulturen wurden in einer Wachstumskammer mit einer 16 Stunden-Photoperiode mit kaltem Weißlicht mit $40\text{--}60 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ inkubiert. Die Regenerierung wurde nach 18 und 23 Tagen Kultur quantifiziert.

[0094] Hypokotyle, die auf einem Medium ohne exogenem Wachstumsregulator kultiviert wurden, erzeugten einen Mittelwert von 0,8 Wurzeln/Explantat, während Bewurzelung bei auf einem TDZ-enthaltendem Medium kultivierten Explantaten nicht beobachtet wurde (Tabelle 2). De novo-Trieborganogenese wurde auf etiolierten Hypokotylsegmenten, die auf einem Medium kultiviert wurden, dem TDZ zugegeben wurde, nach 18 – 21 Ta-

gen induziert (**Fig. 1(a)**). Explantate, die während des Behandlungszeitraums auf dem TDZ-Medium verblieben, entwickelten Anzeichen von Bräunung und die regenerierten Triebe erschienen verkrüppelt und missgebildet verglichen mit solchen, die sich auf Explantaten entwickelten, die nach einer kurzen Exponierung gegenüber TDZ auf ein Grundmedium überführt wurden. Zugabe von TDZ alleine in das Induktionsmedium führt zur Induzierung von signifikant mehr Regenerierung als jegliche andere Kombination von Wachstum in diesen Experimenten. Unter den hier beschriebenen Bedingungen betrug die optimale Konzentration von TDZ zur Induzierung von Trieborganogenese auf etioliertem Johanniskrauthypokotylen $5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$. Die Induzierung der Regenerierung wurde durch die Dauer der Exponierung gegenüber TDZ beeinflusst. Unter den oben angegebenen Bedingungen betrug die optimale Kulturdauer auf TDZ-angereichertem Medium 9 Tage mit Subkultur auf Grundmedium für eine weitere Dauer von 9 Tagen. Variieren der Kulturbedingungen kann diese optimalen Werte verändern. Das hier beschriebene Protokoll erzeugt in 18 Tagen ein Mittel von 54,0 Trieben/Eplantat (Tabelle 2). Regenerierte Triebe, die in Grundmedium enthaltende Kulturboxen überführt wurden, bilden innerhalb von zwei Monaten Wurzeln und ganze Pflänzchen (**Fig. 2(b)** und **(c)**). In ähnlicher Weise bildeten regenerierte Triebe, die in flüssiges Grundmedium enthaltenden Gefäßen wuchsen, kräftig wachsende Pflänzchen. Mehr als 95 der regenerierten Gewebe entwickelten sich in vollentwickelte Pflänzchen, die morphologisch gleich mit aus Samen angezogenen Pflanzen waren, die im Gewächshaus angezogen wurden.

[0095] Die Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop zur Untersuchung des histologischen Prozesses der Adventivwurzelentwicklung in auf Induktionsmedium ($5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ TDZ) angezogenen Johanniskraut-Hypokotylkulturen begutachtet. Umfangreiche meristematische Bereiche entwickelten sich schon nach sieben Tagen nach Kulturbeginn in den hypothermalen Schichten des Hypokotyls (**Fig. 3(a)**, Pfeile). Die meristematischen Bereiche bestanden aus Zellen von kleiner Größe und dichtem Zytoplasma und einem hervortretenden Kern (**Fig. 3(a)**). Nach neun Tagen Kultur differenzierten sich diese meristematischen Bereiche weiter und die Entwicklung schritt in Richtung Epidermis fort (**Fig. 3(b)**). In Beobachtungen, die nach zwei Wochen Kultur gemacht wurden, war die Entwicklung von Wurzelprimordien deutlich sichtbar (**Fig. 3(c)**, Pfeile). Die Wurzelprimordien entwickelten sich um Tag 18 in voll entwickelte Wurzeln mit Gefäßverbindungen zwischen dem Gefäßbündel des Explantats und dem entwickelnden regeneriertem Gewebe (**Fig. 3(d)**).

Tabelle 2: Wirkung von verschiedenen TDZ-Konzentrationen und Kulturzeiträumen auf TDZ ergänztem Medium auf die Regenerierung von Johanniskraut-Hypokotylexplantaten. Statistische Unterschiede wurden mit dem "Student Newman-Kuells mean separation test" errechnet.

[TDZ] $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$	Tag des Transfers auf Grundmedium	Anzahl der Triebe/Hypo- kotyl	Anzahl der Wurzeln/Hypo- kotyl
0	0	4,6 ^e	0,8 ^a
5	6	27,9 ^e	0,3 ^{bc}
5	9	54,0 ^a	0,0 ^c
5	12	42,8 ^{ab}	0,0 ^c
10	3	11,5 ^{de}	0,2 ^{bc}
10	6	13,5 ^{de}	0,0 ^c
10	9	47,6 ^{ab}	0,0 ^c
10	12	46,3 ^{ab}	0,0 ^c
15	3	12,5 ^{de}	0,1 ^{bc}
15	6	22,6 ^{cd}	0,0 ^c
15	9	47,0 ^{ab}	0,0 ^c
15	12	30,2 ^c	0,0 ^c
20	3	20,7 ^{cd}	0,3 ^b
20	9	45,2 ^{ab}	0,0 ^c
20	12	39,0 ^b	0,0 ^c

^{abcde} Werte innerhalb einer Spalte mit verschiedenen Hochstellungen sind signifikant unterschiedlich ($P < 0,05$).

[0096] Beispiel 2 Mikrovermehrung von *Echinacea purpurea* *Echinacea purpurea*-Achänen wurden durch Eintauchen für 30 sek in 70% Ethanol, Tränken für 18 min in 5,4 Natriumhypochlorid (Javex) in Wasser mit einem Tropfen Tween 20 pro 100 ml und dreimaligen Spülen in sterilem deionisiertem Wasser sterilisiert. Wegen der großen Menge pilzlicher Kontaminationen in der Samenhülle von *Echinacea purpurea*-Achänen wurde PPM dem Wasser-Agar zugegeben, um Keimung steriler Sämlinge für Kultur zu erhalten. Sterile Samen wurden auf Wasser-Agar ($8 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$) mit $3 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$ "Plant Preservation Mixture" (PPM) in einer Wachstumskammer in 24 Stunden Dunkelheit bei 24°C für 14 Tage gekeimt. Verschiedene Konzentrationen PPM wurden dem Wasser-Agar ($1, 2, 3, 4$ und $5 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$) zugegeben, um die geringste Menge zu bestimmen, die biostatistisch für Pilzwachstum ist. Eine Konzentration von $3 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$ PPM wurde als geeignet zur Keimung von *Echinacea*-Samen unter den vorliegenden hier definierten Bedingungen gefunden. Diese Konzentration kann abhängig von den Kulturbedingungen variieren.

[0097] Keimende Sämlinge wurden auf MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962) mit B5-Vitaminen (Gamborg et al., 1968), $30 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Saccharose und $3 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Gelrite in Magenta-Boxen kultiviert. 2 cm lange Blattstielexplantate wurden von 4 Wochen alten sterilen *Echinacea purpurea*-Pflanzen abgeschnitten und auf MS-Medien, denen Thidiazuron (TDZ) ($0,5, 1, 5$ und $10 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) oder BAP ($1, 2,5, 5, 7,5, 10, 125$ und $15 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) zugegeben war, umfassenden Induktionsmedium kultiviert. TDZ wurde den Medien in Konzentrationen von $0,5$ und $1,0 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ in Kombination mit Indoleessigsäure (IAA, einem Auxin) in Konzentrationen von 5 und $10 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ zugegeben. Auf TDZ und IAA enthaltenden Medien kultivierte Explantate wurden nach 23 Tagen auf MS-Grundmedium subkultiviert, während solche auf höhere TDZ-Konzentrationen enthaltenden Medien kultivierte nach 4 und 8 Tagen auf MS-Grundmedien subkultiviert wurden. Alle Behandlungen bestanden aus zehn Platten pro Behandlung und sechs Explantaten pro Platte. Die Behandlungen wurden in einer Wachstumskammer mit einer 16-Stunden-Photoperiode mit kaltem Weißlicht mit $40\text{--}60 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ inkubiert. Die Regenerierung wurde nach 25 und 33 Tagen für alle Blattstielkulturen und für Wurzeln nach 33 und 42 Tagen Kultur quantifiziert. Die erhaltenen regenerierten Gewebe wurden nach 32 Tagen Kultur von Blattstielen abgeschnitten und auf MS-Grundmedium in Teströhrchen zur Keimung subkultiviert.

[0098] Zugabe von BAP als einziger wachstumsregulierender Verbindung des Kulturmediums induziert de novo-Triebbildung bei allen Konzentrationen (Fig. 4, Tabelle 3). Eine Zugabe von BAP in das Kulturmedium zeigte zusätzlich zur Regenerierung ebenfalls eine Induzierung von Kallusbildung und Elongation der Blattstiele. Wurde IAA mit TDZ kombiniert oder das Medium mit TDZ allein zugegen, wurde die Bildung von de novo-regeneriertem Gewebe beobachtet (Tabelle 4).

Tabelle 3: Wirkung des Zytokinins in BAP auf die Regenerierung von Echinacea purpurea-Blattstielexplantaten. Statistische Unterschiede wurden mittels "Student Newman-Kuells mean separation test" nach 33 Tagen Kultur berechnet.

BAP-Konzentration ($\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$)	Anzahl der regenerierten Gewebe/ Blattstiel
0	0,0 ^c
1	5,4 ^{ab}
2,5	8,1 ^a
5	6,6 ^{ab}
7,5	5,2 ^{ab}
10	3,9 ^b
12,5	5,2 ^{ab}
15	5,5 ^{ab}

^{abc}Werte innerhalb einer Spalte mit verschiedenen Hochstellungen sind signifikant unterschiedlich ($P < 0,05$).

Tabelle 4: Einfluss des Auxins IAA und TDZ auf die Erzeugung von somatischen Embryonen und Wurzeln von Echinacea purpurea-Blattstielexplantaten. Statistische Unterschiede wurden mittels "Student Newman-Kuells means separation test" nach 33 Tagen Kultur berechnet.

IAA-Konzentration ($\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$)	TDZ-Konzentration ($\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$)	Anzahl der regenerierten Gewebe/Blattstiel	Anzahl der Wurzeln/ Blattstiel
0	0	0,0 ^b	0,0 ^b
0	0,5	3,5 ^a	0,0 ^b
0	1,0	3,2 ^a	0,0 ^b
5	0	0,1 ^b	4,4 ^a
5	0,5	3,3 ^a	0,0 ^b
5	1,0	2,4 ^a	0,0 ^b
10	0	0,6 ^b	4,5 ^a
10	0,5	4,9 ^a	0,1 ^b
10	1,0	3,3 ^a	0,0 ^b

^{ab}Werte innerhalb einer Spalte mit verschiedenen Hochstellungen sind signifikant unterschiedlich ($P < 0,05$).

