

Erweiterung der genetischen Basis bei tetraploidem Rotklee (*Trifolium pratense* L. var. *sativum*)

P. Westermeier, S. Hartmann

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung – Züchtungsforschung und Pflanzenbausysteme bei Futterpflanzen, Am Gereuth 4, 85354 Freising, stephan.hartmann@lfl.bayern.de

Einleitung und Problemstellung

Rotklee (*Trifolium pratense* L. var. *sativum*) wird zusammen mit anderen kleinkörnigen Leguminosen und verschiedensten Gräserarten häufig in Saatgutmischungen im Feldfutterbau eingesetzt. Bezogen auf die Anbaufläche zählt Rotklee zu den wichtigsten heimischen Eiweißpflanzen in Deutschland und leistet damit einen entscheidenden Beitrag, Eiweißimporte zu verringern. Am Markt sind di- und tetraploide Sorten verfügbar, wobei sich tetraploide Sorten in der Regel durch höhere Biomasseerträge (Liatukas und Bukauskaitė, 2012) und einem höheren Rohproteingehalt auszeichnen (Julén, 1959), was sich langjährig anhand der in der beschreibenden Sortenliste veröffentlichten Daten bestätigen läßt (Anonymus, 2018). Aus diesem Grund werden tetraploide Sorten bevorzugt in hochwertigen Saatgutmischungen verwendet. Jedoch ist der flächenbezogene Saatgutertrag bei tetraploiden Sorten im Mittel der Jahre niedriger (Liatukas und Bukauskaitė, 2012 und Referenzen darin) und die Saatgutversorgung ist aufgrund von jährlich stark schwankenden Saatguterträgen nicht in jedem Jahr gesichert. Die Aufklärung der Ursachen hierfür war und ist Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Vleugels et al. (2019) nennen u.a. meiotische Störungen und eine im Vergleich mit Diploiden erhöhte Selbstungsrate als mögliche Gründe. Tetraploider Rotklee kommt nicht natürlicherweise vor. Neue Sorten basieren häufig auf einzelnen diploiden Einzelpflanzen, deren Chromosomensatz mit Colchizin verdoppelt wurde oder aus Kreuzungen zwischen bestehendem tetraploiden Material, was die vergleichsweise enge genetische Basis von tetraploidem Rotklee erklärt. Um die genetische Basis von tetraploidem Rotklee zu erweitern und als Untersuchungsmaterial für künftige Forschungsprojekte, wurden durch Polyploidisierung von diploidem Sortenmaterial neue tetraploide Populationen entwickelt. Zielgröße waren dabei 100 tetraploide Pflanzen je behandelte Sorte.

Material und Methoden

Als Ausgangsmaterial der Arbeiten dienten 11 diploide Rotkleesorten, die in Tab. 1 dargestellt sind. Die Samen der einzelnen Sorten wurden vor der Colchizinbehandlung für jeweils fünf Tage auf Filterpapier in Petrischalen bei Raumtemperatur vorgekeimt. Colchizininlösungen in Konzentrationen von 0,2%, 0,4% und 0,6% (jeweils mit 2% DMSO und Tween80, bei einem pH-Wert von 5,5) wurden eingesetzt, um die optimale Colchizinkonzentration zu ermitteln. Nach einer Inkubationszeit von jeweils 3 Stunden wurden die Sämlinge in einem Teesieb für 30 Minuten mit Wasser gespült und anschließend für fünf Tage auf Filterpapier weiterkultiviert. Anschließend wurden die Sämlinge in Kultursubstrat überführt. Zum Zeitpunkt der Entwicklung des 5. bis 6. Laubblattes wurde die Anzahl überlebender Pflanzen bestimmt. Zur Selektion der tetraploiden Individuen wurde ein Laubblatt in 700 µl Färbelösung (CyStain UV Ploidy; Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit einer scharfen Rasierklinge zerkleinert und nach Filtration über CellTrics Filter (Maschenweite 5µm-150µm) mit einem

Flowcytometer (CyFlow Cube; Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland) der Ploidiegrad bestimmt. Als Referenz diente Sortenmaterial bekannter Ploidiestufe.

