

Mitteilungen und Nachrichten

Aus den Arbeitsgemeinschaften der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung (GPZ):

Tagung der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung, AG 17 Arznei- und Gewürzpflanzen 2021

Frank Marthe

Die Gesellschaft für Pflanzenzüchtung (GPZ), AG 17 Arznei- und Gewürzpflanzen veranstaltet regelmäßig Vortragstagungen zu allen Aspekten, die mit der züchterischen Optimierung von Arten aus dieser Nutzungsgruppe der Sonderkulturen in Verbindung stehen. Hierzu zählen Fragen zu Menge und Zusammensetzung sekundärer Metaboliten, zu agronomischen und phytopathologischen Merkmalen ebenso, wie zur Inkulturnahme von Arten, die bislang in Wildbeständen besammelt werden.

Die Veranstaltung am 10. und 11.06.2021 im Julius Kühn-Institut (JKI) in Quedlinburg umfasst sechs Vorträge mit einem Schwerpunkt zu Forschungsarbeiten bei Johanniskraut (*Hypericum perforatum*, Abbildung 1). Beiträge zu den Kulturen Kamille (*Matricaria recutita*) und Kümmel (*Carum carvi*) werden ebenfalls vertreten sein. Auch Entwicklungen zu einem modularen Trockner zur Trocknung von Arznei- und Gewürzpflanzen werden dargestellt.

Ich freue mich auf die Informationen und die Diskussionen, die wir erforderlichenfalls auch Online führen werden.

(Quedlinburg, den 01.05.2021,
Dr. Frank Marthe)

Bewertung der Funktionalität des modularen Trockner-Prototyps im Trocknungsprozess von Heilpflanzen

Barati, Z.¹, Esper, A.², Müller, J.¹

¹Institut für Agrartechnik, Fachgebiet Tropen und Subtropen (440e), Universität Hohenheim, 70599 Stuttgart

²Innotech Ingenieursgesellschaft mbH, Weilemer Weg 27, 71155 Altdorf
E-Mail Ziba Barati: ziba.barati@uni-hohenheim.de

Der Anbau von Arznei- und Gewürzpflanzen stellt in Deutschland eine wirtschaftlich interessante Nische der landwirtschaftlichen Produktion dar. Die Arznei- und Gewürzpflanzen haben eine kurze Vorratsdauer und müssen für die spätere Verwendung in der Lebensmittel-, Kosmetik-, Pharma- und Kräuterindustrie unbedingt konserviert und gelagert werden. Die Heil- und Gewürzpflanzen sollten sofort nach der Ernte getrocknet werden, um Qualitätsverluste zu vermeiden. Durch den Einsatz geeigneter Trocknungssysteme kann die Produktqualität gesteigert und die Verluste reduziert werden. Für etablierte Betriebe mit einer Anbaufläche von mehr als 50 ha sind in Deutschland



Abb. 1. blühendes Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) in einem artenreichen Feldrain am Rand des Campus Klein-Altendorf der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

Affiliation

Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen, Quedlinburg

Kontaktanschrift

Dr. Frank Marthe, Leiter AG 17 der GPZ, Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg,
E-Mail: frank.marthe@julius-kuehn.de

verschiedene Trocknertypen auf dem Markt verfügbar. Für kleinere Erntemengen, wie sie für Einsteiger in die Arzneipflanzenproduktion typisch sind, fehlt es jedoch an wirtschaftlichen Lösungen auf dem Markt. Daher ist es Ziel dieser Arbeit einen praxistauglichen und kostengünstigen modularen Trockner (Abbildung 2) zu entwickeln. In Zusammenarbeit mit der Firma Innotech wurde inzwischen ein Prototyp gebaut. Durch den Einsatz von Trocknungsboxen (Abbildung 1) besitzt der Modultrockner eine hohe Flexibilität hinsichtlich einer steigenden Erntemenge bei einer Ausweitung der Anbaufläche, ausgehend von einer Anfangsfläche von 1 ha. Dieser Trockner hat eine Länge von 4,2 m, eine Breite von 2 m und eine Höhe von 3 m und kann mit 140 Boxen mit den Maßen 60×40×22 cm befüllt werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, die Trocknungsfläche um 14,4 m³ durch das zweite Modul (2,4×2×3 m) zu erweitern. Der Trockner ist auch für verschiedene Pflanzentypen, Verarbeitungsformen (z. B. ganze Pflanze, Stecklinge) und Pflanzenfraktionen (z. B. Blätter, Blüten, Wurzeln) geeignet. Um die Trocknungseffizienz zu erhöhen, ist der Modultrockner mit einer teilweisen Luftrückführung durch Frischluft ausgestattet. Durch Öffnen der Klappen wird die abgesaugte Luft mit Frischluft vermischt. Außerdem soll die Nutzung und Kombination verschiedener Wärmequellen möglich sein, um fossile Energie zu sparen. Die vorläufigen Ergebnisse zeigen, dass der Luftstrom und die Wärme gleichmäßig auf die einzelnen Boxen im Trockner verteilt werden, was auf das große Potenzial dieses Trockners für die Anwendung in der Heilpflanzenproduktion hinweist. Die Funktionalität des modularen Trockners wird von Mai bis August 2021 an der Universität Hohenheim systematisch in Bezug auf Handhabung, Luftstrom, Wärmeverteilung, Energieverbrauch sowie Gleichmäßigkeit und Qualität der getrockneten Produkte untersucht. Der Trockner wird auch bei unterschiedlichen Betriebsbedingungen (z. B. unterschiedliche Trocknungstemperaturen von 35, 55 und 75 °C) für verschiedene Pflanzenformen (Ganzpflanzen und Stecklinge) getestet. Zusätzlich wird die Kapazität des Trockners für verschiedene Fraktionen von Heilpflanzen (Blätter, Stängel, Wurzeln) untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie könnten Anfängern in der Heilpflanzenproduktion neue Perspektiven eröffnen, indem diese Details über das modulare Trocknersystem als neuen Ansatz für die Trocknung liefern.

