

## **Züchterische Verbesserung von Baldrian zur Erhöhung der Rentabilität und Drogenqualität (Phase I bis III)**

- Laufzeit:** 01.11.2008 - 31.12.2018
- Forschungsstelle:** Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)  
Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung  
Arbeitsgruppe Heil- und Gewürzpflanzen  
Vöttinger Straße 38  
85354 Freising
- Projektleitung:** Dr. Heidi Heuberger
- Förderung:** Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft unter den Förderkennzeichen 22015008 (Phase I), 220214111 (Phase II) und 22003015 (Phase III) aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages.

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages



### **Problemstellung/Zielsetzung**

Das Projekt ist Teil des Demonstrationsvorhabens zur züchterischen und anbautechnologischen Verbesserung der Produktion von Kamille, Baldrian und Melisse. Das Verbundvorhaben hat das Ziel zu zeigen, dass es durch entsprechende Investitionen in Forschung und Entwicklung gelingen kann, die Rentabilität und Produktqualität zu verbessern und dadurch den Anbau dieser Arten in Deutschland zu intensivieren sowie den Absatz zu international üblichen Preisen zu steigern.

Das Teilprojekt zur Züchtung von Baldrian, *Valeriana officinalis* L., hat das Ziel, durch Auslese und Kreuzungszüchtung eine oder mehrere Baldriansorten mit gröberen und weniger verzweigten Wurzelstöcken mit hohem Ertrag und gutem Inhaltsstoffgehalt zu entwickeln. Dadurch sollen Ernte- und Aufbereitungsverluste reduziert, der Ertrag erhöht und die Reinigung der Wurzeln vereinfacht werden. Gleichzeitig wird im Hinblick auf ein zu entwickelndes Direktsaatverfahren Wert auf gute Saatgutkeimfähigkeit und Triebkraft sowie eine geringe Schossneigung im 1. Kultivierungsjahr gelegt. Auf diese Weise sollen insgesamt die Rentabilität der Kultur und die Drogenqualität verbessert werden.

## Sachstand

### Charakterisierung und Aufbau des Zuchtmaterials

Der Grundstein für die züchterische Bearbeitung wurde 2008-2010 mit der **Beurteilung einer großen Herkunftsammlung** mit einhergehender **Selektion** von Individuen gelegt. Die selektierten Einzelpflanzen (Eliten) erwiesen sich als besonders interessant in ihrem morphologischen Wurzelbau und/oder in ihrem Gehalt an Inhaltsstoffen.

Aus **Kreuzungen** von Eliten mit gegensätzlichen Eigenschaften, die Wurzelmorphologie und Inhaltsstoffe betreffend, gingen mehrere F<sub>1</sub>-Populationen hervor. Durch offenes Abblühen (*open pollination*) an Isolationsstandorten entstanden daraus 30 F<sub>2</sub>-Bestände, aus denen 2013 Einzelpflanzen mit kombinierten Eigenschaften selektiert wurden. Von diesen wurde 2014, nach Abstammung getrennt in Blühgruppen, die F<sub>3</sub>-Generation erzeugt. Mit durchschnittlich 94% zeigte das Saatgut eine sehr gute Keimfähigkeit, sodass alle zehn F<sub>3</sub>-Blühgruppen-Populationen am Baumannshof auf ihre Leistung geprüft werden konnten. Drei Populationen wurden selektiert, die eine bestmögliche Kombination züchtungsrelevanter Merkmale zeigen. In 2016 wurden diese drei Populationen zusammen mit einem Standard für Inhaltsstoffe und einem Standard für grobe Wurzelstruktur in einer vierortigen Feldleistungsprüfung unter Praxisbedingungen angebaut. Bei gesamtheitlicher Betrachtung mehrerer Merkmale hat sich eine Kreuzungspopulation aufgrund ihrer Eigenschaften als guter Sortenkandidat erwiesen und wurde 2017 zur Absicherung der Ergebnisse nochmals mehrortig geprüft. Die gute Leistung dieses Sortenkandidats hat sich bestätigt, sodass eine Markteinführung unter der markenrechtlich geschützten Bezeichnung Weila<sup>®</sup>riana angestrebt wird. Parallel zu den Prüfungen werden die Saatgutvermehrungsbestände aufgebaut.