Tab. 1: Diploide Rotkleesorten als Ausgangsmaterial für die Polyploidisierung

	Blühbeginn Tage nach 1. April	in D zuge- lassen seit	Züchter
Avisto	58	2017	ILVO, Belgien
Global	61	2002	ILVO, Belgien
Harmonie	64	2007	NPZ Lembke
Kontiki	64	2010	NPZ Lembke
Lucrum	73	1968	Saatzucht Steinach
Merula	53	2003	FAL Reckenholz, Schweiz
Milvus	53	1997	Deutsche Saatveredelung
Nemaro	60	1986	Saatzucht Steinach
Odenwälder Rotklee	58	1955	(Badische Landessaatzuchtanstalt) heute ZG Raiffeisen eG
Suez	-	-	DLF, Dänemark
Violetta	-	-	ILVO, Belgien

Ergebnisse und Diskussion

Insgesamt wurden 6.199 nach der Colchizinbehandlung überlebende Sämlinge auf ihre Ploidiestufe hin untersucht. Über alle Sorten hinweg betrachtet, konnten 1.194 tetraploide Pflanzen und 10 oktaploide (8x) Pflanzen detektiert werden. 1.062 Pflanzen zeigten einen chimären Zustand, bei dem 2x und 4x-Zustand gleichzeitig in einer Pflanze auftreten. Diese wurden, ebenso wie die 3.933 diploiden Pflanzen nicht weitergeführt.

Bei separater Betrachtung der einzelnen Colchizin-Konzentrationen kann festgestellt werden, dass mit ansteigender Colchizin-Konzentration die Erfolgsrate der Chromosomenverdopplung zunimmt. Eine Colchizinkonzentration von 0,2% ergab 14,9% tetraploide Pflanzen (in 10 Sorten getestet), eine Colchizinkonzentration von 0,4% erhöhte den Anteil tetraploider Pflanzen auf 21,7% (in 11 Sorten getestet). 0,6% Colchizin resultierten in 33,9% tetraploider Pflanzen, dieser Ansatz wurde aufgrund der starken Schädigung der Keimlinge und der damit einhergehenden langen Erholungsphase aber nur für 3 Sorten durchgeführt. Die Anteile chimärer Pflanzen in den drei Colchizinkonzentrationen lagen in ähnlichen Bereichen, wie die Anzahl der rein tetraploiden Pflanzen (12,4%, 19,8% und 32,8%). Die Überlebensraten der Sämlinge in den Konzentrationsstufen 0,4% und 0,6% lagen bei jeweils 30 %, für die Konzentration 0,2% liegen die Daten leider nicht vor.

Neben den durch verschiedene Colchizin-Konzentrationen verursachten Unterschieden in der Aufdopplungsrate, kann im dargestellten Sortenpanel darüber hinaus eine starke Sortenabhängigkeit der Polyploidisierungsraten festgestellt werden. Abb. 1 zeigt die für die einzelnen Sorten und Colchizinstufen erzielten Ergebnisse. Die geringste Polyploidisierungsrate wurde in der Sorte Nemaro (0,2% Colchizin) mit 8,6 % festgestellt, die gleichzeitig auch die höchste Rate mit 41,4% bei 0,6% Colchizin aufwies. Die Spanne für die Behandlung mit 0,2% Colchizin reichte von den schon genannten 8,6% bei der Sorte Nemaro bis 20,6% bei der Sorte Lucrum. In der Variante 0,4% Colchizin wurden Polyploidisierungsraten zwischen 15,5% in der Sorte Avisto und 37,9% in der Sorte Merula erreicht. In der Variante 0,6% Colchizin wie-

sen die beiden Sorten Lucrum und Milvus sogar leicht verringerte Polyploidisierungsraten auf, lediglich die Sorte Nemaro zeigte eine weitere Steigerung auf 41,5%.

