
Themenkreis E: Wildsammlung, Inkulturnahme, Züchtung

ESL 20 Bedeutung einer effizienten Charakterisierung pflanzlicher Extrakte für die Züchtung und den Übergang von der Wildsammlung zum kontrollierten Anbau



The role of an efficient characterization of plant extracts for breeding and the transition from wild collection to controlled cultivation

Roland Geyer^a, Fred Eickmeyer^b, Michael Rettig^a, Steffen Heelemann^a, Renate Kirchhöfer^a

^alifespın GmbH, Am Biopark 13, 93053 Regensburg, roland.geyer@lifespın.de

^bESKUSA GmbH, Bogener Str. 24, 94365 Parkstetten, eickmeyer@t-online.de

DOI 10.5073/jka.2018.460.020

Siehe auch Poster **P 4**

Zusammenfassung

Die Inkulturnahme noch nicht fest etablierter Heil- und Gewürzpflanzen steht vor folgendem Dilemma: Einerseits ist eine steigende Nachfrage nach Ware aus kontrolliertem, dokumentiertem, überprüfbarem, heimischem Anbau zu verzeichnen und eine Erhöhung der Anbauflächen dieser Arten politisch gewünscht. Andererseits wird die Anbauware im Preis, je nach Versorgungslage, mit dem Preis der Ware aus Wildsammlungen verglichen. Bei vergleichbaren Qualitäten erhält dann in der Regel die preiswertere Wildsammelware den Vorzug im Einkauf.

Dies führt dazu, dass eine kontinuierliche Versorgung der Verarbeitungsbetriebe mit Ware aus kontrolliertem Anbau immer wieder zusammenbricht, da die Anbauer sich nicht auf Preise und Abnahme verlassen können. Auswege aus diesem Dilemma bestehen darin, entweder mit dem Anbau zu warten, bis die Wildsammlungen versagen oder das anzubauende Material qualitativ deutlich von der Wildsammelware abzugrenzen.

An den Beispielen Echte Arnika (*Arnica montana* L.) und Russischer Löwenzahn (*Taraxacum kok-saghyz* L.E.Rodin) wird gezeigt, dass - vom Wildmaterial ausgehend - in den ersten Selektionszyklen enorm große Zuchtfortschritte erzielt werden können; vorausgesetzt die Ziele sind klar definiert und es steht eine ausreichende Analytik-Kapazität zur Verfügung. Eine solche kann beispielweise mittels moderner Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) mit entsprechender software-basierter Datenanalyse realisiert werden und wird im Folgenden, im oben genannten Kontext, diskutiert.

Stichwörter: Inkulturnahme, Elitenselektion, NMR, Hochdurchsatzphänotypisierung

Abstract

The cultivation of not yet well-established medicinal and herbal plants faces the following dilemma: On the one hand there is an increasing demand for goods from controlled, documented, verifiable, domestic cultivation and an increase in the acreage of these species is politically desired. On the other hand, the cultivated product is compared in price, depending on the supply situation, with the price of the product from wild collections. Usually, this results in the use of the cheaper wild collected goods.

As a result, the continuous supply of raw material from controlled cultivation to the processing plants collapses time and again as growers can not rely on prices and acceptance. The solution to this dilemma is either to wait with the cultivation until the wild collections fail or the quality of the material to be grown is clearly differentiated from the wild collection.

Based on two examples, Arnica (*Arnica montana* L.) and Russian Dandelion (*Taraxacum kok-saghyz* L.E.Rodin), it is demonstrated that - starting from the wild material - high breeding progress can be achieved in the first selection cycles. A necessary precondition is, that the goals are clearly defined and that there is sufficient capacity available to analyze output traits and lead ingredients. Such can be realized for example by means of modern nuclear magnetic resonance (NMR) analysis techniques with appropriate software-based data analysis and will be discussed below.