Förderung

Diese Forschung wurde gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) aufgrund eines

Beschlusses des Deutschen Bundestages über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) unter der Projektnummer FKZ:22021317

Möglichkeiten von Genotyping by Sequencing (GBS) bei Arzneipflanzen am Beispiel Kümmel (*Carum carvi*)

VON MAYDELL, D., MARTHE, F.

Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg
E-Mail Daniel von Maydell: daniel.maydell@julius-kuehn.de

Die deutlich gesunkenen Kosten im Bereich der Next Generation Sequencing (NGS)-Methoden ermöglichen auch deren Nutzung bei der Züchtungsforschung an Sonderkulturen wie den Arznei- und Gewürzpflanzen. Das Genotyping by Sequencing (GBS) ist eine NGS-Methode zur Genotypisierung einer hohen Anzahl an Genotypen (ELSHIRE et al., 2011). Durch den Einsatz von Restriktionsenzymen wird eine Genomreduktion vorgenommen. Nichtsdestoweniger wird durch GBS eine hohe Genomabdeckung erreicht. Zur Auswertung der Sequenzdaten ist ein Referenzgenom zwar vorteilhaft, jedoch nicht zwingend erforderlich. Dies ist wichtig, weil für die meisten Arzneipflanzen, wie Kümmel noch kein Referenzgenom vorliegt. Üblicherweise werden GBS-Daten zur Detektion von Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) genutzt, es kann aber auch ein Screening auf Simple Sequence Repeats (SSRs) durchgeführt werden. Beide Marker-Typen sind co-dominant, das heißt sie ermöglichen die Unterscheidung des heterozygoten Zustands von beiden homozygoten Zuständen in einem biallelen Kontext.

Im Kümmelprojekt von 2017 bis 2020, gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) (FNR: FKZ 22023215) haben wir uns aufgrund der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten für die Durchführung eines GBS entschieden. Zentrale Ziele waren die Aufklärung der Populationsstrukturen und der genetischen Diversität innerhalb verfügbarer Kümmelakzessionen, die Detektion von Marker-Merkmalassoziationen und die Analyse der Auskreuzungsrate mittels eines co-dominanten Marker-Systems. Insgesamt wurden 137 Akzessionen genotypisiert. Siebzig Akzessionen waren zweijährig und 67 einjährig, das heißt ohne Vernalisationsbedarf. Auf Basis der GBS-Reads wurde zunächst eine sogenannte „Mock-Reference“ erstellt (Clustering), was notwendig ist, wenn kein Referenzgenom vorliegt.



Abb. 2. Der modulare Trockner-Prototyp an der Universität Hohenheim (links) und die Trocknungsboxen im Inneren des Trockners (rechts)

Letztendlich führte die weitere Auswertung zur Detektion von 13.155 SNPs mit allen gewünschten Qualitätseigenschaften. Auch wenn sich das SNP-Set für die weiteren Analysen als äußerst geeignet erwies, wurden doch auch einige Nachteile der GBS aufgedeckt (KIM et al., 2016). So enthielten viele Marker Fehlstellen und eine unnatürlich hohe Heterozygotie wurde detektiert, was auf Fehler im Clustering zurückzuführen sein könnte. Generell dürfte eine GBS deutlich mehr und qualitativ hochwertigere SNP-Marker liefern, wenn ein Referenzgenom vorliegt.

