

Abschlussbericht

zum Vorhaben:

**Entwicklung von Basismaterial des Johanniskrautes
(*Hypericum perforatum* L.) und seine Verwendung zur
Merkmalsübertragung bei der Züchtung welkeresistenter Sorten**

Teilvorhaben 2

Verbundprojekt

**Bundsanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen
Quedlinburg
und
Interessengemeinschaft Johanniskraut
in der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V.**

Förderkennzeichen:	22002700
Zuwendungsempfänger:	IG Johanniskraut Kranzweiherweg 10 53489 Sinzig Tel.: 02642 / 983713 Fax.: 02642 / 983720
Projektbearbeitung:	Prof. Dr. Wolf Dieter Blüthner N.L. Chrestensen Samenzucht und Produktion GmbH Witterdaer Weg 6 99092 Erfurt
Laufzeit des Vorhabens:	1. Dezember 2000 – 31. März 2005

Inhaltsverzeichnis

ABSCHLUSSBERICHT ZUM GESAMTPROJEKT.....2

1	Einleitung.....	2
2	Aufgabenstellung.....	4
3	Material und Methoden.....	4
4	Ergebnisse.....	5
4.1	Entwicklung einer optimalen Kreuzungstechnik.....	5
4.2	Ergebnisse der Kreuzungsversuche.....	6
4.3	Verhalten der Nachkommen bezüglich Befruchtungstyp.....	8
4.4	Verhalten der Nachkommen bezüglich Ploidiegrad.....	8
4.5	Verbesserung der Resistenz.....	9
4.6	Verbesserung der Qualität	10
5	Schlussfolgerungen und Diskussion.....	12
6	Zusammenfassung.....	14
7	Literatur.....	15
8	Verzeichnis der Anhangstabellen und Abbildungen.....	15
9	<u>Liste der auf Grund des Projektes entstandenen Publikationen.....</u>	<u>16</u>
10	Anhangstabellen und Abbildungen.....	A-1

1 Einleitung

Johanniskraut wird nach Einschätzung der führenden Inverkehrbringer auch zukünftig eine zentrale Pflanze im Phytopharmakabereich bleiben. Nach der schnellen Steigerung des Anbaus in Deutschland auf ca. 800 ha von 1982 bis 1998 und den damit verbundenen großen Problemen, die durch die Johanniskrautwelke verursacht wurden, hat sich der Johanniskraut-Anbau in Deutschland nach einer zwischenzeitlich gegenläufigen Tendenz bei ca. 300 ha stabilisiert. Sollte sich der Phytopharmakamarkt weiterhin langfristig stabilisieren, könnten gegebenenfalls wieder Flächen wie Mitte der 90iger Jahre zum Anbau von Johanniskrautanbau genutzt werden.

Als entscheidende Argumente für einen Anbau in Deutschland haben sich die Qualität, die Homogenität und die Erzeugungssicherheit durchgesetzt, die jedoch hinsichtlich der Risiken eines Welkebefalls bis zum heutigen Zeitpunkt deutlich eingeschränkt wurden.

Zur Lösung dieser Probleme ist eine mehrjährige, praxisorientierte Forschungsarbeit zwingend erforderlich, die von den beteiligten meist mittelständischen Unternehmen allein nicht zu bewältigen war. Positiv für eine zielorientierte Projektarbeit sind dabei auch die existierenden, klaren Zielvorstellungen der abnehmenden Industrie zu den Parametern des Ernteprodukts Johanniskraut. Die Bereitstellung von Droge mit hohen und konstanten Qualitätsparametern ist dabei entscheidend. Größtes Hindernis für den heimischen Anbau ist dabei weiterhin die Johanniskrautwelke. Dieses Problem kann nur durch die Entwicklung genetisch verbesserter Sorten, durch richtiges Saatgutmanagement und durch moderne Produktionstechnologien gelöst werden.

Die FNR hat durch das Verbund-Forschungsprojekt 97NR 135-F die Entwicklung welkeresistenter Sorten eingeleitet und mit den Anschlussprojekten 22002600 (BAZ) und 22002700 (IG/FAH) weiter gefördert. Diese Projekte hatten den innovativen Ansatz, über die Beschreibung der genetischen Variabilität in den natürlichen Populationen hinaus, durch scharfe Selektion spezifische Linien mit Welkeresistenz, hohem Gehalt an Hypericin und/oder Hyperforin und einem sexuellen Reproduktionsmodus zu finden. Damit sollte die Möglichkeit eröffnet werden, Merkmale durch Kreuzung miteinander zu kombinieren und so einen neuen Variabilitätspool für züchterische Weiterentwicklungen zu schaffen.

Die Aufgabe der BAZ bestand in der Linienentwicklung und parallel in der Methodenentwicklung. Das betraf vor allem den schnellen und sicheren Nachweis des Reproduktionstyps als Voraussetzung für gezielte Kreuzungen und die sinnvolle Weiterverwendung des Materials sowie die Weiterentwicklung eines Testes für die massenhafte Prüfung auf Welkeresistenz im Jungpflanzenstadium und im Feld. Die Aufgabe der IG/FAH/NLC bestand vor allem in der Etablierung einer praktikablen Kreuzungstechnik zur Kombination von Resistenz und Qualität. Das entstandene Kreuzungsmaterial sollte auf seinen Reproduktionstyp getestet werden. Fakultativ apomiktische Linien sollten auf Resistenz, Inhaltsstoffe und agronomische Merkmale geprüft werden.

Im Gesamtprojekt, dessen wissenschaftliche Leitung bei der BAZ lag waren weitere Partner beteiligt. In der folgenden Übersicht sind die Institutionen und

verantwortlichen Wissenschaftler aufgeführt, die sich im Teil FAH/IG an der Bearbeitung des Verbundprojektes beteiligt haben.

Institution	Mitarbeiter	Hauptaufgaben
Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ) Quedlinburg, Institut für gartenbauliche Kulturen	Pank F	Gesamtkonzept und Koordinierung
	Kästner U	Evaluierung, Resistenztest, Linienentwicklung, Flowcytometrie, mikroskopische Embryologie
	Scholze P	Entwicklung Resistenztest
Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben	Matzk F	Methodik Flowcytometrie
N. L. Chrestensen Erfurter Samen- und Pflanzenzucht GmbH (NLC) Erfurt	Blüthner WD	Kreuzungsexperimente Resistenzbewertungen
Biologische Bundesanstalt (BBA) Braunschweig, Institut für Pflanzenschutz im Gartenbau, Außenstelle Kleinmachnow	Gärber U	Prüfung Saatgutbefall, Resistenztest Inokulumbereitstellung
Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH) Bonn	Kroth E	Koordinierung der Interessengemeinschaft der FAH
Hessisches Dienstleistungszentrum für Landwirtschaft, Gartenbau und Naturschutz (HDLGN) Bad Hersfeld	Pfaff H	Inhaltsstoffanalytik: Hypericin, Hyperforin,

In der regulären Laufzeit des Projektes FAH/IG konnten Kreuzungskombinationen auf der Grundlage von diploiden, sexuellen Müttern und getesteten tetraploiden Vätern erzeugt werden. Die bisher realisierten Kreuzungen erwiesen sich für die geplanten weiteren Kreuzungsschritte als wenig geeignet. Durch die ungeradzahligen Genomsituationen und die aneuploiden Chromosomenkonstellationen sinkt der Kreuzungsansatz von der F1 zur F2 um eine Zehnerpotenz und die entstehenden Produkte sind instabil und wahrscheinlich auch leistungsschwächer. Nur 3x apomiktische Kreuzungsprodukte scheinen direkt nutzbar zu sein.

Bei den Resistenzbewertungen in den selektierten Linien und in den Kreuzungsprodukten zeigte sich übereinstimmend bei beiden Projektpartnern, dass die Resistenzbonituren in der Jungpflanze und im Feld teilweise nicht übereinstimmten. Dabei gab es Abweichungen in beide Richtungen. Im Jungpflanzentest und im Feldtest konnten keine klaren Spaltungen und damit Hinweise auf Resistenzmajorgene gefunden werden. Die bisherigen Befunde deuten auf verschiedene Schutzmechanismen in der Pflanze hin, die komplex vererbt werden.

