



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 296 958 A5

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

5(51) C 12 N 5/04
A 01 M 4/00
A 01 N 3/00

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 N / 300 075 8

(22) 20.02.87

(44) 19.12.91

- (71) Arzneimittelwerk Dresden GmbH, Wilhelm-Pieck-Straße 35, O - 8122 Radebeul, DE
 (72) Dietrich, Beate, Dr. rer. nat.; Gröger, Detlev, Prof. Dr. rer. nat.; Luckner, Martin, Prof. Dr. rer. nat.; Mertinat, Heidelore, Dipl.-Pharm.; Breuel, Klaus, Dr. rer. nat.; Pötter, Heinrich, Dr. rer. nat., DE
 (73) Arzneimittelwerk Dresden GmbH, O - 8122 Radebeul; Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg, O - 4020 Halle–Wittenberg; Akademie der Wissenschaften, Institut für Biochemie der Pflanzen, O - 4020 Halle (Saale), DE

(54) Verfahren zur virusfreien vegetativen Vermehrung und Erhaltung von Rauwolfia-Hochleistungspflanzen

(55) Rauwolfia-Hochleistungspflanzen; Viruseliminierung; Pathogenfreiheit; Meristemkultur; Klonpflanzengewinnung; Virustestung; Freilandadaptation; Kryokonservierung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur pathogenfreien Vermehrung und Erhaltung von Rauwolfia-Hochleistungspflanzen in vitro, das über eine lange Zeit einen innerhalb der Population gleichmäßig hohen und in seiner Zusammensetzung konstanten Alkaloidgehalt bewirkt. Dazu werden nach einer intermittierenden Temperatur- und Lichteinwirkung, die zur Eliminierung von Viren und anderen pathogenen Mikroorganismen aus den meristematischen Geweben führt, aus Meristemen, Meristemanlagen bzw. Sproßspitzen, Stengelstücken, Seitenknospen oder Blüten mit Meristemen oder Meristemanlagen unter sterilen Bedingungen auf üblichen Nährmedien, die Cytokinine und/oder Auxine enthalten können, Sprosse und Meristemgewebe angezogen, diese von den Ausgangsexplantaten abgetrennt, weiter vermehrt und vereinzelt und auf Nährlösung mit Gesteinsmehl aus Aluminiumsilikat bestimmter Korngröße zur Bewurzelung gebracht. Die so erhaltenen Pflanzen werden isoliert, in Gesteinsmehl pikiert und unter Folietunnel an Gewächshaus- bzw. Freilandbedingungen adaptiert. Die Pflanzen werden durch serologische Nachweisverfahren auf ihre Virusfreiheit getestet. Zu diesem Zwecke werden hochspezifische Antiseren hergestellt und die serologischen Nachweisverfahren für Routineuntersuchungen mit hoher Nachweissicherheit angewendet. Die Pflanzen dienen entweder der weiteren vegetativen Vermehrung oder der Saatgutgewinnung. Zur Erhaltung des genetisch hochwertigen Ausgangsmaterials werden sterile Pflanzen bei minimalen Entwicklungsbedingungen oder sterile Meristeme bei Ultratieftemperaturen konserviert und bei Bedarf rekultiviert.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur virusfreien vegetativen Vermehrung und Erhaltung von Rauwolfia-Hochleistungspflanzen durch Verklonung meristematischer Gewebe in vitro in einem für Gewebekulturen üblichen Nährmedium, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Ausgangspflanzen intermittierenden Temperatur- und Lichteinwirkungen unterwirft, aus den Pflanzen Meristeme oder Meristemanlagen bzw. Sproßspitzen, Stengelstücke, Seitenknospen oder Blüten mit Meristemen oder Meristemanlagen gewinnt, diese sterilisiert und auf einem Cytokinine und ggf. Auxine enthaltenden Nährmedium bis zur Neubildung von Sprossen und Meristemgewebe kultiviert, diese von den Ausgangsexplantaten abtrennt, vereinzelt und in an sich bekannter Weise auf einem Cytokinine und ggf. Auxine enthaltenden Nährmedium vermehrt, anschließend in auxinhaltiger Lösung badet und bis zur Bewurzelung auf Gesteinsmehl mit hormonfreier Nährlösung mit verringertem Stickstoff- und Zuckergehalt kultiviert, die so erhaltenen Pflanzen isoliert, durch Pikieren in Gesteinsmehl unter Folietunneln an Gewächshaus- bzw. Freilandbedingungen adaptiert sowie auf Pathogenfreiheit prüft und sterile Pflanzen bei minimalen Entwicklungsbedingungen oder sterile Meristeme in Anwesenheit von Kryoprotektoren bei Temperaturen von unter -100°C konserviert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Temperatur- und Lichteinwirkung über einen Zeitraum von 4–10, vorzugsweise 6–8 Wochen intermittierend 16 Stunden mit 37°C und 5000 Lux und 8 Stunden mit 24°C und Dunkelheit erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man für die Bewurzelungs- und Adaptationsphase Gesteinsmehl aus Aluminiumsilikaten mit einer Korngröße von 0,5–3 mm, vorzugsweise 1–2 mm, wie z. B. das Aluminiumsilikatmehl Perlit®, anwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Gewächshauspflanzen mit hochempfindlichen Nachweisverfahren auf der Basis eines spezifischen serologischen Tests mittels Antiseren auf ihre Virusfreiheit getestet werden.
5. Verfahren zur Konservierung von Hochleistungspflanzen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß in vitro angezogene Pflanzen im sterilen Zustand bei 0 bis 4°C und 500 bis 1000 Lux auf einem hormonfreien mit Agar oder Gesteinsmehl aus Aluminiumsilikaten, vorzugsweise Perlit, verfestigtem Nährmedium verschlossen, d. h. bei einer relativen Luftfeuchtigkeit nahe 100% aufbewahrt werden.
6. Verfahren zur Konservierung von Hochleistungspflanzen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß in vitro angezogene Meristeme nach Kryoprotektorbehandlung entweder sehr langsam (ca. 0,5 bis $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) auf -100°C oder sehr schnell durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren und dann in oder über flüssigen Stickstoff gelagert, bei Bedarf möglichst schnell wieder aufgetaut und auf einem geeigneten Nährboden weiter kultiviert werden.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Kryoprotektoren Mischungen von 5–10% Dimethylsulfoxid und 90–94% Wasser oder von 5–10% Dimethylsulfoxid, 5–10% Glycerol sowie 5–10% Saccharose und 70–85% Wasser eingesetzt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Einleitung der Konservierung die Kryoprotektoren bis zu 48 Stunden auf die Meristeme einwirken.
9. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Auftauen durch Erwärmen mit Wasser von etwa 40°C erfolgt.
10. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Kryoprotektor nach dem Auftauen aus den Meristemen langsam in das umgebende Medium diffundiert und durch Austausch des Mediums entfernt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Das zur Gewinnung von Alkaloiden für die Arzneimittelproduktion benutzte Pflanzenmaterial von Rauwolfia serpentina, Rauwolfia vomitoria, Rauwolfia tetraphylla u. a. Rauwolfia-Arten wird in Plantagen der tropischen und subtropischen Länder angebaut. Die Erfindung ermöglicht die Gewinnung von gesundem und einheitlichem Pflanzenmaterial aus ausgelesenen Hochleistungspflanzen.

