



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 250 464 A5

4(51) A 61 K 31/015
A 61 K 31/045

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP A 61 K / 270 119 0	(22)	30.11.84	(44)	14.10.87
(71)	siehe (73)				
(72)	Chlodwig, Franz, Dr. habil. Dipl.-Agr.; Isaac, Otto, Dr., DE				
(73)	DEGUSSA AG, 6450 Hanau 1, DE				
(54)	Verfahren zur Herstellung von verbesserten Kamillenauszügen und ätherischem Öl aus dem getrockneten Material				

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Kamillenauszügen und ätherischem Öl. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens unter Verwendung des getrockneten Materials, das aus der tetraploiden Kamillensorte DEGUMILL hergestellt wurde. Erfindungsgemäß wird dieses getrocknete Material mit Alkoholen extrahiert, um einen Auszug zu erhalten, der mindestens 5 mg% Chamazulen und mindestens 15 mg% (–)- α -Bisabolol und weniger als 8 mg% an übrigen Bisaboloiden enthält, oder daß man das getrocknete Material in Gegenwart von Wasser erhitzt, um ein ätherisches Öl zu erhalten, welches mindestens 5% Chamazulen und mindestens 15% (–)- α -Bisabolol und weniger als 10% an übrigen Bisaboloiden enthält.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von alkoholischen Kamillenauszügen oder von ätherischem Kamillenöl unter Verwendung des getrockneten Materials, welches dadurch erhalten wird, daß man die diploide Kamillensorte DEGUMILL tetraploidisiert, die tetraploidisierten Pflanzen auswählt und weitervermehrt, und daß man die Blüten im Vegetationsstadium, wo 30–100 % der Röhrenblüten eines Blütenköpfchens offen sind, erntet und bei einer Temperatur von höchstens 60°C getrocknet, um ein trockenes Material zu erhalten, das mindestens 120 mg% Chamazulen, mindestens 200 mg% (-)- α -Bisabolol und weniger als 50 mg% an übrigen Bisaboloiden enthält, **gekennzeichnet dadurch**, daß man dieses getrocknete Material mit Alkoholen extrahiert, um einen Auszug zu erhalten, der mindestens 5 mg% Chamazulen und mindestens 15 mg% (-)- α -Bisabolol und weniger als 8 mg% an übrigen Bisaboloiden enthält, oder daß man das getrocknete Material in Gegenwart von Wasser erhitzt, um ein ätherisches Öl zu erhalten, welches mindestens 5% Chamazulen und mindestens 15% (-)- α -Bisabolol und weniger als 10% an übrigen Bisaboloiden enthält.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Kamillenauszügen und ätherischem Öl aus dem getrockneten Material der tetraploiden Kamillensorte DEGUMILL.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Patentanmeldung AP A 61 K/264591/1 betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines getrockneten Materials mit antiphlogistischer Wirkung aus *Matricaria Chamomilla* und ist dadurch gekennzeichnet, daß die diploide Kamillensorte DEGUMILL tetraploidisiert wird, daß tetraploidisierte Pflanzen ausgewählt und weitervermehrt werden und daß die Blüten im Vegetationsstadium, wo 30 bis 100% der Röhrenblüten eines Blütenköpfchens offen sind, geerntet und bei einer Temperatur von höchstens 60°C getrocknet werden, um ein trockenes Material zu erhalten, das mindestens 120 mg% Chamazulen, mindestens 200 mg% (-)- α -Bisabolol und weniger als 50 mg% an übrigen Bisaboloiden enthält.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens zur Herstellung von Kamillenauszügen und ätherischem Öl.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Kamillenauszüge und ätherisches Öl aus einem getrockneten Material herzustellen, das durch Tetraploidisierung der diploiden Kamillensorte DEGUMILL erhalten wird.

Es hat sich nun gezeigt, daß die aus diesem getrockneten Material erhaltenen Auszüge beziehungsweise Extrakte ebenfalls gleichzeitig hohe Chamazulen- und (-)- α -Bisabololgehalte aufweisen. Dasselbe gilt für ein aus diesem getrockneten Material gewonnenes ätherisches Öl.

