

Gefördert durch



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

Projektträger



Bundesanstalt für
Landwirtschaft und Ernährung

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Schlussbericht zum Thema

“ Erhöhung der Anbauwürdigkeit von Luzerne (*Medicago sativa* L.) als Futterpflanze- Neue Impulse für die Königin der Futterpflanzen“ (LuzNutz)

Förderkennzeichen: 2818EPS002 (JKI)
2818EPS035 (IPK)
2818EPS036 (INP)
2818EPS037 (SZS)

Projektnehmer:

**Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI) (Koordination),
Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Leibniz-Institut für
Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP), Saatucht Steinach GmbH & Co KG (SZS).**

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen der BMEL Eiweißpflanzenstrategie

Gemeinsamer Teil des Abschlussberichts

Kurzfassung

Kleinkörnige Leguminosen leisten einen wichtigen Beitrag für eine nachhaltige Landwirtschaft und gelten dabei als wertvolle heimische Eiweißressource für die Tierfütterung. Insbesondere die Luzerne (*Medicago sativa*) besitzt große Potenziale im Trockenmasse- und Eiweißertrag, ist aber in Deutschland züchterisch kaum bearbeitet. Mit dem Verbundvorhaben LuzNutz soll Züchtungsforschung und Züchtung an dieser Feinleguminose neu initiiert werden. Entlang der Wertschöpfung wurden basierend auf genetischen Ressourcen durch Kombination neuer technologischer Methoden und klassischer Züchtungsmethodik, die Grundlage für die Züchtung neuer ertragreicher und -stabiler Sorten gelegt. Dabei wurde eine hohe genetische Variabilität in genetischen Ressourcen der Luzerne durch sequenzbasierte Analysen ermittelt, die auf einen Kulturpool und einen Wildpool zurückgehen. Ein ausgewähltes Materialsubset wurde hinsichtlich Phosphoraufnahmeeffizienz, Wurzelsystemarchitektur, Trockenmasseertrag und Futterqualität sowie Anthraknoseresistenz phänotypisiert und bietet mit hoher phänotypischer Variabilität ein großes züchterisches Nutzungspotential und wissenschaftliche Anschlussfähigkeit. Mit etablierten Methoden zur Identifikation von Anthraknose-Resistenz und der Plasmabehandlung von infiziertem Saatgut wurden weiterhin Methoden entwickelt, die in einem Zuchtprogramm Einsatz finden können. Die in diesem Projekt erhobenen Ergebnisse bieten die Grundlage für weitere züchtungsrelevante Projekte, die auch vor dem Hintergrund des Klimawandels, eine zukünftige Ausweitung der Anbaufläche für Luzerne bedingen könnten.

Abstract

Fine-grained legumes are an important part of sustainable agriculture and are considered a valuable domestic source of protein for animal feed. In particular, alfalfa (*Medicago sativa*) has considerable potential in terms of dry matter and protein yield; however, it has not been the subject of significant domestic breeding efforts in Germany. New breeding research and breeding of this fodder legume will be initiated by the LuzNutz project. Based on plant genetic resources, a combination of new technologies and conventional breeding methods has been used to foster new high-yielding, stable varieties. In the present study, high genetic variability in the genetic resources of alfalfa was identified through sequence-based analyses, which revealed the existence of two distinct genetic pools: a culture pool and a wild pool. A selected subset of materials was subjected to phenotypic analysis with regard to phosphorus uptake efficiency, root system architecture, dry matter yield and feed quality, as well as anthracnose resistance. The high phenotypic variability inherent to this subset offers significant potential for the advancement of breeding and follow-up scientific inquiry. The development of methods to identify resistance to anthracnose and to apply plasma treatment to infected

seeds has provided methods that can be used in further breeding programmes. Findings from this project provide the basis for further breeding-related projects, particularly in the context of climate change, which could lead to an increase in the area under alfalfa cultivation.

Inhaltsverzeichnis gemeinsamer Abschlussbericht

1	Einführung	4
1.1	Gegenstand des Vorhabens	
1.2	Ziele und Aufgabenstellung des Projektes	
1.3	Planung und Ablauf des Projektes	
2	Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde	5
I.	Bericht des Teilvorhabens JKI	9
3	Material und Methoden	
4	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	
5	Diskussion der Ergebnisse JKI	
6	Angaben zum vorraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse	
7	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	
II.	Bericht des Teilvorhabens IPK	34
3	Material und Methoden	
4	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	
5	Diskussion der Ergebnisse IPK	
6	Angaben zum vorraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse	
7	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	
III.	Bericht des Teilvorhabens INP	56
3	Material und Methoden	
4	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	
5	Diskussion der Ergebnisse INP	
6	Angaben zum vorraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse	
7	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	
IV.	Bericht des Teilvorhabens SZS	76
3	Material und Methoden	
4	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	
5	Diskussion der Ergebnisse SZS	
6	Angaben zum vorraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse	
7	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	
5	Gemeinsame Diskussion der Ergebnisse	84
8	Zusammenfassung	88
9	Literaturverzeichnis	89
10	Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt	92

1 Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Die Feinleguminose Luzerne (*Medicago sativa*) gehört mit einem weltweiten Anbauumfang von etwa 30 Millionen Hektar zu den leistungsfähigsten mehrjährigen Futterpflanzen mit dem höchsten Ertragspotential und einer hochwertigen Futterqualität (Eiweißressource). Die für die Fütterung von Schweinen, Kühen, Schafen, Pferden und Geflügel angebaute Luzerne wird hauptsächlich in den USA auf einer Fläche von 7,4 Mio ha, in Argentinien von 7,0 Mio ha, in Kanada von 2,0 Mio ha, in Russland von 1,8 Mio ha kultiviert. In Deutschland ist der Anbauumfang mit 44 000 ha - auch im Vergleich zu den heimischen Körnerleguminosen wie Ackerbohne mit 60 000 ha, Erbse mit 117 000 ha und Süßlupine mit knapp 30.000 ha – als sehr gering einzustufen. Gefördert wird der Anbau der Luzerne als Greening-fähige Leguminose (Erhalt und Förderung der biologischen Vielfalt, als Reinsaat angebaut), sowie zur Erzeugung von Bioenergie und zur Futtermittelherstellung (Heu, Trockenfutter, Pellets, Silage). Des Weiteren kann durch die vergleichsweise hohen Rohproteingehalte der Zukauf von Eiweißfuttermitteln reduziert werden. Das Saatgut der Luzerne wird überwiegend aus dem Mittelmeerraum oder aus Nordamerika importiert.

Um die Qualität des Rohproteins nicht zu schmälern ist der Anbau von gesunden Pflanzen unabdinglich. Der Anbau resistenter Sorten ist sicherlich die ökologisch wertvollste Variante zur Sicherung der Futterpflanze in Deutschland.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts, Bezug des Vorhabens zu den einschlägigen Zielen der EPS oder zu konkreten Bekanntmachungen und Ausschreibungen

Gesamtziel des Vorhabens ist es, für eine in Deutschland kaum züchterisch bearbeitete, aber wertvolle kleinsamige, heimische Eiweißpflanze, ertragreiche und ertragsstabile Sorten für eine nachhaltige Tierfütterung zu entwickeln. Dazu sollen Züchtungsforschung und Züchtung neu initiiert werden. Entlang der Wertschöpfungskette sollen basierend auf genetischen Ressourcen durch Kombination neuer technologischer Methoden mit klassischen Methoden der Züchtungsforschung, (an den Klimawandel angepasste) marktrelevante leistungsfähige Luzerne-Sorten entwickelt werden, die eine nachhaltige und ökologische Verwertung der Pflanze als hochwertiges heimisches Futtermittel ermöglichen.