Die Erwartung, in den Kreuzungen auch apomiktische Produkte zu erhalten, bestätigte sich. Im ersten Kreuzungszyklus wurden sexuelle und apomiktische Pflanzen im Verhältnis 1:1 gefunden. Die Apomikten stellten sich in ersten Prüfungen als merkmalsstabil für agronomische Merkmale dar und bilden somit ein sofort nutzbares Sortenpotential. Diese Arbeiten waren zunächst zusätzliche Leistungen,

stellten sich aber im Projektverlauf als eine wesentliche Möglichkeit zur Verwendung der entstandenen Kreuzungspflanzen dar.

2 Aufgabenstellung

Im Verbundprojekt waren die Bundesanstalt für Züchtungsforschung (BAZ) und eine Interessensgemeinschaft koordiniert über die Forschungsvereinigung für Arzneimittel-Hersteller (FAH) beteiligt. Aufbauend auf einem Vorläuferprojekt zur Sammlung und Charakterisierung von möglichst vielen Johanniskrautherkünften, waren im aktuellen Projekt Arbeiten zur Linienentwicklung (BAZ) und zur Etablierung einer Kreuzungstechnik (FAH) vorgesehen. Das entstandene Material sollte auf agronomische Merkmale, Resistenz, Qualität und Befruchtungstyp geprüft werden.

3 Material und Methoden

Das Ausgangsmaterial für die Kreuzungen wurde durch die BAZ im Jahre 2000 (1. Serie) und 2001 (2. Serie) an NLC übergeben. Die Ausgangscharakterisierung ist in den Zwischenberichten 2001 (Seite 4) und 2002 (Seite 9) gegeben.

Für die Kreuzungen wurde folgende Technologie entwickelt:

Die Kastration der Blüten erfolgte vor Öffnung der Blütenblätter und vor dem Herausschieben der dreiteiligen Narbe. Kastriert wurde mit Hilfe einer Kopflupe mittels einer Spitzpinzette. Am günstigsten waren Blütenstände, bei denen die Zentralblüte bereits verblüht war und die nächstfolgenden Blüten noch nicht geöffnet waren. Die Narbenäste durften noch nicht sichtbar sein. Zu alte und zu junge Blüten wurden mechanisch entfernt. Es verblieben je nach Blütenstand 4 bis 8 kastrationsfähige Blüten. Die Blütenblätter wurden vorsichtig herausgezupft, die Kelchblätter an der Blüte belassen. Alle Antheren wurden entfernt und der Blütenstand eingetütet. Die Bestäubung erfolgte in der Regel am nächsten Tag. Gut stäubende Blüten wurden gesammelt. Durch zurückklappen der Blütenblätter entstand ein „Antherenpinsel“ der direkt zur Bestäubung verwendet wurde. Die Abreife der Samenkapseln dauerte weitere 6 bis 8 Wochen. Der Ablauf der Kastration ist in der Abbildung 1 dargestellt.

Die Resistenztests erfolgten in enger Anlehnung an die Methode der BAZ. Es wurde eine Konidien suspension von der BBA bereitgestellt, die aus den 5 Isolat Stamm 100, ES 38, ES 39, ES 33 und ES 20 bestand. Die ES Isolate entstammen aus der BAZ Quedlinburg. Die Konidiendichte wurde mit 10^6 Konidien/ml Suspension eingestellt. Beim Jungpflanzentest erfolgte die Inokulation bei einer Pflanzenlänge von ca. 5-8cm. Die Pflanzen wurden mit einer Rückendruckspritze allseitig eingespritzt und anschließend im Folientunnel für 8 Tage bei maximaler Luftfeuchtigkeit weiter kultiviert. Die Auszählung erfolgte nach etwa 4 Wochen bei voller Ausprägung der Symptome. Die Nachkommenschaften wurden in den Abstufungen gesund/befallen/tot Einzelpflanzenweise beurteilt. Eine Woche später erfolgte nochmals eine Gesamtbeurteilung der Linie verbal und mit einer Befallsnote. Hier wurden vor allem das Fortschreiten der Infektion und eine potentielle Regeneration der Pflanzen bewertet.

Die Feldbestände wurde Ende Mai gleichfalls mit einer Rückenspritze inokuliert. Die Pflanzen waren in voller Längenentwicklung bis Beginn Knospenschieben. Hier wurde vor allem der Stängelgrund besprüht. Die Krankheit wurde nach 4-6 Wochen sichtbar.

Die Bestimmung des Befruchtungstyps erfolgte in der regulären Projektlaufzeit in der BAZ. Die Methode ist im dortigen Abschlussbericht ausführlich beschrieben. In der Projektverlängerung wurden die Analysen im IPK Gatersleben durchgeführt. Es wurde ein Partec-Messgerät CA III Version 1.39 eingesetzt. 50 Samen wurden zerrieben, mit DAPI gefärbt, eine Stunde unbewegt auf Eis gestellt und dann vermessen. Als Standard wurden die tetraploide Sorte Topaz und eine diploide Linie des IPK eingesetzt. Bestimmt wurden die Ploidiestufe 2x bis 5x und der Reproduktionstyp sexuell (Note 9) bzw. fakultativ apomiktisch (Note 5). Eine ausführliche Erläuterung zu möglichen Histogrammen und ihrer Interpretation ist bei Pank et al.2003 und Kästner u. Pank 2005 zu finden.

Die Analyse der Inhaltsstoffe erfolgte nach Gaedcke (1977), bzw. der Methode der Fa. Finzelberg. Für Hypericine und Hyperforine liegen folgende Analysemethoden zu Grunde (Pfaff H, schriftliche Mitteilung 2003)

Bestimmung der Hypericine

Probenaufbereitung:	methanolische Extraktion
Analysenmethode:	HPLC, isokratisch
Säulenmaterial:	RP 18
Mobile Phase:	Ethylacetat/Puffer pH 2/Methanol
Messwellenlänge:	590 nm

Bestimmung der Hyperforine

Probenaufbereitung:	methanolische Extraktion
Analysenmethode:	HPLC, Gradientenelution
Säulenmaterial:	RP 18
Mobile Phase:	Phosphorsäure/Acetonitril/Wasser/Methanol
Messwellenlänge:	254 nm

Details der HPLC-Methoden sind im Abschlussbericht von Pank (2004) beschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung einer optimalen Kreuzungstechnik

Im Projektzeitraum sollte eine optimierte Kreuzungstechnik erarbeitet werden. Dabei entstandenes Material wurde darüber hinaus möglichst umfassend charakterisiert.

Im Einzelnen waren zu untersuchen:

Kastrations- und Bestäubungstechnik

Gibt es Unterschiede zwischen Gewächshaus- und Freilandkreuzungen?

Welchen Einfluss übt der Ploidiegrad der Eltern aus?

Für die Kreuzungen wurde folgende Technologie entwickelt:

Die Kastration der Blüten erfolgte vor Öffnung der Blütenblätter und vor dem Herausschieben der dreiteiligen Narbe. Kastriert wurde mit Hilfe einer Kopflupe mittels einer Spitzpinzette. Am günstigsten waren Blütenstände, bei denen die Zentralblüte bereits verblüht war und die nächstfolgenden Blüten noch nicht geöffnet waren. Die Narbenäste durften noch nicht sichtbar sein. Zu alte und zu junge Blüten wurden mechanisch entfernt. Es verblieben je nach Blütenstand 4 bis 8 kastrationsfähige Blüten. Die Blütenblätter wurden vorsichtig herausgezupft, die Kelchblätter an der Blüte belassen. Alle Antheren wurden entfernt und der Blütenstand eingetütet. Die Bestäubung erfolgte in der Regel am nächsten Tag. Gut stäubende Blüten wurden gesammelt. Durch Zurückklappen der Blütenblätter entstand ein „Antherenpinsel“ der direkt zur Bestäubung verwendet wurde. Die Abreife der Samenkapseln dauerte weitere 6 bis 8 Wochen. Der Ablauf der Kastration ist in der Abbildung 1 dargestellt.