Keywords: Domestication, elite selection, NMR, high-throughput phenotyping

Einleitung

Aktuell werden etwa 85-90% der pro Jahr benötigten Rohdrogen nach Deutschland importiert. Davon wiederum stammen etwa 70% aus Wildsammlungen (STELTER 2017, STRAUB 2017). Vermehrt führt dies zur Übersammlung vieler Arten, bis hin zum totalen Verlust. Wenn man weiterhin soziale Aspekte und die demographische Entwicklung in den Sammelländern berücksichtigt, ist mit weiterem Rückgang der Verfügbarkeit von Wildmaterial zu rechnen. Schon jetzt führt die beschriebene Situation, in Kombination mit natürlichen Schwankungen in den Beständen und Qualitäten, zu volatilen Preisen und stark jahresabhängigen Qualitäten der Rohwaren für die verarbeitende Industrie. Um dieser Situation zu begegnen und Druck von den Beständen zu nehmen, ist neben zahlreichen Aktivitäten die Wildsammlung betreffend (z.B. Programme und Ausbildung zur nachhaltigen und kontrollierten Sammlung), eine Inkulturnahme und züchterische Bearbeitung zahlreicher Arten unabdingbar.

Um dabei der Diskrepanz zwischen Marktpreisen und Kosten für Züchtung und kontrolliertem Anbau in Deutschland zu begegnen, ist eine hohe Effizienz der Prozesse nötig. Wichtiger Bestandteil ist in diesem Zusammenhang zweifelsohne eine hohe Informationsdichte in der Selektion und späteren Qualitätskontrolle der Bestände bzgl. der Chemotypen und Zielsubstanzgehalte. Innovativen Verfahren wie der modernen und softwaregestützten NMR-Analytik wird hier eine wichtige Bedeutung zukommen. Die im folgenden beschriebenen Methoden zeigen eine Option auf, die züchtungsbegleitend genutzt werden kann und auch wirtschaftlich tragbar ist. Durch Analyse von mehreren 1000 Proben pro Jahr, bei Kosten unter 50% von denen klassischer analytischer Methoden, können Züchtungsprojekte beschleunigt werden und zielgerichtet den oben dargestellten Bedarf adressieren.

Methodenbeschreibung

Insbesondere im Übergang von der Wildsammlung zum kontrollierten Anbau, ist eine effiziente Charakterisierung pflanzlicher Extrakte, wie oben beschrieben, von fundamentaler Bedeutung.

Die im Folgenden beschriebenen Projekte wurden über mehrere Jahre und damit bei über 10.000 Einzelpflanzenproben mit NMR-Analysen inkl. software-basierter uni- und multivariater Datenanalyse begleitet. Wichtige Merkmale der Methode sind deren Reproduzierbarkeit, die quantitative Erfassung der Zielmetaboliten, ohne Kalibration oder substanzabhängige Einflüsse, sowie der hohe Grad an Effizienz und damit verbunden niedrige Kosten.

Für beide Verfahren sollten 50 mg Material nicht unterschritten werden. Nach oben ist prinzipiell keine Grenze gesetzt und letztlich wird die Möglichkeit zur repräsentativen Probennahme hier den tatsächlichen Maßstab setzen. Das zu untersuchende Material wird über Nacht gefriergetrocknet und im Folgenden mittels Kugelmühle homogenisiert. Dabei können bis zu 24 Proben (je nach Laborausstattung natürlich auch mehr) parallel bearbeitet werden, mit Run-times von je einer Minute. Das gemahlene Material wird dann mit entsprechender Extraktionslösung (Löwenzahn: Toluolbasiert, inkl. 10% Toluol-d8 und internem Standard 2,6-Dimethoxyphenol (DMOP); Arnika: Methanol/H₂O 50/50 V/V, inkl. 5% D₂O und internem Standard 3-(Trimethylsilyl)propion-2,2,3,3-d₄-säure (TSP)) extrahiert, abzentrifugiert und in NMR-Röhrchen gefüllt. Die Messzeit pro Probe liegt für die genutzten 1D ¹H Messungen mit Lösungsmittelunterdrückung bei 7 Minuten und wird an 600 MHz NMR-Spektrometern realisiert. Durch Nutzung von Autosamplern und entsprechender Automatisierungslösungen ist eine Messung von bis zu 480 Proben ohne manuelle Interaktion möglich. Die resultierenden Spektren werden im Folgenden automatisch referenziert, phasen- und basislinienkorrigiert und decken einen dynamischen Konzentrationsbereich von 6 Größenordnungen ab. Die nachfolgende Quantifizierung der Zielsubstanzen (Löwenzahn: *cis*-Polyisopren; Arnika: Summe der Helenaline und Dihydrohelenaline, Gesamt und Substanzklassenbezogen) erfolgt gegen internen Standard und wird gemeinsam mit inter- und