Zielsetzung: Die Agrarwirtschaft in Deutschland sieht sich mit wachsenden gesellschaftlichen Anforderungen an die Erzeugung von hochwertigen Futtermitteln sowie von Ausgangsstoffen für den Food und Non-Food Bereich konfrontiert. Diese Anforderungen sind mit der gleichzeitigen Erwartung eines nachhaltigen Umgangs mit den bewirtschafteten Ressourcen, einer Minimierung von Gewässerbelastungen und klimarelevanten Emissionen, der Bewahrung der biologischen Vielfalt, sowie mit einer verantwortungsvollen Anwendung von Dünge- und Pflanzenschutzmitteln verbunden.

Der Leguminosenanbau ist in besonderer Weise dazu geeignet, diesen Anforderungen zu entsprechen. Die verstärkte (Wieder)Eingliederung der Eiweißpflanze Luzerne in die landwirtschaftlichen Fruchtfolgen würde einen Beitrag zu einer **nachhaltigen Erzeugung und Bereitstellung nachwachsender Rohstoffe und daraus abgeleiteter Produkte der Tierfütterung** leisten, indem sie zur Diversifizierung der Fruchtfolgen, zur Erweiterung der

Rohstoffbasis sowie zur Bereicherung der Anbauoptionen beiträgt.

1.3 Planung und Ablauf des Projekts

Das Projekt ist ein Verbundvorhaben von drei wissenschaftlichen Einrichtungen (IPK, JKI, INP) und der Saatzucht Steinach als Wirtschaftspartner.

Durch regen Austausch, regelmäßige Projekttreffen und gemeinsame Analysen wurde der Fortschritt des Projekts von allen Partnern gleichermaßen verfolgt und vorangetrieben.

Arbeitspakete der Module A bis C werden wurden im Verbund bearbeitet, jedoch sind die Fragestellungen und methodischen Ansätze der Arbeitspakete zwischen den Partnern sehr unterschiedlich. Aus diesem Grund wurde von den Verbundpartnern jeweils ein eigenständiger Zwischenbericht sowie aktuell je ein Abschlussbericht pro Teilvorhaben erstellt (Gliederungspunkte 3.-7.). Die Abschlussberichte der Teilvorhaben werden in kumulativer Form mit anführendem gemeinsamen Teil (Gliederungspunkte 1.-2., 8.-10.) und gemeinsamer Diskussion beim Projektträger eingereicht.

Die wissenschaftlichen und technischen Aktivitäten des Vorhabens sind entsprechend ihren Schwerpunkten in drei Projektmodule untergliedert, die die Themenbereiche ‚Ertrag und Qualität‘, ‚Ertragsstabilität‘ und ‚Sequenzbasierte Genotypisierung und genomweite Assoziationsstudien‘ umfassen.

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Sortenvielfalt / Diversität

In der Sortenübersicht der beschreibenden Sortenliste des Bundessortenamts werden knapp 20 verschiedenen Sorten gelistet, darunter auch die beiden Sorten der Saatzucht Steinach ‚Catera‘ und ‚Fleetwood‘.

Die zumeist tetraploiden Sorten sind Fremdbefruchter, heterozygot und autotetraploid. Die tetraploide Luzerne weist eine tetrasome Vererbung auf, was bedeutet, dass alle Chromosomen während der Meiose untereinander rekombinierbar sind (Saha et al., 2013). In der beschreibenden Sortenliste des Bundessortenamtes sind mit dem Stand von 2017 16 Sorten von acht Züchtern zugelassen. Wegen ihres Bastardcharakters werden sie der Art *Medicago x varia* Martyn zugerechnet. Darüber hinaus werden insgesamt 1.236 Akzessionen aus 39 verschiedenen Arten der Gattung *Medicago* als pflanzen genetische Ressourcen an der bundeszentralen Ex-situ-Genbank landwirtschaftlicher und gärtnerischer Kulturpflanzen des IPK erhalten; diese stehen für das Projekt zur Verfügung.

Ertrag (Trockenmasse)

Im Vergleich zu Rotklee, der bei zweijähriger Nutzung einen Trockenmasse-Jahresertrag von 127 dt/ ha aufweist, kann die Luzerne ohne den Einsatz von Stickstoff-Dünger und geringem Pflanzenschutzmittel-Einsatz einen Ertrag von 164 dt/ ha erzielen. Möglich ist dies aufgrund des bis zu zehn Meter tiefen Wurzelsystems (Pfahlwurzel), welches es der Luzerne gestattet, hohe Erträge auch auf eher klimatisch ungünstigen Standorten mit beispielsweise hoher Frühjahrstrockenheit zu generieren. Voraussetzung hierfür sind tiefgründige, durchlässige, leicht

erwärmbare Böden mit einem pH-Wert um 6 (Pfannkuchen, 2007, Frick et al., 2014). Zudem besitzt Luzerne ein Potential der Stickstofffixierung (409 kg N/ ha), das etwas höher liegt als beim Rotklee (361 kg N/ ha) (Berendonk, 2013, Schmidtke, 2016) und hat dementsprechend einen guten Vorfruchtwert für Getreide, Zuckerrüben, Kartoffeln oder Mais (Thaysen, 2013).

Trockenmasseertrag / Proteingehalt

Bei einer praxisüblichen zweijährigen Nutzung mit vier bis fünf Schnitten pro Jahr können 110 dt Trockenmasse (TM)/ ha und 2,6 t/ ha und Jahr Rohprotein (Frischluzerne) erzielt werden. Das entspricht einem Proteingehalt von etwa 300 g/ kg TM pro Schnitt mit leicht abnehmender Tendenz je Schnitt. Dabei hat die Luzerne einen vergleichsweise hohen Lysin- und Methionin-Gehalt. Beide essentiellen Aminosäuren sind im Gehalt und im Verhältnis zueinander für die Beurteilung des Futterwertes maßgeblich. Bei der Luzerne bestimmt hierbei ein früher Schnitt einen hohen Methioningehalt, der mit 1,5 g / 100 g Rohprotein dem Sojaprotein (1,5 g / 100 g Rohprotein) gleichwertig ist und sogar weitaus höher liegt als bei Futtererbse und Ackerbohne (0,28 g bzw. 0,24 g/ 100 g Rohprotein) (Wüstholtz, 2017).