Charakteristika der bekannten technischen Lösungen

Durch aufwendige Screeningverfahren ausgelesene Exemplare von *Rauwolfia serpentina*, *Rauwolfia vomitoria*, *Rauwolfia tetraphylla* u. a. *Rauwolfia*-Arten mit hohem Alkaloidgehalt, gutem Wachstum, Resistenz gegenüber Schädlingen, Krankheiten und ungünstigen Umweltbedingungen werden gegenwärtig durch Stecklinge oder Wurzelschößlinge vegetativ vermehrt. Das Verfahren begünstigt jedoch die Übertragung von Krankheiten, insbesondere Virose, von der Mutter- auf die Tochterpflanzen und ist hinsichtlich der erzielbaren Vermehrungsarten nur wenig produktiv. Auch die Regeneration von *Rauwolfia*-Pflanzen aus Zellkulturen hat sich nicht bewährt, da das Verfahren zu aufwendig ist und ein heterogenes Pflanzenmaterial erhalten wird.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die effektive Nutzung von *Rauwolfia*-Hochleistungspflanzen für die Pflanzenvermehrung bei gleichzeitiger qualitativer Verbesserung der hergestellten Tochterpflanzen und einer beträchtlichen Senkung des für die Vermehrung notwendigen Aufwandes.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung bestand darin, die Mängel der bisher bekannten Verfahren zur Erhaltung und Vermehrung von hochwertigem *Rauwolfia*-Pflanzenmaterial zu überwinden und ein Verfahren zu entwickeln, welches