Aus ursprünglich 21 Elitepflanzen, selektiert aufgrund grober Wurzelstruktur und guter Inhaltsstoffe, wurden im Gewächshaus durch Isolation der Blütenstände **Inzuchtlinien** erzeugt. Die Erzeugung der nächsten Inzuchtgeneration bedarf im Normalfall mindestens zwei Jahre, weil zur Blütenbildung ein Kältereiz notwendig ist. Um den Zyklus zu beschleunigen wurde bereits 2009/2010 eine Methode, die die Anlage von Blüten durch eine künstlich herbeigeführte Kälteeinwirkung oder durch die Anwendung von Phytohormonen einleitet, erarbeitet. Dadurch war es möglich, bis einschließlich 2016 insgesamt 434 Inzuchtlinien zu erzeugen und 196 Inzuchtlinien der Inzuchtstufen I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub>, und I<sub>4</sub> auf ihre Leistung im Feld zu prüfen. Aus den geprüften Inzuchtlinien wurden bis einschließlich 2016 insgesamt 249 Individuen mit guten, dem Zuchtziel entsprechenden Eigenschaften selektiert. Die wichtigen Eigenschaften Vitalität und Wüchsigkeit sowie die Anzahl der Inzuchtlinien gingen tendenziell mit zunehmender Inzuchtstufe zurück. Dies sind deutliche Zeichen einer Inzuchtdepression. Besonders ausgeprägt war der Effekt schließlich beim Übergang von der Inzuchtstufe I<sub>3</sub> zur I<sub>4</sub>. Deshalb ist die I<sub>3</sub>-Generation auch jene, die für weitere Züchtungsschritte maßgeblich herangezogen wird. Im Vordergrund steht bei der Inzuchtlinienentwicklung das Interesse der Homogenisierung von Morphologie und Genetik des Zuchtmaterials, um diese Linien im zweiten Schritt als Kreuzungskomponenten zu verwenden.

Die Leistung von Nachkommen (F<sub>1</sub>) aus Einzelpflanzenkreuzungen wurden 2016/2017 und werden 2018 im Feld geprüft, um die **Kombinationseignung** abzuschätzen und eine aussichtsreiche Kombination für eine Sorteneinführung zu finden. Es konnten bereits Kreuzungen selektiert werden, die eine gute Leistungskombination der geforderten Zuchtziele zeigen. Mittels *in vitro* Vermehrung sollen die Komponenten vervielfältigt werden, um damit Saatgutvermehrungsbestände aufzubauen. Dadurch kann genügend Saatgut für weitere, auch mehrortige, Prüfungen der Leistung im Feld erzeugt werden. Erste Feldprüfungen, mit Saatgut, das auf *in vitro* vermehrten Pflanzenmaterial erzeugt wurde, wurden 2018 angelegt.

Zur Ermittlung der **Auskreuzungsrate** (% Fremdbefruchtung) wurden auf der Genomebene auftretende Polymorphismen (AFLP's) herangezogen und die I<sub>1</sub>-Generation potenzieller Paarungskandidaten untersucht. Dazu wurde die DNA von je 20 Individuen von 16 Inzuchtlinien und deren Ausgangspflanze isoliert, und es wurden homozygot vorliegende polymorphe Ban-

den gesucht. Parallel dazu wurden alle 16 Ausgangspflanzen verklont. Drei geeignete Paarungen wurden im Frühjahr 2013 an zwei Standorten aufgepflanzt und die auftretenden Auskreuzungsraten aus zwei Jahren bestimmt. Die molekulargenetischen Untersuchungen ergaben eine Auskreuzungsrate von 78 bis 98%.