Resistenz / Toleranz

Hohe Ertragsdefizite bei der Luzerne werden vor allem durch den pilzlichen Erreger *Colletotrichum trifolii* Bain & Essary verursacht, dem Erreger des südlichen Stängelbrenners (Anthraknose; Schubiger (AGROSCOPE), mündl. Mitteilung). Der Pilz kann bereits an jungen Pflanzen die Biomasseentwicklung erheblich verringern. In der Saatgutvermehrung wird durch den Befall die Anzahl der Blüten und somit auch des Korns erheblich minimiert. Die pathogenen Erreger können auf abgestorbenen Pflanzenteilen oder im Wurzelhals als Myzel überwintern, bei günstigen Temperaturen erneut auskeimen und neue Pflanzen infizieren. Die Mykose kann durch eine optimale Schnittführung bei gleichzeitiger guter Abtrocknung des Bestandes und Werkzeug-Hygiene (Stuteville und Erwin, 1990) nur bedingt eingedämmt werden. Da der Pilz auch samenübertragbar ist und eine chemische Bekämpfung des Pilzes durch klassische Saatgutbeize aufgrund der kaum zugelassenen Mittel nicht praktikabel ist, spielt hier die Entwicklung von resistenten Sorten eine besondere Rolle. Bereits Irwin (1977) weist auf eingeschränkte Futtermittelproduktion hin, die durch den Befall mit Anthraknose bei der Luzerne auftreten kann. Durch rekurrente Selektion konnten Genotypen oder Linien identifiziert werden, die über eine Resistenz verfügen (Clements et al. 1984). Liegen keine genetischen Resistenzressourcen vor wird bei einigen Kulturarten u.a. Mais, aber auch Körnerleguminosen eine alternative physikalische Behandlung des Saatguts mit Elektronenstrahlen (zugelassenes Verfahren, e-vita, Ceravis) durchgeführt. Zudem zeigt sich in ersten Ansätzen (Labormaßstab) eine Behandlung mit physikalischem Kaltplasma als weitere vielversprechende Alternative (N. Wannicke, INP Greifswald, mündl. Mittlg.). Plasma gilt als vierter physikalischer Aggregatzustand, dessen Materie unter anderem aus Ionen, reaktiven Spezies und Elektronen besteht. Bis zum Jahr 2017 wurden mehr als 73 wissenschaftliche Artikel zur Behandlung von Saatgut mit Kaltplasmen (Temperaturen <40°C) veröffentlicht. Die Anwendung des Kaltplasmas in der Vor- und Nachernte wird, neben weiteren physikalischen Methoden (UV-Licht, Ultraschall, gepulste elektrische Felder), ab 2019 in dem BMBF geförderten Projekt "Physics for FOOD" (FKZ 03WIR2802B) zunächst nur für ausgewählte Leitarten (Gerste, Raps, Lupine) untersucht. Im Hinblick auf den Ökolandbau sind diese neuen Saatgut-Behandlungsmethoden als Schutz gegen pilzliche Erreger oder der Anbau resistenter Sorten alternativlos. Ergebnisse genetischer Forschung deuten auf die Möglichkeit einer Züchtung auf Anthraknose-Resistenz hin. So konnten QTLs für eine Anthraknose-Resistenz auf den Kopplungsgruppen 4 und 8 einer autotetraploiden Luzerne kartiert werden (Mackie et al.,

2007). Die resultierenden Marker stellen für die Züchtung ein wertvolles Selektionsinstrument für anfällige bzw. resistente Luzerne-Sorten/ -Genotypen dar. Das Resistenzgen RCT1, ursprünglich in *M. truncatula* detektiert und kloniert, exprimiert ebenfalls Resistenz in RCT1-transgenen Genotypen von Alfalfa (Yang et al. 2008). Im Hinblick auf die Erhöhung der Jahresmitteltemperatur in Folge des Klimawandels in Europa und in Deutschland wird diese Krankheit in Zukunft eine immer größere Rolle spielen, da *C. trifolii* ähnlich wie *C. lupini* warme und feuchte Vegetationsperioden bevorzugt. Aus diesem Grund dürfen in den USA nur noch als *Colletotrichum* resistent gekennzeichnete Sorten angebaut werden.

Genotypisierung / Genetische Marker

Die Genotypisierung mittels Sequenzierung („Genotyping by Sequencing“/GBS, Elshire et al., 2011) als eine der aktuellen, DNA-basierten Methoden zur Erfassung der genetischen Diversität ermöglicht die Sequenzierung von bestimmten Abschnitten genomischer DNA. Der hierbei vorgeschaltete Verdau der DNA durch Restriktionsenzyme ist maßgeblich für die Auswahl des zu sequenzierenden Bereichs der Erbinformation und vernachlässigt Genombereiche, die für die zu untersuchende Fragestellung nicht erforderlich sind. Mit dieser Variante der Hochdurchsatz-Sequenzierung können parallel mehrere Fragmente und Proben in einem Durchlauf sequenziert werden, was zeitsparend und - im Vergleich zu anderen Methoden - kostengünstig ist. Sowohl die Sequenz als auch Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms) können anschließend beispielsweise für genomweite Assoziationsstudien genutzt werden.

Die Anwendung von GBS an Luzerne – welche eine Chromosomengrundzahl von acht sowie eine Genomgröße ca. von 850 Mbp bei diploiden bzw. von 1 700 Mbp bei tetraploiden Formen besitzt - wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich demonstriert. So komplettierte GBS die von Young et al. (2011) publizierte Genom-Sequenz von *Medicago truncatula* als Modellart der Gattung *Medicago* (u.a. Krishnakumar et al. 2015). Die erfolgreiche Übertragung dieser Technik auf tetraploide Luzernen konnten Rocher et al. (2015) zeigen.

Bereits seit Jahren werden am Hauptstandort des IPK in Gatersleben sowohl GBS als auch weitere Sequenzierungstechniken wie bspw. whole genome sequencing zur genotypischen Charakterisierung sowie zur Erfassung der genetischen Diversität von Kulturpflanzen (u.a. Gerste, Weizen, Kartoffel) eingesetzt. Die Anpassung der Next Generation Sequenzierungstechniken (GBS, WGS) für Luzerne ist mit geringem Aufwand zu bewerkstelligen, sodass dieser Ansatz für das vorliegende Projekt gewählt wurde.

Die Verwendung von Hochdurchsatz-Sequenzdaten im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien („Genome-Wide Association Studies“, GWAS), welche die Zuordnung von Sequenzvariationen zu agronomisch relevanten Merkmalen von Organismen erlauben, zeigten bei Luzerne zum einen Sakiroglu und Brummer (2017). Sie konnten Loci identifizieren, welche den Biomasse-Ertrag und den Nährwert von Luzerne beeinflussten. Multiple Loci die mit der Futterqualität assoziiert sind konnten ebenfalls durch Lin et al (2021) mittels GWAS identifiziert werden. Weiterhin gelang es Yu et al. (2017) in GWAS-Untersuchungen, GBS-Sequenzvariationen mit der Resistenz gegen *Verticillium*-Welke zu assoziieren. Adhikari et al. (2018) entwickelten basierend auf GBS-SNP Mapping Marker für züchterisch wertvolle Merkmale (z.B. Winterhärte).

