

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

P 11 Die Verwendung von Isoenzym-Polymorphismen - eine Herausforderungen bei der Züchtung neuer Baldriansorten (*Valeriana officinalis* L. s.l.)

*The Application of Isozyme-Polymorphism – a challenge in the breeding of new varieties of valerian (*Valeriana officinalis* L. sl)*

Michael Penzkofer¹, Heidi Heuberger¹, Manuel Geyer¹, Berta Killermann¹, Monika Konnert²

¹Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung (IPZ 3d Arbeitsgruppe Heil- und Gewürzpflanzen, IPZ 6d Arbeitsgruppe Saatgutforschung und Proteinelektrophorese), Vöttinger Str. 38, 85354 Freising, Deutschland

Michael.Penzkofer@LfL.bayern.de, www.lfl.bayern.de, www.lfl.bayern.de

²Bayerisches Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht (ASP),

Forstamtsplatz 1, 83317 Teisendorf, Monika.Konnert@asp.bayern.de,

www.asp.bayern.de



DOI 10.5073/jka.2014.446.041

Zusammenfassung

Mit Hilfe von Isoenzym-Polymorphismen sollte versucht werden, biochemische Unterschiede (Fingerprint) zwischen verschiedenen Baldrianherkünften darzustellen, um im Anschluss diejenigen Individuen zu finden, die durch Kreuzung und nicht durch Selbstung entstanden sind. Bei Baldrian konnte für diese Methode kein Verfahrensprotokoll etabliert werden, womit auch eine Untersuchung von Kreuzungsnachkommen nicht erfolgte.

Abstract

The aim of this work was to develop a method to distinguish different origins of valerian by isozyme polymorphisms (fingerprint) in order to identify selfings and crossings in breeding generations. In valerian a protocol could not be established, whereby an analysis in crossbreed descendants also did not happen.

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. Diese Variationsbreite erleichtert einerseits das Erzeugen von neuer Variabilität, andererseits kann die Fixierung von gewünschten Merkmalen dadurch auch erschwert und die Züchtungsarbeit langwierig werden.

Baldrian wird in der Literatur als Fremdbefruchter beschrieben (HEEGER 1956), jedoch sind keine Angaben zu finden ob und in welchem Ausmaß es bei freier, zufälliger Bestäubung (Panmixie) auch zur Selbstbefruchtung innerhalb einer Pflanze kommt. Diese Information ist jedoch für die geplante Züchtungsarbeit von großer Bedeutung, da bei der Produktion von Hybridsaatgut im Idealfall nur Samen aus der Kreuzung zwischen den Elternlinien entstehen sollen.

Zur Überprüfung ob Saatgut durch Selbstung oder Fremdbefruchtung entstanden ist, können Polymorphismen unterschiedlichster Art genutzt werden. Es ist in diesem Zusammenhang nur wichtig, dass sich die Eltern in mindestens einem homozygot vorliegenden morphologischen

Merkmal, molekularen oder biochemischen Marker unterscheiden. Es wurde zunächst versucht, biochemische Marker (Isoenzyme) zu nutzen.

Isoenzyme sind Genexpressionen, mit deren Hilfe Polymorphismen im Phänotyp und damit auch im Genotyp gefunden werden können. Nach MARKERT und MÖLLER (1959) sind Isoenzyme multiple molekulare Formen eines Enzyms mit ähnlicher oder gleicher Funktion. Einzelne Isoenzyme können gewebe-, entwicklungs- oder artspezifisch sein und unterscheiden sich in ihrer elektrophoretischen Mobilität.

Da es bislang für Baldrian kein Verfahrensprotokoll gab, wurden zunächst verschiedene Extraktions- und Elektrophoreseverfahren für die unterschiedlichen Isoenzymssysteme geprüft. Diese Arbeiten wurden an der LfL in Freising in Zusammenarbeit mit Prof. Müller-Starck (ehemals Fachbereich für Forstgenetik an der TU München) sowie am Bayerischen Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht in Teisendorf durchgeführt.