- die Erhaltung des genetischen Materials einmal ausgelesener *Rauwolfia*-Hochleistungspflanzen für einen langen Zeitraum über das natürliche Lebensalter hinaus ermöglicht,
- die vegetative Vermehrung dieser Pflanzen in einer sehr hohen Zahl und mit praktischer Eignung für den Feldanbau erlaubt, wobei die erhaltenen Tochterpflanzen einen Klon mit gleichmäßig hohem und in seiner Zusammensetzung einheitlichen Alkaloidgehalt bilden und
- die Eliminierung von Viren und pathogenen Bakterien sowie die Prüfung auf Pathogenfreiheit bei den Klonpflanzen gestattet.

Durch Anbau geeigneter pathogenfreier Klone in Mischung kann in der Folge ein Hybridsaatgut erhalten werden, aus dem sich Pflanzen entwickeln, die durch Heterosiseffekt dem verklonten Ausgangsmaterial in den genannten Merkmalen noch überlegen sind.

Es wurde ein Verfahren zur virusfreien vegetativen Vermehrung und Erhaltung genetisch hochwertiger Individuen von *Rauwolfia* gefunden, wonach die Pflanzen für eine bestimmte Zeit intermittierenden Temperatur- und Lichteinwirkungen ausgesetzt werden, um vorhandene Viren aus den Meristemen und Meristemanlagen praktisch zu eliminieren. Danach werden meristematische Gewebe unter sterilen Bedingungen auf ein cytokinin- und ggf. auxinhaltiges Medium übertragen und bis zur Bildung von Sprossen oder neuem Meristemgewebe kultiviert. Diese Neubildungen werden von den Ausgangsexplantaten abgetrennt, vereinzelt und in an sich bekannter Weise vermehrt, wobei der Vermehrungszyklus sich nach Bedarf wiederholen kann. Die Bewurzelung der Sprosse erfolgt unter ebenfalls sterilen Bedingungen durch Kultivierung auf Gesteinsmehl und Bewurzelungsmedium. Die so erhaltenen Pflanzen werden isoliert, aus dem sterilen Milieu in Gesteinsmehl überführt und unter Folietunneln an Gewächshaus- bzw. Freilandbedingungen adaptiert. Im folgenden wird die Pathogenfreiheit der Pflanzen durch empfindliche Nachweisverfahren überprüft. Die pathogenfreien Pflanzen können wiederum wie oben beschrieben vegetativ vermehrt oder zur Saatgutgewinnung herangezogen werden. Die Erhaltung des Materials erfolgt durch Konservierung entweder in Form von sterilen Pflanzen als Arbeitskonserven oder in Form von sterilen Meristemen als Langzeitdepot.

Für das erfindungsgemäße Verfahren wird die Virusfreiheit erzielt, indem die Pflanzen 4 bis 10 Wochen intermittierend 16 Stunden etwa 37°C sowie etwa 5000 Lux und 8 Stunden etwa 24°C sowie Dunkelheit ausgesetzt werden.