intraserieller Qualitätskontrolle software-basiert durchgeführt. Für beide Fragestellungen können auf diese Weise etwa 100 Proben pro Tag bearbeitet und über Nacht gemessen werden.

Neben der Quantifizierung von Leitsubstanzen kann im gleichen analytischen Vorgang auch eine tiefergehende Charakterisierung, ein sogenanntes Fingerprinting, erfolgen. Trotz der auftretenden natürlichen Variabilität können z.B. über Machine Learning Verfahren Metabolit-Netzwerke, bestehend aus Konzentrationsverhältnissen, entwickelt werden, die eine hohe Klassifizierungsgenauigkeit zulassen (MUSMANN et al. 2014). Auf diese Weise kann z.B. sehr schnell erkannt werden, ob die analysierte Probe unerlaubte Zusätze enthält oder ein von der Spezifikation (Chemotyp, agronomische Merkmale, Herkunft, Sorten, kontrollierte Replikation, u.v.m.) abweichendes Inhaltsstoff-Profil aufweist. Weitere Anwendungsbeispiele wurden hierzu beispielweise präsentiert von VAN DER KOOY, 2009, KRISHNAN et al. 2005 oder TOMITA et al. 2015.

Ergebnisse

Ein Anbau in Deutschland kann sich unter Berücksichtigung der hohen Lohn- und Lohnnebenkosten nur bei qualitativ deutlich höher zu bewertendem Material lohnen. Um dies zu erreichen ist für Züchter eine effiziente Charakterisierung nötig um die gesetzten Ziele schnellstmöglich zu erreichen.

Die enge Zusammenarbeit von Züchtung (ESKUSA) und Analytik (lifespın) ermöglichte diesbezüglich u.a. bei den gezeigten Arten mit vertretbarem Kostenaufwand und innerhalb kurzer Zeit hohe Gehalte an den gewünschten Inhaltsstoffen, in Kombination mit für den Anbau relevanten agronomischen Eigenschaften, zu selektieren. Damit kann sich das entwickelte Zuchtmaterial qualitativ deutlich vom ursprünglichen Wildtyp abgrenzen und sich mittelfristig als rentable und zielführende Alternative zum Material aus Wildsammlungen etablieren.

Beispiel Arnika

Die Preise für Arnika Blütendroge schwankten in den letzten zehn Jahren teilweise um bis zu 100% (GERARD, 2018). Solch volatile Preise, letztlich Indikatoren für die Versorgungslage, sind ein Treiber für langsam wachsendes Interesse an Inkulturnahme und Anbau als Alternative zur Wildsammlung.

Zielsubstanzen bzw. Substanzklassen sind im durchgeführten Projekt Sesquiterpenlaktone vom Helenalin bzw. Dihydrohelenalin-Typ. Der Gesamtgehalt sollte möglichst hoch sein, bei gleichzeitig überwiegend Dihydrohelenalinen, analog der qualitativen Zusammensetzung in Arnika vom „spanischen Typ“.