### **Gewebekulturtechniken**

Bei der Etablierung einer **Methode zur Gewinnung von Haploiden** wurden 2011 und 2012 zahlreiche Untersuchungen mit tetraploiden Spenderpflanzen durchgeführt. Die Versuche, durch variierende Kälte- oder Wärme-Stressbehandlung der Knospen über Mikrosporen haploide Pflanzen zu erzeugen, lieferten zuerst erfolgsversprechende Erkenntnisse, sind letztendlich jedoch fehlgeschlagen. Es entwickelte sich eine größere Anzahl von Kalli, aus denen sich auch einige Regenerate ausbildeten. Die ersten Auswertungen von Blattmaterial im Flow-Cytometer ergaben, dass auch scheinbar diploide, also mit halbiertem Chromosomensatz ausgestattete, Pflanzen entstanden waren. Bei späteren Messungen konnte die Halbierung des Chromosomensatzes allerdings nicht mehr nachgewiesen werden.

Dem Ansatz, mit Hilfe von **Reizbefruchtung** haploide Pflanzen über das Gynözeum zu gewinnen, wurde nachgegangen, indem ausgewählte Mutterpflanzen kastriert und mit Pollen des nah verwandten Feldsalats und mit Baldrian einer niedrigeren Ploidiestufe bestäubt wurden. Es konnten keine lebensfähigen Regenerate beziehungsweise keine Pflanzen mit reduziertem Chromosomensatz erzeugt werden.

Im Anschluss an eine Haplonten-Gewinnung erfolgt für die Erzeugung von dihaploiden Pflanzen eine **Wiederaufdopplung des Chromosomensatzes**. Untersuchungen mit 0,01 bis 0,6%igen Colchizininlösungen an tetraploiden Sämlingen ergab eine steigende Aufdoppelungsrate mit zunehmender Colchizinkonzentration. Eindeutig oktaploide Individuen konnten ab einer Behandlung mit einer 0,1%igen Colchizininlösung gefunden werden. Im weiteren Verlauf wurde ersichtlich, dass eine Aufdopplung nicht in der gesamten Pflanze erfolgt war und dass in der  $I_1$ -Nachkommenschaft von oktaploiden Individuen verschiedenste Ploidiestufen auftraten (Mixoploidie). Bei einer erneuten Selbstung oktaploider  $I_1$ -Pflanzen wurden abermals unterschiedliche Ploidiestufen ermittelt. Es bleibt weiterhin fraglich, welche Ursache hierfür angeführt werden kann. Denkbar ist eine unvollständige somatische Aufdoppelung der Elternpflanze oder eine Störung während der Reifeteilung.

### **Kreuzung zwischen verschiedenen Cytotypen**

Die unterschiedlichen Cytotypen, die es bei Baldrian natürlicherweise gibt, eröffnen Möglichkeiten der Kombination und dadurch die Entstehung neuer Variabilität und vielleicht auch neuer Pflanzeigenschaften. Des Weiteren sind zur Erstellung einer **polyploiden Serie** Kreuzungen unterschiedlicher Ploidiestufen notwendig. In den Nachkommen, die durch solche Kreuzungen entstanden sind, wurden 2011 nicht plausible Ploidieniveaus ermittelt. Ob dies am Pflanzenmaterial lag oder durch die Messmethode bedingt war, wurde 2013 in einer Studienabschlussarbeit untersucht. Die Ploidieniveaus der Elternherkünfte und deren  $F_1$ -Nachkommen wurden hierfür sowohl flow-cytometrisch als auch durch Chromosomenzählung ermittelt und verglichen. Die flow-cytometrischen Untersuchungen wurden insoweit adaptiert, als dass in jeder Probe ein in seiner Genomgröße (diploid) definierter Standard mit untersucht wurde. Dadurch war es möglich, sowohl die absoluten Genomgrößen der Proben zu bestimmen als auch deren Genomgröße relativ zum Standard.

Der Ploidiegrad, der für die jeweilige Herkunft angenommen wurde, konnte durch die Chromosomenzählung bestätigt werden. Dies galt allerdings nicht für die Kreuzungsnachkommen. Bei zwei Kreuzungen wurden gänzlich andere Ploidiegrade ermittelt. Bei einer weiteren Kreuzung konnten in den Nachkommen verschiedene Ploidieniveaus ermittelt werden. Die Flow-Cytometrie und die Chromosomenzählung ergaben fünf sich entsprechende Ploidieniveaus, deren Genomgrößen sich jedoch nicht additiv verhalten.