Zuerst wurde das SNP-Set zur Analyse der Populationsstrukturen verwendet wurde (VON MAYDELL et al., 2021). Es wurde ein Bayesisches Clustering (STRUCTURE), eine Hauptkoordinatenanalyse und ein Neighbor-Joining durchgeführt. Alle Analysen zeigten die Aufspaltung der Akzessionen in zwei Subpopulationen, die weitgehend deckungsgleich mit dem Blühtyp waren. Zudem wurden generell die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Akzessionen aufgedeckt. Solche Informationen sind wichtig in neuen Züchtungsprogrammen, um möglichst diverses Ausgangsmaterial für Kreuzungen und Selektionen zusammenzustellen. Berechnete Kennzahlen der genetischen Diversität zeigten eine ähnlich hohe Diversität im zweijährigen wie im einjährigen Genpool.

Die genotypisierten Akzessionen wurden in den Jahren 2018–2020 ebenfalls für wichtige Merkmale phänotypisiert. Dies ermöglichte die Durchführung einer Genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) zur Detektion von Marker-Merkmal-Assoziationen. Für die GWAS wurden mehrere Modelle getestet, die auf gemischt linearen Modellen (MLMs) basieren. MLMs erlauben die Einbeziehung sowohl der individuellen verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Akzessionen (kinship) als auch der Populationsstrukturen. Dies war in der vorliegenden genetisch strukturierten Population äußerst wichtig. Es wurden Marker-Assoziationen unter anderem mit Blühtyp, Ätherischölgehalt, Kornausfallrate und Tausendkorngewicht gefunden. Die gefundenen Marker sollten zunächst weiter in Kartierungspopulationen getestet werden, bevor diese in der Marker-gestützten Selektion (MAS) eingesetzt werden können. Die Nutzung von MAS wäre ein Meilenstein für die Züchtungsforschung an Kümmel.

Für die MAS ist die Überführung der SNP-Marker in ein diagnostisches Marker-System erforderlich. Das PACE-Marker-System (ähnlich zu KASP) ist hier ein gutes, Hochdurchsatz-geeignetes System, das mittels einer qPCR-Plattform durchgeführt wird. Auf Basis von GBS-Daten konnte dieses für Kümmel unkompliziert implementiert werden (VON MAYDELL et al., 2020). In diesem Fall wurden die Marker zur Bestimmung der Auskreuzungsrate genutzt, die für Kümmel bis dato unbekannt war. Im Mittel wurde eine Auskreuzungsrate von 66.5 % und eine hohe Variabilität zwischen den Genotypen gefunden. Kenntnis der Auskreuzungsrate ist wichtig zur Auswahl einer geeigneten Züchtungsmethode.

Zusammenfassend erwies sich die GBS als sehr robuste Genotypisierungsmethode mit vielen Anwendungsmöglichkeiten und nur kleineren Schwächen, die durch die hohe Anzahl an Markern ausgeglichen wurden. Während für die Bearbeitung einzelner wissenschaftlicher Fragestellungen klassische Marker-Systeme noch günstiger sein können, dürfte sich GBS als nachhaltig und kosteneffizient erweisen, wenn die Daten für eine Vielzahl an Analysen genutzt werden.

Literatur

ELSHIRE, R.J., J.C. GLAUBITZ, Q. SUN, J.A. POLAND, K. KAWAMOTO, E.S. BUCKLER, S.E. MITCHELL, 2011: A robust, simple genotyp-

- ing-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. Plos One 6 (5), DOI: 10.1371/journal.pone.0019379.
- KIM, C., H. GUO, W.Q. KONG, R. CHANDNANI, L.S. SHUANG, A.H. PATERSON, 2016: Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs. Plant Science 242, 14–22, DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.04.016.
- VON MAYDELL, D., J. BRANDES, H. LEHNERT, W. JUNGHANNS, F. MARTHE, 2020: Breeding synthetic varieties in annual caraway: observations on the outcrossing rate in a polycross using a high-throughput genotyping system. Euphytica 217, 1, DOI: 10.1007/s10681-020-02732-5.
- VON MAYDELL, D., H. LEHNERT, T. BERNER, E. KLOCKE, W. JUNGHANNS, J. KEILWAGEN, F. MARTHE, 2021: On genetic diversity in caraway: Genotyping of a large germplasm collection. PLoS One 15, e0244666, DOI: 10.1371/journal.pone.0244666.

Entwicklung einer sterilen Kamillensorte zur Erweiterung der Anbaufläche in Deutschland

Otto, L.-G.¹, Sonnenschein, M.², Faehrich, B.³, Franz, C.³, Ruzicka, J.³, Novak, J.³, Fraust, B.¹, He, S.¹, Himmelbach, A.¹, Plocharski, B.², Bubner, U.², Albrecht, S.², Plescher, A.², Sharbel, T.¹

¹Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Corrensstraße 3, 06466 Gatersleben

²PHARMAPLANT Arznei- und Gewürzpflanzen Forschungs- und Saatzucht GmbH, Straße am Westbahnhof 4, 06556 Artern

³Veterinärmedizinischen Universität Wien, Institut für Angewandte Botanik, Veterinärplatz 1, A – 1210 Wien