Phänotypisierungen zur Phosphor-Aufnahme-Effizienz ausgewählter Luzerne-Akzessionen

Analog zur großen Variabilität genetischer Ressourcen der Luzerne bezüglich verschiedenster Eigenschaften wie Biomasseertrag, Proteingehalt, Krankheitsresistenz oder Inhaltsstoffe ist in der Gattung *Medicago* auch mit einer hohen Variabilität in Hinblick auf die Effizienz bei der

Nährstoffaneignung zu rechnen. Daher soll eine Auswahl von 200 genotypisch möglichst unterschiedlichen *Medicago*-Akzessionen der IPK-Genbank im Gewächshaus hinsichtlich ihrer Phosphor (P)-Aufnahme sowie ihrer Wurzelparameter vergleichend untersucht werden. Dabei konzentrieren sich die P-Effizienz-Untersuchungen möglichst auf organische P-Quellen, da P sowohl im Boden als auch in alternativen P-Düngern, wie Wirtschaftsdüngern oder Komposten, größtenteils organisch gebunden vorliegt. Neben Kultursorten der Luzerne werden auch züchterisch kaum bearbeitete Landrassen bzw. Ökotypen sowie Wildart-Akzessionen in die Untersuchungen miteinbezogen, da diese ein hohes (Diversitäts-) Potenzial aufweisen können.

Gewährleistung der Saatgutqualität durch physikalische Technologien

Für die erfolgreiche (Wieder)Eingliederung der Eiweißpflanze Luzerne in die landwirtschaftlichen Fruchtfolgen ist eine Gewährleistung der Saatgutqualität unabdingbar. Zwar erfolgt die Aussaat von Luzerne im Überschuss, um ein geringeres Auflaufen auszugleichen und entsprechende wirtschaftliche Erträge einzufahren. Jedoch gewährleistet ein Ausbringen im Überschuss keinen gesunden Pflanzenbestand. Eine zu hohe Aussaatstärke steigert zudem die Krankheits- und Lagergefahr und verschlechtert die Saatgutqualität. Eine Übertragung des Erregers *Colletotrichum trifolii* ist über infiziertes Saatgut möglich. Es sind gegen *C. trifolii* resistente Sorten auf dem Markt, jedoch tauchen neue Varianten des Pathogens auf, welche die Resistenz durchbrechen können (Elgin und Ostazeski 1982, Mackie et al. 2003). Eine nicht-chemische Saatgutbehandlung, gerade auch mit der Option auf Anwendung im ökologischen Anbau, ist vor allem bei ungünstigen Aussaatbedingungen nötig. Bei den neuen innovativen physikalischen Methoden kann Saatgutschutz auch einhergehen mit verbesserter Jugendentwicklung. Zu diesen physikalischen Technologien zählt zum einen die bereits etablierte Behandlung mit Elektronenstrahlen (hierzu Beitrag von Ceravis).

Darüber hinaus besitzt die Behandlung mit Kaltplasma vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten im Agrarbereich. Positive Effekte zeigen sich in Bezug auf die pflanzliche Keimung auch bei Leguminosen (z.B. Filatova et al 2011, 2013). Zudem sind wirksame Effekte hinsichtlich der Abtötung von pathogenen Mikroorganismen auf der Saatgutoberfläche nachgewiesen (z.B. Ling et al. 2014). Im BMBF Projekt „Physics for FOOD“ (FKZ 03WIR2802B) werden ab 2019 sowohl Saatgutvitalität, als auch der Schutz vor Pathogen perspektivisch im landwirtschaftlichen Anbau getestet. Zunächst nur an den Leitpflanzen Gerste, Raps und Lupine. Für die Behandlung kleinsamiger Leguminosen müssen vorhandene Behandlungsapparate neu konzipiert, gebaut und getestet werden. Teil dieses Projektes „LuzNutz“ ist eine vergleichende Aussaat und Ertragsermittlung im Feldmaßstab unter Einsatz von Kaltplasmabehandlung im Vergleich zur Elektronenstrahlbehandlung des Saatgutes. beobachtet.

3 Material und Methoden

Die Beschreibung von Material und Methoden erfolgt in den jeweiligen Berichten der Teilvorhaben JKI, IPK, INP und SZS.

4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse findet sich in den Berichten der Teilvorhaben JKI, IPK, INP und SZS.

Schlussbericht zum Thema:

**“Erhöhung der Anbauwürdigkeit von Luzerne (*Medicago sativa* L.)
als Futterpflanze-
Neue Impulse für die Königin der Futterpflanzen (LuzNutz)“**

I. Bericht zum Teilvorhaben JKI

Förderkennzeichen: 2818EPS002

Laufzeit: 01.02.2021 bis 31.01.2024

Projektnehmer: Julius Kühn-Institut (JKI),
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,
Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen,
Rudolf Schick Platz 3a,
18190 Sanitz OT Gross Lüsewitz

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen der BMEL Eiweißpflanzenstrategie.

Inhaltsverzeichnis Teilvorhaben JKI

Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	11
1 Einführung.....	12
2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	12
3 Material und Methoden	12
3.1 Beschreibung des genetischen Materials	12
3.2 Etablierung der Kultivierung von <i>Colletotrichum trifolii</i> auf sterilem Medium.....	13
3.3 Etablierung der Sameninokulation mit <i>Colletotrichum trifolii</i>	13
3.4 Etablierung Resistenzscreening im Gewächshaus an Ganzpflanzen (Sprühinokulation) ..	14
3.5 Etablierung Resistenzscreening im Feld (Sameninokulation)	14
3.6 Entwicklung eines Boniturschemas für <i>C. trifolii</i> Symptome.....	15
3.7 PCR-Nachweis von <i>Colletotrichum trifolii</i> an Keimpflanzen	16
3.8 Etablierung von SSR-Markern.....	16
3.9 Statistische Analyse	16
4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse.....	16
4.1 Kultivierung und Vermehrung des Pilzes <i>C. trifolii</i> (ModulB-B2)	16
4.2 Sameninokulation und Keimfähigkeit (ModulB-B2)	17
4.3 PCR-Nachweis des Pilzes an Blattmaterial (ModulB-B2)	21
4.4 Resistenztests an Ganzpflanzen (ModulB-B2).....	21
4.5 Feldresistenztests (ModulB-B2)	23
4.6 Genetische Variabilität auf Genomebene (ModulB-B2)	26
5 Diskussion der Ergebnisse.....	30
5.1 Genetische Variation des Sets	30
5.2 Resistenztests.....	30
6 Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse	31
7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	33