4.2 Ergebnisse der Kreuzungsversuche

Die Kreuzungsexperimente waren zweistufig aufgebaut:

1. Schritt: 2x sexuelle Mutter x 4x Resistenz- bzw. Inhaltsstoffvater
2. Schritt: 3x sexuelle F1 aus dem ersten Schritt x alternativem 4x Vater

Diese Kreuzungsmodell wurde 2000 und 2001 mit jeweils anderen Eltern begonnen und zeitversetzt, parallel weitergeführt

Die Ergebnisse der Kreuzungen im Projektzeitraum sind in diesen zwei Gruppen separat zu betrachten.

Ergebnisse im 1. Kreuzungsschritt:

Die Kreuzungen waren in allen Jahren möglich. In der ersten Serie erwies sich, dass nur eine Mutter den 2x, sexuellen Status hatte, die 2. Mutter war 4x, fakultativ apomiktisch, so dass nur muttergleiche Pflanzen entstanden, die nicht weiter bearbeitet wurden. Die Ergebnisse beider Kreuzungsserien sind in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

Beide Kreuzungsserien wurden im Gewächshaus durchgeführt. Im Jahr 2000 waren die äußeren Bedingungen allerdings deutlich besser als bei den sehr hohen Temperaturen 2001. Beschränkend war die geringe Ausbildung von Samenkapseln. 2000 bildeten 20% der bestäubten Blüten eine Kapsel, 2001 entstanden nur bei 5% der bestäubten Blüten Kapseln. Der Samenansatz je geernteter Kapsel war 2000 mit 29 Samen gut, 2001 mit 4,5 Samen deutlich schlechter.

Eine unbeabsichtigt durchgeführte Kreuzung 4x apomiktisch x 4x Vater ergab in etwa die gleichen Ansätze. 621 bestäubte Blüten ergaben 94 Kapseln mit 2185 Samen. 23,2 Samen/Kapsel bzw. 3,5 Samen/bestäubter Blüte lagen geringfügig unter den Werten der Kombination 2x x 4x. Da die Embryobildung ohne Bestäubung einsetzt und der Pollen nur zur Endosperm bildung notwendig ist, spricht dieses Ergebnis für eine korrekte Kastration und Bestäubung. Die apomiktische Samenbildung konnte durch die Homogenität der Pflanzennachkommenschaft und die flowcytometrische Kontrolle der Elternnachkommenschaften bestätigt werden.

Tab. 1: Ergebnisse des 1. Kreuzungsschrittes in beiden Serien

Jahr	Kombination	Anzahl bestäubter Blüten	Anzahl geernteter Kapseln	Samen/ geernteter Kapsel	Samen/ bestäubter Blüte	F1-Samen gesamt	Erhaltene Jungpflanzen
2000	x Resistenz	77	21	22	6,00	456	209 (46%)
	x Qualität	80	11	43	6,00	475	276 (58%)
	Summe	157	32	29	6,00	931	485 (52%)
2001	x Resistenz	663	37	4,8	0,27	179	72 (40%)
	x Qualität	639	28	4,1	0,16	114	34 (30%)
	Summe	1302	65	4,5	0,22	293	106 (36%)
Summe 2001 + 2002		1459	97	12,6	0,84	1224	591 (48%)

Ergebnisse im 2. Kreuzungsschritt:

Für den zweiten Kreuzungsschritt wurden nach den Ergebnissen der Flowcytometrie sexuelle Einzelpflanzen mit guten Merkmalsausprägungen ausgewählt und mit der jeweils alternativen Bestäubergruppe gekreuzt. Ziel war die Kombination guter Inhaltsstoffwerte mit verbesserter Resistenzausprägung. Die als mütterlicher Partner verwendeten Pflanzen hatten einen 3x Genomstatus. Phänotypisch fiel die große Variabilität der Pflanzen auf. Generelle Leistungseinschränkungen waren nicht festzustellen. Die Kreuzungsergebnisse (Tab. 2) waren allerdings deutlich schlechter als im ersten Kreuzungsschritt, insbesondere im Vergleich zu 2000. Noch deutlicher ging die Anzahl der vitalen Jungpflanzen zurück. Beide Effekte sind vermutlich auf die gestörte Reduktionsteilung in den 3x Mütter zurückzuführen, die zu aneuploiden Chromosomenkonstellationen führen muss.

Die 2. Kreuzungsserie führte allerdings zu unerwarteten flowcytometrischen Ergebnissen. Es wurden keine 3x Formen, sondern nur 2x und so genannte BIII Hybriden gefunden. BIII Hybriden entstehen durch Befruchtung einer unreduzierten Eizelle. Dieses Ergebnis kann mit den vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden.

Tab. 2: Ergebnisse des 2. Kreuzungsschrittes in beiden Serien

Jahr	Kombination	Anzahl bestäubter Blüten	Anzahl geernteter Kapseln	Samen/ geernteter Kapsel	Samen/ bestäubter Blüte	F1-Samen gesamt	Erhaltene Jungpflanzen
2002 Gewächshaus	x Resistenz	242			0,58	140	6 (4%)
	x Qualität	153			0,79	121	13 (11%)
	Summe	395			0,66	261	19 (7%)
2002 Freiland	x Resistenz	257			0,36	92	29 (32%)
	x Qualität	185			0,84	155	37 (24%)
	Summe	442			0,56	247	66 (27%)
Summe 2002		837			0,61	508	85 (17%)
2003	2x sexuell	519			0,13	66	nicht ausgesät
	3x, BIII Hybride	49			0,88	43	
Summe 2003		578			0,19	109	

4.3 Verhalten der Nachkommen bezüglich Befruchtungstyp

Aus dem Kreuzungsansatz sexuelle Mutter x apomiktischer Vater ergab sich die Frage nach dem Verhalten der Nachkommen. Aus theoretischer Sicht ist die Frage der genetischen Grundlage des Merkmals „Befruchtungstyp“ noch nicht geklärt. Aus züchtungspraktischer Sicht ist die Differenzierung in sexuelle oder apomiktische Nachkommen entscheidend für die weitere Verwendung der jeweiligen Pflanzen. Stabilität des Merkmals vorausgesetzt, können apomiktische Pflanzen als direkte Sortenkandidaten behandelt werden, während sexuelle Pflanzen spaltende Nachkommenschaften ergeben.

In der ersten Kreuzungsserie, 1. Kreuzung konnten unter den 3x Nachkommen 39 fakultativ apomiktische und 49 sexuelle Pflanzen gefunden werden. Die Apomixie konnte bis auf eine Ausnahme in den Nachkommen der 39 Pflanzen bestätigt werden. Daraus kann auf eine züchterisch nutzbare Stabilität des Merkmals „Apomixie“ geschlossen werden. Die sexuellen Pflanzen sollten nach der alternativen 2. Kreuzung wiederum spalten. 47 Pflanzen konnten flowcytometrisch untersucht werden. 20 Pflanzen hatten den Befruchtungstyp 5 „fakultativ apomiktisch/sexuell“, 27 Pflanzen waren sexuell (Typ 9). Aus der 2. Kreuzungsserie konnte ein Verhältnis von 13 Pflanzen mit Befruchtungstyp 5 zu 5 Pflanzen mit Befruchtungstyp 9 gefunden werden. Das Gesamtverhältnis über alle drei Versuche ergab 72 apomiktische zu 81 sexuellen Pflanzen.