[0099] Auf MS-Medien + $5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ BAP kultivierte Blattstielexplantate wurden an Tag 0, 3, 5, 7, 14, 21, 28 und 35 nach Kulturbeginn geerntet. Proben wurden sofort in Formalin/Eisessigsäure und 50% Ethanol (FAA)-Mischung (5 : 5 : 90 v/v/v) fixiert. Sorgfältige und schnelle Fixierung der Probe wurde durch Vakuumierung der Proben bei -20 kPa für 10 Minuten sichergestellt. Die Proben wurden dann durch eine abgestufte Se-

rie tertiären Butanols dehydriert und in Paraffinwachs eingebettet. 8 µm dünne Querschnitte wurden unter Verwendung eines Ultramikrotoms (Porter-Blum Ultramicrotom MT-1, Ivan Sorvall Inc., Connecticut, USA) geschnitten und mit Alziangrün und Safranin gefärbt (Jensen, 1962). Die Schnitte wurden unter einem zusammengesetztem Lichtmikroskop (Zeiss, Deutschland) begutachtet.

[0100] Histologische Beobachtungen zeigten, dass Regenerierung in Blattstielkulturen von Echinacea hauptsächlich als Ergebnis der de novo-Sprossbildung von wucherndem ("callusing") Gewebe auftritt. Nach 3 bis 4 Tagen in Kultur begannen die epidermalen und subepidermalen Schichten des Blattstielexplantates mit der Teilung (Fig. 5(a)) und bildeten eine kompakte Masse von Kallusgewebe (Fig. 5(b)). Dieses Kallusgewebe bestand aus zahlreichen meristematischen Bereichen (Fig. 5(a) – Pfeile, Fig. 5(c)). Die Zellen dieser meristematischen Bereiche waren von kleiner Größe mit dichtem Zytoplasma und einem hervortretendem Kern. Diese meristematischen Zonen machten ferner eine Differenzierung durch und bildeten am Tag 21 ein kuppelförmiges Triebmeristem (Fig. 5(d) – Pfeile). Das Triebmeristem entwickelte Blattprimordien (Fig. 5(e), (f) – Pfeile) und bildete schließlich nach 21 Tagen Triebknospen. Eine gut entwickelte Triebknospe bestand aus einem kuppelförmigen Triebmeristem umgeben von einigen wenigen Blattprimordien (Fig. 5(f)). Die Blattprimordien hatten gut entwickelte Trichome. Gefäßelemente wurden sporadisch verteilt im Kallus beobachtet, hauptsächlich nahe der Basis der Triebknospen (Fig. 5(f) – Pfeile).

[0101] Zusätzlich zur Trieborganogenese gab es Anzeichen von somatischer Embryogenese bei der histologischen Untersuchung der Blattstielkulturen. Proembryo-ähnliche Strukturen wurden in den subepidermalen Schichten des Blattstiel schon nach 14 Tagen Kultur beobachtet (Fig. 6(a) – Pfeile). Diese Proembryos traten in runder Form auf, waren multizellulär und wurden von einer einzelnen äußeren Wand umgeben. Die Proembryos differenzierten sich später in herzförmige somatische Embryonen (Fig. 6(b)). Diese somatischen Embryos können auf Grundmedium überführt und unter zur Bildung von Pflänzchen geeigneten Konditionen kultiviert werden.

Beispiel 3: Mikrovermehrung von Huang-qin

Samenkultur:

[0102] Huang-qin (*Scutellaria bicalensis*)-Samen wurden durch Eintauchen für 30 s in 95 Ethanol, dann Untertauchen in Tween-20 (2 Tropfen pro 100 ml Lösung) enthaltendem 1,5% Natriumhypochlorid für 18 min oberflächensterilisiert und dann 3 mal in sterilem destilliertem Wasser gespült. Fünf Samen wurden in einzelnen Petrischalen, die 25 ml Induktionsmedium, das aus MS-Salzen (Murashige und Skoog, 1962), B5-Vitaminen (Gamborg et al., 1968), 30 g × l⁻¹ Saccharose, 3 g × l⁻¹ Gelrite bestand und dem verschiedene Konzentrationen TDZ und 4 ml/l PPM (um Pilze in den Samen abzutöten) zugegeben waren, aseptisch kultiviert. Das Medium wurde vor dem Autoklavieren bei 121°C, 1,4 kg × cm⁻² für 20 min, auf pH 5,75 eingestellt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm versiegelt und in einer Wachstumskammer bei 24 ± 2°C mit einer 16 h-Photoperiode inkubiert, die mit Leuchtstoffröhren mit 30 – 35 µmol × m⁻² × s⁻¹ ausgestattet war.

[0103] Nach 7 Tagen Kultur begannen Huang-qin-Samen zu keimen. Einige wenige Sämlinge regenerierten nach 10 Tagen Kultur Wurzeln aus der Krone. An Tag 14 begannen alle keimenden Sämlinge auf dem Medium mit TDZ de novo-Triebe zu entwickeln. Die Sämlinge, die auf dem Medium mit 2,5 µmol × l⁻¹ TDZ kultiviert wurden, hatten ein Mittel von 19 Trieben pro Sämling, während die Samen, die auf dem Medium ohne TDZ gekeimt wurden, ein Mittel von zwei Trieben pro Sämling hatten. Das 5,0, 7,5 und 10 µmol × l⁻¹ enthaltende Medium zeigte ebenfalls Triebbildung (Tabelle 5).

Tabelle 5: Einfluss des TDZ auf die Induzierung von Triebbildung in Huang-qin-Sämlingen nach 14 Tagen Kultur

TDZ-Konzentration (µmol × l ⁻¹)	Anzahl der Triebe/Sämling
0,0	2,32 ^c
2,5	19,85 ^a
5,0	12,05 ^b
7,5	17,40 ^{ab}
10,0	17,07 ^{ab}
20,0	17,25 ^{ab}

^{abc}Werte innerhalb einer Spalte mit verschiedenen Hochstellungen sind signifikant unterschiedlich (P < 0,05).

Hypokotylkultur:

[0104] Huang-qin-Samen wurden wie oben beschrieben sterilisiert und aseptisch in 25 ml 0,8 Wasser-Agar mit 4 ml/l PPM enthaltenden Petrischalen kultiviert. Kulturen wurden zur Keimung für 14 Tage in Dunkelheit bei 24°C inkubiert. Sechs etiolierte Hypokotylabschnitte (ungefähr 0,5 cm) wurden von den Sämlingen abgeschnitten und auf einem Induktionsmedium, das MS-Salze, B5-Vitamine, 3 Saccharose, 0,3% Gelrite und verschiedene TDZ-Konzentrationen (0, 2,5, 5, 7,5 und 10,0 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) umfasste, kultiviert. Die Kulturen wurden in einer Wachstumskammer bei $24 \pm 2^\circ\text{C}$ mit einer 16 h-Photoperiode für 14 Tage inkubiert, die mit Leuchtstoffröhren mit $30\text{--}35 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ausgestattet war.

[0105] Huang-qin-Hypokotyle auf dem MS-Grundmedium wechselten in Abwesenheit von TDZ nach 7 Tagen Kultur ihre Farbe zu hellem violett. Nach 10 Tagen begannen sie, eine oder zwei Adventivwurzeln zu regenerieren. Nach 14 und 18 Tagen nahm die Trieblänge rasch zu, aber es gab keine signifikante Zunahme in der Triebanzahl pro Explantat. Hypokotyle, die auf Induktionsmedium mit 2,5, 5,0, 7,5 und 10 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ TDZ kultiviert wurden, erschienen geschwollen und entwickelten nach 7 Tagen Kultur eine grüne Farbe. Nach 10 Tagen begannen Hypokotyle bei diesen Behandlungen Triebe auf dem geschwollenen Gewebe zu bilden. Die Behandlung mit 7,5 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ TDZ induzierte signifikant mehr Triebe verglichen mit der Kontrolle (Tabelle 6). Die Anzahl der Triebe pro Explantat bei allen TDZ-Behandlungen stieg an Tag 14 und Tag 18 rapide. Alle Explantate auf dem TDZ-enthaltenden Medium bildeten Triebe mit einem Mittel von 8–11 Trieben pro Explantat, während die Explantate, die auf keinen Pflanzenwachstumsregulator enthaltenden Medium kultiviert wurden, ein Mittel von einem Trieb pro Explantat hatten (Tabelle 6).

Tabelle 6: Einfluss von TDZ auf die Induzierung von Triebregenerierung auf etiolierten Huang-qin-Hypokotylen

TDZ-Konzentration ($\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$)	Anzahl der Triebe an Tag 10	Anzahl der Triebe an Tag 14	Anzahl der Triebe an Tag 18
0,0	1,03 ^b	1,08 ^b	1,50 ^b
2,5	1,96 ^b	9,67 ^a	11,06 ^a
5,0	1,53 ^b	9,39 ^a	9,44 ^a
7,5	2,40 ^a	8,00 ^a	8,42 ^a
10	2,00 ^b	8,17 ^a	9,33 ^a

^{ab}Werte innerhalb einer Spalte mit verschiedenen Hochstellungen sind signifikant unterschiedlich ($P < 0,05$).

Epikotylkultur:

[0106] Zur Bestimmung der Wirkung von TDZ auf Huang-qin-Epikotylgewebe wurden Stengelabschnitte (ungefähr 1,0 cm lang) von sterilen Sämlingen, die wie oben beschrieben für 20 Tage auf MS-Grundmedium angezogen wurden, abgeschnitten und auf Induktionsmedium kultiviert. Die getesteten TDZ-Konzentrationen waren 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10 und 20 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$. Induktionskulturen wurden in einer Wachstumskammer bei $24 \pm 2^\circ\text{C}$ für 14 Tage mit einer 16 h-Photoperiode inkubiert, die mit Leuchtstoffröhren mit $30\text{--}35 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ausgestattet war. In allen Experimenten umfasste jede Behandlung fünf Replika und jedes Experiment wurde mindestens zweimal wiederholt. Triebregenerierung wurde nach 10 Tagen, 14 Tagen und 18 Tagen Kultur beobachtet und nach 14 Tagen Kultur quantifiziert. Die Ergebnisse der Quantifizierung an Tag 14 sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

[0107] Huang-qin-Stengelkulturen auf dem TDZ-enthaltendem Medium begannen an den Schnittkanten anzuschwellen und bildeten ab Tag 7 Kallus, der in grüner Farbe auftrat. Regenerierung von Trieben wurde nach 10 Tagen Kultur beobachtet. Am Tag 14 hatten sich auf allen Explantaten, die TDZ ausgesetzt waren, Triebe gebildet. Die Explantate auf dem Medium mit TDZ hatten ein Mittel von 12 – 14 Trieben pro Stengelabschnitt, während Explantate, die in Abwesenheit von Wachstumsregulatoren kultiviert wurden, ein Mittel von drei Trieben pro Explantat hatten.