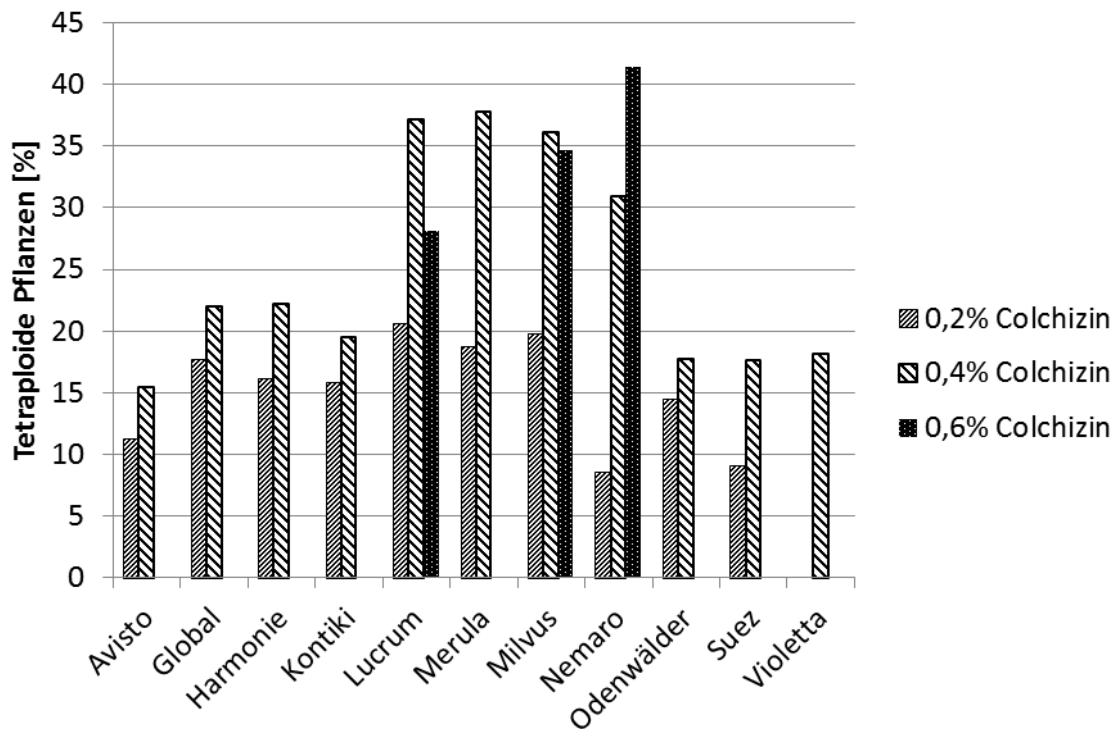


Abb. 1: Anteil tetraploider Rotkleepflanzen in Abhängigkeit von eingesetzter Colchizin-Konzentration und Sorte

Mit dieser Arbeit vergleichbare Resultate werden in der Arbeit von Ghidoni und Graz (1965) beschrieben. Die Autoren testeten Colchizin-Konzentrationen zwischen 0,1% und 0,5% sowie Einwirkdauern zwischen 30 Minuten und 3 Stunden, jedoch zusätzlich unterstützt von kurzzeitig angelegtem Unterdruck. Die optimale Colchizin-Konzentration in Bezug auf Überlebensrate und erfolgreicher Polyploidisierung wurde bei 0,25% Colchizin und 75 Minuten Einwirkdauer identifiziert. Die Erfolgsquote lag bei 25,9% bezogen auf die Anzahl der überlebenden Pflanzen. Boller et al. 2010 berichten von üblicherweise eingesetzten Colchizin-Konzentrationen bei Rotklee-Sämlingen zwischen 0,02 und 0,4%, jedoch geringeren Überlebensraten in Höhe von ca. 10%. In älterer Literatur wurde sogar eine 1%ige Colchizinlösung zur Polyploidisierung vorgeschlagen (Julén, 1959 und Referenzen darin), ohne jedoch Überlebensraten anzugeben.

Schlussfolgerungen

Bei Betrachtung von genetisch diversem Sortenmaterial hat sich gezeigt, dass eine Colchizin-konzentration von 0,4 % und eine Einwirkdauer von drei Stunden einen guten Kompromiss zwischen Polyploidisierungsrate und dem weiteren Entwicklungsverlauf der Pflanzen darstellt. Durch die angestrebte Anzahl von mind. 100 polyploidisierten Pflanzen je Akzession und deren offenes Abblühen innerhalb dieser 100 Pflanzen ist zudem sichergestellt, dass eine breite genetische Basis für zukünftige Forschungsarbeiten, sowie neue Diversität für die Entwicklung neuer tetraploider Sorten geschaffen wurde.

Literatur

Anonymus (2018) Beschreibende Sortenliste Futtergräser, Esparsette, Klee, Luzerne 2018. Hrsg. Bundessortenamt Hannover.

Boller B., Schubiger F.X., Kölliker R. (2010) Red Clover. S. 439-456. In: Boller B., Posselt U.K., Veronesi F. Handbook of Plant Breeding – Fodder Crops and Amenity Grasses. Springer Verlag.

Ghidoni A., Graz F. (1965) Ottenimento di Poliploidi in *Trifolium pratense* a Seguito di Trattamenti Con Colchicina. *Caryologia* 18, 327-347.

Julén G. (1959) Rotklee, *Trifolium pratense* L. S. 242-305. In: Kappert H., Rudolf W. Handbuch der Pflanzenzüchtung, Band IV – Züchtung der Futterpflanzen, 2. Auflage. Verlag Paul Parey.

Liatukas Z., Bukauskaitė J. (2012) Differences in yield of diploid and tetraploid red clover in Lithuania. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B* 66, 163-167.

Vleugels T., Van Laere K., Roldán-Ruiz I., Cnops G. (2019) Seed yield in red clover is associated with meiotic abnormalities and in tetraploid genotypes also with self-compatibility. *Euphytica* 215, 79.