

7. Tagung Arznei- und Gewürzpflanzenforschung, 14. bis 17. September 2014, Wien - Innovation entlang der Produktionskette

## **DSL 20 Karyologische Variabilität in Kreuzungsnachkommen – eine Herausforderung bei der Züchtung neuer Baldriansorten (*Valeriana officinalis* L. s.l.)**

*Ploidy levels in crossbred descendants – a challenge in the breeding of new varieties of valerian (*Valeriana officinalis* L. s.l.)*

**Michael Penzkofer, Heidi Heuberger, Manuel Geyer, Martin Müller**

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung (IPZ 3d Arbeitsgruppe Heil- und Gewürzpflanzen, IPZ 1a Arbeitsgruppe Gewebekulturtechniken), Vöttinger Str. 38, 85354 Freising, Deutschland  
Michael.Penzkofer@LfL.bayern.de, www.LfL.bayern.de



DOI 10.5073/jka.2014.446.020

### **Zusammenfassung**

In der Studie wurden die unterschiedlichen Ploidiestufen von Baldrianpopulationen (Herkünfte und deren Kreuzungsnachkommen) untersucht. Mittels Chromosomenzählung konnten die Ploidiestufen der Elternherkünfte bestätigt werden. Dabei zeigten die Kreuzungsnachkommen zum Teil unerwartete Ploidieniveaus.

### **Abstract**

The different ploidy levels of valerian populations (provenance populations and their crossbred descendants) were studied. Using chromosome counting the already known ploidy levels of the parental populations could be confirmed. The crossbred descendants showed partly unexpected ploidy levels.

### **Einleitung**

Die 2008 begonnene Züchtungsarbeit an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Arbeitsgruppe Heil- und Gewürzpflanzen hat zum Ziel, durch die Züchtung von neuen Baldriansorten die Rentabilität für den heimischen Anbau zu steigern. Durch Auslese und Kreuzungszüchtung soll die Drogenqualität dahingehend verbessert werden, dass auf Grund groberer Wurzeln der hohe personelle und technische Aufwand in der Nachernteaufbereitung verringert und gleichzeitig die Qualitätsanforderungen des Europäischen Arzneibuches sicher eingehalten werden.

Die züchterische Arbeit wird durch vielerlei Eigenheiten des Baldrians erschwert. So zum Beispiel durch die Ontogenese - die generative Phase setzt erst nach einer Überwinterung im zweiten Standjahr ein; durch die Blühbiologie - in der Infloreszenz befinden sich gleichzeitig alle Entwicklungsstufen; und durch eine vielfältige morphologische, genetische und cytologische (di-, tetra- und oktoploide Ploidiestufen sind bekannt) Variationsbreite.

Die unterschiedlichen Cytotypen, die es bei Baldrian natürlicherweise gibt, eröffnen Möglichkeiten der Kombination und dadurch die Entstehung neuer Variabilität und vielleicht auch neuer Pflanzeigenschaften, zum Beispiel im Hinblick auf die Fertilität der Blüten (männliche Sterilität bei triploiden Pflanzen) oder der Entwicklung einer polyploiden Reihe, die Aussagen über die Leistungsfähigkeit verschiedenerer Cytotypen zulassen würden.

Aus einigen di-, tetra- und oktoploiden Herkünften des Baldriansortiments der LfL wurden im Frühjahr 2011 reziproke Kreuzungen zwischen verschiedenen Cytotypen vorgenommen (Tab. 1) und der Ploidiegrad der entstandenen Nachkommen mittels Flow-Cytometrie überprüft. Es wurden Ploidiegrade ermittelt, die in Anbetracht der Ploidie der Eltern nicht zu erwarten waren und auch nicht erklärt werden konnten. Um auszuschließen, dass eine fehlerhafte Messung vorliegt, wurden 2013 die Ploidiegrade der Eltern und deren Kreuzungsnachkommen mittels Chromosomenzählung überprüft.