E-Mail Lars-Gernot Otto: ottol@ipk-gatersleben.de

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestags über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe

Die Echte Kamille, *Matricaria recutita* L., ist eine der wichtigsten Arzneipflanzen mit einer langen Tradition zur Behandlung diverser Beschwerden wie Infektionen und Entzündungen der Haut, gastrointestinale Beschwerden und Atemwegsprobleme. Neben ihrer wirtschaftlichen Bedeutung trägt der Anbau der Kamille zur Agrobiodiversität bei. Kamille wird zwar auf ca. 1.100 ha in Deutschland angebaut, doch deckt dies nur einen kleinen Teil des Bedarfs. Eine Stabilisierung und Ausweitung des Anbaus von Arznei- und Gewürzpflanzen in Deutschland und damit aufgrund der Bedeutung insbesondere auch von Kamille ist wünschenswert. Neue Flächen lassen sich allerdings nur schwer gewinnen, da die Samen 10 – 15 Jahre im Boden keimfähig bleiben und Kamille als Beikraut schwer zu bekämpfen ist. Auf den vorhandenen Flächen findet eine Akkumulation der Kamillenkrankheiten statt, da der Fruchtwechsel ausbleibt. In den letzten Jahren sorgt neben Echtem und Falschem Mehltau sowie *Septoria matricariae* ein neuer Schadpilz, *Rhoxocerosporidium* sp. nov., im Anbau für Ertragseinbußen (FNR-Pressemittteilung, 23.03.2021).

Eine sterile Sorte erzeugt durch interploide Kreuzungen, vergleichbar den etablierten triploiden sterilen Sorten in der Obst- und Zierpflanzenzüchtung, wäre eine Lösung für diese Problemstellung, da die unreifen Blütenköpfe der Kamille vor der Samenbildung geerntet werden. Die Fremdbefruchtungsrate bei Kamille wurde auf ca. 70 % bestimmt, bei hoher genotypabhängiger Variabilität und einem gewissen Umwelt- bzw. Standorteinfluss. Da Kamille somit nur ein überwiegender Fremdbefruchter ist, müssen für die notwendige Bestäubungslenkung bei der Erzeugung steriler triploider Pflanzen Selbstungen ausgeschlossen werden. Hierzu wurden verschiedene Wege verfolgt, stabile männlich sterile und weiblich fertile Mutterlinien zu entwickeln: Selbstinkompatibilität (SI), kern-

genetisch-männliche Sterilität (MS) sowie cytoplasmatisch männliche Sterilität (CMS). Des Weiteren wurde die chemische Kastration mit verschiedenen Gametoziden sowie der Einfluss von hohen Temperaturen während der Blüte untersucht, die allerdings nicht zu einer ausreichenden MS geführt haben. Es gelang, Pflanzen zu identifizieren, die bei wiederholten Selbstungen keinen Kornansatz zeigten. Die SI scheint allerdings stark von Umweltfaktoren abhängig und damit schwer kontrollierbar zu sein. Während die Erzeugung von CMS durch Kreuzungen entsprechender Eltern noch in der Entwicklung ist, konnten spontan auftretende MS-Kamillensorten in zwei Populationen gefunden werden. Zwei MS-Linien wurden daraus generiert, eine in der diploiden Sorte 'Bona', die andere in einer tetraploiden italienischen Handelsherkunft. Nach Bestäubung mit MF-Pflanzen der gleichen Linie betrug das Verhältnis von sterilen Pflanzen 26 % in der F₂-Generation/23 % in der F₃-Generation für die 'Bona'-Linie und 11 % in der F₂-Generation für die Handelsherkunft Italien. Diese Verhältnisse deuten auf einen rezessiven Vererbungsweg hin.

Um die genetische Basis der männlichen Sterilität zu entschlüsseln, wurden 159 Pflanzen beider Linien, d. h. 90 MS- und 69 MF-Pflanzen, mittels Genotyping-by-Sequencing (GBS) analysiert. Eine Analyse der genetischen Diversität mittels der Software STRUCTURE unter Verwendung der SNP-Marker zeigte, dass sich die italienische Herkunft deutlich von 'Bona' unterscheidet. Um molekulare Marker zu identifizieren, die mit MS assoziiert sind, wurden die GBS-SNPs für eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) verwendet. Die bislang am stärksten mit MS assoziierten SNPs waren in 80–90 % der MS-Pflanzen vorhanden, wurden allerdings auch in 4–7 % der MF-Pflanzen nachgewiesen. Derzeit wird eine Transkriptomanalyse durchgeführt, um Unterschiede in der Genexpression zwischen 8 MS- und 4 MF-Pflanzen aufzudecken und damit die genetischen Faktoren und mögliche molekulare Marker für MS zu identifizieren. Das Transkriptom der Blütenköpfe jeweils 3 verschiedener Entwicklungsstadien wurde *de novo* mit der Galaxy-Pipeline assembliert. Erste Ergebnisse ergaben 490 hoch- und 263 herunterregulierte Gene.