Zur Herstellung des als Ausgangsmaterial für die erfindungsgemäßen Kamillenauszüge und Kamillenöle verwendeten getrockneten Materials wird eine Kamille mit der Bezeichnung DEGUMILL verwendet (es handelt sich hierbei um die im Patentanspruch der Deutschen Patentschrift 2402802 erwähnte Kamillensorte; DDR-Sortenschutzrecht Degumill; italienisches Patent 1 035 096). Diese Kamillensorte Degumill weist einen gleichzeitig hohen Gehalt an (-)- α -Bisabolol und Chamazulen auf. Der Chamazulen und Bisabololgehalt dieser Kamillensorte DEGUMILL ist jedoch nur dann beständig, wenn jegliche Einkreuzung beziehungsweise Fremdbestäubung mit anderen Kamillensorten, deren Bisabolol- und Chamazulengehalt erheblich niedriger ist, beziehungsweise mit der überall vorhandenen wirkstoffarmen Wildkamille, verhindert wird. Diese Einkreuzungsgefahr durch Fremdbestäubung ist fast immer vorhanden, da die Wildkamille praktisch überall vorkommt.

Die Kamillensorte DEGUMILL ist diploid. Durch Tetraploidisierung wird aber überraschenderweise erreicht, daß die so erhaltene tetraploide Kamille nicht mehr anfällig gegen die Fremdbestäubung ist, das heißt, daß der Chamazulengehalt und der (-)- α -Bisabololgehalt beständig wird. Durch weitere Selektions- und Vermehrungsschritte gelingt es dann insbesondere, den Gehalt an (-)- α -Bisabolol und auch an Chamazulen weiter zu erhöhen, während der Gehalt an den übrigen Bisaboloiden abnimmt und unter 50 mg% liegt.

Die Tetraploidisierung kann durch Behandlung von Pflanzenteilen (Samen, Wurzeln, Sproßspitzen, Keimen, Achselknospen) oder Gewebe der Kamillenpflanze DEGUMILL mit Chemikalien, Röntgenstrahlen, Gammastrahlen oder UV-Strahlen erfolgen. Sie kann weiterhin durch Anwendung von hohen oder auch niedrigen Temperaturen auf die Kamillenpflanze DEGUMILL beziehungsweise Pflanzenteile oder Gewebe der Kamillenpflanze DEGUMILL erfolgen. Es wird hierzu beispielsweise auf das Buch von Werner Gottschalk „Die Bedeutung der Polyploidie für die Evolution der Pflanzen“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1976, insbesondere Seiten 13 bis 22 sowie das DDR-Patent 223064 verwiesen.

Als Chemikalie für die Tetraploidisierung kommt insbesondere Colchicin in Frage.

Die Behandlung mit Colchicin erfolgt zum Beispiel bei Temperaturen zwischen 0 und 35°C, vorzugsweise 12 bis 30°C, insbesondere 15 bis 25°C. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß Samen der Kamillensorte DEGUMILL in einer 0,01 bis 0,2%igen, insbesondere 0,02 bis 0,1%igen, vorzugsweise 0,05%igen Colchicininlösung zum Quellen gebracht werden oder daß ausgekeimte, 5 bis 7 Tage alte gut entwickelte Keimlinge der Kamillensorte DEGUMILL (mit den Keimblättern nach unten) in eine 0,01 bis 0,2%ige, insbesondere 0,02 bis 0,1%ige, vorzugsweise 0,05%ige Colchicininlösung getaucht werden. Bei letzterem Verfahren soll die umgebende Atmosphäre nahezu 100% relative Luftfeuchtigkeit aufweisen. Die Dauer der Colchicin-Behandlung beträgt beispielsweise 3 bis 36 Stunden, insbesondere 4 bis 10 Stunden. Bei der Verwendung von Keimlingen ist im allgemeinen eine Einwirkungsdauer bis zu 10 Stunden ausreichend. Bei der Verwendung von Samen kann sich die Einwirkungsdauer gegebenenfalls bis zu 36 Stunden erstrecken.