## Material und Methoden

Die Blüten (23 Blüten je Kreuzung) der Mutterpflanze wurden kurz vor dem Öffnen kastriert und bereits aufgeblühte Blüten und nicht verwendete Knospen entfernt. Die Infloreszenzen der Samenträger wurden ebenso wie die Blütenstände des Pollenspenders mit einer Pergamintüte isoliert, um eine Kontamination mit Fremdpollen auszuschließen. Temperaturabhängig entfalteten sich 2-5 Tage später die drei Narbenblätter und der reife Pollen des Kreuzungspartners wurde auf die Narbe übertragen. Die Blütenstände wurden wieder mit Pergamintüten isoliert und anschließend mehrfach auf Knospenneubildungen kontrolliert, um diese zu entfernen. Da der Blühzeitpunkt der vorgesehenen Elternpflanzen nicht immer synchron war, wurden zu früh schossende Kreuzungspartner durch einen längeren Aufenthalt in der Kühlkammer in ihrer Entwicklung verzögert.

**Tab. 1** Kreuzungs- und BLBP-Nummern der Elternherkünfte, Anzahl der Nachkommen je Kreuzung, sowie die Ploidiestufen der Elternherkünfte und die erwarteten Ploidiestufen der Kreuzungsnachkommen.

Kreuzungs- nummer	BLBP		Ploidie (2n)		Anzahl der Nachkommen	Ploidie (2n) erwartet
	Mutter	Vater	Mutter	Vater		
101	23	112	8x	2x	1	5x
103	23	20	8x	8x	13	8x
105	23	20	8x	8x	14	8x
109	87	111	4x	2x	1	3x
113	20	23	8x	8x	12	8x
114	20	87	8x	4x	3	6x

Anschließend erfolgten flow-cytometrische Messungen, um den Ploidiestatus der Nachkommen zu ermitteln. Dabei wurden unerwartete Ergebnisse erzielt. An den weiterkultivierten Pflanzen wurden 2013 durch weitere flow-cytometrische Untersuchungen und einer mikroskopischen Chromosomenzählung die Ploidielevels erneut bestimmt.

Da letztere Methode vergleichsweise viel Zeit benötigt, konnten nicht alle zur Verfügung stehenden Pflanzen analysiert werden. Aus den Elternherkünften und den Nachkommenschaften wurden, soweit vorhanden, je drei Pflanzen geprüft. Ausnahme ist die Herkunft BLBP20, von welcher nur die Chromosomen eines Klons gezählt wurden, da diese Herkunft bei der Kreuzung durch ebendiesen Klon vertreten war. Für die Chromosomenzählung ausgewählt, wurden jene Individuen, welche die meisten jungen und gesunden Wurzeln zeigten. Den Pflanzen wurden möglichst Wurzelspitzen mit etwa 1-2 cm Länge und 1 mm Durchmesser entnommen.

Diese wurden für 5 h bei etwa 15 °C in 3 ml einer 0,6 %igen wässrigen 1-Bromnaphthalin-Emulsion getaucht. Nach der Vorbehandlung erfolgte die Fixierung der Wurzeln, indem die 1-Bromnaphthalin-Emulsion durch jeweils 3 ml einer Fixationslösung ausgetauscht wurde. Die Fixationslösung bestand aus 3 Teilen Ethanol (96 %) und 1 Teil Essigsäure (98 %).

Die Fixationslösung wurde durch ein zehnmütiges Wasserbad entfernt. Das Aquadest wurde anschließend für die Hydrolyse der Proben durch jeweils 3 ml 1N HCl ersetzt und in einem Wasserbad bei 60 °C für 10 bis 12 min inkubiert. Nach einer weiteren fünfminütigen Waschung in 3 ml Aquadest und der Entfernung der anhaftenden Salzsäure, konnte mit der Herstellung des Quetschpräparats begonnen werden.

