



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **258 624 A1**4(51) C 12 N 5/00
A 01 G 31/00
A 01 N 3/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 282 700 0	(22)	11.11.85	(44)	27.07.88
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Institut für Rübenforschung, Klein Wanzleben, 3105, DD

(72) Lohmann, Karin, Dr. rer. nat.; Lux, Horst, Dipl.-Biol., DD

(54) Langzeitlagerung von Zuchtmaterial bei Zuckerrüben

(57) Die Erfindung betrifft ein System, das geeignet ist, bewurzelte in vitro Pflanzen von Zuckerrüben mit geringem Aufwand an Kosten und Energie 18–24 Monate ohne Passagierung zu lagern. Ziel der Erfindung ist es, Zuchtmaterial genetisch unverändert für mehrere Jahre aufzubewahren und wiederholt für den Zuchtprozeß zur Verfügung zu stellen. Erfindungsgemäß ist die Bereitstellung eines geeigneten Überlagerungsmediums mit bestimmten Zuständen und die Auswahl geeigneter Temperatur- und Lichtbedingungen. Erfindungsgemäß besteht das Medium aus bekannten Makro- und Mikroelementen, dem Phytohormon Indolyl-3-buttersäure und Zusätzen von osmotisch wirksamen Substanzen: Glycerin oder Saccharose. Die optimalen Kulturbedingungen liegen bei 8 °C und 800 Lux.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Langzeitlagerung (Depothaltung) von bewurzelten Beta-Rüben in synthetischen Nährmedien **gekennzeichnet dadurch**, daß die Pflanzen unter Zusatz von Phytohormonen und osmotisch wirksamen Substanzen bei Temperaturen von +6°C bis +10°C und weißem Schwachlicht im Bereich von 500 bis 1000 Lux gelagert werden.
2. Verfahren nach Pkt. 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Phytohormon Indolyl-3-buttersäure im Konzentrationsbereich von 0,1 ... 10 mg/l, vorzugsweise 3 ... 5 mg/l, zugefügt wird.
3. Verfahren nach Pkt. 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als osmotisch wirksame Substanzen vorzugsweise Saccharose oder Glycerin verwendet werden, wobei Saccharose im Bereich von 5 ... 150 g/l, vorzugsweise im Bereich von 80 ... 100 g/l und Glycerin im Bereich von 0,01 ... 0,5 mol/l, vorzugsweise im Bereich von 0,1 ... 0,3 mol/l, verwendet werden.
4. Verfahren nach Pkt. 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Temperatur vorzugsweise 6 ... 8°C und das Schwachlicht vorzugsweise 800 Lux beträgt.
5. Verfahren nach Pkt. 1-4, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Pflanze die Zuckerrübe, *Beta vulgaris*, ist.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Langzeitlagerung bewurzelter Beta-Rüben unter in vitro Bedingungen im Rahmen der Hybridzüchtung.

Bekannte technische Lösungen

Umfangreiche Erfahrungen zur in vitro Langzeitlagerung liegen bei Kartoffeln vor.

Dabei handelt es sich um verschiedene Methoden zur Verlängerung des Subkulturintervalls:

- Einsatz von Hungermedien (MOREL, G.: In: FRANKEL, O. H.; HAWKES, J. G. [Eds.] *Crop genetics resources für today and tomorrow*, Cambridge, London, New York, Melbourne, Cambridge University Press, 1975, S. 327-332)
- Einsatz von Wachstumsretardantien (MIX, G.: *Kartoffelbau*, Gelsenkirchen — Buer 32 [1981 a] 7, S. 198-199; Mix, G.: *Informationsblatt für Düngung und Saatgut*, Wien [1982] 1; MiX, G.: *Landbauforsch. Völkenrode*, Braunschweig 33 [1983] 3, S. 179-182)
- Einsatz von Osmotika (SCHILDE-RENTSCHLER und SCHIEDICHTE: *CIP Circular*, Lima, 12 [1984] 1, S. 1-6, WESTCOTT, R. J.: *Potato Res.*, Wageningen 24 [1981] S. 343-352)
- Anwendung spezifischer Kulturbedingungen (MENSCHAW, G. G. et al.: In: INGRAM, D. S.; HELGESON, J. P. (Eds.): *Tissue culture methods for plant pathologists*, Edinburgh, Boston, Melbourne, Blackwell Scientific Publications [1980], S. 71-76; STANDKE, K.-H. C.: *Proc. 5 th Intern. Congr. Pl. Tissue and Cell Cult.*, Tokyo and Lake Yamanaka, 11. — 16. 7. 1982, S. 257)
- Erzeugung von Mikroknollen (OSTAPENKO, D. P.: *Patentschrift*, SU, WP, A01 H 1/04, Nr. 743646 [1982], 4 S., PETT, B.; THIEME, R.: *Potato Res.*, Wageningen 24 [1981], S. 105-110)
- Gefrierkonservierung (BAJAJ, Y. P. S.: *Euphytica*, Wageningen 30 [1981] 1, S. 141-145; MANZULIN et al.: *Fiziol. Rast.*, Moskva 31 [1984] 4, S. 639-645)

Aus vorläufigen Ergebnissen mit Zuckerrüben wird mitgeteilt, daß bewurzelte Sprosse für maximal 1 Jahr bei 5-10°C und geringer Lichtintensität gehalten werden können (MIEDEMA, D.: *Euphytica* 31 [1982]. S. 635-643).