Nach der Behandlung mit Colchicin werden die gequellten Samen, Keimlinge, beziehungsweise sonstige Pflanzenteile, mit Wasser mehrmals gespült. Die gequellten Samen werden beispielsweise ausgesät. Die Pflanzen mit behandelten Wurzeln oder sonstige Pflanzenteile oder die behandelten Keimlinge werden beispielsweise in Pflanzkisten pikiert. Aus den so behandelten Samen beziehungsweise Keimlingen werden die Pflanzen aufgezogen (zum Beispiel im Gewächshaus: Temperatur zwischen 18 bis 25°C am Tag und 10 bis 16°C nachts) und die Pflanzen ausgewählt, deren Pollen etwa 1 1/2mal größer sind als die Pollen des Ausgangsmaterials beziehungsweise eine Chromosomenzahl der somatischen Zellen von 36 aufweisen. Falls man sonstige Pflanzenteile (ober- oder unterirdische Teile) der Chemikalienbehandlung unterwirft, werden ausschließlich die aus den behandelten Teilen hervorgegangenen Triebe, Wurzeln oder Blüten/Samen einer späteren Untersuchung auf erfolgte Tetraploidisierung unterzogen. Wenn beispielsweise eine Sproßbehandlung oder eine Achselbehandlung vorgenommen wurde, wird anschließend nur der aus dieser Achsel beziehungsweise aus diesem Sproß entstehende neue Trieb und die auf ihm gebildeten Blüten beziehungsweise Samen auf Chromosomenzahl untersucht.

Die Pollengrößmessungen und die Chromosomenzählung können beispielsweise so durchgeführt werden wie in „Beispiel zur Herstellung des Ausgangsmaterials“ angegeben ist.

Die Behandlung mit Colchicin kann auch nach folgender Methode durchgeführt werden:

Von blühenden Pflanzen werden geschlossene Röhrenblüten geerntet, deren Antheren (Staubbeutel) sich im Stadium vor der ersten Pollenmitose befinden. Die Antheren werden mittels Mikromanipulator aus den Blütenknospen entnommen und in Petrischalen übertragen, die beispielsweise mit dem Nährmedium nach Nitsch und Nitsch (Science 1969) gefüllt sind.

Anschließend werden die Petrischalen in einem Kulturraum im 16-Stunden-Tag bei 28°C Tag- und 20°C Nachttemperatur aufbewahrt. Nach circa vier Wochen beginnen die Antheren aufzubrechen und Pflänzchen herauszuwachsen. Diese sind bei diploidem Elternteil haploid, bei tetraploidem Elternteil dihaploid; sie werden nach Ausbildung von Wurzeln beispielsweise in Gartenerde getopft und im Gewächshaus zum Blühen gebracht. Diese (di)haploiden Pflanzen sind steril, können jedoch durch Sproßspitzen-, Wurzel- oder Stengelbehandlung mit Chemikalien, wie zum Beispiel Colchicin polyploidisiert werden, wobei homozygote Pflanzen entstehen, die sich dann über Samen weitervermehren lassen. Das weitere Vorgehen erfolgt wie bei der Behandlung mit Colchicin beschrieben ist.

Von den durch Pollengrößmessung und/oder Chromosomenzählung ausselektierten tetraploiden Kamillenpflanzen, die nach den vorstehend beschriebenen Möglichkeiten erhalten werden können, werden dann nochmals die Pflanzen ausselektiert, die folgende Bedingungen erfüllen:

- a) ungefähr gleichzeitiges Blühen,
- b) eine gleichmäßige, grundständige Verzweigung und eine schmale Blühzone von circa 5 cm,
- c) große Blütenköpfchen mit einem Außendurchmesser von circa 30 mm (25 bis 35 mm),
- d) Mindestgehalt an Chamazulen von 150 mg% und Bisabolol von 300 mg% und einem Gehalt an übrigen Bisaboloiden (insbesondere Bisabololoxid) unter 50 mg% (bezogen auf die getrockneten Blüten, siehe Beispiel).