In den in der BAZ durchgeführten Versuchen konnten unter 92 geprüften Pflanzen aus unterschiedlichen Mutterpflanzen ca. 28% Nachkommen mit dem Reproduktionstyp 5 „fakultativ apomiktisch/sexuell“ gefunden werden. Obligate apomiktische Pflanzen (Reproduktionstyp 1) konnten weder in Quedlinburg noch in Erfurt gefunden werden (Abschlussbericht BAZ, Tab.11, S.34).

4.4 Verhalten der Nachkommen bezüglich Ploidiegrad

Neben dem Befruchtungstyp ist der Ploidiegrad in den Kreuzungsgenerationen von Interesse. Der „Normaltyp“ ist tetraploid (4x). 2x Formen kommen in natürlichen Populationen gelegentlich vor und unterscheiden sich im Wirkungsspektrum nicht signifikant (Abschlussbericht BAZ, S. 33). Das konnte auch für die experimentell erzeugten 3x Kreuzungspflanzen bestätigt werden.

Die 47 Pflanzen aus der 2. Kreuzung, 1. Kreuzungsserie (3x Mutter x 4x Vater) waren unerwartet zu ca. 80% wiederum triploid. 2x sowie 4x und 5x traten zu je 10% auf. Die flowcytometrische Untersuchung erlaubt allerdings keine exakte Feststellung der Chromosomenzahl. Diese Befunde können daher nur vorsichtig in die Richtung interpretiert werden, dass die zur Befruchtung kommenden Eizellen keine zufälligen Chromosomenzahlkonstellationen aufweisen. Stark aneuploide Gameten sind vermutlich weniger lebensfähig. Stabile Chromosomenzahlen werden nach diesen Ergebnissen erst nach mehreren Generationen verbunden mit flowcytometrischen Kontrollen zu erwarten sein.

In der 2. Kreuzungsserie wurden 36 Einzelpflanzen nach Selbstung von 9 triploiden BIII Müttern untersucht. 90% aller Pflanzen waren tetra- oder pentaploid, 10 % waren triploid. Auch hier gibt es offensichtlich Regulationsmechanismen in Richtung normale Ploidie- und Chromosomenzahlverhältnisse.

4.5 Verbesserung der Resistenz

Das Ausgangsmaterial aller Arbeiten entstammte der Linienentwicklung aus Quedlinburg. Die Ergebnisse bei der Kombination von Qualität und Resistenz baut auf dem vorgegebenen Ausgangsniveau auf. In der 1. Kreuzungsserie konnten bei Feldbonituren nach künstlicher Inokulation folgende Erkenntnisse gewonnen werden.

Tab. 3: Freilandbonituren an den Elternpflanzen 1. Kreuzungsserie und der F1-Pflanzen

Mittlerer Boniturwert des Freilandwelkebefalls (1 ohne Befall, 9 Pflanze tot)					
2x Mutter	Qualitätsväter	Resistenzväter	F1-Resistenzkombinationen	F1-Qualitätskombinationen	Kontrolle Topaz
4,8	7,6	3,6	7,3	7,7	4,8

Die Resistenzväter waren deutlich besser als die Mutterlinie, die Qualitätsväter und auch besser als Topaz. Alle F1-Kombinationen entsprachen den anfälligen Partnern. Zwischen den Einzelpflanzen gab es erhebliche Unterschiede. Eine Nachkommenschaftsprüfung 2002 bestätigte die unterschiedliche Bewertung der Einzelpflanzen.

Tab. 4: Ergebnisse der Nachkommenschaftsprüfung im Jungpflanzentest

	Anzahl Einzelpflanzen-nachkommenschaften	% gesunde Pflanzen (Mittelwert)	% gesunde Pflanzen (Spannweite)
Resistenzkombinationen	15	14,4	0-48
Qualitätskombinationen	19	3,1	0-21
Standard Topaz	1	0	
Standard Topaz	Wasserkontrolle	67	

In den Resistenzkombinationen konnten mehr EP-Nachkommenschaften mit besserer Welkeresistenz gefunden werden. Beim Nachbau der Resistenzkombinationen wurde im Mittel die Note 1,82, bei den Qualitätskombinationen 5,30 erreicht. Die Chance zur Selektion widerstandsfähiger Pflanzen war in den Resistenzkombinationen höher als in den Qualitätskombinationen. Die Ergebnisse von Jungpflanzen- und Freilandtest stimmten dabei teilweise nicht überein. Beide Bewertungen müssen also parallel durchgeführt werden.

In der 2. Kreuzungsserie ergaben sich in den F1-Kombinationen mit den Qualitätsvätern bzw. mit den Resistenzvätern keine Unterschiede (Zwischenbericht 2004). Im Freiland trat kein spontaner Befall auf, künstlich inokuliert wurde nicht, da die Pflanzen für weitere Arbeiten zur Verfügung stehen sollten. Im Jungpflanzentest an den Nachkommen dieser Pflanzen wurden in beiden Kreuzungskombinationen im Durchschnitt 19% gesunde Pflanzen gefunden, die Spannweite lag für dieses Merkmal zwischen 0 und 42% gesunde Pflanzen. Von einigen der als BIII-Hybriden charakterisierten Pflanzen wurden Nachkommen angebaut und weitere Jungpflanzentests durchgeführt. Die Übereinstimmung beider Testgenerationen war gering. Nur in der Gruppe 122 traten gehäuft gesunde Pflanzen auf. Bei 123 und 132 gab es gesunde und kranke Nachkommenschaften. In vier Gruppen gab es

überhaupt keine gesunden Nachkommen, obwohl hier meist höhere Anteile gesunder Pflanzen bei den F1 Nachkommen gefunden wurden (Tab. 5).

Tab. 5: Prozentualer Anteil gesunder Pflanzen in zwei aufeinander folgenden Generationen von BIII-Hybriden

Pfl. Nr.	F1	F2
122	10,7	71,82,98,75,0,83
123	1,0	0,0,31,27,48
131	31,7	0,0,0
132	13,5	52,0
342	41,8	0,0,0,0,0,
376	22,5	0,0,0,0,0
378	0	0,0,0,0,0

Im Kapitel 1.2.5 Prüfung der neuen Kreuzungspartner wurde diese differenzierte Reaktion auch für die neuen Kreuzungspartner aus der BAZ festgestellt. Alle Qualitätspartner waren in ihrer Resistenzreaktion schlecht, die Resistenzpartner reagierten unterschiedlich (Tab. 3 des Zwischenberichts 2005). Damit wird die Notwendigkeit mehrfacher Prüfungen sowohl im Jungpflanzenstadium als auch auf dem Feld nochmals unterstrichen.

4.6 Verbesserung der Qualität

Die Qualitätsuntersuchungen wurden im Hessischen Dienstleistungszentrum Bad Hersfeld analog zu den Proben aus der BAZ durchgeführt. Jahreseffekte, unterschiedliche Schnittzeitpunkte und Einzelpflanzen schränken die Vergleichbarkeit ein.

Im Zwischenbericht 2004 sind die Ergebnisse 2002 und 2003 gewonnen an den gleichen Pflanzen nebeneinander gestellt (Tab. 3 des Zwischenberichts 2005). Die Hypericin und Gesamthypericinwerte lagen 2003 nur bei ca. 30% der Werte von 2002. Die hohen Hyperforinwerte bestätigten sich.

Eine Zusammenfassung der Befunde über alle Jahre ist in Tab. 6 gegeben. Positiv aus der 1. Serie fielen insbesondere die Pflanzen 10b4 und 10c8 auf. Sie waren außerdem deutlich resistenter und apomiktisch. Dementsprechend wurden sie auch als väterlicher Kreuzungspartner in der neuen Kreuzungsserie 2005 eingeordnet. Die Inhaltsstoffbewertungen nach dem 2. Kreuzungsschritt sind der Anhangstabelle A1 zu entnehmen.

In der zweiten Serie gab es unterschiedliche positive Einzelergebnisse. In der Anhangstabelle A2 sind ausgewählte Nachkommenschaften triploider BIII Mutterpflanzen und in A3 weitere für den 2. Kreuzungsschritt ausgewählte Pflanzen mit ihren Merkmalen zusammengestellt.