Material und Methoden

2009 wurden in Freising je 40 Pflanzen aus vier tetraploiden Baldrianherkünften (BLBP 45, 58, 60, 85) auf mögliche Polymorphismen zwischen den Herkünften und auch innerhalb der Herkünfte untersucht. Das Saatgut der Herkünfte stammte aus einer panmiktischen Vermehrung 2008. Die Anzucht der Jungpflanzen erfolgte im Sommer 2009 als pikierte Einzelpflanzen. Im 2- bis 4-Blattstadium (etwa sieben Wochen nach der Aussaat) wurden die Pflanzen für eine Woche bei etwa 5 °C in einer Klimakammer mit 16 h/Tag Belichtung kühl gestellt. Intern gesammelte Erfahrungen zeigten, dass die Ergebnisse der Gel-Elektrophorese sich nach einer Kälte-Vorbehandlung besser auswerten lassen sollten. Die Beprobung erfolgte an den jüngsten Blättern da diese nach SOLTIS und SOLTIS (1989) eine höhere enzymatische Aktivität aufweisen als älteres Blattmaterial. Für die Herstellung des Extrakts wurden für die Stärkegel-Elektrophorese (SGE) pro Pflanze Blattmaterial in der Größe von etwa 2 cm², für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) von etwa 7 cm² entnommen und bis zur Extraktion kühl aufbewahrt.

Die SGE erfolgte in horizontalen Elektrophorese-Kammern (Model Desaphor HE 125) bei Stromstärken zwischen 60 und 180 mA, einer Spannung von 500 V und einer Laufzeit von 5-6 Stunden. Die PAGE der Superoxid-Dismutase (SOD) wurde bei 25 mA und 300 V für 3,5 Stunden in einer Multigel-Long-Kammer der Firma Biometra durchgeführt. Im Anschluss an die Trennung wurden die Gele, nach kurzem Einwirken eines Vorpuffers, mit der jeweils enzymespezifischen Färbelösung bei 39 °C, Dunkelheit und stetigem Schütteln für 0,5 Stunden (PAGE) bzw. 1-2,75 Stunden (SGE) gefärbt.

Zusätzlich wurden anfang Februar 2011 zehn sich in Winterruhe befindende Baldrian Pflanzen aus BLBP 14, 20, 21, 83, 89, 90, 96 und 99 nach dem SGE-Protokoll für Buche des ASP untersucht. Es wurden Proben von kleinen Blattaustrieben (sofern vorhanden) oder von noch nicht ausgetriebenen Blattknospen der im Gewächshaus überwinterten Pflanzen für die Untersuchungen verwendet. An zwei Pflanzen der Herkünfte BLBP 20 und 99 erfolgte zusätzlich die Beprobung von Adventivwurzeln.

Die Trennung erfolgte mittels SGE bei 60-180 mA, mittels PAGE bei 25 mA. Für Isocitrat-Dehydrogenase (IDH), Aconitase (ACO), Malat-Dehydrogenase (MDH) und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-PGDH) wurde 2011 der Tris-Citro Puffer, sowie Gerbu-Stärke oder ein Gemisch von Gerbu- und Biomol-Stärke verwendet. Bei Phosphogluco-Isomerase (PGI) und Glutamat-Oxalacetate-Dehydrogenase (GOT) erfolgte die Trennung mit dem Ashton-Puffer und Biomol-Stärke. 2009 wurde für die Trennung Toronto-Stärke verwendet. Die Laufzeit betrug zwischen 3,5 und 6,0 Stunden. Die Färbung erfolgte mit der jeweiligen enzymespezifischen Reaktionslösung.

Die in Freising und Teisendorf untersuchten Isoenzymssysteme sind in Tabelle 1 aufgeführt. Das GDH (Isoenzymssystem Glutamat-Dehydrogenase) und SOD wurden nur in Freising, das Isoenzymssystem GOT nur in Teisendorf untersucht.

Tab. 1 Elektrophoresemethode und Puffersystem zur Trennung der jeweiligen Isoenzyme für die Suche nach Polymorphismen in den Baldrianherkünften BLBP 45, 58, 60, 85 in 2009 und BLBP 14, 20, 21, 83, 89, 90, 96, 99 in 2011

Labor \ Jahr	Abkürzung	Isoenzymssystem	Trennmethode	Puffersystem	pH-Wert		Stromstärke [mA]		Trenndauer [h]	
					2009	2011	2009	2011	2009	2011
Freising \ 2009	GDH	Glutamat-Dehydrogenase	SGE	Tris-Citro	7,5		180		5,5	
	SOD	Superoxid-Dismutase	PAGE	Tris-Borsäure	7,1		25		3,5	
	ACO	Aconitase	SGE	Ashton	8,1	8,1	60	180	5	5,75
	IDH	Isocitrat-Dehydrogenase	SGE	Tris-Citro	7,5	7,5	180	180	5,5	5,75
	MDH	Malat-Dehydrogenase	SGE	Tris-Citro	7,8	7,5	160	180	6	5,75
	MNR	Menadion-Reduktase	SGE	Ashton	8,1	8,1	60	100	5	5,75
	PGI	Phosphogluco-Isomerase	SGE	Ashton	8,1	8,1	60	100	5	5,75
	PGM	Phosphoglucomutase	SGE	Tris-Citro	7,8	7,5	160	180	6	5,75
	SKDH	Shikimat-Dehydrogenase	SGE	Tris-Citro	7,5	7,5	180	180	5,5	5,75
	6-PGDH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	SGE	Tris-Citro	7,8	7,5	160	180	6	5,75
Teisendorf \ 2011	GOT	Glutamat-Oxalacetate-Dehydrogenase	SGE	Ashton		8,1		100		5,75