Tabelle 7: An Tag 14 quantifizierte Wirkung von TDZ auf die Induzierung von Triebbildung in Huang-qin-Stengelexplantaten

TDZ-Konzentration ($\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$)	Anzahl der Triebe/Explantat
0,0	3,54 ^c
2,5	13,61 ^a
5,0	14,19 ^b
7,5	14,58 ^{ab}
10,0	13,78 ^{ab}
20,0	12,61 ^{ab}

^{abc}Werte innerhalb einer Spalte mit verschiedenen Hochstellungen sind signifikant unterschiedlich ($P < 0,05$).

Beispiel 4: Mikrovermehrung von Mutterkraut

Präparierung der Explantate:

[0108] Für alle Experimente wurde vollentwickeltes Mutterkraut (*Tanacetum parthenium*) verwendet. Samen wurden sorgfältig nach Gleichmäßigkeit selektiert und durch Untertauchen für 3 Minuten in 70% (v/v) Ethanol, gefolgt durch ein 20minütiges Tränken in 1,5 (v/v) Natriumhypochlorid in Wasser, das 2 Tropfen Tween-20 pro 100 ml enthielt, und 5 Spülungen mit sterilem deionisiertem Wasser oberflächensterilisiert. Sterilisierte Samen wurden individuell in 10 ml Wasser-Agar mit 3 ml/l PPM enthaltenden 50 ml Glasröhrchen kultiviert. Samen, die für die ersten 7 Tage in Dunkelheit bei 24°C gekeimt und dann ins Licht (30–35 E m⁻²s⁻¹, 16 h-Photoperiode) gestellt wurden, wurden nach zwei Monaten geerntet und auf einem Regenerierungsinduzierungsmedium kultiviert.

Regenerationsinduktionsmedium:

[0109] Mutterkrautexplantate wurden auf einem Induktionsmedium kultiviert, das MS-Salze (Murashige und Skoog, 1962), B5-Vitamine (Gamborg et al., 1965) und 30 g/l Saccharose mit 0, 5, 10, 15, 20, 25 oder 50 (mol/l) Thidiazuron (TDZ) oder Benzylaminopurin (BAP) enthielt. Der pH des Mediums wurde auf 5,75 eingestellt und 0,3% Gelrite (Scott Laboratories, Carson, USA) wurden als Gelierungsmittel vor dem Autoklavieren mit 1,4 kg/cm² für 20 Minuten zugegeben. Regenerierung wurde an Stengel-, Blatt- und Triebexplantaten induziert, die auf einem TDZ-enthaltenden Induktionsmedium kultiviert wurden. Der zur Induzierung einer Regenerierung von Mutterkraut unter den vorliegenden Bedingungen optimale Gehalt an TDZ-Zusatz betrug 5 (mol/l). Dieser Wert kann abhängig von den verwendeten Bedingungen variieren.

Inkubierung der Kulturen:

[0110] Nach einem Monat wurden regenerierte Triebkulturen zur weiteren Entwicklung auf ein MS-Salze, B5-Vitamine und 3 Saccharose enthaltendes Grundmedium überführt. Die regenerierten Triebe bildeten innerhalb von zwei Monaten Kultur auf festem Grundmedium Wurzeln und vollständige Pflänzchen. Ebenso wurde proliferierende Regenerierung von Pflänzchen in Kulturen beobachtet, die auf flüssiges Grundmedium überführt wurden. Die optimale Dauer der Exponierung von Mutterkrautexplantaten auf flüssigem Grundmedium wurde in einem Bioreaktorsystem mit temporärem Eintauchen ermittelt. In diesem System wurden 30 Tage alte Explantate mit proliferierender Triebregenerierung in ein steriles Bioreaktorgefäß überführt. Kulturen wurden in dem Wachstumsraum mit 35 $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ inkubiert und flüssiges Grundmedium wurde im 6-Stunden-Rhythmus in das Gefäß gepumpt und aus dem Gefäß abgesaugt. Die Gefäßumgebung wurde mit einem konstanten Fluss steriler Luft während des ganzen Inkubierungszeitraums belüftet. Mit diesem Protokoll wurde massive Proliferierung von Mutterkrautpflanzen in einem 30-Tage-Zeitraum erreicht.

Beispiel 5: Pflanzliche Anreicherung von Echinacea mit Zink

[0111] Echinacea-Achänen wurden durch Untertauchen für 30 sek in 70% Ethanol, Tränken für 18 min in 5,4% Natriumhypochlorid (Javex) in Wasser mit einem Tropfen Tween-20 pro 100 ml und dreimaligem Spülen in sterilem deionisiertem Wasser, sterilisiert. Wegen einer großen Menge pilzlicher Kontaminationen auf der

Samenhülle von *Echinacea purpurea*-Achänen wurde dem Wasser-Agar PPM zugegeben, um sterile Sämlingskeimung für Kultur zu erhalten. Sterile Samen wurden auf Wasser-Agar ($8 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$) mit $3 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$ "Plant Preservation Mixture" (PPM) in einer Wachstumskammer in 24 Stunden Dunkelheit bei 24°C für 14 Tage gekeimt. Verschiedene Konzentrationen PPM (1, 2, 3, 4 und $5 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$) wurden dem Wasser-Agar zugegeben, um die niedrigste Menge, die biostatistisch für Pilzwachstum wäre, zu bestimmen. Eine Konzentration von $3 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$ PPM wurde als die optimale Konzentration zur Keimung von *Echinacea*-Samen unter den vorliegenden Bedingungen bestimmt. Diese Konzentration kann abhängig von den Kulturbedingungen variieren.

[0112] Keimende Sämlinge wurden auf MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962) mit B5-Vitaminen (Gamborg et al., 1968), $30 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Saccharose und $3 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Gelrite in Magentaboxen kultiviert und in einer Kammer mit kontrollierter Umgebung für 30 Tage mit einer 16-Stunden-Photoperiode mit kaltem Weißlicht mit $40\text{--}60 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ inkubiert. Vollentwickelte Sämlinge wurden in 25 ml Grundmedium, dem 0, 50, 100, 150 oder $200 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ Zink zugegeben waren, enthaltende 125 ml-Gefäße subkultiviert und in der gleichen Kammer für 30 Tage inkubiert (flüssiges Grundmedium, Tabelle 1).

[0113] In Experimenten, die zur Bestimmung der Zinkaufnahme in mikrovermehrten *Echinacea*-Pflänzchen ausgelegt waren, wurden 2 cm lange Blattstielexplantate von den 4 Wochen alten sterilen *Echinacea*-Pflanzen abgeschnitten und auf MS-Medien, denen Thidiazuron (TDZ) ($0,5, 1, 5$ und $10 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) oder BAP (1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 und $15 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) alleine oder in Kombination mit Indoleessigsäure (IAA) in Konzentrationen von 5 und $10 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ zugegeben waren, enthaltendes Induktionsmedium subkultiviert. Die Kulturen wurden in einer Wachstumskammer mit einer 16-Stunden-Photoperiode mit kaltem Weißlicht mit $40\text{--}60 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ inkubiert. Regenerierung wurde für alle Blattstielkulturen nach 25 und 33 Tagen und Wurzeln nach 33 und 42 Tagen Kultur quantifiziert. Die resultierenden regenerierten Gewebe wurden von Blattstielen abgeschnitten und in 125 ml-Gefäßen, die 25 ml Grundmedium, dem 0, 50, 100, 150 oder $200 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ Zink zugegeben waren, enthielten (flüssiges Grundmedium), subkultiviert. Der pH von allen Medien wurde auf 5,7 eingestellt und die Experimente unter kontrollierten Bedingungen in einer Wachstumskammer mit einer 16-Stunden-Photoperiode mit $40\text{--}60 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ für 30 Tage durchgeführt.

[0114] Pflanzen wurden am 45. Tag nach Beginn der Behandlung geerntet. Pflänzchen wurden mit dem Trieb und intakten Wurzeln entnommen, mit Leitungswasser gewaschen, mit deionisiertem Wasser gespült und mit Seidenpapier trockengetupft. Vor einer Lufttrocknung bei 90°C für 48 Stunden wurde das Frischgewicht der einzelnen Pflänzchen bestimmt. Jede Probe wurde mit einem kommerziellen Waring-Blender gemahlen und mineralische Elemente mit einem geschlossenen Teflongefäß unter Verwendung des Verfahrens von Topper (1990) extrahiert. Der Zinkgehalt der Proben wurde durch Verwendung eines AA55 Varian Atomabsorptions-Spektrophotometer oder durch ICP-Analyse bestimmt. Jedes Experiment bestand aus vier Replikagefäßen pro Behandlung und das Experiment wurde zweifach wiederholt.

[0115] Alle Pflanzen in der Kontrolle und den mit 50, 100 und $150 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ Zink behandelten Gruppen erschienen normal und gesund. Bei höheren Zinkkonzentrationen in dem Medium wurde eine geringe Inhibierung des Wachstums beobachtet und die Rate des Pflänzchenwachstums war reduziert.

[0116] Die in **Fig. 7** gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass Zinkanreicherung mit der Konzentration bis zu einem Maximum von 12475 mg/kg in *Echinacea*-Pflänzchen anstieg, die auf einem Medium kultiviert wurden, dem $200 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ Zink zugegeben waren.

Beispiel 6: Pflanzliche Anreicherung von Johanniskraut mit Lithium

[0117] Johanniskraut-Sämlinge wurden von sterilisierten Samen erhalten, die in einer kontrollierten Umgebung gekeimt wurden. Johanniskrautsamen wurden durch Untertauchen für 5 s in einer 70%-Ethanollösung, gefolgt von einem Untertauchen in einer 30% Lösung von 5,4% Natriumhypochlorid (Lilo Products, Hamilton, Ontario) in Wasser mit einem Tropfen Tween-20 pro 500 ml für 20 Minuten und dreimaligen Spülen in sterilem destillierten Wasser sterilisiert. Sterile Samen wurden auf Wasser-Agar ($8 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$) gekeimt und für 16 Tage in Dunkelheit in einer Wachstumskammer bei 24°C gehalten. Einzelne Sämlinge wurden in Magentaboxen auf einem MS-Medium (Murashige and Skoog, 1962), B5-Vitamine (Gamborg et al., 1968), $30 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Saacharose und $3 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Gellan gum (Gelrite, Schweitzerhall Inc., South Plainfield, NJ, USA) enthaltendem Medium kultiviert. Sämlingkulturen wurden in einer Wachstumskammer mit einer 16-Stunden-Photoperiode mit kaltem Weißlicht mit $40 - 60 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ inkubiert. Nach 30 Tagen wurden Sämlinge aus den Magentaboxen abgeschnitten und in 125 ml-Gefäße subkultiviert, die 25 ml eines MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962), B5-Vitamine (Gamborg et al., 1968) und $30 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ enthaltendes Grundmedium enthielten. Dem Medium (flüssiges Grundmedium) wurde 0, 50, 100, 150 oder $200 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ Lithium zugegeben und die Kulturen auf einer routierenden Plattform für 30 Tage mit einer 16 h-Photoperiode mit $40\text{--}60 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ inkubiert.