Insgesamt sind die Befunde in ihrer absoluten Höhe vorsichtig zu bewerten. Gesicherte Ergebnisse erfordern den Anbau größerer Parzellen mit der dazugehörigen Bewertung. In der Tendenz bestätigen sich die Selektionsfortschritte im BAZ Material. Parallele Verbesserungen von Hypericin und Hyperforin scheinen nur in engen Grenzen aber nicht in den Maximalausprägungen möglich zu sein.

Tab. 6: Überblick über die Inhaltsstoffanalysen in der Projektlaufzeit

	Hypericin	Gesamthypericin	Hyperforin
2002, 1. Kreuzungsserie, apomiktische F1-Pflanzen,			
Spannweite	0,02-0,15	0,08-0,27	1,2-3,6
positive Pflanzen	10b4, 10c8	10b4, 10c8	10b4, 10c8
			11-61,5b7
		5-33	
	12c8,4a8		
2002, 1. Kreuzungsserie, Einzelpflanzen für 2. Kreuzung			
Spannweite	0,02-0,12	0,06-0,31	1,06-2,97
positive Pflanzen	6-30, 11-40	6-30, 11-40	6-30, 11-40
			5b8,5b5
		6-33	
Topaz-Standard	0,035	0,213	1,386
2004, 1. Kreuzungsserie, 2. Kreuzung			
Spannweite	0,02-0,12	0,05-0,33	1,45-9,29
positive Pflanzen	11-1	11-1	11-1
			51-3,56-5,68-1, 71-5,72-10
		25-5	
2003, 2. Kreuzungsserie, 1. Kreuzung			
Spannweite	0,05-0,20	0,10-0,40	1,17-4,09
positive Pflanzen	19	19	19
			4,54
	159,359	159,359	
		134,125,	
2004, Nachkommenschaften von BIII Hybriden, Mischprobe			
Spannweite	0,07-0,13	0,13-0,26	3,74-8,20
positive Pflanzen	131	131	
			132,134,342,375
		376,378	
2004, Einzelpflanzennachkommenschaften aus 1. Kreuzung nach Resistenztest			
Spannweite	0,05-0,17	0,11-0,35	1,45-7,12
positive Pflanzen	133-3	133-3	
		133-1	
			31-1,309-1u.2 342-3u.4,345-1bis3

5. Schlussfolgerungen und Diskussion

Kreuzungen

Im Projektzeitraum konnte eine optimierte Kreuzungstechnik entwickelt werden. Kreuzungen sind sowohl im Gewächshaus als auch im Freiland möglich. Der bessere Habitus der Pflanzen spricht für die Kultur im Freiland. Die Gewinnung gut stäubender Blüten war allerdings im Freiland kaum möglich, da durch starken Insektenbesuch die Pollen meist schon vorher entnommen wurden. Eine Kombination von Mutterpflanzenkultur im Freiland und Vaterpflanzenkultur im Gewächshaus erwies sich als optimal. Die Kreuzungsergebnisse selbst wiesen keine klaren Differenzen zwischen Freiland und Gewächshaus auf.

Die aus dem verfügbaren Ausgangsmaterial realisierbaren Kreuzungen führten durch die genomatische Situation (Mutter diploid und Vater tetraploid) zu erheblichen Schwierigkeiten. Die Erzeugung von F1-Pflanzen war noch relativ gut möglich. Parallele Kreuzungen auf 2x x 2x Niveau erbrachten allerdings wesentlich bessere Kreuzungsergebnisse und auf 4x x 4x Niveau etwa die gleichen Ansätze. Die Hauptschwierigkeit entstand bei der weiteren Arbeit mit den triploiden F1-Pflanzen. Deutlich geringere Ansätze und Ausbeuten an lebensfähigen Pflanzen im zweiten Kreuzungsschritt (3x x 4x) sind aus den chromosomalen Instabilitäten in den entstehenden Eizellen erklärbar. Stabile Konstellationen erfordern mehrjährige Zyklen von Anbau und Selektion, die im Rahmen des Projektes nicht möglich waren.

Im zweiten Kreuzungszyklus entstanden zunächst meist 2x, sexuelle Pflanzen neben einigen triploiden BIII-Hybriden. Eine Erklärung kann dafür nicht gegeben werden.

Der neue Kreuzungsansatz mit den in der BAZ entwickelten 4x, sexuellen Müttern konnte im verkürzten Verlängerungszeitraum nur begonnen werden. Auch nach Gewächshauskultur der Mutterpflanzen setzte die Blüte erst nach Abschluss der Projektlaufzeit ein.

Resistenz

Der in der BAZ genutzte Resistenztest für die Jungpflanzen- und die Freilandprüfung konnte bei NLC Erfurt adaptiert werden. Damit steht auch für dieses Unternehmen ein funktionierender Resistenztest zur Verfügung. Die Konidiendichten von 10^6 /ml erwiesen sich auch bei NLC als geeignet. Die Jungpflanzeninfektion war kräftig. Die Freilandinfektionen mit der gleichen Konidiendichte funktionierten 2002 sehr gut, 2005 allerdings nicht. Die Abhängigkeit von den jeweiligen Außenbedingungen wird hier deutlich.

Im Jungpflanzenentest deutet sich an, dass verschiedene Resistenzmechanismen/-ausprägungen vorkommen. Neben klaren Reaktionen von totalem Befall und Befallsfreiheit traten auch häufig Zwischentypen auf. Nach einer mittleren Infektionsstärke gab es Pflanzen, die eine deutliche Regeneration zeigten. Diese Regenerationsfähigkeit könnte ein weiterer nutzbarer Mechanismus in der Strategie der Gesunderhaltung von Johanniskrautbeständen sein.

Die schon im Abschlußbericht der BAZ festgestellte unterschiedliche Reaktion von Jungpflanze und adulter Pflanze bei einzelnen Linien, konnte bestätigt werden. Resistenzbewertungen sollte zweistufig (Jungpflanze/Feldbestand) durchgeführt werden. Künstliche Inokulationen sind in jedem Fall notwendig.

Inhaltstoffe

Die Selektionsschärfe auf Hypericin, Gesamthypericin und Hyperforin erscheint nach den vorliegenden Ergebnissen als gering. Einzelpflanzen spiegeln das Verhalten einer Parzelle nur schwach wider. Die Schnittzeitpunkte beeinflussen die Inhaltsstoffzusammensetzung stark. Späte Schnitte führen zu höheren Hyperforinwerten. Parallele Verbesserungen von Hypericin und Hyperforin scheinen nur in geringem Maße möglich.

Die zusammenfassende Betrachtung über die Spannweiten und die positiven Einzelpflanzen zeigt allerdings doch eine deutliche Verbesserung gegenüber „Topaz“. In den Anhangstabellen sind die möglichen Kandidaten mit verbesserten Inhaltsstoffwerten zusammengestellt. Weitere Analysen zur Absicherung dieser Befunde sind notwendig.

Untersuchungen zum Cadmiumgehalt wurden nicht durchgeführt. Aus dem Vorläuferprojekt war allerdings bekannt, dass Erfurt ein Standort mit niedriger Cadmiumakkumulation ist.

Befruchtungstyp

Diese Untersuchungen wurden in der BAZ und im Verlängerungszeitraum im IPK Gatersleben durchgeführt. Bei Kreuzungsarbeiten mit sexuellen Partnern ist in jedem Falle die Nachkommenschaft auf den Befruchtungstyp zu untersuchen. Festgestellte Apomixie erwies sich bis auf Ausnahmen als stabil. Der sexuelle Befruchtungstyp scheint nach den Befunden in der BAZ als instabil. In den Nachkommenschaften von sexuellen Pflanzen sank der Anteil sexueller Pflanzen von 78% auf 49%. Interpretiert wird dieses Ergebnis als Folge der Heterozygotie für das Merkmal „Sexueller Befruchtungstyp“ (PANK et al. 2005). Ob homozygote, sexuelle Pflanzen selektierbar sind, kann aus diesen Befunden nicht beantwortet werden.