Da die Kreuzungsnachkommen nicht erwartete Ploidiegrade und innerhalb einer Nachkommenschaft auch unterschiedliche Ploidiegrade aufwiesen, ist die Realisierbarkeit einer polyploiden Serie bei einem vertretbaren Aufwand nur schwer möglich.

## Einfluss der Wurzelmorphologie auf Inhaltsstoffe

Ein Züchtungsschwerpunkt ist die Reduzierung des Seitenwurzelanteils mit einhergehender Selektion auf dicke Adventivwurzeln. Es wurde befürchtet, dass ein negativer Zusammenhang zwischen der Selektion in Richtung grober Wurzelstruktur und den Inhaltsstoffgehalten (Valerensäure und Ätherisches Öl) existiert. 2012/2013 wurden Untersuchungen durchgeführt, die eine Abschätzung diesbezüglich zulassen sollten.

Nach einer praxisüblichen Kultivierung erfolgte an vier aus Klon-Pflanzen bestehenden Beständen eine schonende Ernte mit anschließender Auftrennung der Wurzeln in vier verschiedene Durchmesser und in zwei Wurzelordnungen (Adventivwurzel, Seitenwurzel) sowie Rhizom. Unterschiede im Gehalt an Inhaltsstoffen zwischen Adventiv-, Seitenwurzeln und Rhizom waren deutlich vorhanden. Dabei zeigten die untersuchten Inhaltsstoffe und Bestände unterschiedliche Verteilungsmuster. Die Inhaltsstoffgehalte zwischen den Wurzeldurchmessern unterschieden sich kaum, waren mit zunehmendem Durchmesser sogar leicht steigend.

Unter Berücksichtigung der Inhaltsstoffgehalte in den einzelnen Fraktionen und deren Anteil am gesamten Drogengewicht kann davon ausgegangen werden, dass eine Selektion auf Grobwurzeligkeit keine negative Auswirkung auf die Gehalte an Ätherischem Öl und Valerensäuren hat.

Zudem wurde das Pflanzenmaterial mittels bildgebender und bildanalytischer Verfahren untersucht, um die Verteilung des ätherischen Öls im Wurzelquerschnitt näher zu beleuchten. Im gesamten Wurzelquerschnitt waren Öltröpfchen vorhanden, wobei die Anzahl und Dichte zur Wurzeloberfläche hin zunahm und die vier Klone eine unterschiedliche Verteilung der Öltröpfchendichte über den Wurzelquerschnitt zeigten. Die oberflächennahe Lokalisation der Öltröpfchen verdeutlicht, wie wichtig eine schonende Wurzelernte und -aufbereitung ist, wohingegen die Verteilung der Öltröpfchendichte als Hilfsmittel bei der züchterischen Selektion herangezogen werden könnte.

## Projektbezogene Veröffentlichungen

Penzkofer, M.; Baron, A.; Naumann, A.; Krämer, A.; Schulz, H.; Heuberger, H.  
Characterization of essential oil distribution in the root cross-section of *Valeriana officinalis* L. s.l. by using histological imaging techniques.  
Plant Methods, 2018, 14, 41, <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0309-4>

Penzkofer, M.; Heuberger, H.; Steinhauer, B.; Nießen, C.; Müller, M.  
Erkenntnisse zur *in-vitro* Etablierung und Vermehrung über direkte Adventivsprossbildung aus unreifen Infloreszenzen bei *Valeriana officinalis* L. s.l.  
Zeitschrift für Arznei- und Gewürzpflanzen, 2018, 22, 33-39

Penzkofer, M.; Seefelder, S.; Heuberger, H.  
Estimation of outcrossing rates using genomic marker and determination of seed quality parameters in *Valeriana officinalis* L. s.l. under field conditions.  
Euphytica, 2018, 214:81, <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2164-9>