[0118] In einer zweiten Reihe von Experimenten wurde die Lithiumanreicherung von regenerierten Johanniskrauttrieben bestimmt. Pflänzchen wurden wie vorher beschrieben regeneriert. Kurz dargestellt wurden Johanniskrautsamen wie oben beschrieben oberflächensterilisiert und auf Wasser-Agar ($8 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$) für 16 Tage in Dunkelheit in einer Wachstumskammer bei 24°C gekeimt und gehalten. Hypokotylbereiche wurden von sterilen,

etiolierten Sämlingen abgeschnitten und auf einem MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962), B5-Vitamine (Gamborg et al, 1968), $30 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Saccharose, $5 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ des Zytokinins Thidiazuron (pH wurde auf 5,7 eingestellt und $3 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Gellan gum (Gelrite, Schweitzerhall Inc., South Plainfield, NJ, USA) wurde dem Medium vor dem Autoklavieren zugegeben) enthaltendem Medium kultiviert. Nach 9 Tagen wurden die Hypokotylbereiche auf dem gleichen Medium ohne Pflanzenwachstumsregulatoren (Thidiazuron) zur Entwicklung von regenerierten Geweben subkultiviert.

[0119] Alle Kulturen wurden in einer Wachstumskammer mit einer 16 Stunden-Photoperiode unter kaltem Weißlicht mit $40\text{--}60 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ kultiviert. Nach 30 Tagen Kultur wurde Explantate mit sich entwickelnden de novo-Trieben und steril kultivierte Sämlinge in 125 ml-Gefäße überführt, die 25 ml eines Grundmediums enthielten, das MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962), B5-Vitamine (Gamborg et al., 1968) und $30 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Saccharose enthielt. Dem Medium (flüssiges Grundmedium) wurden 0, 50, 100, 150 oder $200 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ Lithium zugegeben und die Kulturen auf einer routierenden Plattform für 30 Tage mit einer 16 Stunden-Photoperiode mit $40\text{--}60 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ inkubiert. Jedes Experiment bestand pro Behandlung aus vier Replikagefäßen und das Experiment wurde zweifach wiederholt.

[0120] Proben wurden von den Kulturen geerntet und auf Lithium mit dem gleichen Protokoll wie oben beschrieben analysiert. Johanniskrautpflänzchen erschienen bei allen Behandlungsstufen gesund und die Wachstumsrate war durch die Lithiumzugabe in das Kulturmedium unbeeinflusst.

[0121] Die in **Fig. 8** gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass Lithium sich bis zu einer Konzentration von ungefähr 2000 mg/kg in Johanniskrautexplantaten, die auf einem Medium kultiviert wurden, dem $200 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ Lithium zugegeben waren, anreicherte.

[0122] Die vorangehende Beschreibung soll die beanspruchte Erfindung in keiner Weise beschränken, ferner dürfte die diskutierte Kombination von Merkmalen für die erfinderische Lösung nicht uneingeschränkt notwendig sein.

Referenzen

- [0123] Betz, W. (1998) Epidemic of renal failure due to herbals. *Sci. Rev. Alt. Med.* 2: 12–13.
- [0124] Cott JM, (1997) In vitro receptor binding and enzyme inhibition by *Hypericum perforatum* extract. *Pharmacopsychiat.* 30 (supp.): 108–112. Consumer Safety Symposium on Dietary Supplements and Herbs (1998) New Good Housekeeping Institute study finds drastic discrepancy in potencies of popular herbal supplement. Good Housekeeping Institute. New York, NY. 3 März 1998.
- [0125] Consumer Safety Symposium on Dietary Supplements and Herbs (1998) New Good Housekeeping Institute study finds drastic discrepancy in potencies of popular herbal supplement. Good Housekeeping Institute. New York, NY. 3 März 1998.
- [0126] Evans MF and Morgenstern K, (1997) St. John's wort: an herbal remedy for depression? *Can. Fam. Physician.* 43: 1735–1736.
- [0127] Gamborg OL, Miller RA and Ojima K, (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 150–158.
- [0128] Gibson, R. S., Yeudall, F. Drost, N. Mtitimuni, B and T. Culliman (1998) Dietary interventions to prevent zinc deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 4845–4875.
- [0129] Greenwald, J. 1998. Herbal healing. *Time*, 23 November 1998. 48-58.
- [0130] Hansgen KD, Vesper J and Ploch M, (1994) Multicenter doubleblind study examining the antidepressant effectiveness of *Hypericum extract* LI 160. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 7: S15–S18.
- [0131] Huetteman CA and Preece JE, (1993) Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 33: 105–119.
- [0132] Hutchinson JM and Saxena PK, (1996) Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) tissue cultures. *Plant Cell Rep.* 15: 512–515.
- [0133] Jensen, W. A. (1962) *Botanical histochemistry*. San Francisco: W. H. Freeman.
- [0134] Johansen, D. A. (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Inc. New York, USA.
- [0135] Kindscher, K. (1992) *Medicinal wild plants of the prairie law rence*. University Press of Kansas. S. 86.
- [0136] Linde K, Ramirez G and Mulrow D (1996) St. John's wort for depression – an overview and meta-analysis of randomized clinical trials. *Br. Med. J.* 313: 253–261.
- [0137] Lu C-Y, (1993) The use of thidiazuron in tissue culture. *Cell Dev. Biol.* 29: 92–96.
- [0138] Miller AL, (1998) St. John's wort (*Hypericum perforatum*): Clinical effects on depression and other conditions. *Altern. Med. Rev.* 3: 18–26.
- [0139] Mok MC and Mok, DWS (1985) The metabolism of [^{14}C]-thidiazuron in callus cultures of *Phaseolus lunatus*. *Physiol. Plant.* 65: 427–432
- [0140] Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.

- [0141] Murch SJ, Simmons CB and Saxena, PK (1997) Melatonin in feverfew and other medicinal plants. *The Lancet* 350: 1598–1599.
- [0142] Murthy BNS, Murch SJ and Saxena, PK (1995) Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiol. Planta.* 94: 268–276.
- [0143] Murthys BNS, Murch SJ and Saxena, PK (1998) Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 34: 267–275.
- [0144] Nahrstedt A and Butterweck L (1997) Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiat.* 30: 129–134.
- [0145] National Institute of Health (1997) St. John's wort study launched. *Complementary and Alternative Medicine at the NIH.* 4(4): 5, October, 1997.
- [0146] Ruel M. T. and H. E. Bouis (1998) Plant breeding: a long-term strategy for the control of zinc deficiency in vulnerable populations. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 488S–494S.
- [0147] SAS Inc. (1995) The GLM procedure. In *SAS/STAT Guide for Personal Computers, Version 6* (P. Stephenie Hersg.), S. 183–260. SAS Institute, Inc., Cary, NC. ISBN 0-917382-84-6.
- [0148] Schardt, D. April 1998. Still out in the cold – Nutrition Action Health Letter.
- [0149] Schweitzer I. and V. Tuckwell (1998) Risk of adverse events with the use of augmentation therapy for the treatment of resistant depression. *Drug Saf.* 19: 455–464.
- [0150] Sharp, W. R., Sondhal, M. R., Calder, R. S., Maraffa, S. B. (1980) The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews* 2: 268–310.
- [0151] Skoog, F. and Miller, C. O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118–140.
- [0152] Sommer H and Harrer G (1994) Placebo-controlled double blind study examining the effectiveness of an *Hypericum* preparation in 105 mildly depressed patients. *J. Geriatr. Psychiatry. Neurol.* 7: S9–S11.
- [0153] St. John's Wort Monograph (1997) *American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium HerbalGram*, American Botanical Council. 40: 37–45.
- [0154] Visser C, Qureshi JA, Gill R and Saxena PK (1992) Morphoregulatory role of thidiazuron: substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. *Plant Physiol.* 99: 1704–1707.
- [0155] Whittaker, P. (1998) Iron and zinc interactions in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 442S–446S.

Patentansprüche

1. Verfahren zur in vitro Mikrovermehrung und pflanzlichen Anreicherung einer pharmazeutisch nutzbaren Pflanze, Schritte umfassend, bei denen man:
 - a) ein steriles Explantat der pharmazeutisch nutzbaren Pflanze auf einem Induktionsmedium zieht, das mindestens einen Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität umfasst, um regeneriertes Gewebe zu bilden;
 - b) das regenerierte Gewebe auf ein Grundmedium überführt und kultiviert, um Pflänzchen zu bilden; und
 - c) die Pflänzchen auf einem Grundmedium weiter kultiviert, welches mindestens einen ausgewählten Zusatzstoff enthält, um die Aufnahme und Anreicherung des mindestens einen ausgewählten Zusatzstoffes in einer biologisch verfügbaren Form in den Pflänzchen zu ermöglichen.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem man das regenerierte Gewebe nach dem Schritt des Kultivierens (Schritt a)) und vor dem Schritt des Überführens (Schritt c)), auf Grundmedium plaziert und weiter kultiviert wird, um verbesserte Bildung regenerierten Gewebes zu ermöglichen.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem man das Pflänzchen nach dem Schritt des Überführens (Schritt b)) in eine hydroponische Umgebung mit einer Recyclinglösung, die mindestens einen ausgewählten Zusatzstoff enthält, überführt, um Aufnahme und Akkumulation des mindestens einen ausgewählten Zusatzstoffes in eine biologisch verfügbare Form in dem Pflänzchen oder Sämling zu ermöglichen.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, bei dem man den mindestens einen ausgewählten Zusatzstoff in dem Kultivierungsschritt aus Bor, Calcium, Chlor, Chrom, Kalium, Kobalt, Kupfer, Eisen, Lithium, Iod, Magnesium, Mangan, Molybdän, Natrium, Nickel, Phosphor, Selen, Silicium, Schwefel, Zinn, Vanadium und Zink auswählt.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem die pharmazeutisch nutzbare Pflanze aus einer Gruppe bestehend aus *Achillea millefolium*