Die so ausgesuchten Pflanzen werden nun vegetativ durch Stecklinge vermehrt (verklont) und über 3 bis 5 Generationen ausgelesen, wobei die Auswahl stets nach den oben angegebenen Kriterien a)–d) erfolgt. Das heißt, die gemäß den Kriterien a)–d) ausgesuchten Pflanzen werden verklont, aus den verklonten Pflanzen wird Saatgut gewonnen, die hieraus erhaltenen Pflanzen nach den Kriterien a)–d) ausselektiert und aus letzteren wieder Saatgut gewonnen.

Die Sequenz Aussaat–Selektion gemäß a)–d)–Saatgutgewinnung kann 2–4mal wiederholt werden.

Daran schließt sich nochmals eine Sequenz Aussaat–Selektion gemäß a)–d)–Verklonung–Saatgutgewinnung an.

Das zuletzt erhaltene Saatgut ist dann das Vermehrungsgut.

Die Stecklingsvermehrung erfolgt dabei auf folgende Weise: Zur Stecklingsvermehrung müssen die Ausgangspflanzen (Klonmutterpflanzen) unter Kurztagbedingungen blütenknospenfreie Kurztriebe ausbilden. Dies erfolgt im Winterhalbjahr im Gewächshaus ohne Zusatzbeleuchtung oder in Klimakammern bei einer Tageslänge von 6 bis 10, vorzugsweise 8 Stunden und Temperaturen von 10 bis 15°C, vorzugsweise 12°C. Zur Verklonung beziehungsweise Vermehrung eignen sich Blatt-, Trieb- und insbesondere Kurztrieb-(Seitentrieb-)Stecklinge. Ihre Bewurzelung erfolgt bei 12 bis 18°C, vorzugsweise 15°C und Tageslängen von 12 bis 16, vorzugsweise 14 Stunden in gespannter Atmosphäre (ca. 100% relative Luftfeuchte). Als Substrat kann beispielsweise ein Torf-Sand-Gemisch im Verhältnis 1:1 verwendet werden; es eignen sich aber auch reiner Quarzsand, Steinwolle-Stecklingswürfel, Torf-Stecklingswürfel und ähnliches.

Für die Aussaat kommen hierbei beispielsweise folgende Böden in Betracht: Gartenerde; humose, mittelschwere Lehmböden; lehmige oder humose Sandböden.

Es kann im Gewächshaus oder auch im Freiland ausgesät werden. Die Temperaturen für Keimung und Wachstum der Pflanzen liegen beispielsweise zwischen 12 bis 24°C, insbesondere 18 bis 20°C. Falls im Freiland ausgesät wird, wird vorzugsweise im Herbst (September/Oktober) oder im Frühjahr (März/April) gesät. Diese Termine gelten für sämtliche in Frage kommenden Anbaugebiete (zum Beispiel nördliche Hemisphäre, gemäßigte bis subtropische Klimagebiete).

Die so erhaltene Kamillensorte gehört zur Kulturpflanzenart der echten Kamille mit der botanischen Bezeichnung *Matricaria Chamomilla* L. (synonym *Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). Das bei einer Temperatur von höchstens 60°C getrocknete Material aus den Blüten dieser Kamille, die in dem Vegetationsstadium geerntet werden, wo 30–100% der Röhrenblüten eines Blütenköpfchens geöffnet sind, enthält mindestens 120 mg% Chamazulen, mindestens 200 mg% (-)- α -Bisabolol und weniger als 50 mg% an übrigen Bisaboloiden. Besonders günstig ist es, wenn solche Blüten getrocknet werden, die in dem Blüten-Entwicklungsstadium geerntet werden, wo erst 30–70% insbesondere 40–60% (das heißt im allgemeinen 50%) aller Röhrenblüten eines Blütenköpfchens geöffnet sind und diese dann unter Ausschluß des Sonnenlichts bei einer Lufttemperatur

von höchstens 50°C beispielsweise bei 35–50°C insbesondere 40°C getrocknet werden.