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Versuchsanlage am Standort Groß Lüsewitz	15
Abbildung 2: Boniturschema zur Bewertung des Anthraknosebefalls an <i>Medicago sativa</i>	15
Abbildung 3: <i>Colletotrichum trifolii</i> Stamm CTR2 kultiviert auf SNA-Medium.....	17
Abbildung 4: Konidienwachstum von <i>C. trifolii</i> auf PDA-Medium (links), Konzentration der Konidien in Lösung pro ml; Wachstumsraten von <i>C. trifolii</i> auf PDA-Medium (rechts).....	17
Abbildung 5: Sameninokulation mit <i>C. trifolii</i> , dargestellt der RKL-Zuchtstamm Variante V0 und Variante V5.....	18
Abbildung 6: Mittlere Befallsstärke vom <i>Medicago</i> -Samen in den Varianten V0 bis V8.....	19
Abbildung 7: Ermittlung des Keimverhaltens von <i>Medicago</i> -Samen in den Varianten V0-V8	19
Abbildung 8: Symptome an Jungpflanzen im Gewächshaus nach Sameninokulation	20
Abbildung 9: Nachweis von anthraknose-spezifischen Symptomen an Gewächshauspflanzen nach Sameninokulation	20
Abbildung 10: 1-2=Blattmaterial nicht infizierter <i>Lupinus albus</i> , 3-4=Blattmaterial nicht infizierter <i>M. sativa</i> (cv. Roxana), 5-6 Blattmaterial nicht infizierter <i>M. sativa</i> (cv. Madalina), 7-8=Blattmaterial infizierter <i>M. sativa</i> (cv. Madalina), 9-10 Blattmaterial infizierter <i>M. sativa</i> (cv. Roxana), 11-12 Konidien von <i>C. trifolii</i>	21
Abbildung 11: Rückschnitt der Gewächshauspflanzen direkt vor der Inokulation mit <i>C. trifolii</i>	21
Abbildung 12: Pflanzen der anthraknose-anfälligen Rotklee-Zuchtlinie 2-3 Wochen nach Infektion	22
Abbildung 13: Anthraknosesymptome an Stängel und Blatt von Einzelpflanzen der Sorte Franken-Neu.....	22
Abbildung 14: Freilandtest 2022 als Mikroparzellen, Parzellenpflege.....	23
Abbildung 15: Mittelwertsvergleich des Befallsniveaus 2022 über alle 29 Prüfglieder und den Varianten V0 bis V8	24
Abbildung 16: Mittleres Befallsniveau aller Prüfglieder und Varianten dargestellt als Maxiplot, die Größe der dargestellten Punkte stellt die Befallsstärke des jeweiligen Prüfglieds und Vorbehandlungsvariante dar.	24
Abbildung 17: Mittelwerte über alle Prüfglieder und Varianten in den Versuchsjahren 2022, 2023 jeweils vor (je Versuchsjahr links) und nach dem Rückschnitt (je Versuchsjahr rechts)	25
Abbildung 18: Mittelwertsvergleich des Befallsniveaus 2023 über alle 29 Prüfglieder und den Varianten V0 bis V10	26
Abbildung 19: Markerpolymorphismen des SSR-Markers MsEST110 in einer Auswahl von Prüfgliedern	27
Abbildung 20: Markerpolymorphismen des SSR-Markers MsEST110 innerhalb von 50 Individuen der Linie LE2670.....	28
Abbildung 21: Anzahl Allele pro SSR-Marker im Set von 29 Prüfgliedern (gelb= 1Allel, hellblau= 2 Allel, mittelblau= 3 Allele, dunkelblau= 4 Allele, rosa = N/A)	29

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialübersicht über das genetische Set.....	12
Tabelle 2: Übersicht über die Behandlungsvarianten.....	13

1 Einführung

Eine Einführung zum Verbundvorhaben befindet sich im gemeinsamen Teil des Abschlussberichtes.

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der wissenschaftliche und technische Stand, an den in diesem Verbundvorhaben angeknüpft wurde, ist in dem gemeinsamen Teil des Abschlussberichtes dargestellt.

3 Material und Methoden

3.1 Beschreibung des genetischen Materials

Im Projekt LuzNutz wurde angestrebt ein Materialset zu bearbeiten, welches das höchste Maß an genetischer Variabilität innerhalb von *Medicago sativa* besitzt, vorausgesetzt der ausreichenden Saatgutverfügbarkeit. Insgesamt wurden 24 alte Zuchtsorten bzw. Akzessionen und fünf aktuelle Sorten in die im Bericht dargestellten Versuche integriert (Tabelle. 1)

Tabelle 1: Materialübersicht über das genetische Set

Partie	Akz.nummer	Feldnummer	Name	BIOSTATUS	LAND
LE 2365 / 2001 A	LE 2365	29	Planet	Zuchtsorte	[Deutschland
LE 2366 / 2001 A	LE 2366	52	Plato	Zuchtsorte	[Deutschland
LE 2367 / 2001 A	LE 2367	30	Sanditi	Zuchtsorte	[Niederlande
LE 2368 / 2001 A	LE 2368	47	Diane	Zuchtsorte	[Frankreich
LE 2369 / 2001 A	LE 2369	31	Daphne	Zuchtsorte	[Frankreich
LE 2370 / 2001 A	LE 2370	58	Daisy	Zuchtsorte	[Dänemark
LE 2372 / 2001 A	LE 2372		Tomin	Begleitflora	(Albanien
LE 2376 / 2013 A	LE 2376	32	Neuga	Zuchtsorte	[DDR
LE 2401 / 1992 A	LE 2401		Defi	Zuchtsorte	[Niederlande
LE 2494 / 1987 A	LE 2494	4	Peru	Zuchtsorte	[Türkei
LE 2647 / 1982 A	LE 2647		Palava	Zuchtsorte	[CSFR
LE 2661 / 2003 A	LE 2661	33	Sammlung TI	Unbekannt	[Tadshikistan
LE 2670 / 2000 A	LE 2670	15	Sammlung B	Halb-natürlich	Bulgarien
LE 2682 / 1999 A	LE 2682	35	Sammlung A	Unbekannt	[Albanien
LE 520 / 2001 A	LE 520		Europe	Zuchtsorte	[Frankreich
LE 539 / 1987 A	LE 539		Franken Neu	Zuchtsorte	[Deutschland
LE 566 / 2012 A	LE 566		Isis	Zuchtsorte	[Dänemark
LE 629 / 1986 A	LE 629	21	Maris Phoen	Zuchtsorte	[Großbritannien
LE 713 / 1984 A	LE 713	23	Okusz	Zuchtsorte	[Rumänien
LE 747 / 1984 A	LE 747		Plauresa	Zuchtsorte	[DDR
LE 784 / 1978 A	LE 784	40	Resis	Zuchtsorte	[Dänemark
LE 857 / 1984 A	LE 857	14	Tb 10	Zucht-/Forsch	CSFR
LE 888 / 1984 A	LE 888	20	Verko	Zuchtsorte	[DDR
LE 894 / 2013 A	LE 894		Victor	Zuchtsorte	[Großbritannien
aktuelle Sorte		18	Alpha	Zuchtsorte	[Niederlande
aktuelle Sorte		28	Fleetwood	Zuchtsorte	[Deutschland
aktuelle Sorte		50	Sibemol	Zuchtsorte	[Frankreich
aktuelle Sorte		51	Catera	Zuchtsorte	[Deutschland
aktuelle Sorte		57	Artemis	Zuchtsorte	[Frankreich

3.2 Etablierung der Kultivierung von *Colletotrichum trifolii* auf sterilem Medium

Erhaltung

Die Etablierung der im Projekt angestrebten Infektionsversuche von Luzerne mit *Colletotrichum trifolii* erfolgte mit acht verschiedenen Stämmen von *Colletotrichum trifolii* aus der Schweiz (Agroscope) und einem weiteren Stamm aus Frankreich (GEVES). Die Konidien des Pilzes wurden auf SNA Medium (Selektivmedium für Pilze) etabliert und bei Raumtemperatur im Klimaschrank kultiviert. Parallel wurden die Konidien in einer Schutzlösung (14% Saccharose + 1% Pepton) zur Langzeitlagerung bei -80°C schockgefroren.

