

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 285 791 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit der entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 5/04

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 N / 330 478 0 (22) 06.07.89 (44) 03.01.91

- (71) Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR, Institut für Rübenforschung, Leninallee 3a, Klein Wanzleben, 3105, DD
(72) Lux, Horst, Dr. sc.; Lohmann, Karin, Dr. agr.; Kaiser, Andreas, Dr. rer. nat.; Oehme, Johannes, Prof. Dr. agr., DD
(73) siehe (71)
(74) siehe (71)
-

(54) **Verfahren zur Langzeitlagerung bei Beta-Rüben in vitro**

(55) Beta-Rübe; Genotyp; Langzeitlagerung; in-vitro; Verfahren; Effektivität

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Langzeitlagerung bei Beta-Rüben in vitro. Ziel der Erfindung ist die ständige Verfügbarkeit wertvollen Zuchtmaterials bei Verkürzung der Züchtungszeit für neue Hybridsorten und einer Reduzierung des ökonomisch-technischen Aufwands. Erfindungsgemäß besteht das Verfahren darin, daß die Genotypen unter Zusatz von Wachstumsretardanten bei Temperaturen von +2°C bis +8°C unter weißem Schwachlicht im Bereich von 100 lx bis 3000 lx und Kurztagsbedingungen aufbewahrt werden.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Langzeitlagerung bei Beta-Rüben in vitro, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Genotypen bei Verwendung synthetischer Nährmedien unter Zusatz von Wachstumsretardanten bei Temperaturen von +2°C bis +8°C unter weißem Schwachlicht im Bereich von 100 lx bis 3 000 lx und Kurztagsbedingungen aufbewahrt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß dem synthetischen Nährmedium, üblicherweise ein Mineralsalzmedium nach Murashige und Skoog, Paclobutrazol (PP333) in einem Konzentrationsbereich von 0,001 mg/l bis 10 mg/l, vorzugsweise 0,1 bis 1 mg/l, zugesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Temperatur vorzugsweise +4°C und das Schwachlicht vorzugsweise 500 lx beträgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kurztagsbedingungen vorzugsweise unter einem Licht-Dunkel-Wechsel im 3stündigen Rhythmus gestaltet werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein effektives Verfahren zur Langzeitlagerung (Depothaltung) für die Beta-Rüben-Hybridzüchtung unter In-vitro-Bedingungen.

Bekannter Stand der Technik

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 for 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. Völknerode, Braunschweig 33 [1983] 3, S. 179-182; PETT, B. et al.: Potato Res., Wageningen 29 [1986], S. 169-172)
- 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; THIEME, R.: Diss. A, Berlin, Groß Lüsewitz, AdL der DDR [1985], 119 S.)
- Anwendung spezifischer Kulturbedingungen (MENSCHAW, M. 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. 5th 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, A 01 H 1/04, Nr. 743646 [1982], 4 S., PETT, B.; THIEME, R.: Potato Res., Wageningen 24 [1981], S. 105-110, KWIATKOWSKI, S. et al.: Amer. Potato J. Orono, Maine 65 [1988] 6, 369-37)
- 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) bzw. bei 3-4°C (RANALLI, P. et al.)

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

Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der Erfindung, durch die ständige Verfügbarkeit wertvollen Zuchtmaterials die Züchtungszeit für neue Hybridsorten bei einem relativ niedrigen ökonomisch-technischen Aufwand zu verkürzen.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mit Hilfe verfahrenstechnischer Maßnahmen wertvolles Zuchtmaterial über längere Zeiträume genetisch unverändert bei minimiertem Aufwand unter In-vitro-Bedingungen zu erhalten.

In den langwierigen Prozeß der züchterischen Bearbeitung von Zuckerrüben bis zur Sortenzulassung ergibt sich wiederholt die Notwendigkeit, selektiertes Zuchtmaterial hinsichtlich seiner Eigen- und Hybridleistung zu überprüfen. Für diesen Bedarf ist das Selektionsmaterial genetisch unverändert auf vegetativem Wege, zu erhalten. Auf Grund phytopathologischer Aspekte ist die vegetative Erhaltung mittels Verklonung über einen längeren Zeitraum nur unter In-vitro-Bedingungen möglich.

Erfindungsgemäß besteht das Verfahren darin, daß zur Verlangsamung des Pflanzenwachstums zusätzlich zur Lagerung unter Kühl- (+2°C bis +6°C) bzw. Schwachlichtbedingungen (200 lx bis 1000 lx) den synthetischen Nährmedien, wie sie für die In-vitro-Verklonung von Beta-Rüben üblich sind, Paclobutrazol (PP333), vorzugsweise in einer Menge von 0,1 mg/l, zugesetzt wird.