Weiterhin gibt es Überlegungen, durch Erhöhung des Mediumvolumens die Lagerdauer zu verlängern und die Absterberate der Pflanzen zu reduzieren (SAUNDERS, J. W., schriftl. Mitteil. vom Landwirtschaftsattaché Schulz). Eine Überlagerung bei 12°C erforderte die Umsetzung des Materials im Abstand von 18 Wochen (HUSSEY, G.; HEPHER, R. P.: *Ann. Bot.* 42 [1978], S. 477-479).

Bei „Strube-Dieckmann“ (BRD) werden ca. 1000 verschiedene Genotypen in einer „kleinen Genbank“ bei 10°C über einen Zeitraum von 4 Jahren gehalten (GASSNER, D.: *Dt. Rübenzeitung*, Worms 21 [1985]).

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der vorliegenden Erfindung, für die Züchtung von Beta-Rüben, Zuchtmaterial über mehrere Jahre genetisch unverändert aufzubewahren und wiederholt in den Zuchtprozeß einzuordnen.

Wesen der Erfindung

Bei dem sehr langwierigen Prozeß der züchterischen Bearbeitung von Zuckerrüben bis zur Zulassung einer neuen Sorte (ca. 15 Jahre) ergibt sich die Notwendigkeit, das selektierte Material zu überprüfen bzw. die Kombinationseignung festzustellen. Bis zur Ermittlung der Materialeigenschaften vergehen mitunter mehrere Jahre.

Erfindungsaufgabe ist es, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem die Dauer der Lagerung von Zuchtmaterial unter in vitro Bedingungen verlängert werden kann.

Erfindungsgemäß besteht das Verfahren für die Langzeitlagerung von Beta-Rübenzuchtmaterial aus der Nutzung von synthetischen Nährmedien mit Phytohormonen und Osmotika, die bei niedriger Temperatur und Schwachlicht aufbewahrt werden.

Zur Senkung der Wachstumsintensität während der Kühlung werden osmotisch wirksame Substanzen eingesetzt. Als besonders vorteilhaft erwiesen sich dabei Saccharose bzw. Glycerin, die als physiologisch inaktive Substanzen keine Nebenwirkungen zur Folge haben, wie es bei retardierend wirkenden Substanzen bekannt ist.

An Stelle von Agrarmedien wird für die in vitro-Bewurzung und Kühlung Flüssigmedium eingesetzt. Hierdurch ist es ohne Schwierigkeiten möglich, durch nachträgliche Zugabe der osmotisch wirksamen Substanz negative Wirkungen auf die Bewurzung zu vermeiden und bei Bedarf frische Nährlösung nachzufüllen.

Besonders bevorzugt ist als Phytohormon zur Bewurzung und Kühlung Indolyl-3-buttersäure im Konzentrationsbereich 3,0 bis 5,0 mg/l.

Die Glycerinzugabe erfolgt vorzugsweise in einer Menge von 0,10 bis 0,20 mol/l, die Saccharosekonzentration wird bevorzugt eingesetzt bei 80 bis 100 g/l.

Ein solches Verfahren ermöglicht es, die Lagerungsdauer in vitro bewurzelter Pflanzen von Zuckerrüben bei niedriger Temperatur (8°C) und Schwachlicht (800 Lux) im Unterschied zu den herkömmlichen Verfahren von bisher 12 Monate auf 18 bis 24 Monate zu verlängern.

Die Erfindung soll nachstehend durch Beispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel 1

Die in vitro-Bewurzung erfolgt auf Flüssig-Mineralsalzmedium nach MURASHIGE und SKOOG (Physiol. Plant. 15 [1962]) unter Zusatz von

20 g/l Saccharose

4 mg/l Indolyl-3-buttersäure

Kulturbedingungen: 16 Std. Licht, 8 Std. Dunkelheit bei 25°C/15°C, 3000 Lux, weißes Licht)

Nach 6 Wochen Kultur kann die Lagerung unter folgenden Bedingungen beginnen:

Temperatur: 8°C

Licht: 3 × 4 Std. bei 800 Lux

Die Nährlösung wurde nach 9 Monaten in der erforderlichen Menge ergänzt.

Die Lagerung des in vitro-Materials erfolgt auf diese Weise für die Dauer von 18 Monaten.

Ausführungsbeispiel 2

Die Kulturbedingungen für die in vitro-Bewurzung wie in Beispiel 1 beschrieben. Es wurde nur die Zugabe von Saccharose variiert, anstelle von 20 g/l Saccharose enthielt das Bewurzlungsmedium bzw. Überlagerungsmedium 80 g/l Saccharose. Damit wurde eine Überlagerungsdauer von 24 Monaten erreicht.