Achyranthes bidentata
Aconium napellus
Adonis aestivalis
Agastache mexicana
Agrimonia eupatoria
Agathosma betulina
Allium sp
Anchusa officinalis
Anemopsis californica
Angelica dahurica
Angelica polymorpha sinensis (A. sinensis)
Arnica Montana
Ammi visnaga
Arctostaphylos uva-ursi
Asclepias tuberosa
Astragalus membranaceus
Astragalus chinensis
Baphicacanthus cusia
Bixa orellana
Bupleurum falcatum
Brugmansia (Datura) spp.
Campanula rapunculus
Carum roxburianum
Carum copticum
Cassia tora
Chamaelirium luteum
Chimaphila umbellata
Commiphora africana
Conium macularum
Crithium maritimum
Datura metel (Datura alba)
Datura inoxia
Dracocephalum moldavia
Echinacea sp.
Eclipta alba (E. prostrata)
Ephedra nevadensis
Eriodictyon californicum
Eucommia ulmoides
Eupatorium perfoliatum
Filipendula vulgaris (F. hexapetala)
Gaultheria procumbens
Geum urbanum
Houttuynia cordata
Hydrocotyle asiatica (Centella asiatica)
Hypericum perforatum cv. Anthos
Inula helenium
Jatropha curcas
Leptrospermum scoparium
Lespedeza capitata
Ligusticum porteri
Ligustrum lucidum
Lithospermum officinale
Lycium barbarum
Mucana pruriens
Mandragora officinarum
Origanum dictamnus
Patietaria judaica (P. officinalis)
Phyllanthus emblica
Picrasma excelsa
Piniella ternate

Pogostemon patchouli
Polygonum multiflorum
Porophyllum ruderale ssp. macrocephalum
Prunella vulgaris
Pueraria lobata (P. thunbergiana)
Rauwolfia serpentina
Rivea corymbosa
Sanguinaria canadensis
Satureja douglasii
Schizonepeta tenuifolia
Scutellarias baicalensis
Solanum xanthocarpum (S. suratiense)
Sutherlandia frutescens
Tabebuia impetiginosa
Tanacetum parthenium
Tribulus terrestris
Trichosanthes kirilowii
Turnera diffusa
Voacanga africana und
Withania somnifera
ausgewählt wird

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem die pharmazeutisch nutzbare Pflanze aus Johanniskraut (*Hypericum perforatum* cv. Anthos), Huang-qin (*Scutellaria baicalensis*), Echinacea sp. und Mutterkraut (*Tanacetum parthenium*) ausgewählt ist.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, bei dem der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokininaktivität aus der Gruppe bestehend aus Thidiazuron (TDZ, N-Phenyl-N'-(1,2,3-thiadiazol-yl)harnstoff), Benzylaminopurin (BAP), Zeatin, CPPU (N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N-(phenylharnstoff) und 2-i-P(N6-(2-Isopentenyl)adenin oder 6-gamma,gamma-Dimethylallylaminopurin) ausgewählt ist.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, bei dem der mindestens eine Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokininaktivität aus Thidiazuron (TDZ) und Benzylaminopurin (BAP) ausgewählt ist.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, bei dem das Induktionsmedium ca. 0,001 bis ca. 25 µmol/l des mindestens einen Pflanzenwachstumsregulators mit Zytokininaktivität enthält.

10. Verfahren gemäß Anspruch 8, bei dem das sterile Explantat ca. 1 bis ca. 50 Tage auf dem Induktionsmedium belassen wird.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, bei dem das Explantat aus Samen, Blattstiel, Hypokotyl, Stiel, Keimblatt oder Blatt ausgewählt ist.

12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem die pharmazeutisch nutzbare Pflanze Johanniskraut ist.

13. Verfahren gemäß Anspruch 12, bei dem der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokininaktivität Thidiazuron ist.

14. Verfahren gemäß Anspruch 13, bei dem das Induktionsmedium ca. 0,001 bis ca. 25 µmol/l Thidiazuron enthält.

15. Verfahren gemäß Anspruch 14, bei dem das Induktionsmedium ca. 4 bis ca. 10 µmol/l Thidiazuron enthält.

16. Verfahren gemäß Anspruch 12, bei dem das sterile Explantat ca. 1 bis ca. 15 Tage auf dem Induktionsmedium belassen wird.

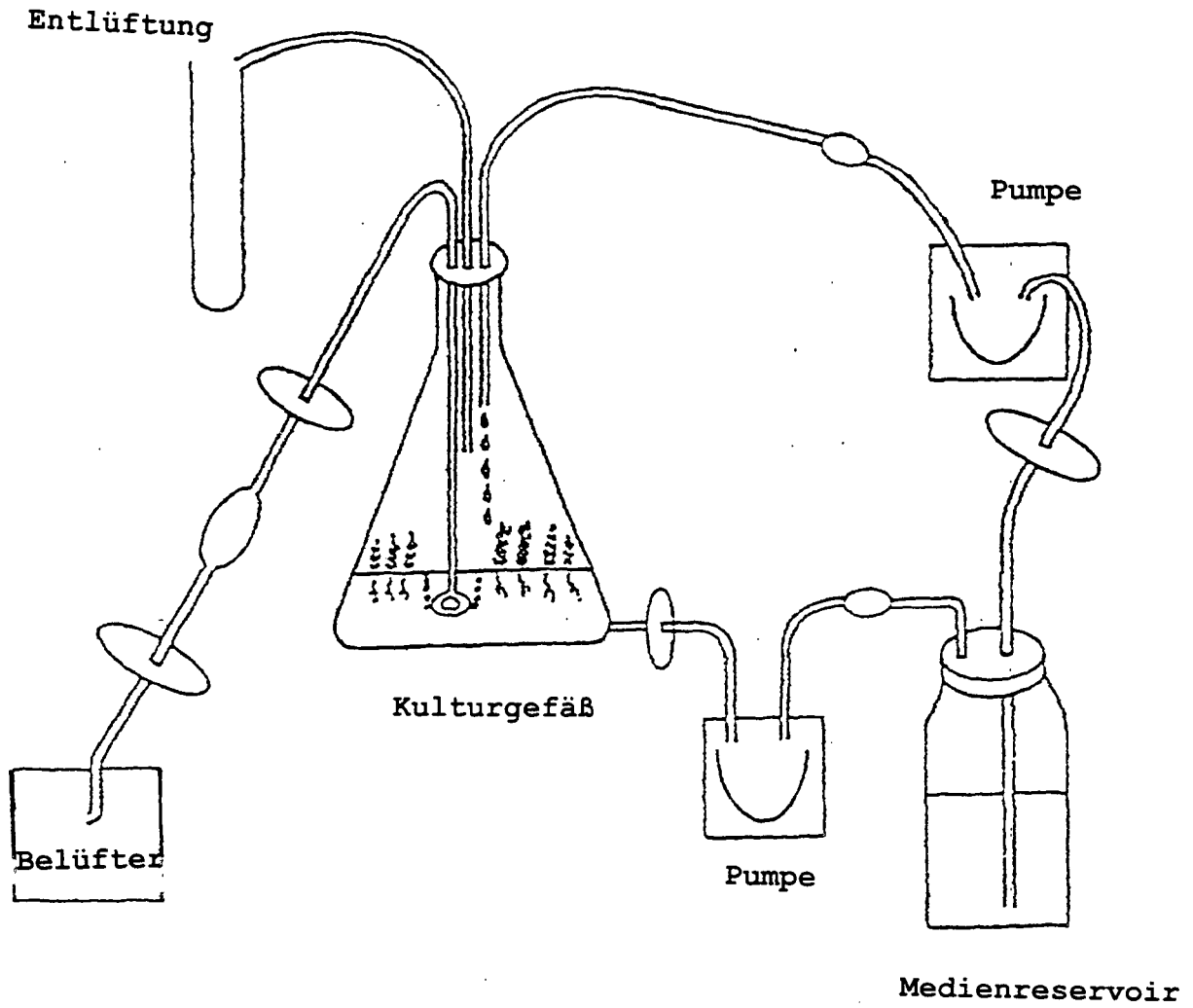
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, bei dem das sterile Explantat ca. 8 bis ca. 10 Tage auf dem Induktionsmedium belassen wird.

18. Verfahren gemäß Anspruch 12, bei dem das Explantat etioliertes Hypokotyl ist.
19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem die pharmazeutisch nutzbare Pflanze *Echinacea* sp. ist.
20. Verfahren gemäß Anspruch 19, bei dem der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität aus der Gruppe, bestehend aus Thidiazuron und Benzylaminopurin, ausgewählt ist.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, bei dem das Induktionsmedium ca. 0,001 bis ca. 25 µmol/l des Pflanzenwachstumsregulators mit Zytokinaktivität enthält.
22. Verfahren gemäß Anspruch 20, bei dem der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität in einer Konzentration von ca. 1,0 bis ca. 15 µmol/l vorliegt.
23. Verfahren gemäß Anspruch 19, bei dem das sterile Explantat ca. 1 bis ca. 50 Tage auf dem Induktionsmedium belassen wird.
24. Verfahren gemäß Anspruch 23, bei dem das sterile Explantat ca. 10 bis ca. 35 Tage auf dem Induktionsmedium belassen wird.
25. Verfahren gemäß Anspruch 19, bei dem das Explantat Blattstiel ist.
26. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem die pharmazeutisch nutzbare Pflanze *Huang qin* ist.
27. Verfahren gemäß Anspruch 26, bei dem der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität Thidiazuron ist.
28. Verfahren gemäß Anspruch 27, bei dem das Induktionsmedium ca. 0,001 bis ca. 25 µmol/l des Pflanzenwachstumsregulators mit Zytokinaktivität enthält.
29. Verfahren gemäß Anspruch 28, bei dem der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität von ca. 1,5 bis ca. 20 µmol/l enthalten ist.
30. Verfahren gemäß Anspruch 26, bei dem das sterile Explantat ca. 1 bis ca. 30 Tage auf Induktionsmedium belassen wird.
31. Verfahren gemäß Anspruch 30, bei dem das sterile Explantat ca. 14 bis ca. 20 Tage auf dem Induktionsmedium belassen wird.
32. Verfahren gemäß Anspruch 26, bei dem das Explantat aus Samen, Hypokotyl und Stiel ausgewählt ist.
33. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem die pharmazeutisch nutzbare Pflanze Mutterkraut ist.
34. Verfahren gemäß Anspruch 33, bei dem der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität Thidiazuron ist.
35. Verfahren gemäß Anspruch 34, bei dem das Induktionsmedium ca. 0,001 bis ca. 25 µmol/l von dem Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität enthält.
36. Verfahren gemäß Anspruch 35, bei dem der Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokinaktivität von ca. 2,0 bis ca. 8,0 µmol/l enthalten ist.
37. Verfahren gemäß Anspruch 33, bei dem das sterile Explantat ca. 1 bis ca. 15 Tage auf dem Induktionsmedium belassen wird.
38. Verfahren gemäß Anspruch 37, bei dem das sterile Explantat ca. 20 bis ca. 35 Tage auf dem Induktionsmedium belassen wird.