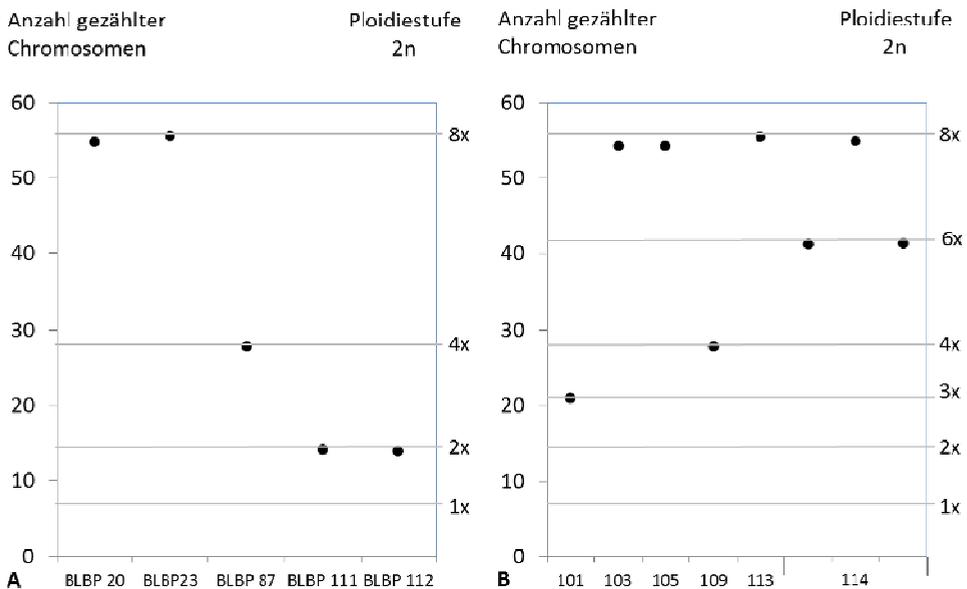
Hierfür wurde eine Wurzelspitze auf einen Objektträger gelegt, vorsichtig mit Filterpapier abgetupft und der vorderste Teil der Wurzelspitze (etwa 1 mm) mit einer Präpariernadel auf dem Objektträger ausgestrichen. Zu den entfernten Zellen des Wurzelmeristems wurde umgehend ein Tropfen Essigsäure (45 %) pipettiert und mit Hilfe der Präpariernadel vermengt. Anschließend erfolgte die Färbung der Chromosomen. Auf die zu untersuchenden Zellen wurde ein Tropfen

Färbelösung gegeben. Für die Herstellung der Färbelösung wurden 2,2 g Orcein unter leichtem Kochen in 100 ml Eisessig gelöst. Nach dem Abkühlen und Filtrieren wurde auf eine Essigsäure-Lösung (45 %) verdünnt.

Nach einer Minute Einwirkzeit der Färbelösung wurden die angefärbten Zellen etwa 5 cm über einer Flamme für 8 s erhitzt. Mit einem Durchlichtmikroskop wurden bei 1000-facher Vergrößerung die Chromosomen der Zellkerne gezählt und die Ergebnisse fotografisch festgehalten.

### Ergebnisse / Diskussionen

Die Chromosomenzählungen an den Pflanzen der Kreuzungseltern bestätigten alle zuvor angenommenen Ploidiestufen (vgl. Tab. 1 und Abb. 1), deren Chromosomenzahlen auf der Grundzahl  $n=7$  beruhen. Innerhalb der jeweiligen Herkunft wurden keine unterschiedlichen Cytotypen beobachtet. Auch die Chromosomenzahl innerhalb einzelner Pflanzen war homogen. Die Ergebnisse der Chromosomenzählung an den Elternherkünften sind in Abb. 1-A dargestellt. In Abb. 2 ist die Metaphase einer Baldrianpflanze am Beispiel der Elternherkunft BLBP 23 dargestellt.



**Abb. 1** Anzahl gezählter Chromosomen und Ploidiestufen bei Baldrian, Chromosomengrundzahl  $n=7$ : Elternherkünfte BLBP 20, BLBP 23, BLBP 87, BLBP 111 und BLBP 112; B: Kreuzungsnachkommen 101, 103, 105, 109, 113 und 114.  $N=3$ , außer  $N=1$  bei 101 und 114.



**Abb.2** Metaphase der Wurzelmeristemzellen von Baldrian am Beispiel der Elternherkunft BLBP23,  $2n=56$

Die Ergebnisse der Chromosomenzählung an den Kreuzungsnachkommen sind in Abb. 1-B dargestellt. Es wurden nicht bei allen Kreuzungen jene Cytotypen bestimmt, welche aufgrund der Ploidie der Kreuzungseltern erwartet worden sind. Der Nachkomme von Kreuzung 101 ist nicht wie erwartet pentaploid ( $2n = 4x + 1x$ ) sondern triploid.