6 Zusammenfassung

- Es konnte eine praktikable Technik für Johanniskrautkreuzungen entwickelt werden.
- Auf der Grundlage der in der BAZ entwickelten Linien sollten Experimentalkreuzungen zur Zusammenführung von Welkeresistenz mit hohen Inhaltstoffwerten erprobt werden.
- Die Genomkombination diploid x tetraploid erwies sich als wenig geeignet. Neben gewissen Einschränkungen in der primären Kreuzung, traten vor allem bei der weiteren Bearbeitung der triploiden F1-Pflanzen starke Störungen in der Kreuzbarkeit und in der Pflanzenvitalität auf. Alle Aussagen zu anderen Merkmalen müssen unter dem Gesichtspunkt der instabilen Chromosomenahlen bewertet werden.
- Tetraploide, sexuelle Pflanzen standen erst zum Ende der Projektlaufzeit zur Verfügung. Kreuzungen damit konnten noch nicht realisiert werden.
- Die bei der Linienentwicklung erreichten Fortschritte in der Welkeresistenz konnten in den Kreuzungen bestätigt werden. Im Mittel waren die „Resistenzlinien“ immer besser als die „Qualitätslinien“. Auf die Einzelpflanze bezogen gab es allerdings eine große Variation im Resistenzverhalten. Hier sind mehrfache Selektionen notwendig. Es konnten Einzelpflanzen-nachkommenschaften mit deutlich verbessertem Resistenzverhalten erzeugt werden.
- Das Resistenzverhalten im Jungpflanzenstadium und als adulte Pflanze ist teilweise unterschiedlich. Beide Tests sind notwendig, um das Resistenzpotential der Pflanzen zu erkennen. Weitere Unterschiede treten im Regenerationsvermögen auf. Es gibt Linien mit mittlerer Anfälligkeit aber ausgezeichnetem Regenerationsvermögen. Inwieweit dieses Merkmal im Feldbestand Komponente einer Resistenzstrategie sein kann, ist noch nicht zu beantworten.
- Beim Merkmalskomplex Inhaltsstoffe gab es durch die Linienbearbeitung gleichfalls deutliche Fortschritte. Die Vererbung dieser Merkmale ist sicher komplex und stark von Umweltbedingungen und Entwicklungs- und Wachstumsverläufen abhängig. Positiv bewertete Pflanzen müssen im Weiteren als Feldbestand geprüft werden. Parallele Verbesserungen von Hypericin- und Hyperforingehalten scheinen nur begrenzt möglich. Insbesondere im Hyperforingehalt konnten sehr hohe Gehaltswerte erreicht werden.
- Der Befruchtungstyp und der Ploidiegrad lassen sich flowcytometrisch relativ leicht bestimmen. Exakte Chromosomenzahlen können allerdings nicht festgestellt werden. Nach Kreuzungen sexueller x apomiktischer Pflanzen müssen züchterisch interessante Pflanzen auf ihren Befruchtungstyp untersucht werden. Apomikten sind fertige Sortenkandidaten, während sexuelle Pflanzen weiter aufspalten.
- Im Ergebnis der Kreuzungen entstanden zahlreiche Einzelpflanzen-nachkommenschaften, die potenzielles Zuchtmaterial sind.

7 Literatur

Gaedcke F: Johanniskraut und dessen Zubereitungen, Qualitätsbeurteilung über ein selektives, reproduzierbares HPLC Verfahren. Deutsche Apotheker Zeitung 1997, 137 (42), 117-121

Kästner U, Pank F: Entwicklung sexueller Johanniskrautlinien (*Hypericum perforatum* L.) für die Kreuzungskombinationszüchtung. 2005, Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen, eingereicht

Pank F, Matzk F, Kästner u, Blüthner WD, Foltys de Garcia E, Meister A, Ryschka U, Schumann G: Reproductive diversity and strategies for breeding in St. John's wort (*Hypericum Perforatum* L.), *Euphytica* 2003, 134, 77-84

8 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabellen:

- Tab. 1: Ergebnisse des 1. Kreuzungsschrittes in beiden Serien
- Tab. 2: Ergebnisse des 2. Kreuzungsschrittes in beiden Serien
- Tab. 3: Freilandbonituren an den Elternpflanzen 1. Kreuzungsserie und der F1-Pflanzen
- Tab. 4: Ergebnisse der Nachkommenschaftsprüfung im Jungpflanzentest
- Tab. 5: Prozentualer Anteil gesunder Pflanzen in zwei aufeinander folgenden Generationen von BIII-Hybriden
- Tab. 6: Überblick über die Inhaltsstoffanalysen in der Projektlaufzeit

Anhangstabellen:

- Tab.A1: Zusammenstellung aller positiven Pflanzen aus der 1. Kreuzungsserie, 2. Kreuzungsschritt
- Tab.A2: Zusammenstellung positiver Einzelpflanzennachkommen triploider BIII-Mutterpflanzen
- Tab.A3: Zusammenstellung weiterer positiver Nachkommenschaften aus der 2. Kreuzungsserie, 1. Kreuzungsschritt
- Tab.A4: Bewertung der BAZ-Linien im Blockversuch 2005

Abbildungen:

- Abb. 1: Schritte bei der Kastration eines Johanniskrautblütenstandes
- Abb. 2: Boniturklassen im Jungpflanzentest und Beispiele
- Abb. 3: Gesamtblick auf die Feldprüfung 2005 und Beispielparzellen

9 Liste der auf Grund des Projektes entstandenen Publikationen

Blüthner WD, Kästner U, Pank F.

Ergebnisse intraspezifischer Kreuzungen von sexuellen und apomiktischen Johanniskrauttypen (*Hypericum perforatum* L.) mit unterschiedlicher Ploidiestufe.

Vortrag, Zusammenfassung im Tagungsband „Fachtagung für Arznei- und Gewürzpflanzen des Deutschen Fachausschusses für Arznei-, Gewürz- und Aromapflanzen. 07.-09.09.2004 in Jena, S.18

Blüthner WD.

Fortschritte bei der Entwicklung von welkeresistentem Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.): Übertragung der Resistenz durch Kreuzung.

Vortrag zum 14. Bernburger Winterseminar 24.-25.02.2004, Kurzfassung der Referate und Poster, 2004, S.24-27

Blüthner WD.

Fortschritte bei der Züchtung von F1-Majoran und Johanniskraut.

Vorträge für Pflanzenzüchtung 2004, 63, 271-278

Pank F, Matzk F, Kästner U, Blüthner WD, Foltys de Garcia E, Meister A, Ryschka U, Schumann G

Reproductive diversity and strategies for breeding in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.)

Euphytica 2003, 134, 77-84

Schneider E, Pank F, Koball G, Foltys de Garcia E, Dehe M, Blüthner WD.

Einfluss des Genotypus auf die Cadmiumaufnahme des Johanniskrautes (*Hypericum perforatum* L.)

Zeitschrift für Arznei- und Gewürzpflanzen 2002, 7, 329-335

Scholze P, Pank F, Foltys de Garcia E, Blüthner WD, Dehe M, Schneider E.