Vermehrung

Die Vermehrung der Konidien erfolgte auf Kartoffel-Dextrose-Medium (PDA), in dem ein ca. 1 cm großes Stück SNA-Medium mit Konidienbesatz ausgeschnitten und auf Petrischalen mit PDA-Agar überführt wurde (Abb. 3). Die Selektion des optimalen *C. trifolii*-Stamms für die Infektionsversuche erfolgte ebenfalls nach Vermehrung des Pilzes auf PDA-Medium. Dafür wurde zum einen die Konidienkonzentration (Thoma-Zellzählkammer, Anzahl Konidien/ml) in der Suspensionslösung bestimmt und zum anderen die Wachstumsraten des Pilzes auf dem Medium ermittelt (Erfassung der Wachstumsradien 1-7 Tage nach Überimpfung).

Inokulum

Nach einer Wachstumsphase von 14 Tagen erfolgte die Herstellung der Suspension mit sterilem H₂O, die dann für die Inokulation ganzer Pflanzen, oder der Inokulation von Saatgut mit dem Pilz verwendet wurde.

3.3 Etablierung der Sameninokulation mit *Colletotrichum trifolii*

Zur Etablierung Infektionsversuchen an *Medicago*-Samen mit *Colletotrichum trifolii* sowie der Wirkung von chemischer Beize oder Plasma auf die Infektionsraten von Saatgut wurden die in Tab. 2 aufgeführten Varianten genutzt. Die Wirkung von E-Vita auf die Infektion der Samen mit *Colletotrichum* konnte nicht ermittelt werden, da die Fa. Ceravis nach interner Umstrukturierung keine Handlungsmöglichkeiten mehr sah (s. Zwischenbericht 2022). Die Varianten 0 und 1 stellen die Kontrollvarianten dar.

Tabelle 2: Übersicht über die Behandlungsvarianten

0: keine Behandlung				
1: Behandlung mit H ₂ O				
2: Behandlung mit E-Vita (Ceravis)				
3: Behandlung mit Plasma (INP)				
4: Behandlung mit chemischer Beize				
5: Behandlung mit <i>Colletotrichum</i>				
6: Behandlung mit <i>Colletotrichum</i> und E-Vita (Ceravis)				
7: Behandlung mit <i>Colletotrichum</i> und Plasma (INP)				
8: Behandlung mit <i>Colletotrichum</i> und chemischer Beize				
9: Behandlung der Jungpflanze mit Plasma (INP)				
10: Behandlung mit <i>Colletotrichum</i> und Jungpflanze mit Plasma (INP)				

Zur Ermittlung der optimalen Inokulationsbedingungen wurden verschiedene Parameter getestet: Konidienkonzentration der Suspension (1×10^6 – 6×10^5), Inkubationsdauer des Saatgutes in der Pathogensuspension (2h, 4h, 6h, ÜN), Dauer der Rücktrocknung des Saatgutes (24h, 48h, 72h). Boniturzeitraum.

Die Inokulationsversuche über alle Varianten wurden vier Prüfglieder von Luzerne sowie die *C. trifolii* anfällige Rotkleezuchtlinie verwendet. Pro Wiederholung wurden 20 Korn pro PDA-Schale ausgewertet, der Versuch erfolgte in drei Wiederholungen und die Bonitur konnte nach 8-10 Tagen Kultivierung (Klimaschrank 20°C) erfolgen.

Für die Behandlung der Samen mit Beize wurden das für Luzerne zugelassene flüssige Beizmittel (VIBRANCE TRIO Fa. Syngenta) 1:1 verdünnt und in ein verschließbares Gefäß überführt. Die Samen wurden anschließend in das Gefäß überführt und mit der Beize vermengt (2g Saatgut/10µl Beize). Unter diesen Bedingungen konnte eine Keimrate von bis zu 90% erreicht werden.

Die Behandlung der Samen mit Plasma (V7) erfolgte durch den Projektpartner INP. Das Saatgut wurde unbehandelt oder nach der Inokulation mit *Colletotrichum trifolii* in gasdurchlässige Tyvek Beutel eingeschweißt und mittels plasma-behandelter Luft und einem Prozessparameter von 63 slm (standard liter per minute) Durchflussgeschwindigkeit durch den Plasma Mikrowellengenerator), 10 min inkubiert. Für die Varianten V9 und V10 (2023) wurde 5 Wochen nach Aussaat 5 Liter plasmabehandeltes Wasser an zwei Folgetagen mit der Rückenspritze auf die entsprechenden Parzellen ausgebracht.

Parallel wurden alle das Saatgut (N=20 Korn) aller Varianten einem Keimtest auf feuchten Filterpapier unterzogen. Zur Erfassung der *C. trifolii*-spezifischen Symptome an Jungpflanzen wurde das behandelten Saatgut in Trays (Topferde) ausgelegt und bei 20 °C im Gewächshaus kultiviert. Nach sechs Wochen wurden die *C. trifolii* spezifischen Symptome an Blatt und Stängel an den Jungpflanzen erfasst.

3.4 Etablierung Resistenzscreening im Gewächshaus an Ganzpflanzen (Sprühinokulation)

Ein wesentlicher Teil des Projektmoduls B bestand in der Etablierung von Resistenztests im Gewächshaus und im Feld.

Für den Gewächshausversuch wurden 15 Pflanzen je Prüfglied aus dem Set von *M. sativa* (N= 29 Prüfglieder) und die Zuchtlinie (Rotklee) als Referenz im Gewächshaus in Erde angezogen. Nach 35-40 Tagen Anzucht erfolgte der 1. Schnitt (auf ca 15 cm Pflanzenhöhe) und die anschließende Inokulation mit *C. trifolii* über eine Sprühinfection (6×10^5 /ml Konidien/Suspension). Verwendet wurde der Stamm CTR2 (Agroscope/Schweiz). Die Bonitur erfolgte ca. 14 Tage nach der Inokulation nach dem unter 3.6 beschriebenen Boniturschema.

3.5 Etablierung Resistenzscreening im Feld (Sameninokulation)

Die Feldversuche wurden im Projektjahr 2022 und 2023 am JKI-Standort Groß Lüsewitz durchgeführt. Die Versuchsanlage bestand aus einer Doppelreihe pro Versuchsglied (1,35m Reihe) in zweifacher

Wiederholung. Es wurde alle 29 Prüfglieder (s. Tab. 1) in den Versuch integriert. Die Prüfglieder wurden 2022 den Behandlungsvarianten V0-V8 unterzogen (Tab. 2). Im Jahr 2023 wurden zusätzlich noch die Varianten V9 und V10 hinzugefügt (Tabelle 2). Die Aussaat (per Hand) wurde am 31.05.2022 und am 03.05.2023 durchgeführt. Die Saatgutdichte betrug 0,5g pro Reihe = 1g Saatgut pro Variante

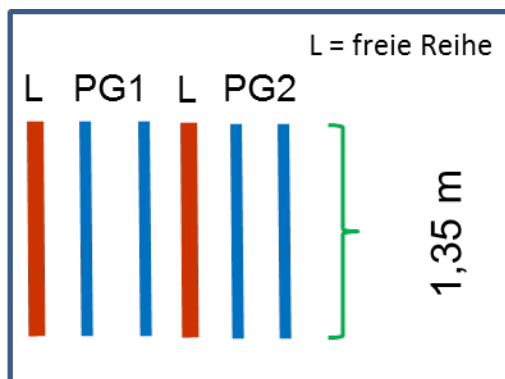


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Versuchsanlage am Standort Groß Lüsewitz

Die Anthraknosebonituren im Feld wurden am 27.7.2022 und 10.08.2022 durchgeführt unter Berücksichtigung des unter 3.6 dargestellten Boniturschemas. Der erste Rückschnitt erfolgte am 17.08.2022 per Hand unter Berücksichtigung möglicher Sekundärinfektion zwischen den Parzellen. Der zweite Rückschnitt erfolgte am 5.10.2022 um im Versuchsjahr 2023 eine mögliche Sekundärinfektion im Neuaufwuchs nachweisen zu können.