Generell entstehen triploide Cytotypen durch die Fusion monoploider und diploider Gameten. Im Falle dieser Kreuzung könnte der triploide Cytotyp durch die Fusion eines monoploiden Pollens der Herkunft BLBP112 ( $1n = 1x$ ) mit einer diploiden Eizelle der Herkunft BLBP23 ( $1n = 2x$ ) entstanden sein. Erwartungsgemäß bildet eine oktaploide Mutterpflanze allerdings tetraploide Eizellen. Vergleichbare euploide und zugleich numerisch irreguläre Gameten haben OSELEBE et al. (2006) bei *Musa*-Hybriden dokumentiert. Wie ein cytologisch doppelt reduzierter Gamet entsteht, ist nicht bekannt. Eine irreguläre Meiose der oktaploiden Mutterpflanze ist dennoch wahrscheinlich. Da bei der Chromosomen-

zählung ausschließlich 21 Chromosomen gezählt wurden, ist Non-Disjunction vermutlich nicht die Ursache für die Triploidie des Nachkommen aus Kreuzung 101.

Bei den Kreuzungen 103, 105, und 113 stimmen die Ergebnisse der Zählungen mit den erwarteten Ploidiestufen überein. Die Nachkommen sind, wie aufgrund der Ploidie der Eltern zu erwarten war, oktaploid.

Bei dem  $F_1$ -Nachkommen aus Kreuzung 109 wurde durch die Chromosomenzählung, ein tetraploider Cytotyp festgestellt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine nicht beabsichtigte Selbstbestäubung der tetraploiden Mutterpflanze (BLBP87) in Folge einer unvollständigen Kastration. Dies könnte auch die Ursache für den oktaploiden Nachkommen aus Kreuzung 114 sein. Das gleichzeitige Vorkommen von verschiedenen Stadien (Knospe, Blüten, Samen) in der Infloreszenz des Baldrians zeigt wie wichtig es ist, nach der Bestäubung fortlaufend die sich entwickelnden Blüten zu entfernen.

Von den Ploidieniveaus der Elternherkünfte ausgehend, sollten aus Kreuzung 114 ausschließlich hexaploide Nachkommen entstehen ( $2n = 4x + 2x$ ). Allerdings entwickelten sich zwei verschiedene Cytotypen, zwei hexaploide und ein oktaploider.

### Schlussfolgerungen

Die Einzelblütenbestäubung bei Baldrian ist schwierig und diffizil, daher ist diese Methode eher für die experimentelle Saatguterzeugung geeignet und wird sich nicht in einem größeren Maßstab bei Kreuzungen im Rahmen des Züchtungsprogramms anwenden lassen. Die mikroskopische Chromosomenzählung stellte sich als aufwändig, aber als eine sichere Methode zur Identifizierung des Cytotyps dar. Wie sich bestätigte, entstanden Nachkommen mit nicht erwarteten Ploidiestufen. Auch innerhalb einer Nachkommenschaft stellten sich unterschiedliche Ploidiestufen ein. Wenn sich jedoch die Cytotypen nicht exakt vorherbestimmen lassen, scheint die Nutzung von intercytotypischen Kreuzungen (beispielsweise zur Erstellung einer Ploidiereihe oder zur Erzeugung von triploiden und dadurch womöglich samensterilen Sorten) sich nur schwer verwirklichen zu lassen.

### Danksagung

Gedankt sei all denen, die durch ihre fachliche und praktische Hilfestellung bei Problemen diese Arbeit ermöglicht haben. Dies waren an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft Herr

Baumann (LfL, IPZ 1a) und Frau Schultheiß (LfL, IPZ 1a), sowie am Fachgebiet Obstbau der TU München Herr Dr. Neumüller.

Die Baldrianzüchtung ist Teil des Verbundvorhabens „Verbesserung der internationalen Wettbewerbsposition des deutschen Arzneipflanzenanbaus am Beispiel der züchterischen und anbautechnologischen Optimierung von Kamille, Baldrian und Zitronenmelisse (KAMEL)“ und wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt.

### **Literatur**

OSELEBE, H.O., TENKOUANO, A. und PILLAY, M., 2006: Ploidy variation of *Musa* hybrids from crosses. African Journal of Biotechnology 5: 1084-1053.