Bewertung der Anfälligkeit von Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) gegenüber der Johanniskrautwelke (*Colletotrichum cf. gloeosporioides*)

Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen 2001, 6, 209-215

Tab. A1: Zusammenstellung aller positiven Pflanzen aus der 1. Kreuzungsserie, 2. Kreuzungsschritt

Feld- nummer	Pflanzen- nummer	Wuchshöhe (cm)	Wuchstyp	Resistente im Jung- pflanzentest (% Befall)				Hypericin	Pseudo hypericin	Hyperforin	Adhyperforin	Gesamt hypericin	Reproduk- tionstyp	Saatgut- bestand (g)
				tot	mittel	res. Befall								
sexuelle Qualitätsmütter x Resistenzväter														
51	1	61	aufrecht, schön					0,061	0,094	1,543	0,237	0,155		0,035
	2	67	aufrecht, schön	73	27	0	7	0,043	0,081	3,403	0,733	0,124	3x, 5	0,337
	3	67	aufrecht, schön	10	90	0	3	0,037	0,046	8,720	2,364	0,084	3x, 5	0,628
	4	60	aufrecht	13	87	0	5	0,053	0,093	1,751	0,192	0,146	3x, 9	0,237
52	1	68	aufrecht	0	100	0	5	0,041	0,042	3,656	0,572	0,084		0,142
	2	62	aufrecht	43	57	0	7	0,087	0,148	2,848	0,489	0,234	3x, 5	0,405
53	1	53	aufrecht	0	100	0	5	0,117	0,116	4,821	0,671	0,233	3x, 5	0,115
	2	70	spät	0	9	91	1	0,089	0,086	1,606	0,219	0,174	4x, 5	0,170
55	1	55	aufrecht	38	44	18	5	0,028	0,052	3,896	0,655	0,080	3x, 9	1,320
	2	43	aufrecht	0	10	90	1	0,027	0,032	2,966	0,661	0,058	3x, 5	0,823
	3	57	aufrecht											0,019
	4	50	aufrecht	8	10	82	3	0,041	0,089	1,825	0,357	0,130	3x, 9	0,109
	5	37	aufrecht	20	0	80	3	0,072	0,047	1,855	0,203	0,120	4x, 5	1,333
	7	70	halbaufrecht					0,065	0,105	3,448	0,640	0,170		0
56	1	58	aufrecht, schön	16	53	31	1	0,041	0,055	6,935	1,721	0,096	3x, 5	1,039
	2	57	aufrecht, schön	6	17	77	3	0,029	0,077	2,622	0,534	0,106	3x, 9	0,607
	3	64	aufrecht, schön	17	75	8	5	0,034	0,054	6,458	1,810	0,088	3x, 5	1,149
	4	60	aufrecht, schön	8	92	0	1	0,049	0,061	6,416	1,602	0,110	3x, 5	0,977
	5	62	aufrecht, schön	13	87	0	1	0,036	0,048	8,459	2,411	0,084	3x, 5	1,369
	6	55	schwachwüchsig, halbaufrecht	44	56	0	5	0,047	0,117	4,315	0,719	0,164	3x, 5	0,320
	7	61	aufrecht, schön	54	46	0	7	0,033	0,063	1,546	0,206	0,096	4x, 5	0,580
	8	59	aufrecht, schön	54	8	38	3	0,097	0,123	3,792	0,585	0,220	3x, 9	1,245
11	1	62	halbaufrecht	25	75	0	5	0,118	0,122	3,739	0,546	0,240	3x, 9	0,238
12	1	22	schwachwüchsig, aufrecht											0,004
	2	24	schwachwüchsig, aufrecht											0,020
	3	39	schwachwüchsig, aufrecht					0,070	0,093	3,136	0,557	0,163		0,086

Feld- nummer	Pflanzen- nummer	Wuchshöhe (cm)	Wuchstyp	Resistente im Jung- pflanzentest (% Befall)				Hypericin	Pseudo hypericin	Hyperforin	Adhyperforin	Gesamt hypericin	Reproduk- tionstyp	Saatgut- bestand (g)
				tot	mittel	res.	Befall							
	4	38	schwachwüchsig, aufrecht					0,102	0,117	3,229	0,412	0,219		0,010
sexuelle F1- Resistenzmütter x Qualitätsväter														
59	1	43	liegend	4	0	96	1	0,034	0,086	3,285	0,515	0,120	3x, 9	2,242
63	1	73	aufrecht, schön	23	77	0	5	0,064	0,083	3,752	0,648	0,147	5x, 5 ?	2,325
64	1	38	aufrecht					0,013	0,052	2,675	0,478	0,065		0
68	1	76	aufrecht	65	35	0	7,sp.	0,086	0,141	8,309	1,519	0,227	3x, 9	2,655
	2	50	aufrecht, krank	75	25	0	5	0,077	0,127	4,246	0,817	0,204	3x, 9	1,713
	3	61	aufrecht					0,034	0,097	4,296	0,516	0,131		0,010
21	1	46	großblättrig, aufrecht	48	52	0	7 reg.	0,039	0,069	5,627	1,378	0,108	3x, 9	0,722
	2	48	großblättrig, aufrecht	50	50	0	8 reg.	0,025	0,064	2,219	0,358	0,089	3x, 9	0,201
	3	22	schwachwüchsig, aufrecht											0,014
	4	59	strarkwüchsig, aufrecht					0,053	0,122	1,446	0,198	0,175		0,025
	5	42	halbaufrecht, sehr spät					0,065	0,072	5,364	1,324	0,136		
	6	38	halbaufrecht	81	19	0	7						3x, 5	0,401
25	1	49	aufrecht, schön	29	71	0	5	0,038	0,107	4,918	0,547	0,145	3x, 5	0,182
	2	48	aufrecht, schön	73	27	0	7	0,047	0,140	3,482	0,362	0,187	3x, 9	0,620
	3	30	aufrecht, schwachwüchsig	56	44	0	7						3x, 9	0,028
	4	66	aufrecht, starkwachsend	88	12	0	7	0,045	0,079	3,338	0,406	0,124	3x, 5	0,242
	5	38	aufrecht					0,081	0,252	2,333	0,250	0,333		0,185
70	1	61	aufrecht	60	40	0	5	0,020	0,070	3,790	0,583	0,099	3x, 9	0,239
71	1	51	halbaufrecht											0,050
	2	45	aufrecht					0,014	0,049	3,682	0,615	0,064		0,035
	3	65	aufrecht	77	23	0	9,sp.	0,036	0,073	3,289	0,585	0,109	3x, 9	2,437

Feld- nummer	Pflanzen- nummer	Wuchshöhe (cm)	Wuchstyp	Resistente im Jung- pflanzentest (% Befall)				Hypericin	Pseudo hypericin	Hyperforin	Adhyperforin	Gesamt hypericin	Reproduk- tionstyp	Saatgut- bestand (g)
				tot	mittel	res.	Befall							
71	4	59	aufrecht, befallen	92	8	0	9	0,058	0,109	5,815	0,638	0,167	3x, 5	0,569
	5	65	aufrecht	88	12	0	9.sp.	0,054	0,102	9,291	0,914	0,156	3x, 5	0,409
	6	65	aufrecht	69	31	0	9.sp.	0,028	0,074	3,888	0,485	0,102	3x, 9	3,682
72	1	73	halbaufrecht	60	40	0	7							1,795
	2	79	aufrecht	48	52	0	5	0,061	0,096	2,922	0,519	0,157	3x, 9	0,778
	3	49	halbaufrecht, krank					0,031	0,056	1,552	0,276	0,087		0
	4	49	aufrecht	92	8	0	7	0,057	0,150	3,035	0,420	0,207	4x, 5	0,413
	5	74	aufrecht	92	8	0	7	0,041	0,059	3,650	0,587	0,100	3x, 9	1,189
	6	75	halbaufrecht	85	15	0	7	0,029	0,046	3,119	0,530	0,075	3x, 9	0,785
	8	61	halbaufrecht	75	25	0	5	0,089	0,072	4,702	0,816	0,161	3x, 9	0,368
	9	42	halbaufrecht	25	75	0	5	0,054	0,156	5,077	0,702	0,211	2x, 9	0,988
	10	38	halbaufrecht, krank	67	33	0	7	0,016	0,031	7,907	1,103	0,047	4x, 5	0,372

Tab. A2: Zusammenstellung positiver Einzelpflanzennachkommen triploider BIII-Mutterpflanzen aus der 2. Kreuzungsserie, 1. Kreuzungsschritt