Als Ausgangsmaterial für die Sterilkultur dienen erfindungsgemäß Meristeme oder Meristemanlagen bzw. Sproßspitzen, Stengelstücke, Seitenknospen oder Blüten mit Meristemen oder Meristemanlagen. Zur Bildung bzw. Vermehrung von Sprossen oder Meristemen wird für das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt das Kulturmedium nach Murashige und Skoog (MS-Medium, Tabelle 1) in originaler oder z. B. durch Zusatz verschiedener Cytokinine und Auxine modifizierter Zusammensetzung verwendet. Zur Bewurzelung werden die angezogenen Sprosse erfindungsgemäß kurzzeitig (1 Stunde) in einer auxinhaltigen sterilen Lösung gebadet und anschließend in Bechergläsern mit Gesteinsmehl aus Aluminiumsilikaten einer Korngröße von 0,5–3 mm und einer Nährlösung mit verringerter Stickstoff- und Zuckerkonzentration überführt. Das für die Adaptation nach der in-vitro-Phase verwendete Gesteinsmehl entspricht dem für die Bewurzelung angewandten. Der Nachweis der Virusfreiheit erfolgt erfindungsgemäß durch spezifische Testungen auf serologischer Basis. Zur Konservierung des Materials werden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren entweder die sterilen Pflanzen auf einem wuchsstofffreien Substrat bei 0 bis 4°C und 500 bis 1000 Lux aufbewahrt oder die sterilen Meristeme nach Vorbehandlung mit Kryoprotektoren, insbesondere Mischungen von Dimethylsulfoxid und Wasser oder Dimethylsulfoxid, mehrwertigen Alkoholen, vorzugsweise Glycerol, sowie Saccharose mit Wasser langsam oder sehr schnell Temperaturen von unter –100°C ausgesetzt, in diesem Bereich gelagert und zur Rekultivierung schnell aufgetaut.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht somit die Erhaltung von genetisch wertvollem Zuchtmaterial von *Rauwolfia*-Arten über einen langen Zeitraum, führt zu pathogenfreien, genetisch einheitlichen Pflanzen (Klonen) mit hoher Vitalität und qualitativ sowie quantitativ einheitlichem Alkaloidgehalt und gewährleistet die reproduzierbare Vermehrung dieses Pflanzenmaterials über lange Zeiträume, in beliebiger Menge und unabhängig von den natürlichen Vegetationsbedingungen. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können hierbei unter produktionsmäßigen Bedingungen ausgehend von einer *Rauwolfia*-Hochleistungspflanze mehrere zehntausend virusfreie Tochterpflanzen mit untereinander gleichen Eigenschaften erhalten werden.

Die Erfindung wird nachstehend anhand der Ausführungsbeispiele näher erläutert:

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Virusfreimachung von Meristemen

Rauwolfia-Pflanzen werden für 8–10 Wochen täglich für 16 Stunden einer Temperatur von ca. 37°C ausgesetzt und gleichzeitig mit weißem Licht von ca. 5000 Lux bestrahlt. Sie werden zwischen den einzelnen Wärmebehandlungen jeweils 8 Stunden bei ca. 24°C im Dunkeln aufbewahrt.

Beispiel 2

Anzucht pathogenfreier Sprosse

Sproßspitzen (Meristeme und nächstliegende Blattprimordien), Größe 0,3–0,5 mm, werden am Sproßende oder aus den Blattachseln sterilisierter Knospen von gemäß Beispiel 1 behandelten Pflanzen entnommen. Die Sproßspitzen werden auf einem Nährboden zur Entwicklung gebracht, der neben den Salzen der Tabelle 1, 0,5 mg Thiamin, 100 mg Inositol, 30 g Saccharose, 5 mg Benzyladenin und 8 g Agar sowie 2,25 g pankreatisches Pepton, 0,1 g Glucose, 0,2 g Dikaliumhydrogenphosphat und 0,3 g NaCl pro Liter enthält. Die Kultivation erfolgt bei 25°C bei einer 16stündigen Belichtung, die durch 8stündige Dunkelperioden unterbrochen wird. Nach 4 Wochen bilden sich virusfreie Sprosse und es entwickeln sich an den Blattachseln neue Sproßspitzen.

Beispiel 3

Vermehrung steriler Sprosse

Nach Beispiel 2 erhaltene Sprosse werden in einem Nährmedium, das neben den Salzen der Tabelle 1, 0,5 mg Thiamin, 100 mg Inositol, 30 g Saccharose, 2–5 mg Benzyladenin und 8 g Agar pro Liter enthält, im Hell-Dunkel-Wechsel, wie in Beispiel 1 beschrieben, kultiviert (1 Sproß auf 25 ml Medium in 100-ml-Becherglas). Innerhalb von vier Wochen bilden sich etwa 10 Tochttersprosse, die vereinzelt werden und entweder zur weiteren Vermehrung benutzt oder zu Pflanzen regeneriert werden.