Über definierte Signale aus Strukturen im Grundgerüst der Sesquiterpenlaktone, unabhängig von der Substitution an der Hydroxygruppe, können die Gesamtsumme, sowie die beiden Teilsummen (Helenalin und Dihydrohelenalin) bestimmt werden. Für einzelne Verbindungen (z.B. die Methacrylsäureester) konnten zusätzlich Einzelsubstanzkonzentrationen erfasst werden, die jedoch für das Züchtungsvorhaben nur informativen Charakter besitzen.

Die Selektion erfolgte auf Basis der NMR-Daten zu Gehalt und qualitativer Zusammensetzung und resultierte, nach wenigen Selektionszyklen, in einer signifikanten Steigerung der Zielparameter. Im nun vorhanden eigenen Zuchtmaterial sind die Gehalte an Dihydrohelenalinen stabil um das 3- bis 5-fache erhöht.

Beispiel Löwenzahn

Um Löwenzahn als Kulturpflanze und Rohstoff für die Kautschukindustrie zu etablieren wurden in mehreren sukzessiven geförderten Vorhaben (Tarulin, BMBF, FKZ 0315971F; Takowind, BMEL, FKZ 22002112; Tarulin II, BMBF, FKZ 031B0059F; Takowind II, BMEL, FKZ 22024015) erste Schritte realisiert. Ausgehend vom Wildmaterial sind eine Verfünffachung des Wurzelgehaltes und durch Kombination mit agronomischen Merkmalen eine mehr als Verdreifachung des Hektarertrages Kautschuk nötig, um wirtschaftlich interessant zu werden. Durch große mögliche Fortschritte in

den ersten Selektionszyklen, ist dies aber, im Gegensatz zur Züchtung etablierter Arten, bei Wildmaterial eben nicht utopisch.

Zielsubstanz in den Löwenzahnwurzeln ist das *cis*-Polyisopren, idealerweise mit einer relativ engen Molgewichtsverteilung. Im Wildtyp sind davon durchschnittlich 3% zu finden, bei einem Hektarertrag von zu Beginn 30 kg/ha. Nach ca. 5 Zyklen, entsprechend etwa der Hälfte des geplanten Weges, sind mittlerweile sowohl Kautschukgehalte in den Wurzeln, als auch Hektarerträge realisiert, die eine erfolgreiche Fortführung der Vorhaben erwarten lassen und in Relation etwa der Anzahl der erfolgten Zyklen entsprechen. Die aktuellen jährlichen Probenzahlen für die Analytik liegen über 3000, konzentriert durchzuführen in ca. 2 Monaten zum Jahresende. Um diesen Aufwand zu stemmen, bei gleichzeitig niedrigem Budget, ist die oben beschriebene effiziente Charakterisierung erneut von grundlegender Bedeutung.

Literatur

- STELTER, W., 2017: Vorstellung der Besonderheiten des Arzneipflanzenanbaus und Förderaktivitäten des BMEL. Gülzower Fachgespräche, 56, 9-21
- STRAUB, M., 2017: Besonderheiten und Potenziale des ökologischen Anbaus von Arznei- und Gewürzpflanzen. Gülzower Fachgespräche, 56, 9-21
- VAN DER KOOP, F.; MALTESE, F.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K.; VERPOORTE, R., 2009: Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. *Planta Med.*, 75(7), 763-775
- KRISHNAN, P.; KRUGER, N.J.; RATCLIFFE, R. G., 2005: Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *J. of exp. botany*, 56(410), 255-265
- TOMITA, S., NEMOTO, T., MATSUO, Y., SHOJI, T., TANAKA, F., NAKAGAWA, H., ONO, H., KIKUCHI, J., OHNISHI-KAMEYAMA, M., SEKUYAMA, Y., 2015: A NMR-based, non-targeted multistep metabolic profiling revealed l-rhamnitrol as a metabolite that characterised apples from different geographic origins. *Food Chemistry*, 174, 163-172
- GERARD, D., persönliche Mitteilung, 2018