Feldnummer	Pflanzennummer	Wuchshöhe (cm)	Wuchstyp	Resistente im Jungpflanzentest (% Befall)				Hypericin	Pseudo hypericin	Hyperforin	Adhyperforin	Gesamt hypericin	Reproduktionstyp	Saatgutbestand (g)
				tot	mittel	res.	Befall							
122	1	55	homogen, aufrecht, kleinblättrig	21	8	71	3	0,067	0,067	6,189	1,057	0,134	3x, 5	0,577
	2			8	10	82	3						4x, 5	0,242
	3			2	0	98	1						3x, 5	0,192
	4			12	13	75	1						4x, 5	0,295
	5			38	62	0	5						4x, 5	0,577
	6			17	0	83	3						4x, 9	1,476
123	1	75	inhomogen halbaufrecht bis liegend, kleinblättrig	21	79	0	4	0,089	0,087	4,413	0,801	0,176	>4x, 9	0,471
	2			15	85	0	3						4x, 5	1,403
	3			46	23	31	5						4x, 5	1,678
	4			27	46	27	5						4x, 5	1,305
	5			4	58	48	3						3x, 5	0,122
131	1	70	homogen halbaufrecht großblättrig	15	64	21	7	0,132	0,121	3,744	0,764	0,235	4x, 5	1,560
	2			89	11	0	7						4x, 5	0,552
	3			73	27	0	7						4x, 5	2,011
132	1	63	inhomogen halbaufrecht großblättrig	17	31	52	3	0,068	0,079	8,202	1,422	0,147	4x, 5	2,227
	2			64	36	0	3						4x, 9	2,600
342	1	100	homogen aufrecht großblättrig	19	81	0	5	0,109	0,100	4,447	0,756	0,210	4x, 9	5,511
	2			25	75	0	3						4x, 5	1,115
	3			73	27	0	7						4x, 9	4,581
	4			33	67	0	3						4x, 5	1,851
	5			15	85	0	3						4x, 5	3,231
345	1	70	inhomogen	75	25	0	7						4x, 9	2,555
	2			85	15	0	7						3x, 5	2,511
	3			35	65	0	7						5x, 5	0,482
	4			73	27	0	5						5x, 5	1,381
376	1	82	homogen lockerer Blütenhorizont	88	12	0	5	0,126	0,129	5,321	1,156	0,256	4x, 5	1,271
	2			90	10	0	7						4x, 9	0,819
	3			75	25	0	5						4x, 5	0,836
	4			31	69	0	5						4x, 5	0,583
	5			88	12	0	5						4x, 9	0,878
378	1	70	homogen lockerer Blütenhorizont	44	56	0	5	0,114	0,124	4,856	0,944	0,238	4x, 9	0,077
	2			86	14	0	9						4x, 9	0,202
	3			100	0	0	9						5x, 5	0,741
	4			43	57	0	7						4x, 5	0,260
	5			58	42	0	7						4x, 9	0,652

Tab. A3: Zusammenstellung weiterer positiver Nachkommenschaften aus der 2. Kreuzungsserie, 1, Kreuzungsschritt

Feld- nummer	Pflanzen- nummer	Wuchshöhe (cm)	Wuchstyp	Resistente im Jung- pflanzenzest (% Befall)				Hypericin	Pseudo hypericin	Hyperforin	Adhyperforin	Gesamt hypericin	Reproduk- tionstyp	Saatgut- bestand (g)
				tot	mittel	res.	Befall							
29	1	40	halbaufrecht, Kleinblättrig	15	85	0	3	0,109	0,147	3,040	0,291	0,255	2x, 9	0,802
	2	52		29	71	0	7	0,097	0,096	3,947	0,627	0,193	2x, 9	1,408
31	1	48	halbaufrecht, Kleinblättrig	69	31	0	7	0,116	0,136	7,121	1,092	0,252	3x, 9	0,331
	2	55		15	85	0	9	0,101	0,092	4,397	0,658	0,193	2x, 9	1,272
131	1	65	halbaufrecht	27	73	0	5	0,083	0,061	4,261	0,650	0,144	4x, 5	0,135
133	1	82	starkwüchsig, halbaufrecht	19	81	0	5	0,137	0,196	2,364	0,445	0,333	4x, 5	0,731
	2	76		6	94	0	5	0,096	0,096	4,514	0,836	0,192	4x, 5	1,853
	3	85		94	6	0	7	0,167	0,186	2,528	0,335	0,353	3x, 5	0,285
309	1	75	halbaufrecht	0	100	0	1	0,056	0,078	5,087	0,608	0,134	2x, 9	0,118
	2	58		0	100	0	1	0,080	0,087	5,736	0,950	0,167	2x, 9	1,639
	3	80		0	100	0	1	0,109	0,109	3,856	0,475	0,218	2x, 9	0,334
	4	60						0,074	0,076	4,475	0,808	0,151		1,785
	5	59		0	100	0	2	0,077	0,060	3,964	0,624	0,136	2x, 9	0,573
	6	50						0,065	0,082	2,949	0,385	0,148		0
	7	61		45	55	0	7	0,113	0,111	3,989	0,969	0,224	3x, 5	3,052
342	1	60	starkwüchsig, halbaufrecht					0,049	0,058	1,448	0,395	0,107		0
	2	88		50	50	0	7	0,059	0,068	2,431	0,441	0,127		0,892
	3	80		25	75	0	5	0,063	0,077	6,054	1,347	0,140	3x, 9	0,225
	4	92		29	71	0	7	0,067	0,064	5,135	0,943	0,132	3x, 5	0,583
351	1	78	aufrecht					0,064	0,093	2,042	0,268	0,158	4x, 5	0,004
	2	72		19	81	0	1 spaltet	0,053	0,068	2,070	0,348	0,121	4x, 5	0,268
	3	64		0	4	96	1	0,087	0,099	3,063	0,415	0,186	4x, 5	0,370
353	1	32	Zwerg, aufrecht									3x, 5	0,033	
354	1	64	spät, aufrecht	29	71	0	7	0,085	0,106	5,310	0,862	0,191	4x, 5	0,198
	2	57		19	81	0	7	0,083	0,092	4,466	0,911	0,175	4x, 5	0,505
	3	64		13	87	0	2	0,090	0,094	5,929	1,008	0,184	4x, 5	0,631
376	1	66	halbliegend					0,090	0,114	2,800	0,388	0,204		0

Tab. A4: Bewertung der BAZ-Linien im Blockversuch 2005

Feldnummer	BAZ-Nummer	Resistente im Jungpflanzentest (% Befall)				Wuchshöhe (cm)	Wuchstyp/Homogenität (Note)	Hypericin	Pseudo hypericin	Hyperforin	Adhyperforin	Gesamt hypericin	Reproduktionstyp
		tot	mittel	res.	Befall								
1a	341-01-a-02	100	0	0	9	55	spät, großblättrig 3						
1b						65							
1c								55					
2a	341-01-a-10	98	2	0	9	55	spät 5						
2b						55							
2c								55					
3a	341-01-a-03-	98	2	0	9	60	spät 3						
3b						50							
3c								50					
4a	341-01-b-04	96	4	0	9	58	spät 5						
4b						55							
4c								50					
5a	341-01-b-01	94	6	0	9	50	spät, großblättrig 3						
5b						58							
5c								50					
6a	342-02-a-07	94	6	0	8, spal.	52	spät, kleinblättrig 7						
6b						53							
6c								58					
7a	341-02-a-11	98	2	0	9	50	spät 5						
7b						60							
7c								55					
8a	341-03-c-04	100	0	0	9	60	meist früh kleinblättrig 3						
8b						65							
8c								60					
9a	247-01-c-01	28	72	0	5, reg.	35	sehr spät, niedrig 7						
9b						40							
9c								40					
10a	247-03-c-15	8	92	0	5	60	sehr früh 7						
10b						63							
10c								60					

Abb. 1: Schritte bei der Kastration eines Johanniskrautblütenstandes



Ausgewählter Blütenstand



Kastrationsfähige Blüten nach Entfernen alter und junger Blüten



Kastrierter Blütenstand



Bestandteile der Johanniskrautblüte