Die Trocknung kann hierbei entweder durch künstliche Luftzufuhr oder auch durch Trocknung im Schatten, gegebenenfalls auch in der Sonne erfolgen, wobei jedoch darauf geachtet werden soll, daß die Wärmezufuhr nicht über das zur vollständigen Trocknung erforderliche Maß hinausgeht. Es ist also vorteilhaft, daß man sich durch jeweilige Kontrollwägungen von der erreichten Gewichtskonstanz überzeugt. Die Trocknung kann spontan oder künstlich (zum Beispiel mit künstlicher Warmluft) erfolgen. Die Qualität des getrockneten Materials ist am besten bei spontaner Trocknung unter Ausschluß des Sonnenlichts, vorzugsweise bei Temperaturen zwischen 40–60°C, insbesondere 40–50°C. Der Trocknungsprozeß soll möglichst bald beziehungsweise umgehend nach der Ernte stattfinden. Die Trocknung soll in dünnen Schichten, beispielsweise von 5 bis 20 cm, vorzugsweise 10 cm Dicke durchgeführt werden.

Beispielsweise enthalten im Trockenschrank bei 40°C getrocknete Blüten (geerntet wo 40–60% der Röhrenblüten eines Blütenköpfchens geöffnet sind) mindestens 150 mg%, zum Beispiel zwischen 150 bis 200 mg% Chamazulen, mindestens 300 mg%, zum Beispiel zwischen 300 bis 450 mg% (-)- α -Bisabolol und nur wenig, das heißt zwischen 5 bis 50 mg% andere Bisaboloide bezogen auf die Trockensubstanz (das heißt bezogen auf das absolute Trockengewicht der Blüten). Dieses absolute Trockengewicht wird durch Trocknung einer separaten Probe von Kamillenblüten im Trockenschrank bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz (72 bis 96 Stunden) bestimmt. Der Wirkstoffgehalt der bei beispielsweise 35 bis 50°C getrockneten Blüten (Droge) wird dann auf die bei 105°C ermittelte Trockenmasse der Blüten berechnet.

Unter der Bezeichnung „übrige Bisaboloide“ werden insbesondere verstanden:

(-)- α -Bisabololoxid A und B; (-)- α -Bisabolonoxid A.

Die aus Degumill erhaltene neue Kamille kann auf allen Böden mit Ausnahme von Böden mit einem Gehalt von mehr als 20% an organischer Substanz (Humusstoffe und Bodenorganismen) erfolgreich angebaut werden; es sind keine besonderen agrotechnischen Verfahren oder Kulturmaßnahmen erforderlich; Lediglich ist für den Anbau ein Langtag mit über 13 Stunden maximale Tageslänge notwendig, das heißt für den Anbau kommen insbesondere die gemäßigten Zonen und die Subtropen in Frage.

Die aus Degumill erhaltene neue Kamille hat einen mittelspäten Erntetermin, eine einheitliche Wuchshöhe mit schmaler Blühzone und große Blütenköpfchen und ist daher besonders für mechanische Ernte geeignet. Hinzu kommt, daß zu gleicher Zeit ausgesäte Pflanzen der aus Degumill erhaltenen neuen Kamille im allgemeinen praktisch zur gleichen Zeit gemeinsam abblühen, so daß auch hierdurch die Ernte sehr vereinfacht und erleichtert wird.

Beispiel für die Herstellung des Ausgangsmaterials

Samen der Kamillensorte DEGUMILL wurden auf ein mit 0,05%iger wäßriger Colchicininlösung getränktes Filterpapier aufgebracht und bei Raumtemperatur (20°C) 6 Stunden quellen lassen. Daraufhin wurden sie vom Filterpapier entfernt, mit Wasser mehrmals gespült und in Saatkisten (Gewächshaus) ausgesät: Erde: Torf-Sand-Gemisch 1:1, Temperatur: 18–20°C, relative Luftfeuchtigkeit: circa 60%, Tageslänge bei künstlicher Belichtung: 14 Stunden.