Heuberger, H.; Penzkofer, M.  
Demonstrationsprojekt Arzneipflanzen: Züchterische Verbesserung von Baldrian  
2. Kongress „Mit Pflanzenzüchtung zum Erfolg“, 3.-4. April 2017, Berlin, Gülzower Fachgespräche Band 55, S. 67-81, 2017

Penzkofer, M.; Seefelder, S.; Heuberger, H.  
Hybrid-breeding of medicinally used valerian (*Valeriana officinalis* L.) – A possible concept developing new varieties?  
2. Kongress „Mit Pflanzenzüchtung zum Erfolg“, 3.-4. April 2017, Berlin, Gülzower Fachgespräche Band 55, S. 134, 2017

Penzkofer, M., Seefelder, S., Heuberger, H.  
Hybridzüchtung bei Baldrian (*Valeriana officinalis* L. s.l.) – ein mögliches Konzept zur Entwicklung neuer Sorten?  
27. Bernburger Winterseminar Arznei- und Gewürzpflanzen, 21.-22. Februar 2017, Bernburg, S. 35-36

Penzkofer, M.  
Breeding and research on valerian (*Valeriana officinalis* L. s.l.)  
Vortrag. 2<sup>nd</sup> EUROPAM Workshop Medicinal and Aromatic Plants: Pyrrolizidine Alkaloids, GACP, Breeding and Harvesting, 7.7.2016, Krems, Austria

Penzkofer, M.; Seefelder, S.; Heuberger, H.  
Hybrid-breeding of medicinally used valerian (*Valeriana officinalis* L. s.l.). A possible concept developing new varieties?  
In: Marthe, F.; Riegler, H. (eds.), 6<sup>th</sup> International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants (BREEDMAP 6), June 19-23, 2016, Quedlinburg, Germany, Julius-Kühn-Archiv, 453, 157-160, 2016

Penzkofer, M.; Ziegler, E.; Heuberger, H.  
Contents of essential oil, valerenic acids and extractives in different parts of the rootstock of medicinal valerian (*Valeriana officinalis* L. s.l.)  
Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2014, 1, 98-106, Doi: 10.1016/j.jarmap.2014.08.002

Penzkofer, M.; Heuberger, H.; Geyer, M.; Müller, M.  
Karyologische Variabilität in Kreuzungsnachkommen - eine Herausforderung bei der Züchtung neuer Baldriansorten (*Valeriana officinalis* L. s.l.)  
In: Schmiderer, C.; Novak, J.; Marthe, F. (Hrsg.), 7. Tagung Arznei- und Gewürzpflanzenforschung, 14.-17.09.2014, Wien, Julius-Kühn-Archiv, 446, 47-51, 2014

Penzkofer, M.; Heuberger, H., Geyer, M., Killermann, B., Konnert M.  
Die Verwendung von Isoenzym-Polymorphismen - eine Herausforderungen bei der Züchtung neuer Baldriansorten (*Valeriana officinalis* L. s.l.)  
In: Schmiderer, C.; Novak, J.; Marthe, F. (Hrsg.), 7. Tagung Arznei- und Gewürzpflanzenforschung, 14.-17.09.2014, Wien, Julius-Kühn-Archiv, 446, 47-51, 2014

Argyropoulos, D.; Biertümpfel, A.; Blum, H.; Blüthner, W.-D.; Hammer, M.; Heuberger, H.; Jubaer, H.; Junghanns, W.; Meinhold, T.; Müller, J.; Neumaier, G.; Paladey, E.; Penzkofer, M.; Plescher, A.; Reichardt, I.; Wahl, S.; Ziegler, T.  
Baldrianwurzeln – effiziente Produktion eines hochwertigen Rohstoffs  
In: FNR (Hrsg): Gülzower Fachgespräche, Tagung Arzneipflanzenanbau in Deutschland – mit koordinierter Forschung zum Erfolg, 2. Tagung, 16./17.Oktober 2013, Bad Blankenburg (Thüringen), Band 44, 87-103, 2014

Penzkofer, M.; Ziegler, E.; Heuberger, H.  
Konsequenzen aus der Verteilung relevanter Inhaltsstoffe in Baldrianwurzeln  
Vortrag und Kurzfassung. Tagungsband 24. Bernburger Winterseminar Arznei- und Gewürzpflanzen, 18.-19.02.2014, Bernburg, 28-30