Ergebnisse und Diskussion

Die Intensität der Färbung, die Interpretation der Bandenmuster und die Anzahl der beobachteten Färbezonen (d. h. Loci) sind in Tabelle 2 für die 170 Individuen aus 12 Baldrianherkünften dokumentiert. Details wie die Anzahl kodierender Allele und die Struktur der Isoenzyme konnten 2009, mit Ausnahme von ACO, MNR und PGI, wegen der schlechten Interpretierbarkeit der Zymogramme nicht ausgewertet werden. Im System SOD konnte keine Färbung der Gele erzielt werden.

In Abb. 1 sind die 2009 entstandenen Zymogramme der Individuen 10 bis 20 von BLBP 45 für die Isoenzymssysteme ACO, MNR und PGI abgebildet. Insgesamt sind bei Betrachtung aller Individuen bei ACO zwei Loci zu beobachten. Locus A weist zwei Allele auf, ist jedoch überwiegend monomorph (kaum Variationen). Bei Locus B werden drei Allele vermutet. Die vorliegende Enzymstruktur ist monomer. MNR weist nur einen Locus auf, bei welchem drei Allele vermutet werden. Die beobachtete Enzymstruktur von MNR ist monomer. Bei PGI konnten, wie bei ACO, zwei Färbezonen beobachtet werden. Während Zone A vermutlich zwei Allele aufweist, finden sich in Zone B drei Allele. Die Enzymstruktur ist aufgrund schlechter Trennschärfe nicht zu erkennen. Bei der Interpretation der Zymogramme wurde von einer monomeren Struktur ausgegangen.

Auffällig ist die große Ähnlichkeit der Zymogramme von ACO, PGI und MNR. Die Bandenmuster ACO-B sind, von wenigen Banden abgesehen, identisch mit PGI-B. Ebenso gleicht das Zymogramm der MNR dem B-Locus von ACO und PGI. Diese Auffälligkeit wurde ausnahmslos bei allen Elektrophorese-Läufen beobachtet. Es wurde angenommen, dass beobachtete Unterschiede im Bandenmuster auf die relativ schlechte Interpretierbarkeit zurückzuführen sind. Der Verdacht, dass ein substratunspezifisches Enzym die Färbung katalysiert, wurde versucht auszuräumen. Hierzu wurde eine Farblösung, bestehend u. a. aus Tris-HCl-Vorpuffer getestet. Es wurde keinerlei Färbung der Gele erzielt. Welches Enzym in diesem Versuch tatsächlich die Färbung bei den Zymogrammen der ACO, der PGI und der MNR verursacht, kann auf dieser Informationsgrundlage nicht beantwortet werden. Mit ACO, MNR und PGI ist daher ausschließlich das im Labor entstandene Zymogramm, und nicht das eigentliche Isoenzymssystem, gemeint.

Tab. 2 Allgemeine Qualität der Färbung und der Interpretierbarkeit der Zymogramme sowie die Anzahl der Färbezonen in Abhängigkeit vom Isoenzymssystem; Baldrianherkünfte 45, 58, 60, 85 in 2009 und BLBP 14, 20, 21, 83, 89, 90, 96, 99 in 2011

Labor \ Jahr	Isoenzym-system	Färbezonen (Loci)	Färbung	Interpretierbarkeit	Variation
Freising \ 2009	ACO	2	gut	mäßig	wenig
	GDH	2	schlecht	schlecht	nicht auswertbar
	IDH	2	gut	schlecht	nicht auswertbar
	MDH	3	gut	schlecht	nicht auswertbar
	MNR	1	gut	mäßig	vorhanden
	PGI	2	gut	schlecht	wenig
	PGM	---	mäßig	schlecht	nicht auswertbar
	SKDH	1	mäßig	schlecht	nicht auswertbar
	SOD	---	---	---	---
	6-PGDH	1	gut	schlecht	nicht auswertbar
Teisendorf \ 2011	ACO	2	gut	Blatt/Trieb: schlecht; Wurzel: g	wenig
	GOT	3	Loci A und B gut, C nur bei Wurzel	Blatt/Trieb: schlecht; Wurzel: g	vorhanden
	IDH	1 ?	gut	schlecht	nicht auswertbar
	MDH	Viele, komplex	gut	schlecht	nicht auswertbar
	MNR	---	keine	---	---
	PGI	2	gut	Locus A gut, Locus B schwierig, bei Wurzel besser	vorhanden
	PGM	2, überlappend	gut	Variabel; Wurzel tw. besser	vorhanden
	SKDH	1	gut	Gut, Wurzel tw. besser	keine
	6-PGDH	3	stark	Variabel; Wurzel tw. besser	wenig