Die keimenden Pflanzen wurden bis zur Blüte beobachtet, der Polyploidisierungserfolg wurde durch Vergleichsmessung der Pollen- und Samengröße sowie durch Chromosomenzählung der Pflanzen (F_1 -Nachkommenschaft = erste, aus Samen gezogene Nachkommenschaft der als tetraploid bestätigten colchicinierten Pflanzen) festgestellt.

Die Tetraploidisierung kann auch auf folgende Weise erfolgen:

Auf wassergetränktem Filterpapier ausgekeimte, 5 bis 7 Tage alte, gut entwickelte Kamillenkeimlinge der Sorte DEGUMILL wurden bei Raumtemperatur (20°C) für 4 bis 6 Stunden mit den Keimblättern nach unten in eine 0,05%ige Colchicininlösung gestellt. Die empfindlichen Keimwurzeln wurden dabei geschont; um Trockenschäden an ihnen zu vermeiden, muß die umgebende Atmosphäre nahezu 100% relative Luftfeuchte aufweisen. Nach der Behandlung wurden die Keimlinge mit Wasser mehrmals gespült und in Pflanzkistchen pikiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie bei den Samen.

Die Pollengrößenmessungen werden mit einem Leitz-Binokular-Forschungsmikroskop mit Mikrometer-Meßokular und Mikrometer-Objekträger durchgeführt.

Die Chromosomenzählung findet an Wurzelspitzen statt: Von den im Gewächshaus gezogenen Jungpflanzen oder Stecklingspflanzen werden 1 bis 2 cm lange frische Wurzelspitzen gesammelt, 5 Stunden in 0,002 molare Hydroxychinolin-Lösung und anschließend 15 Minuten in 1 N HCl eingelegt. Zur Untersuchung werden circa 1 mm der Wurzelspitzen mit 2%iger Orcein-Essigsäure angefärbt und in Ölimmersion mikroskopisch untersucht. Bei den in Mitose befindlichen Zellen kann so der 4fache Chromosomensatz der somatischen Zellen bestimmt werden ($4n = 36$).

Diejenigen Pflanzen, bei welchen der Pollendurchmesser um circa 50% größer als derjenige des diploiden Ausgangsmaterials (circa 30 statt circa 20 μ m) und bei denen der Chromosomensatz der somatischen Zellen auf 36 verdoppelt war (bei dem diploiden Ausgangsmaterial ist die entsprechende Zahl 18) sind tetraploid. Diese wurden ausselektiert. Ungefähr 0,1 bis 0,5% der Samen beziehungsweise der Keimlinge wurden bei der oben angegebenen Methode tetraploidisiert und entwickelten blühfähige, intakte Pflanzen. Es schließen sich nun folgende Schritte an:

Schritt 1:

Von den (wie oben beschriebenen) ausselektierten tetraploiden Kamillenpflanzen wurden diejenigen Individuen ausgelesen, die

- etwa gleichzeitig blühen,
- eine gleichmäßige, grundständige Verzweigung und eine schmale Blühzone von ca. 5 cm aufweisen,
- große Blütenköpfchen mit einem Außendurchmesser von ca. 30 mm aufweisen,
- einen Mindestgehalt für Chamazulen von 150 mg% und Bisabolol von 300 mg% erreichen oder überschreiten und deren Gehalt an übrigen Bisaboloiden (insbesondere Bisabololoxide) deutlich unter 50 mg% liegt. (Sämtliche Werte beziehen sich auf Blütenköpfchen, die bei 40°C getrocknet wurden und deren Ernte in dem Stadium erfolgte, wo erst circa 50% (40 bis 60%) der Röhrenblüten eines Köpfchens aufgeblüht waren.)

Diese Pflanzen wurden verklont. Hierzu wurden die Pflanzen (Klonmutterpflanzen) zunächst auf circa 15 cm Sproßlänge zurückgeschnitten, unter 8 bis 10 Stunden Tageslänge und 12 bis 14°C zum Neuaustrieb (kurze Seitentriebe) gebracht. Die Kurztriebe wurden geschnitten und in ein Torf-Sand-Gemisch gesteckt. Bei circa 100% relativer Luftfeuchte, 15°C Lufttemperatur und einer Tageslänge von 14 Stunden dauerte die Bewurzelung der Stecklinge 7 bis 14 Tage.