Der besondere Vorteil der erfindungsgemäßen Lösung besteht darin, daß sich aus der resultierenden Hemmung des Pflanzenwachstums, insbesondere des Sproßwachstums, zwei die Langzeitlagerung vorteilhaft beeinflussende Effekte ergeben.

1. Aus der Verringerung der Blattfläche der Depotkulturen resultieren geringere Wasserverluste.

2. Die Retardierung des Wachstums der Depotkulturen ermöglicht ihre Miniaturisierung und damit eine wesentlich verbesserte Raumauslastung.

Überraschenderweise führte der Einsatz von Paclobutrazol (PP333) auch zu einer Hemmung der Alterungsprozesse an den Depotkulturen und damit verbunden zu einer Verhinderung der Polyphenolausscheidung. Daraus resultierend ergibt sich eine erhöhte Vitalität der Depotkulturen, so daß die mögliche Überlagerungsdauer nicht mehr vom biologischen System und seiner Alterungscharakteristik, sondern nur noch vom physikalischen Prozeß des Wasserverlustes aus den Depotgefäßen begrenzt wird.

Überraschenderweise führte der Einsatz von Paclobutrazol (PP333) weiterhin einerseits zu einer Förderung der Bewurzelungsrate und des Wurzelwachstums und andererseits zu einer Verzögerung der Alterung des Wurzelsystems. Die Bewurzelung der Sproßkulturen ist eine notwendige Voraussetzung für eine effektive In-vitro-Depothaltung.

Die genannten Effekte bedingen eine erheblich verbesserte Eignung der Kulturen für die Langzeitalterung. Darüber hinaus wirken sich die Einschränkung der Blattfläche und die Verstärkung der Bewurzelung günstig auf die Erfolgsrate bei der Überführung bewurzelter Pflanzen in Erdkultur aus.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachstehend durch Beispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel 1

Die In-vitro-Bewurzelung erfolgt auf einem Mineralsalzmedium nach Murashige und Skoog (Physiol. Plant 15, 1962) unter Zusatz von

- 7g/l Agar
- 20g/l Saccharose
- 4mg/l Indolyl-3-Buttersäure
- 0,1mg/l Paclobutrazol (PP333)

Zur Auslösung der Bewurzelung erfolgt eine Kultur unter Langtagsbedingungen (16h Licht, 8h Dunkelheit), bei 3000lx bei 20-25°C.

Nach 3 Wochen werden die Kulturen in den Depotraum bei einer Temperatur von +4°C, einer Lichtstärke von 500lx und einem Licht-Dunkel-Wechsel im 3stündigen Rhythmus überführt.

	Bewurzelungsrate		Ausfallrate		Maximale Depotpassage (Anzahl Monate)	
	ohne PP333	mit PP333	ohne PP333	mit PP333	ohne PP333	mit PP333
Klon 1	55	64	23	22	18	24
Klon 2	40	43	34	11	12	18
Klon 3	28	44	45	13	12	18
\bar{x}	41	50	34	19		
GD: $\alpha = 5\%$		7,6	18,4			

Nach Ablauf der maximalen Depotpassage werden von den bewurzelten In-vitro-Kulturen die Sproßspitzen isoliert und für einen wiederholten Depotzyklus wieder auf das o. g. Kulturmedium aufgesetzt.

Parallel zur Depothaltung erfolgt eine züchterische Bearbeitung der mittels Depothaltung langzeitgelagerten Genotypen. Nach Vorliegen der Selektionsergebnisse aus der Erhaltungs- bzw. Neuzüchtung, in der Regel nach 4 Jahren, werden von den benötigten Klonen die Sproßspitzen aus den Depotkulturen isoliert und auf übliche Medien zur In-vitro-Verklonung aufgesetzt und der züchterischen Nutzung zugeführt.

Ausführungsbeispiel 2

Die Kulturbedingungen für die In-vitro-Bewurzelung und die Depothaltung werden, wie im Ausführungsbeispiel 1 beschrieben, gestaltet.

Zum für die züchterische Nutzung geeigneten Termin werden die Depotkulturen aus den Überlagerungsgefäßen herausgenommen und zur Anpassung an normale Wachstumsbedingungen im Freiland über eine entsprechende Zwischenpassage (Keimsand, relative Luftfeuchte von 95-98%, Temperatur von 20-30°C) in Erde überführt.