Triploide Kamillensorten als ein Weg zu einer sterilen Sorte wurden sowohl spontan entstanden in Sorten identifiziert, als auch durch gezielte interploide Kreuzungen zwischen di- und tetraploiden Pflanzen erzeugt. Die Charakterisierung von 16 daraus stammenden triploiden Genotypen im Vergleich zu deren di- und tetraploiden Geschwisterpflanzen zeigte die Eignung Triploider zur Entwicklung steriler Kamillensorten. Die triploiden Pflanzen hatten eine sehr hoch ausgeprägte bis vollständige Sterilität und erwiesen sich agronomisch als hinreichend leistungsfähig. Der Ertrag war bei den Triploiden mindestens auf dem gleichen Niveau wie bei den Tetraploiden, mit einzelnen triploiden Genotypen von deutlich höherem Ertrag. Die Blühdauer als Merkmal, das die Länge des möglichen Erntefensters bestimmt, war von di-, tri- und tetraploiden Pflanzen im Durchschnitt als gleich zu bewerten.

Bei geschlossenem Feldanbau als sterile Population könnten ggf. bereits MS-Linien die Ziele einer sterilen Sorte erfüllen.

Im Rahmen der Arbeiten erfolgte erstmalig eine Analyse der genetischen Diversität von 30 Kamillensorten/-populationen verschiedener Herkunft mittels der NGS-Methode GBS. Mit 6.495 SNP-Markern wurde eine detaillierte Analyse der genetischen Diversität von insbesondere wirtschaftlich genutzten Herkünften durchgeführt. Diese zeigte, dass viele (14) der im Anbau verwendeten tetraploiden Herkünfte genetisch sehr ähnlich sind. Des Weiteren wurden durch genomweite Assoziationskartierung (GWAS) mit der Blühzeit und dem wichtigen Inhaltsstoff alpha-Bisabolol assoziierte SNP-Loci identifiziert,

die zur Entwicklung entsprechender Marker für die Selektion in der Züchtung dienen können.

Momentan finden am IPK Gatersleben parallel Arbeiten statt, ein erstes Referenzgenom (draft genome assembly) für Kamille zu erstellen. Dieses wird für alle weiteren Forschungsaktivitäten bei Kamille hinsichtlich Genetik und Genomik eine sehr hilfreiche Ressource darstellen.

Mit allen insgesamt erzeugten Daten können neue Forschungs- und Züchtungsaktivitäten angestoßen werden, wie z. B. zur Züchtung von erforderlichen Krankheitsresistenzen bei Kamille oder zur Verbesserung des Inhaltsstoffprofile/-gehalts, um die aktuellen Probleme im Kamillenanbau in Deutschland zu adressieren.

Doppelhaploiden-Technik bei Johanniskraut: Stand der Entwicklung

Wallbraun, M., Bleichner, S., Nagel, A.

RLP AgroScience, Breitenweg 71, 67435 Neustadt/Weinstraße

E-Mail: michael.wallbraun@agrosience.rlp.de, Tel.: 06321 671 1350, 06321 671 1350

In der modernen Pflanzenzüchtung stellt die Doppelhaploiden-Technik eine wichtige Methode dar, um in kurzer Zeit homozygotes Pflanzenmaterial aus Mikrosporen herzustellen. Über 200 Sorten von 12 verschiedenen Kulturarten wurden bereits mithilfe dieser Technik entwickelt, darunter vor allem Sorten von Raps, Gerste, Paprika, Reis und Weizen. In den letzten Jahren wurden die Bemühungen verstärkt für Medizinalpflanzen diese Methodik zu nutzen. Für die Anwendung der Mikrosporen-Kultur erwiesen sich bisher nur wenige Spezies als geeignet. Als positive Beispiele sind hier Dill, Fenchel und Anis zu nennen, bei denen doppelhaploide Linien mit interessanten Eigenschaften bereits in Zuchtprogrammen genutzt werden. Die Antheren-Kultur konnte bereits bei vielen Medizinalpflanzen-Spezies erfolgreich etabliert werden. Jedoch besteht bei dieser Methode die Gefahr, dass der Ursprung einer Pflanzenregeneration das Antheren-Gewebe ist und nicht die Mikrosporen sind. Auch waren die wenigsten Protokolle effizient genug, um routinemäßig in Zuchtprogrammen eingesetzt zu werden.