Die Bonituren im Jahr 2023 erfolgten am 27.7. und 28.8.2023. Am 28.7. wurde der Rückschnitt durchgeführt.

3.6 Entwicklung eines Boniturschemas für *C. trifolii* Symptome

Das Boniturschema wurde am JKI in Groß Lüsewitz im Projektjahr 2021 an Jungpflanzen im Gewächsaus entwickelt. Berücksichtigt wurden Läsionen am Stängel und Blatt, sowohl das Absterben von Pflanzenteilen oder der gesamten Pflanze (Abb. 2)

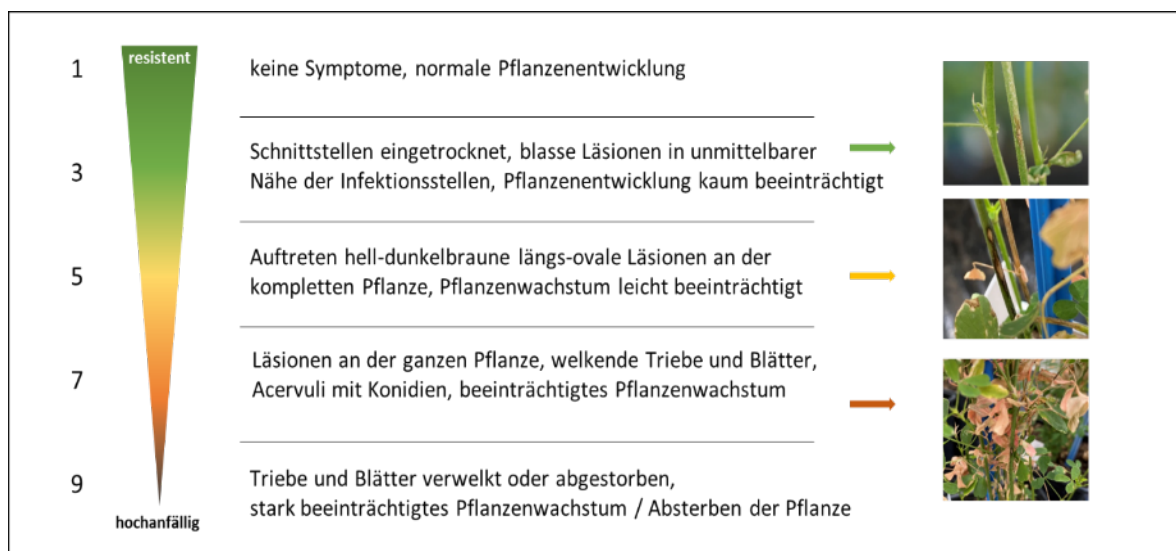


Abbildung 2: Boniturschema zur Bewertung des Anthraknosebefalls an *Medicago sativa*

Im Gewächshaus wurden Einzelpflanzen eines Prüfglieds beurteilt, im Feld eine Note für die gesamte Mikroparzelle eines Versuchsglieds vergeben.

3.7 PCR-Nachweis von *Colletotrichum trifolii* an Keimpflanzen

Genomische DNA wurde aus Blattproben von Keimpflanzen isoliert (nach Stein et al. 2001, modifiziert) und für den Nachweis von *C. trifolii* in infizierten Pflanzen verwendet. Der Nachweis erfolgte PCR-gestützt. Es wurden zwei Primerpaare ITS1+2 (F: TCC GTA GGT GAA CCT GCG C, R: GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC) und EF1 alpha_1 (f: GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT, R: ACH GTR CCR ATA CCA CCR ATC TT) verwendet (White et al. 1990, Rehner and Buebley 2005). Zum Abgleich der Sequenzinformationen (Sanger-Sequenzierung) *C. trifolii*-Stämme wurden folgenden Referenzen genutzt: *Colletotrichum lupini* CBS 109225 Standard Draft (BioSampleID: [SAMN05446214](#)) *Colletotrichum trifolii* MAFF 305078 (BioSampleID: [SAMN10475057](#)). Standard PCR-Reaktionen wurden in 10 µl Ansatz mit 20 ng DNA, 0.02 U/µl Taq-Polymerase (Fa. Promega) und 0.5 µM Primer durchgeführt. Die Reaktion wurde als Touchdown-PCR mit einem Temperatur-Range von 60-50°C durchgeführt. Der Nachweis der amplifizierten PCR-Fragmente erfolgte in 2%igen Agarosegele und anschließender Färbung der DNA durch Ethidiumbromid.

3.8 Etablierung von SSR-Markern

Zur Darstellung der Variabilität des genetischen Sets auf Genomebene wurden insgesamt 29 publizierte SSR-Marker aus *Medicago sativa* (Wang et al. 2013, Min et al. 2017) verwendet und sowohl 20-50 Einzelpflanzen einer Akzession als auch alle 29 Prüfglieder in einer Bulk-Analyse (Mischprobe aus 20 Einzelpflanzen) auf Polymorphismen gescreent. Die DNA-Isolation, PCR-Reaktion und Darstellung der Amplifikate erfolgte wie unter 3.7 beschrieben.

3.9 Statistische Analyse

Die Infektionsraten von *C. trifolii* am Saatgut und an Gewächshauspflanzen wurden über Mittelwertsvergleiche mit dem Programm Excel ermittelt. Die Verrechnung der Felddaten erfolgte mittels des Statistikprogramms R (4.1.2) in grafischer Oberfläche R Studio (2021.09.1). Für die deskriptive Statistik wurde das agricolae Paket (V1.3-7) genutzt. Die Varianzanalyse erfolgte über Einbeziehung angemessener PostHoc-Tests (Kruskal-Wallis bzw. Dunnett-Tests). Die Korrelationsanalyse wurde statistisch nach Pearson berechnet.