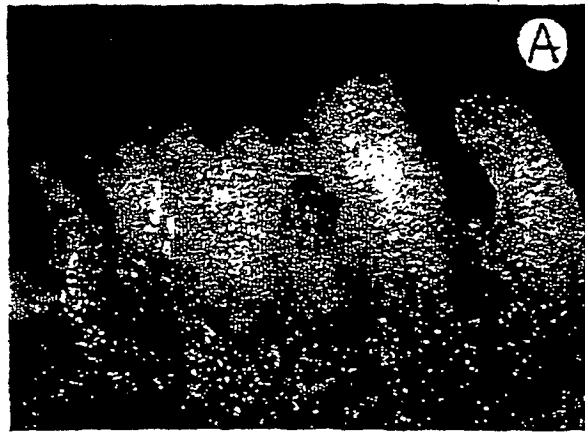
39. Verfahren gemäß Anspruch 33, bei dem das Explantat aus Blatt, Stiel, Blattstiel oder Hypokotyl ausgewählt ist.
40. Verfahren gemäß Anspruch 4, bei dem der mindestens eine ausgewählte Zusatzstoff Zink ist.
41. Verfahren gemäß Anspruch 4, bei dem der mindestens eine ausgewählte Zusatzstoff Lithium ist.
42. Verfahren gemäß Anspruch 4, bei dem der mindestens eine ausgewählte Zusatzstoff in dem Grundmedium von ca. 0,001 bis ca. 500 mg/l enthalten ist.
43. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem das regenerierte Gewebe in dem Überführungsschritt ca. 1 bis ca. 15 Tage subkultiviert wird.
44. Verfahren für die pflanzliche Anreicherung einer in vitro gewachsenen pharmazeutisch nutzbaren Pflanze, Schritte umfassend, bei denen man:
- a) einen sterilen Sämling, Explantat oder regeneriertes Gewebe in Kultur zieht, um ein Pflänzchen zu bilden; und
 - b) das Pflänzchen auf einem Grundmedium subkultiviert, das mindestens einen ausgewählten Zusatzstoff enthält, um Aufnahme und Akkumulation des mindestens einen ausgewählten Zusatzstoffes in einer biologisch verfügbaren Form in dem Pflänzchen zu erlauben.
45. Verfahren gemäß Anspruch 45, bei dem man in dem Schritt des Kultivierens Pflänzchen erzeugt, entweder
- a) auf einem sterilen Explantat einer pharmazeutisch nutzbaren Pflanze, die auf einem Induktionsmedium gewachsen ist, das mindestens einen Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokininaktivität enthält, oder
 - b) aus einem sterilen Samen gewachsen, oder
 - c) als Sämling in Kultur.
46. Verfahren gemäß Anspruch 45, bei dem der eine Pflanzenwachstumsregulator mit Zytokininaktivität aus der Gruppe, bestehend aus Thidiazuron (TDZ, N-Phenyl-N'-(1,2,3-thidiazolyl)harnstoff), Benzylaminopurin (BAP), Zeatin, CPPU (N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N-(phenylharnstoff) und 2-i-P(N6-(2-Isopentenyl)adenin oder 6-gamma,gamma-Dimethylallylaminopurin), ausgewählt ist.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