Die Züchtung von Johanniskraut wird durch seine fakultativ apomiktische Befruchtung erschwert, Zuchtziele konnten durch Selektionszüchtung erreicht werden. Neue Eigenschaften können jedoch nicht konventionell über Kreuzungen eingebracht werden. Ein gezieltes Umschalten vom apomiktischen zum sexuellen Befruchtungstyp ist nicht möglich. Für eine Kombinationszüchtung müssen geeignete sexuelle Linien identifiziert werden. Apomiktische Linien sind sehr heterogen, rezessive Allele sind für die konventionelle Züchtung nicht oder nur schwer nutzbar. In homozygoten, doppelhaploiden Pflanzen können jedoch rezessive Allele zur Ausprägung gebracht werden, die phänotypische Variabilität wird dadurch erhöht. Das Ziel eines von der FNR gefördertes Projektvorhabens war die Etablierung eines Systems zur Herstellung von haploiden bzw. doppelhaploiden (DH) Johanniskrautlinien. Hierzu wird die prinzipielle Fähigkeit unreifer Pollenzellen (Mikrosporen) genutzt, über Androgenese zu haploiden Pflanzen regenerieren zu können. Es wurde die Anwendung sowohl der Antheren- als auch die Kultur isolierter Mikrosporen getestet.

Als Ausgangsmaterial für das Vorhaben stand uns eine Sammlung unterschiedlicher Johanniskraut-Herkünfte zur Verfügung. Darunter befinden sich diploide, tetraploide und hexaploide Genotypen, Genotypen mit obligat apomiktischer und

obligat sexueller als auch mit fakultativ apomiktischer Fortpflanzung. Das durch Stressapplikation induzierte Umschalten der Entwicklung hin zur Androgenese kann von Veränderungen bestimmter cytologischer Marker begleitet werden, wie z. B. Vergrößerung der Zelle, Größenreduzierung der Stärkekörner und Zentrierung des Zellkerns. Mit der Induktion einhergehend wurde in Mikrosporen eine Veränderung der Chromatin-Modifikationen festgestellt. Histon-Modifikationen können auch durch Chemikalien ausgelöst werden, z. B. durch Trichostatin A, ein chemischer Inhibitor der Histon-Acetylase. In unseren Experimenten konnte Trichostatin A in Kombination mit einer Kühle-Vorbehandlung die Zellteilungsrate und die Bildung von Multizellstrukturen in der Mikrosporenkultur von Johanniskraut erhöhen. Bei einem Genotyp wurde eine Weiterentwicklung bis zu globulären Embryo-Strukturen beobachtet. Die Entwicklung stagnierte jedoch in diesem Stadium.

In der Antheren-Kultur wurde u. a. Trichostatin A bzw. Abscisinsäure in Kombination mit einer Kühle-Vorbehandlung der Knospen getestet. Nach 4–5 Wochen bildeten sich erste Kalli an den Antheren aus. Nach weiteren 4 Wochen regenerierten Pflanzen aus den Kalli. Bisher konnten 437 Pflanzen mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Bei 11 Pflanzen wurde der haploide Chromosomensatz im Vergleich zu den Ausgangspflanzen nachgewiesen. Da auch polyploide Regenerate nachgewiesen wurden, kann eine spontane Aufdopplung während der Regeneration nicht ausgeschlossen werden. Eine Mikrosatelliten-Analyse von 236 Pflanzen konnte jedoch keine rein doppelhaploiden Pflanzen nachweisen.

Unsere Ergebnisse unterstreichen die Möglichkeit einer erfolgreichen Etablierung der DH-Technik bei Johanniskraut. Die Arbeiten werden momentan fortgeführt.

Johanniskraut – von der Grundlagenforschung zur Anwendung

Wang, J.¹, Schwedtman, K.¹, Liu, K.¹, Schulz, S.¹, Haberstroh, J.¹, Schaper, G.¹, Wenke, A.¹, Naumann, J.², Wenke, T.², Tabatabaie, M.S.², Wanke, S.^{2*}, Weigand, J.J.^{1*}

¹Technische Universität Dresden, Fakultät Chemie und Lebensmittelchemie, Institut für Anorganische Molekülchemie

²Technische Universität Dresden, Fakultät Biologie, Institut für Botanik, Zellescher Weg 20b, 01062 Dresden

E-Mail Jan J. Weigand: jan.weigand@tu-dresden.de, Stefan Wanke: stefan.wanke@tu-dresden.de,

Die Gattung *Hypericum* ist eine Pflanzengattung innerhalb der Familie der Johanniskrautgewächse (Hypericaceae), die ca. 460 Arten umfasst – Sträucher, Kräuter und Bäume, und ist vor allem in den gemäßigten und tropischen Regionen der Welt verbreitet. Das Echte Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) wird bereits seit der Antike als Heilpflanze verwendet, unter anderem für die Behandlung von Verbrennungen, Hautproblemen und Depressionen. Die medizinischen Wirkungen werden dabei den Sekundärmetaboliten, vor allem den Hypericinderivaten Hypericin und Pseudohypericin, zugeschrieben. Bei der Aufklärung der Hypericin-Biosynthese konnten durch RIZZO et al., 2019 neue Kenntnisse gewonnen werden: so erfolgt die Synthese aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA nun nicht mehr über den Präkursor Emodin, sondern über Penicillipsoin mit Hilfe von verschiedenen Enzymen wie OKS (octaketide synthase), PKC (polyketide cyclase) und POCP (phenol oxidative coupling protein). BBE (berberine bridge enzyme) katalysiert die weitere Umwandlung in Protohypericin, welches schließlich unter Lichteinwirkung nichtenzymatisch in Hypericin umgewandelt wird.