Beispiel 4

Bewurzelung steriler Sprosse

Nach Beispiel 3 erhaltene Sprosse werden 1 Stunde in einer sterilen Lösung, die 25 mg/l Naphthyllessigsäure, 3 mg/l Benzyladenin, 1 g/l Wopil® und 30 g/l Saccharose enthält, gebadet. Die weitere Kultivation erfolgt in einem Medium, das neben den Salzen nach Tabelle 1, 0,5 mg Thiamin, 100 mg Inositol und 30 g Saccharose sowie zur Förderung der Wurzelbildung einen auf ein Viertel verringerten Stickstoffgehalt und auf die Hälfte gesenkten Zuckergehalt und Gesteinsmehl aus Aluminiumsilikaten mit einer Korngröße von 1–2 mm, z. B. Perlit®, enthält. Dabei sollten die Sprosse basal ca. 3–5 mm eingeritzt werden. Innerhalb von etwa 4–6 Wochen hat sich eine für die Überführung aus dem sterilen Milieu ausreichende Wurzelmasse gebildet.

Beispiel 5

Anpassung der steril vermehrten Pflanzen an Freilandbedingungen und Überprüfung der Virusfreiheit

Die nach Beispiel 4 hergestellten sterilen Pflanzen werden in Gesteinsmehl, das dem in Beispiel 4 entspricht, pikiert und unter Folietunneln kultiviert. Durch sich ständig verlängernde Lüftungszeiten wird die Luftfeuchtigkeit unter den Folietunneln vermindert, bis die Pflanzen an Gewächshausbedingungen und später an Freilandbedingungen adaptiert sind. Die Gewächshauspflanzen werden mit hochempfindlichen Nachweisverfahren auf ihre Virusfreiheit getestet. Zu diesem Zwecke werden die auf Rauwolfia-Pflanzen vorkommenden Viren isoliert.

Diese Viren werden für die Antigengewinnung nach dem Verfahren von Leiser und Richter (Arch. Phytopathol. und Pflanzenschutz 14 [1978], S. 337–350) gereinigt. Nach Aufstellen eines Immunisierungsschemas werden von Kaninchen Antisera gewonnen. Als hochempfindlicher, spezifischer Test wird der Agargel-Doppeldiffusionstest angewendet, der sich für Routineüberprüfungen besonders eignet.

Beispiel 6

Konservierung von virusfreien sterilen Mutterpflanzen

Nach Beispiel 4 hergestellte sterile Pflanzen werden auf einem hormonfreien, zur Verfestigung mit Agar oder Gesteinsmehl aus Aluminiumsilikaten mit einer Korngröße von 1–2 mm (z. B. Perlit®) versetzten Medium bei 0 bis 4°C und einer Beleuchtung von ca. 500 Lux aufbewahrt. Die Sprosse dieser Pflanzen können für einen Zeitraum bis zu 12 Monaten zur erneuten Vermehrung nach Beispiel 3 herangezogen werden.

Beispiel 7

Konservierung von Meristemen

Sterile Meristeme, die nach Beispiel 2 oder 3 erhalten wurden, werden mit Kryoprotektoren in Form von Mischungen aus 5–10% Dimethylsulfoxid und 90–95% Wasser oder aus 5–10% Dimethylsulfoxid, 5–10% Glycerol sowie 5–10% Saccharose und 70–85% Wasser versetzt und nach 12stündiger Einwirkung dieser Kryoprotektoren entweder sofort in flüssigen Stickstoff überführt oder langsam (0,5 bis 1°C/min auf etwa –100°C abgekühlt und danach in flüssigen Stickstoff überführt. Die Meristeme werden in oder über flüssigem Stickstoff beliebig lange gelagert. Bei Bedarf werden die Meristeme im Wasserbad bei +40°C schnell aufgetaut und wie in Beispiel 2 beschrieben kultiviert. Die sich entwickelnden Sprosse können nach Beispiel 3 zur weiteren Vermehrung benutzt werden.

Tabelle 1

Modifiziertes Nährmedium nach MURASHIGE und SKOOG (Physiol. Plant. 15 [1962] 479–497)

	mg/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	661,0
KH_2PO_4	170,0
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	37,3
H_3BO_3	6,2
MnSO_4	15,1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6
KJ	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
NH_4NO_3	1 650,0
KNO_3	1 900,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	370,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	50,0
Thiamin	0,5
Pyridoxin	0,5
Nicotinsäureamid	1,0
m-Inosit	100,0
Saccharose	30 000,0
Aminosäuregemisch	10,0 ml