Anstelle der angegebenen konventionellen Verklonung (Stecklingsvermehrung) kann auch die in-vitro-Vermehrung teilungsfähiger Gewebspartien der Pflanze eingesetzt werden (sogenannte Meristem-Vermehrung). Zur Etablierung einer Kamillen-Kultur eignen sich verschiedene Teile der Pflanze, vorzugsweise die Sproßspitzen oder die Achselknospen.

Nach Abspülen der Pflanzen mit H_2O_2 werden unter aseptischen Bedingungen im „Laminar Flow“ (Hochleistungs-Schwebstoff-Filter mit turbulenzarmer Verdrängungsströmung) Sproßspitzen der Blattachselknospen entnommen und in Reagenzgläser übertragen, die mit einem Nährmedium, beispielsweise nach Murashige und Skoog (Physiol. Plant. 15, 473–497, 1962) gefüllt sind. Die Reagenzgläser werden in einen Klimaraum mit 12–18, vorzugsweise 16 Stunden Tageslänge (erreicht durch Fluoreszenz-Leuchtstoffröhren), einer Lichtintensität von 500–10 000 lux, vorzugsweise 1 000–3 000 lux und einer Temperatur von 15–30 °C, vorzugsweise 22–27 °C gestellt.

Sobald die Explantate ein gutes Wachstum zeigen, werden sie auf ein obengenanntes Nährmedium, jedoch mit einer höheren Cytokininkonzentration (30 mg/l N^6 -Isopentenyladenin) und wenig oder gar keinem Auxin (0–0,3 mg/l Indolelessigsäure) überführt. In der Folge strecken sich die Achsen und es werden Adventivorgane sowie vermehrt Achselknospen gebildet. Diese können nach der vorerwähnten Weise entnommen und angezogen werden.

Die für die Pflanzenvermehrung in größerer Zahl bestimmten Explantate (der 3. Passage = 3. Vermehrungsgeneration) werden nach Anwachsen und Ausbildung der Blätter auf dem erstgenannten Nährmedium auf einen Nährboden übertragen, welcher 10 mg/l Indolelessigsäure oder 3-Indolbuttersäure oder 0,1–0,3 mg/l α -Naphthyllessigsäure enthält. Dabei bewurzeln sich die Pflänzchen und können nach etwa 4 Wochen in mit sterilisierter Gartenerde (12 Stunden bei 120 °C gedämpft) gefüllte Töpfe gepflanzt und im Gewächshaus (unter Bedingungen wie für die konventionelle Stecklingsvermehrung üblich) weiterkultiviert werden.

Nährmedium nach Murashige & Skoog:

	mg/l		mg/l
NH_4NO_3	400	Indolelessigsäure	2,0
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$	144	Furfuryladenin	0,1
KNO_3	80	Thiamin	0,1
KH_2PO_4	12,5	Nicotinsäure	0,5
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	72	Pyridoxin	0,5
KCl	65	Glycin	2,0
NaFe-EDTA	25	myo-Inosit	100
H_3BO_3	1,6	Casein-Hydrolys.	1 000
$MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	6,5	Saccharose	2 %
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	2,7	gereinigtes	
KJ	0,75	Agar-Pulver	1 %

Schritt 2:

Die nach Schritt 1 erhaltenen Pflanzen blühten unter isolierten Bedingungen im Gewächshaus gemeinsam ab. Die Pflanzen standen hierbei in 11-cm-Töpfen, gefüllt mit Gartenerde, bei 18 bis 24 °C Tag- und 12 bis 14 °C Nacht-Temperatur. Die Tageslänge betrug mindestens 14 Stunden und wurde im Winterhalbjahr durch Zusatzbelichtung (200 Watt/m²) erreicht. Die Wasserversorgung erfolgte nach Bedarf.