Zur Erlangung weiterer Erkenntnisse der allelischen Zusammensetzung und damit zur Synthese von Hypericin wurde eine neuartige Genotyping-by-synthesis (GBS)-Methode angewandt. Diese zielte darauf ab, Repeats, die bis zu 75 % eines Genoms ausmachen können, im Vorfeld der Sequenzierung aus dem Ansatz zu entfernen. Dazu wurden insgesamt 175 Genotypen von *H. perforatum* der geographischen Verbreitungsgebiete Griechenland, Alpenraum und Sachsen sowie 3 Genotypen von *H. vesiculosum* via GBS analysiert. Ausgehend von der Überlegung, dass genomische Abschnitte, die in die Hypericin-Synthese involviert sind, in den beiden untersuchten Arten *H. perforatum* und *H. vesiculosum* konserviert sein müssten, könnten Hypericin-spezifische Gene am ehesten unter den zwischen beiden Arten konservierten Loci zu finden sein. Bei unseren Analysen konnten ca. 64.000 Loci gefunden werden, die in beiden Arten zu finden waren, wobei 28 Loci identifiziert wurden, die Ähnlichkeit zu Genen des Hypericin-pathways nach RIZZO et al., 2019 aufwiesen. Ein Vergleich dieser Daten mit microRNA-Daten aus *H. perforatum* befindet sich gerade in Bearbeitung und könnte weitere Einblicke in die Biosynthese von Hypericin liefern.

Bei der chemischen Analyse des Pflanzenmaterials verschiedener *Hypericum*-Arten zeigte sich weiterhin, dass *Hypericum*-Pflanzenmaterial als effizienter Katalysator in typischen photoredox-katalysierten Reaktionen eingesetzt werden kann. Hierbei wurden erfolgreich Photoreduktions- sowie Photooxidationsreaktionen durchgeführt. Die Konstitutionsanalyse verschiedener *Hypericum*-Arten zeigte, dass ein hoher Hypericin Gehalt, wie in *H. vesiculosum*, die Photoredoxreaktionen besonders begünstigen. Der Einsatz von getrocknetem *Hypericum* Pflanzenmaterial als aktiver und erneuerbarer Katalysator ist eine nachhaltige Alternative zu bisher verwendeten Metallbasierten Chromophoren und wurde erfolgreich zum Patent angemeldet (DE 10 2019 215 871).

The pistil of *Hypericum perforatum* – A new model tissue for the study of dark glands differentiation and hypericin biosynthesis.

Rizzo, P.¹, Altschmied, L.¹, Stark, P.², Rutten, T.¹, Franke, K.², Wessjohann, L.², Sharbel, T.¹, Ravindran, B.¹, D'Auria, C.¹

¹Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Corrensstraße 3, 06466 Gatersleben

²Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB), Halle (Saale)

E-Mail Paride Rizzo: rizzo@ipk-gatersleben.de,

Hypericum perforatum (Saint John's Wort) is one of the most common medicinal plants available in the international market (CROCKETT & ROBSON, 2012; KLEMOV et al., 2011). The interest around this species mainly derives from two compounds: hypericin and hyperforin. The first one is a naphthodianthrone known for its applications in cancer photodynamic therapy (GARG et al., 2012) and the treatment of Alzheimer's disease (HOFRICHTER et al., 2013) while hyperforin is regarded as a mild antidepressant (BHATTACHARYA et al., 1998; CHATTERJEE et al., 1998; MÜLLER, 2005).

We identified contrasting plant lines, which either develop or do not develop dark glands in their placental tissue (RIZZO et al., 2019).

Dark glands are organs specialized in the accumulation and compartmentalization of hypericin and other secondary metabolites (RIZZO et al., 2020). Previously, scientists studied dark glands in leaves to identify the genes involved in hypericin biosynthesis (SOTAK et al., 2016a; SOTAK et al., 2016b). Although this approach yielded interesting candidate genes, comparative

transcriptomics across different leaf fractions is not an ideal experimental design because it involves comparing different tissues characterized by different morphology.

We use the placental tissue as a model organ to address the transcriptome and metabolome associated with hypericin biosynthesis. Our approach uses a combination of developmental characterization of plant lines with glanded and glandless placental tissues via multi-stage comparative transcriptomics. We identified a shortlist of genes whose expression is strictly synchronized with hypericin accumulation in the dark glands. This led to an updated version of the proposed hypericin biosynthesis. Furthermore, we detected two transcription factors putatively associated with the differentiation of dark glands.