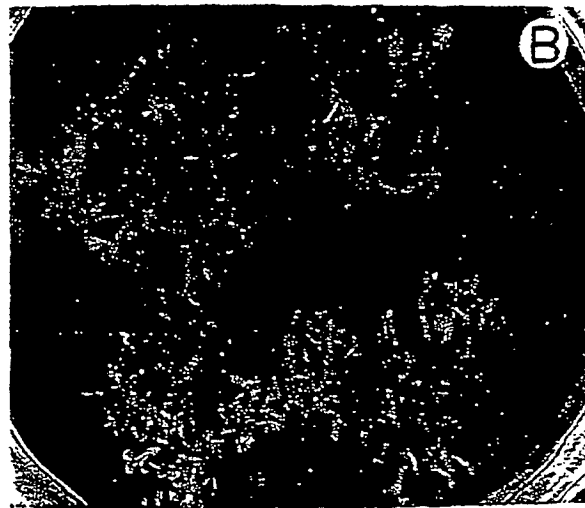
Anhängende Zeichnungen



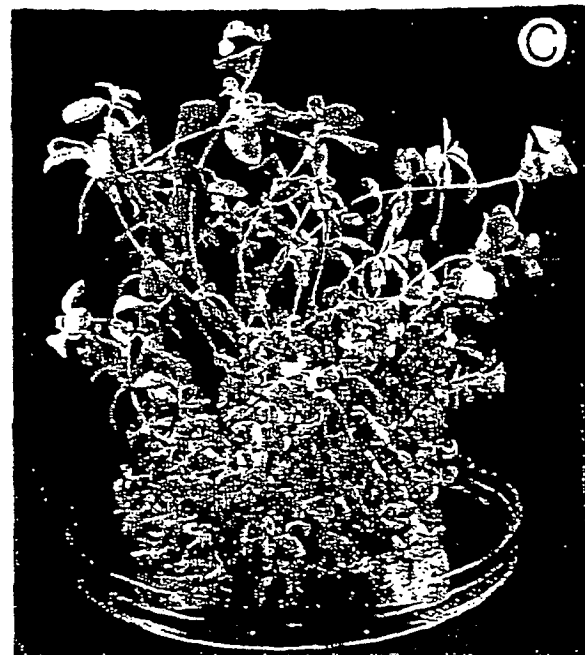
FIGUR 1



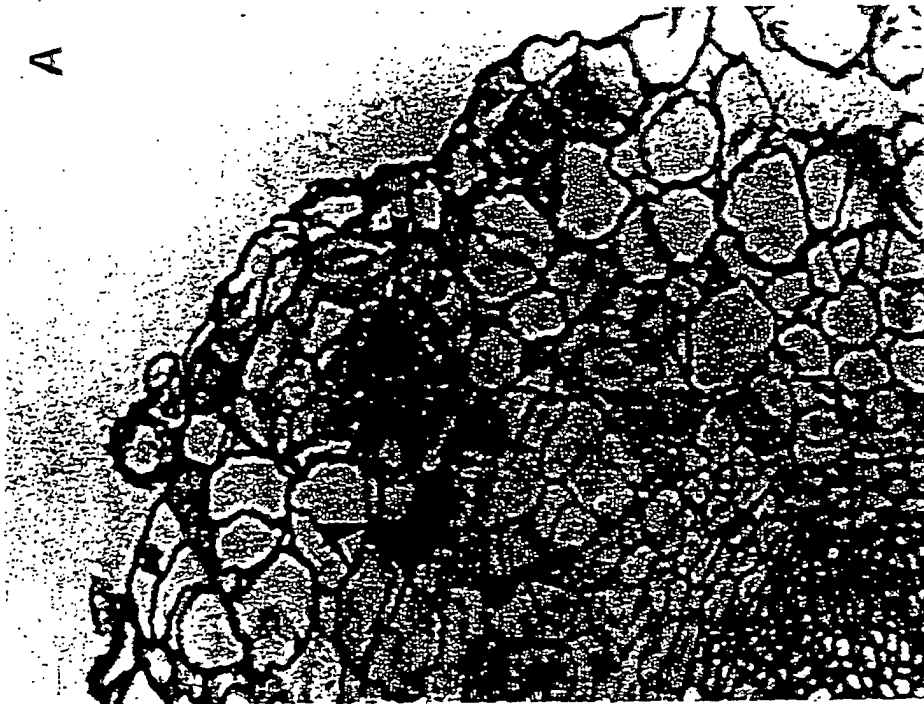
FIGUR 2A



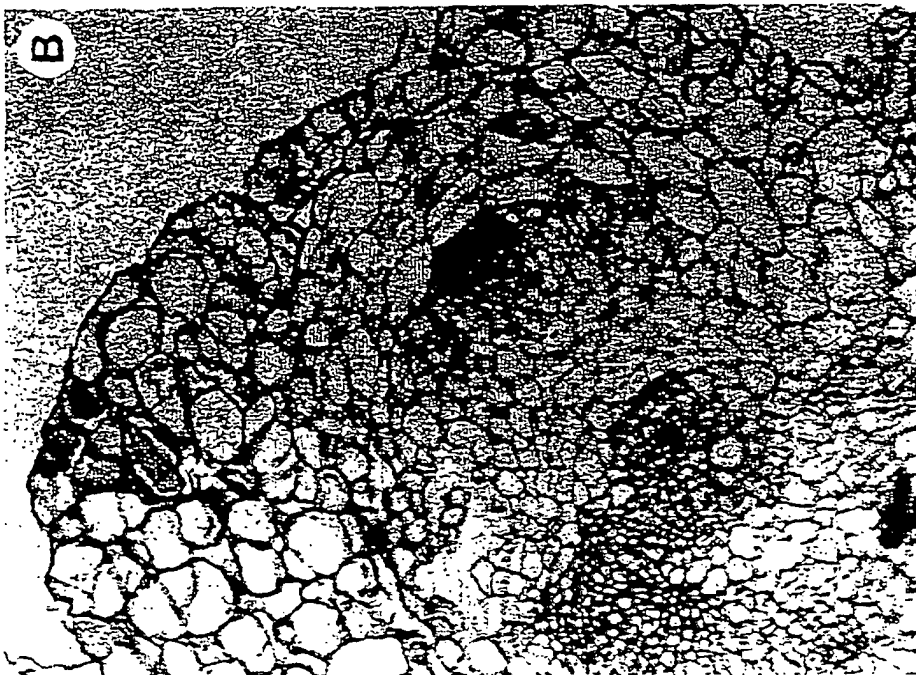
FIGUR 2B



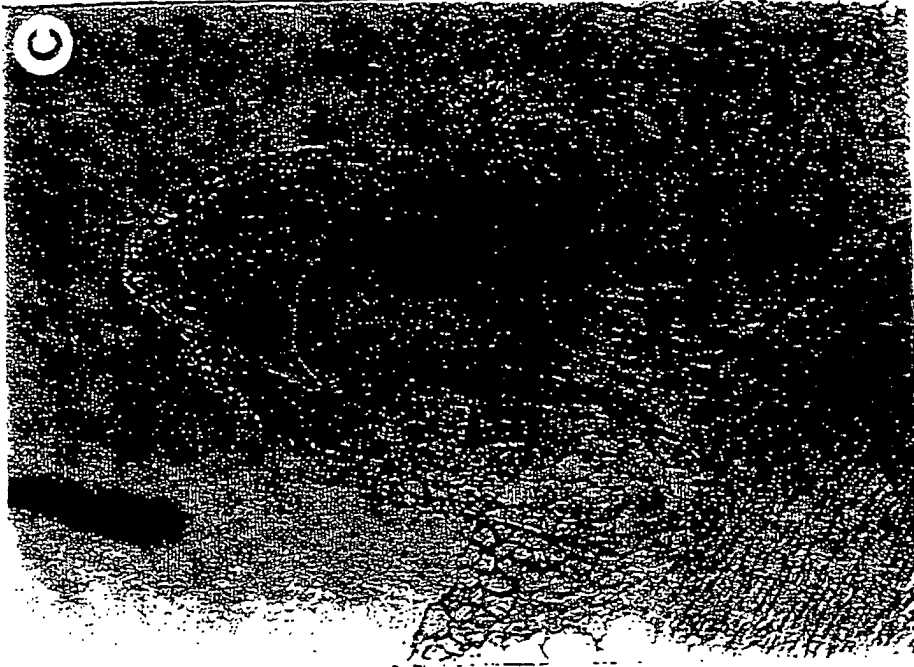
FIGUR 2C



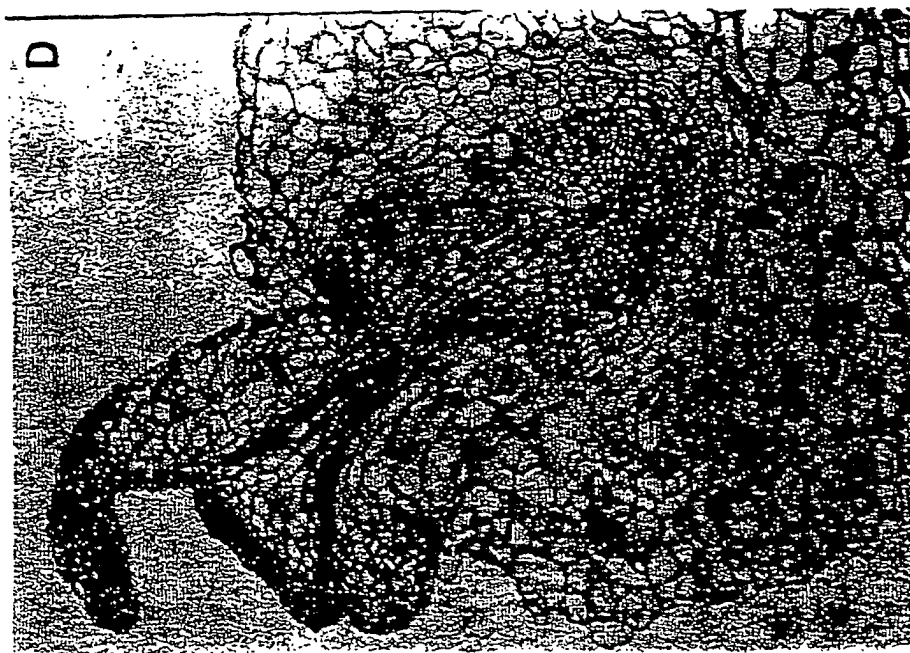
FIGUR 3A



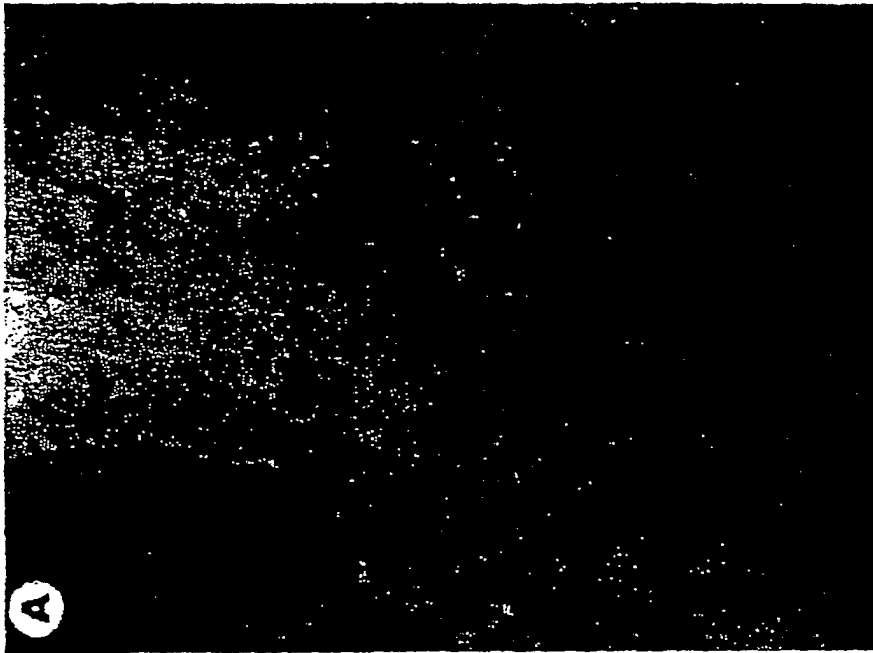
FIGUR 3B



FIGUR 3C



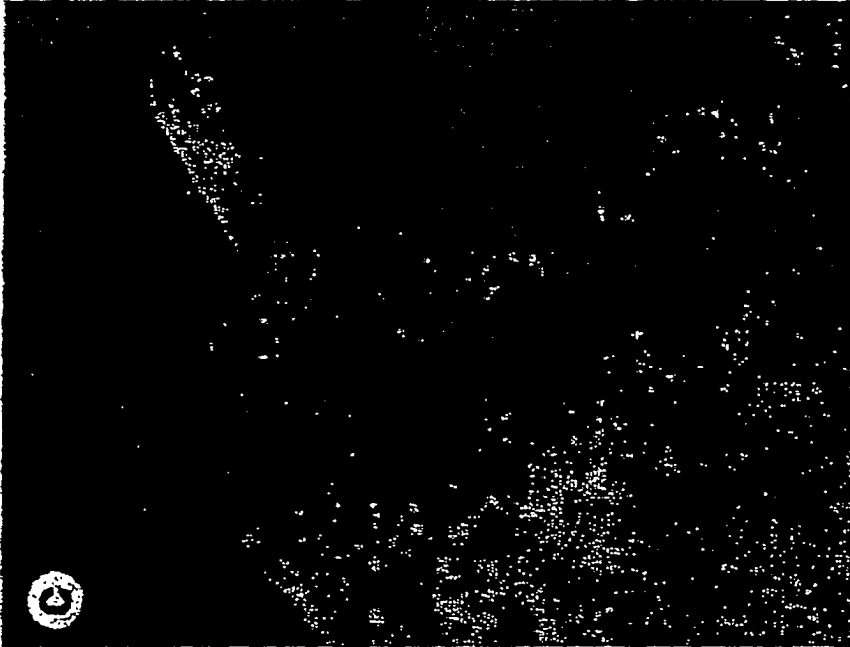
FIGUR 3D