Von der Gesamtheit der selektierten Individuen wurden über einen Zeitraum von 4 Wochen laufend diejenigen Köpfchen zur Saatgutgewinnung geerntet, die verblüht und kurz vor dem Zerfallen waren. Das Saatgut wurde nach Nachtrocknen der geernteten Blüten bei Zimmertemperatur durch Ausblasen der leichteren Blütenbestandteile gewonnen.

Schritt 3:

Aus dem nach Schritt 2 erhaltenen Saatgut wurde eine Stichprobe entnommen und hieraus circa 2 000 Nachkommen gezogen (ökologische Bedingungen wie bei Schritt 2) und nach den gleichen Kriterien a) bis d) von Schritt 1 selektiert. Mit den so selektierten Individuen wurde dann gemäß Schritt 2 verfahren.

Schritt 4:

Von dem Saatgut gemäß Schritt 3 wurde ein Teil an zwei verschiedenen Standorten im Herbst ausgesät.

Standort A)

450 m NN, 48,5° N/11,5° O,
750 mm Jahresniederschlagssumme,
feucht-gemäßigtes Klima,
Januar –10 bis 0 °C,
Juli +10 bis +20 °C,

NN = nördlich Normalnull = Seehöhe

°N = nördliche Breite (ngrad)

°O = östliche Länge (ngrad)

Standort B)

200 m NN, 42° N/1° O,
400 mm Jahresniederschlagssumme,
mediterranes Klima,
Januar 0 bis +10 °C,
Juli +20 bis +30 °C.

Die Aussaat erfolgte an beiden Standorten Ende September/Anfang Oktober.

Die so erhaltenen Feldversuchsbestände wurden hinsichtlich homogenem Wuchs, Blütengröße und Erntetermin überprüft und beurteilt (bonitiert), außerdem wurden Stichproben der Blüten auf die Wirkstoffgehalte untersucht. Aus dem Feldbestand wurden erneut diejenigen Individuen selektiert, die den bei Schritt 1 genannten Parametern entsprechen. Von diesen wird Saatgut entsprechend Schritt 2, letzter Satz, gewonnen.

Schritt 5:

Mit dem Saatgut gemäß Schritt 4 wurden die Schritte 3 und 4 in der angegebenen Reihenfolge und Weise wiederholt.

Schritt 6:

Aus dem nach Schritt 5 gewonnenen Saatgut wurden circa 1500 Individuen gezogen (Ökologische Bedingungen wie bei Schritt 2) und nach dem gleichen Prinzip, wie bei Schritt 1 angegeben ist, selektiert. Von den so ausselektierten Pflanzen wurden 34 Individuen ausgewählt und gemäß Schritt 1 verklont. Je 10 Pflanzen jedes Klons wurden in zufälliger Verteilung im Abstand 40×30 cm im Freiland (Standort A, siehe Schritt 4) an isolierter Stelle aufgepflanzt. Der Boden war Lößlehm, pH 7,0; die Pflanzung erfolgte Anfang Juni, die erste Ernte der Samen Mitte Juli, danach wurden die Pflanzen zurückgeschnitten, blühten nochmals und lieferten Mitte bis Ende August eine zweite Saatguternte.

Die Saatgutgewinnung dieses Materials erfolgte gemäß Schritt 2.

Das nach Schritt 6 erhaltene Saatgut ist das Vermehrungsgut.

Blüten von Pflanzen aus diesem Vermehrungsgut (Aussaat September/Oktober, Ernte Anfang Juni des darauffolgenden Jahres), die zu dem Zeitpunkt gepflückt werden, wenn circa 50% (40 bis 60% der Röhrenblüten eines Köpfchens geöffnet sind, und die sofort anschließend im Trockenschrank bei 40°C 72 Stunden getrocknet wurden, enthalten bezogen auf das Gewicht der getrockneten Blüten (Trockensubstanz) beispielsweise: 150 mg% Chamazulen, 300 mg% (-)- α -Bisabolol und höchstens 50 mg% übrige Bisaboloide.