Our lab is currently establishing a transformation platform that will allow us to test our candidate genes and address biological questions regarding the causal connection between the differentiation of dark glands and downstream metabolic pathways.

On another line of research, we are interested in understanding the functional and structural signature of apomixis (asexual reproduction through seed). In the frame of our apomixis research, we have characterized the sexual and apomictic ovule development both at the morphological and transcriptome level (RIZZO, 2016). We identified an apomixis-related locus likely derived by the assembly of gene fragments of an ancestral sexual genome (SCHALLAU et al., 2010). Furthermore, we detected the differential expression of genes putatively involved in a series of developmental deregulations that, according to our hypothesis, trigger the deviation from a sexual to an apomictic way of reproduction (RIZZO, 2016).

At the IPK we rely on a vast collection of *Hypericum* germplasm that includes genotypes of different genetic backgrounds from different continents.

References

- BHATTACHARYA, S., A. CHAKRABARTI, S. CHATTERJEE, 1998: Activity profiles of two hyperforin-containing hypericum extracts in behavioral models. *Pharmacopsychiatry* **31**, 22-29.
- CHATTERJEE, S., S. BHATTACHARYA, M. WONNEMANN, A. SINGER, W. MÜLLER, 1998: Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life sciences* **63**, 499-510.
- CROCKETT, S.L., N.K.B. ROBSON, 2012: Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* **5** (Special Issue 1), 1-13, PMID: PMC3364714.
- GARG, A.D., D.V. KRYSKO, P. VANDENABEELE, P. AGOSTINIS, 2012: Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **61**, 215-221, DOI: 10.1007/s00262-011-1184-2.
- HOFRICHTER, J., M. KROHN, T. SCHUMACHER, C. LANGE, B. FEISTEL, B. WALBROEL, H.-J. HEINZE, S. CROCKETT, T.F. SHARBEL, J. PAHNKE, 2013: Reduced Alzheimer's disease pathology by St. John's Wort treatment is independent of hyperforin and facilitated by ABC1 and microglia activation in mice. *Current Alzheimer Research* **10**, 1057-1069, DOI: 10.2174/15672050113106660171.
- KLEMOW, K.M., A. BARTLOW, J. CRAWFORD, N. KOCHER, J. SHAH, M. RITSICK, 2011: Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). In: BENZIE, I.F.F., S. WACHTEL-GALOR (Eds), *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, Chapter 11. PMID: 22593920.
- MÜLLER, W.E., 2005: *St. John's Wort and its active principles in depression and anxiety*. Verlag Birkhäuser Basel, ISBN: 978-3-7643-6160-0, DOI: 10.1007/b137619.
- RIZZO, P., 2016: Novel insights on female gametophyte development in the apomictic model species *Boechera* spp. and *Hypericum* spp. PhD thesis, Halle University.
- RIZZO, P., L. ALTSCHMIED, P. STARK, T. RUTTEN, A. GÜNDEL, S. SCHARFENBERG, K. FRANKE, H. BÄUMLEIN, L. WESSJOHANN, M. KOCH, L. BORISJUK, T.F. SHARBEL, 2019: Discovery of key regulators of dark glands development and hypericin biosynthesis in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Plant Biotechnology Journal*, 0-3, DOI: 10.1111/pbi.13141.
- RIZZO, P., L. ALTSCHMIED, B.M. RAVINDRAN, T. RUTTEN, J.C. D'AURIA, 2020: The biochemical and genetic basis for the biosynthesis of bioactive compounds in *Hypericum perforatum* L., one of the largest medicinal crops in Europe. *Genes* **11**, 1210, DOI: 10.3390/genes11101210.
- SCHALLAU, A., F. ARZENTON, A.J. JOHNSTON, U. HÄHNEL, D. KOSZEGI, F.R. BLATTNER, L. ALTSCHMIED, G. HABERER, G. BARCACCIA, H. BÄUMLEIN, 2010: Identification and genetic analysis of the APOSPORY locus in *Hypericum perforatum* L. *The Plant Journal* **62**, 773-784, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04188.x.
- SOTÁK, M., O. CZERANKOVÁ, D. KLEIN, Z. JURČÁKOVÁ, L. LI, E. ČELLÁROVÁ, 2016a: Comparative transcriptome reconstruction of four *Hypericum* species focused on hypericin biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1039, DOI:10.3389/fpls.2016.01039.
- SOTÁK, M., O. CZERANKOVÁ, D. KLEIN, K. NIGUTOVÁ, L. ALTSCHMIED, L. LI, A. JOSE, E. SYRKIN WURTELE, E. ČELLÁROVÁ, 2016b: Differentially expressed genes in hypericin-containing *Hypericum perforatum* leaf tissues as revealed by de novo assembly of RNA-seq. *Plant Molecular Biology Reporter* **34**, 1027-1041, DOI: 10.1007/s11105-016-0982-2.