ACO - Aconitase; GDH - Glutamat-Dehydrogenase; GOT – Glutamat-oxalacetate-Dehydrogenase; IDH - Isocitrat-Dehydrogenase; MDH - Malat-Dehydrogenase; MNR - Menadion-Reduktase; PGI - Phosphogluco-Isomerase; PGM – Phosphoglucomutase; SKDH - Shikimat-Dehydrogenase; SOD - Superoxid-Dismutase; 6-PGDH - 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase

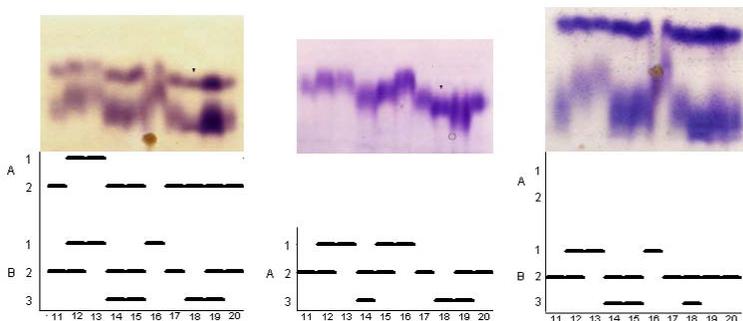


Abb. 1 Zymogramme und deren Interpretation (v.l.n.r) der Isoenzymssysteme Aconitase (ACO), Menadion-Reduktase (MNR) und Phosphogluco-Isomerase (PGI) der Individuen 11 bis 20 der Baldrianherkunft BLBP 45.

In den Untersuchungen 2011 waren die meisten Enzymsysteme gut angefärbt (siehe Tab. 2); die Interpretation war beim Blatt- bzw. Triebmaterial bis auf wenige Ausnahmen schwierig. Dagegen waren die Banden der beiden Wurzelproben meist deutlich besser abgegrenzt. Auf Grund der schwierigen Interpretation waren genaue Aussagen zur Variation und Abweichung der Individuen nur bei PGI und GOT möglich. Im System GOT wird bei Extraktion aus Wurzelmaterial das größte Potenzial zur Nutzung von Polymorphismen gesehen.

Schlussfolgerungen

Die Nutzbarmachung der Isoenzym-Polymorphismen würde weitere Versuchsreihen zur Verbesserung der Methode auf der Basis von Wurzelextrakten erfordern. Welchen Einfluss die Ontogenese und der Tagesrhythmus auf die Aktivität einzelner Isoenzyme in Baldrian hat, ist nicht untersucht worden. Da Isoenzyme entwicklungs- und gewebespezifisch sein können (MARKERT UND MOLLER 1959) muss damit auch bei Baldrian gerechnet werden, zumal die aus Pflanzen unterschiedlichen Alters und verschiedenen pflanzlichen Geweben gewonnenen Ergebnisse darauf hindeuten. Zudem ist wegen des eher seltenen Auftretens von Polymorphismen und der geringen Anzahl von Loci eine Prognose über deren Auftreten und Nutzung in potenziellen Inzuchtlinien sehr ungewiss. Daher wurde dieser Weg beendet und molekulare Marker, deren Untersuchungsmethode für Baldrian mittlerweile etabliert ist, für die Klärung der Fremdbefruchtungsrate angewendet.

Danksagung

Gedankt sei all denen, die durch ihre Bereitstellung von Labor- und Arbeitszeitkapazitäten, ihre fachliche und praktische Hilfestellung bei Problemen diese Arbeit ermöglicht haben. Dies waren am Lehrstuhl für Forstgenetik der TU München Herrn Prof. Dr. Gerhard Müller-Starck (emeritiert seit April 2011) und Herr Paetsch, an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft Frau Silke Vana (IPZ 6d) und am ASP Frau Susanne Nowak.

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:

- HEEGER, E.F., 1956: Handbuch des Arznei- und Gewürzpflanzenbaues. Deutscher Bauernverlag, Berlin
MARKERT, C.L. and F. MOLLER, 1959: Multiple Forms of Enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci., Washington
SOLTIS, D.E. and S.S. SOLTIS, 1989: Isozymes in Plant Biology, Chapman and Hall, London