Heuberger, H.; Penzkofer, M.  
Züchtung von Baldriansorten (*Valeriana officinalis* L. s.l.) mit groben und inhaltsstoffreichen Wurzeln  
Abstract und Posterpräsentation. 23. Bernburger Winterseminar Arznei- und Gewürzpflanzen, 19.-20.02.2013, Bernburg, 38-39

Penzkofer, M.; Heuberger, H.  
Züchtung einer Baldriansorte (*Valeriana officinalis* L. s.l.)  
Posterpräsentation. Eröffnung des Grünen Zentrums Puch. 14.10.2012, Puch (Fürstenfeldbruck)

Penzkofer, M.; Heuberger, H.  
Züchtung von Baldriansorten (*Valeriana officinalis* L. s.l.) mit groben und inhaltsstoffreichen Wurzeln  
Posterpräsentation. Eröffnung des Grünen Zentrums in Puch. 14.10.2012, Puch (Fürstenfeldbruck)

Heuberger, H.; Penzkofer, M.  
Züchtung von Baldriansorten (*Valeriana officinalis* L. s.l.) mit groben und inhaltsstoffreichen Wurzeln  
Poster anlässlich des 20-jährigen Bestehens der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e. V., Bonn, 2012

Heuberger, H.; Penzkofer, M.  
Baldrian Feldtag am 20. September 2012, LfL Baumannshof  
Durchführung des Feldtags und Präsentation des Zuchtmaterials

Heuberger H.  
Neue Erkenntnisse und Entwicklungen zur Produktion von Baldrianwurzeln - Baldrian-Feldtag am 20.09.2012 auf der LfL-Versuchsstation Baumannshof.  
Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen, 18(1), 30-32, 2013

Heuberger, H.; Seefelder, S.; Müller, M.  
Towards developing dihaploids from tetraploid valerian (*Valeriana officinalis* L. s.l., Valerianaceae)  
Abstract. 5<sup>th</sup> International Symposium on Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, June 18-20 2012, Vienna, 35

Heuberger, H.; Heubl, G.; Müller, M.; Seefelder, S.; Seidenberger, R.  
Verwandtschaftsverhältnisse und Ploidiestufen ausgewählter Herkünfte als Ausgangsmaterial für die Züchtung von Arznei-Baldrian (*Valeriana officinalis* L. s.l.)  
Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen, 17(1), 28-37, 2012

Heuberger, H.; Honermeier, B.  
Eigenschaften der Baldriansorten und Potenziale für die Züchtung  
Kurzfassung. Tagungsband 22. Bernburger Winterseminar zu Fragen der Arznei- und Gewürzpflanzenproduktion vom 21.-22.02.2012, Bernburg, 29-30

Honermeier, B.; Heuberger, H.; Doernfeld, P.  
Untersuchungen zur Wirkung von Phytohormonen auf die Blühinduktion von Baldrian (*Valeriana officinalis* L.). Posterpräsentation.  
Kurzfassungen der Vorträge und Poster. 6. Fachtagung Arznei- und Gewürzpflanzen, 19.-22.09.2011, Berlin, 103-105

Heuberger, H.; Heubl, G.; Müller, M.; Seefelder, S.; Seidenberger, R.  
Verwandtschaftsverhältnisse und Ploidiestufen ausgewählter Herkünfte und Wildformen des Arznei-Baldrians (*Valeriana officinalis* L. s.l.)  
Kurzfassungen der Vorträge und Poster. 6. Fachtagung Arznei- und Gewürzpflanzen, 19.-22.09.2011, Berlin, 90-92

Heuberger, H.; Bomme, U.; Seefelder, S.; Seidenberger, R.  
Variabilität der Wurzeigenschaften und Verwandtschaft eines aktuellen Baldriansortiments  
Posterpräsentation. 20. Bernburger Winterseminar zu Fragen der Arznei- und Gewürzpflanzenproduktion, 23.-24.02.2010, Bernburg, 37-38