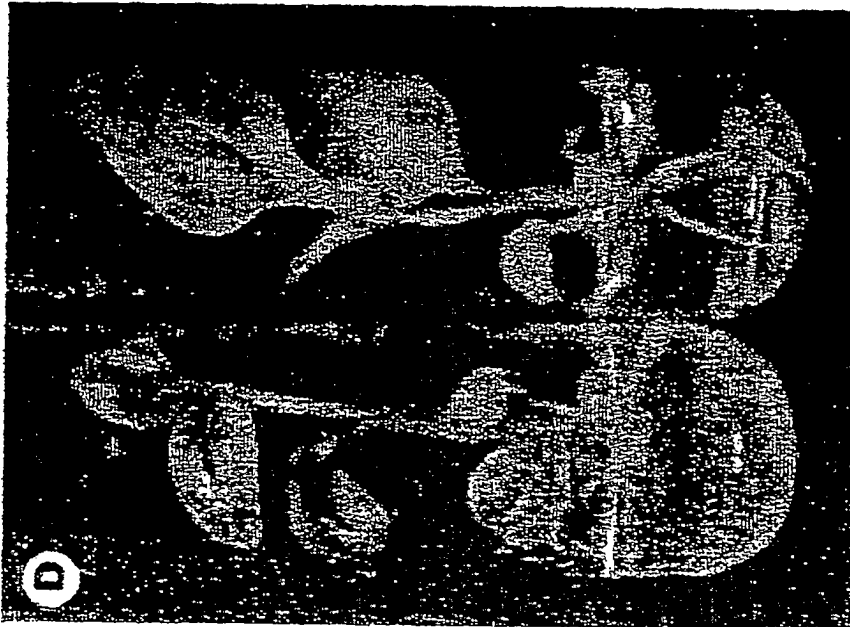
FIGUR 4A



FIGUR 4B



FIGUR 4C



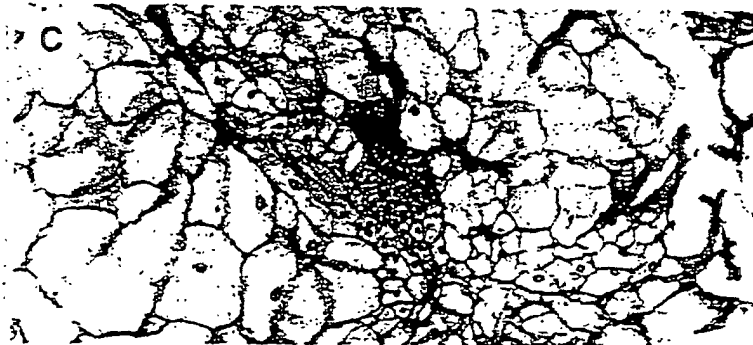
FIGUR 4D



FIGUR 5A



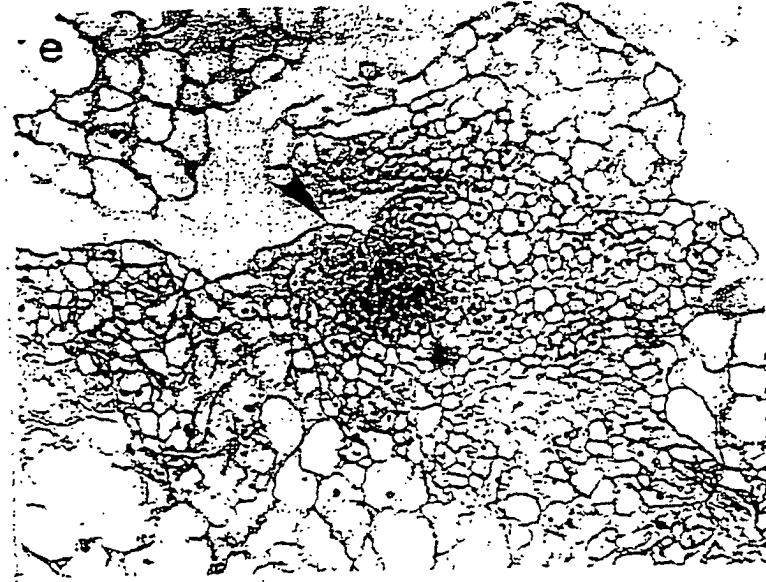
FIGUR 5B



FIGUR 5C



FIGUR 5D



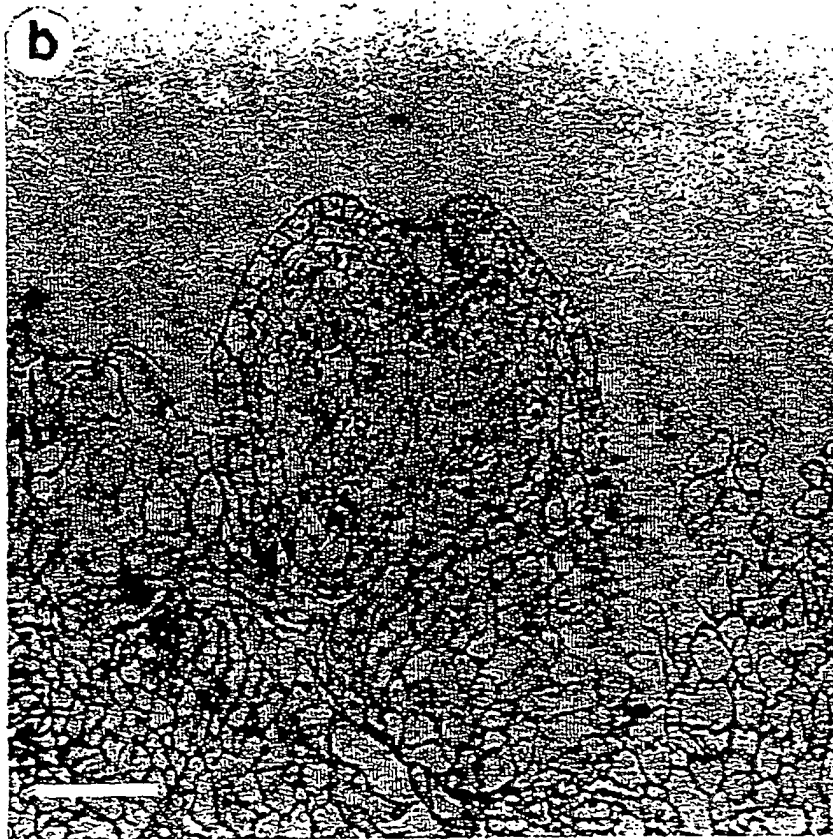
FIGUR 5E



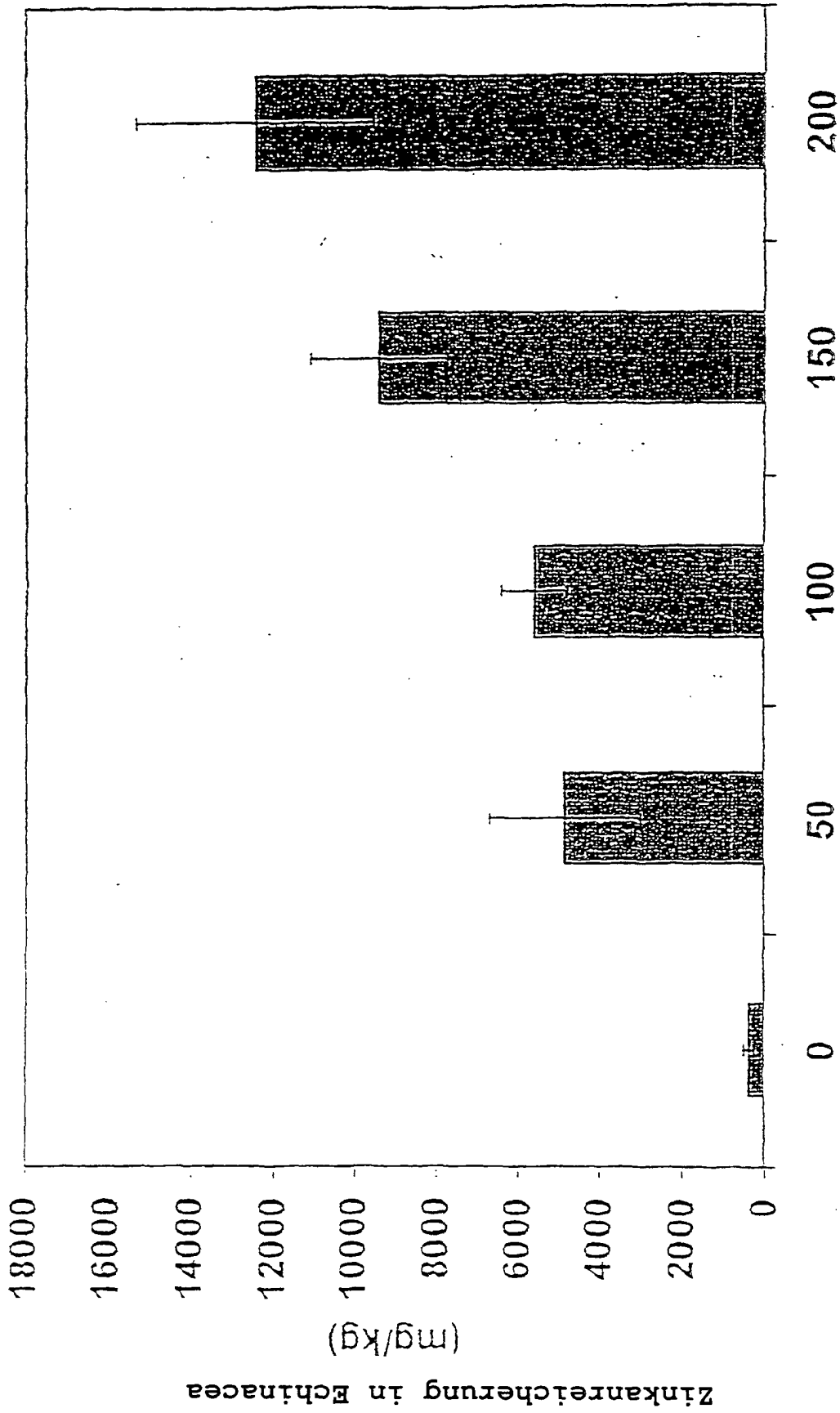
FIGUR 5F



FIGUR 6A

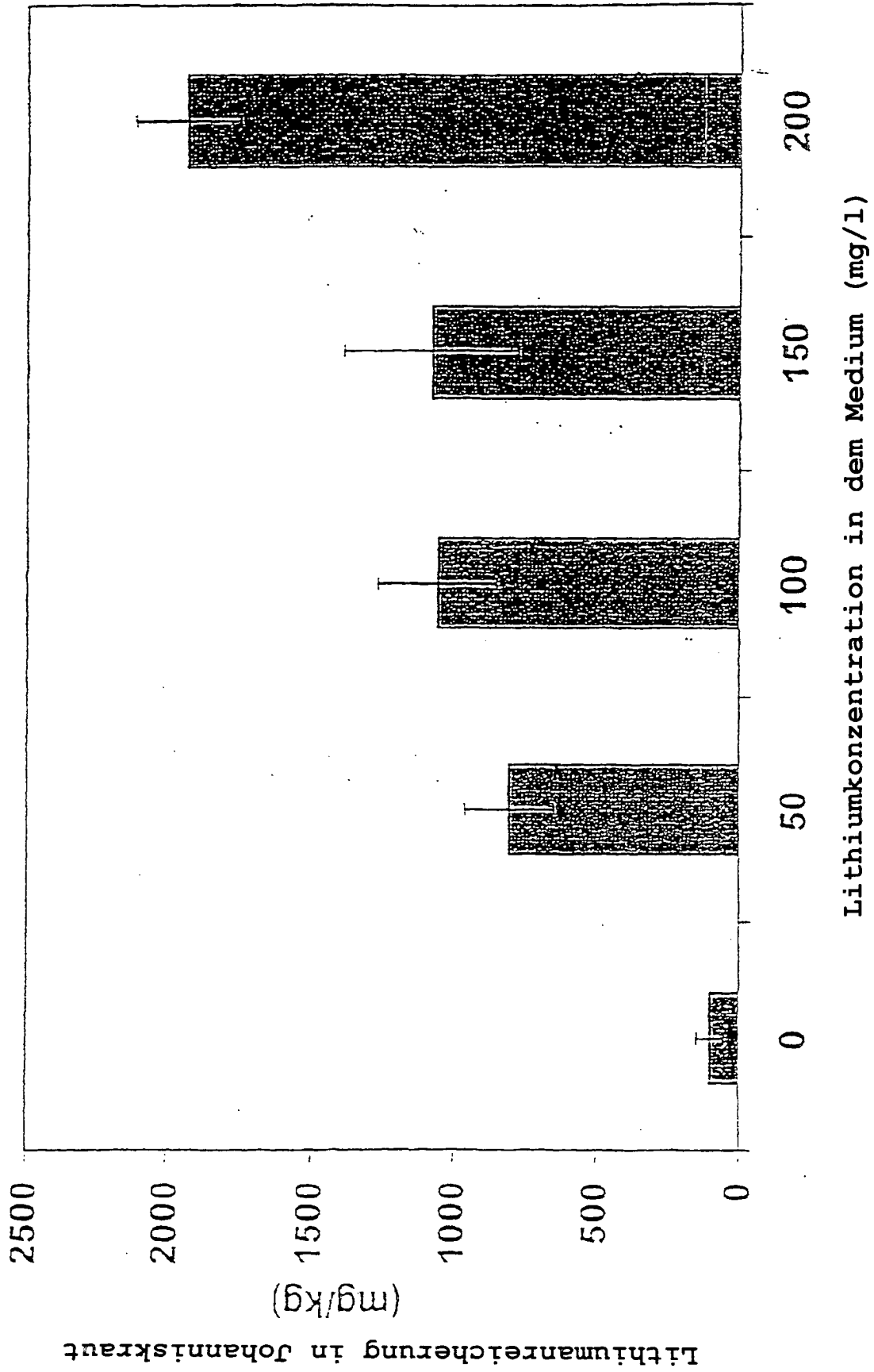


FIGUR 6B



Zinkkonzentration in dem Medium (mg/l)

FIGUR 7



FIGUR 8