4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

4.1 Kultivierung und Vermehrung des Pilzes *C. trifolii* (ModulB-B2)

Acht unterschiedliche Pilzisolat von *Colletotrichum trifolii* wurden erfolgreich auf sterilem Medium (SNA) etabliert (Abb.3). Als Vorbereitung für die Inokulationsversuche wurden die Konidien auf PDA-Medium in einem Zeitraum von 14 Tagen vermehrt (Abb. 4)

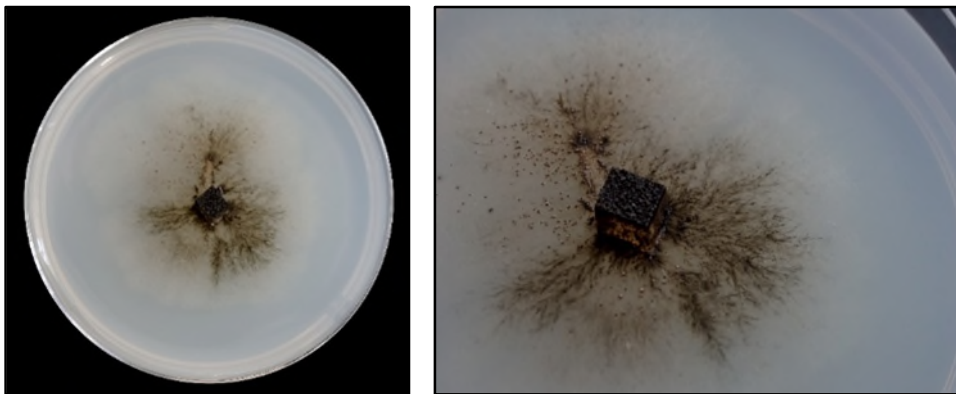


Abbildung 3: *Colletotrichum trifolii* Stamm CTR2 kultiviert auf SNA-Medium

Zur Ermittlung eines Pilzstamms mit hoher Konidienvermehrung, der optimal für die Inokulation von Saatgut und Pflanzen eingesetzt werden kann wurde die Konidienkonzentration in einer H₂O-Lösung/ml und die Wachstumskurven ermittelt (Abb.4). Gemessen wurde der äußerste Mycelradius (Abb. 4) der gewachsenen *C.trifolii* Kultur auf PDA-Medium. Über den Versuchszeitraum von 7 Tagen (ab Impfung) wurde die Radiuserfassung alle 24h ab Impfzentrum durchgeführt. Stamm CTR2 (Abb. 4, Pfeil) zeigte das stärkste Wachstum von allen verwendeten Isolaten. Das zeigt sowohl die Anzahl der Konidien in der Suspension als auch die Wachstumsraten (Abb.4)

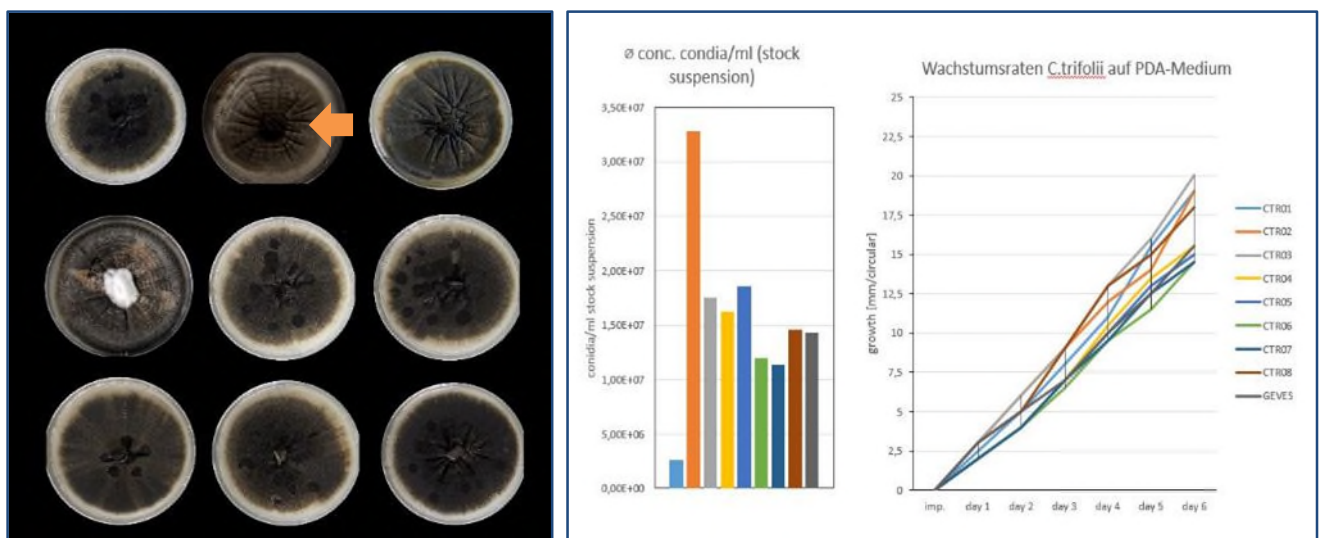


Abbildung 4: Konidienwachstum von *C. trifolii* auf PDA-Medium (links), Konzentration der Konidien in Lösung pro ml; Wachstumsraten von *C. trifolii* auf PDA-Medium (rechts)

4.2 Sameninokulation und Keimfähigkeit (ModulB-B2)

Zur Etablierung der Sameninokulation mit *C. trifolii* wurden die unter 3.3 genannten Parameter variiert, um eine optimale Infektion zu erzielen.

Die Inokulation der Samen ÜN mit der Konidiensuspension führte zur unerwünschten Keimung des Saatguts. Hingegen eine Inokulationszeit von 4h mit einer Konzentration von 5×10^5

Konidien/ml und einer anschließender 48h Rücktrocknung als optimal ermittelt wurde. Ein Vergleich der Keimrate von Saatgut infiziert mit *C. trifolii* vs. Saatgut unbehandelt zeigt keine Unterschiede (Abb 7).



Abbildung 5: Sameninokulation mit *C. trifolii*, dargestellt der RKL-Zuchtstamm Variante V0 und Variante V5

Konidien von *C. trifolii* zeigen sich am Saatgut (links) und am Keimling (rechts) nach optischer Bonitur (5-6 Tage nach der Inokulation) (Abb.5) sowie nach Mittelwertsvergleichen von 5 Prüfgliedern (Franken Neu, LE2670, Klever, Peru, RKL-Zuchtstamm (Abb.6) mit je 20 Korn in 3-facher Wiederholung.

Die Befallsstärke der Samen mit *C. trifolii*, sowie die Kontamination durch Schimmelpilze und Bakterien ist in Abbildung 6 dargestellt. In den Varianten V0 bis V4 ist wie zu erwarten, kein *C. trifolii* nachzuweisen. Die statistische Auswertung zeigt, dass knapp 50 von insgesamt 60 ausgewerteten Körnern Befall mit *Colletotrichum* aufweisen (Abb. 6). Gleichzeitig tritt in dieser Variante die höchste Kontaminationsrate mit Schimmelpilzen und Bakterien auf. Dieses Ergebnis zeigte sich bereits in Vorversuchen. Also treten Wechselwirkungen zwischen Eukaryoten (Pilz) und Prokaryoten (Bakterien) auf, die das Wachstum der Organismen gegenseitig fördern.

Sowohl die chemische Beize (VIBRANCE TRIO) als auch die Inokulation des Saatguts mit Plasma bewirken eine Reduktion des Pilzbefalls, sowohl im Hinblick auf *C. trifolii* als auch auf den Befall mit Schimmelpilzen. In der Variante V7 sind weniger als 10 Körner mit Pilz und Bakterien besiedelt und bei der Variante V8 weisen knapp 30 Körner Bakterienbefall auf (Abb. 6) Der relative hohe Bakterienbefall in V8 zeigt, dass das Beizmittel Pilz- und nicht Bakterien- spezifisch wirkt.

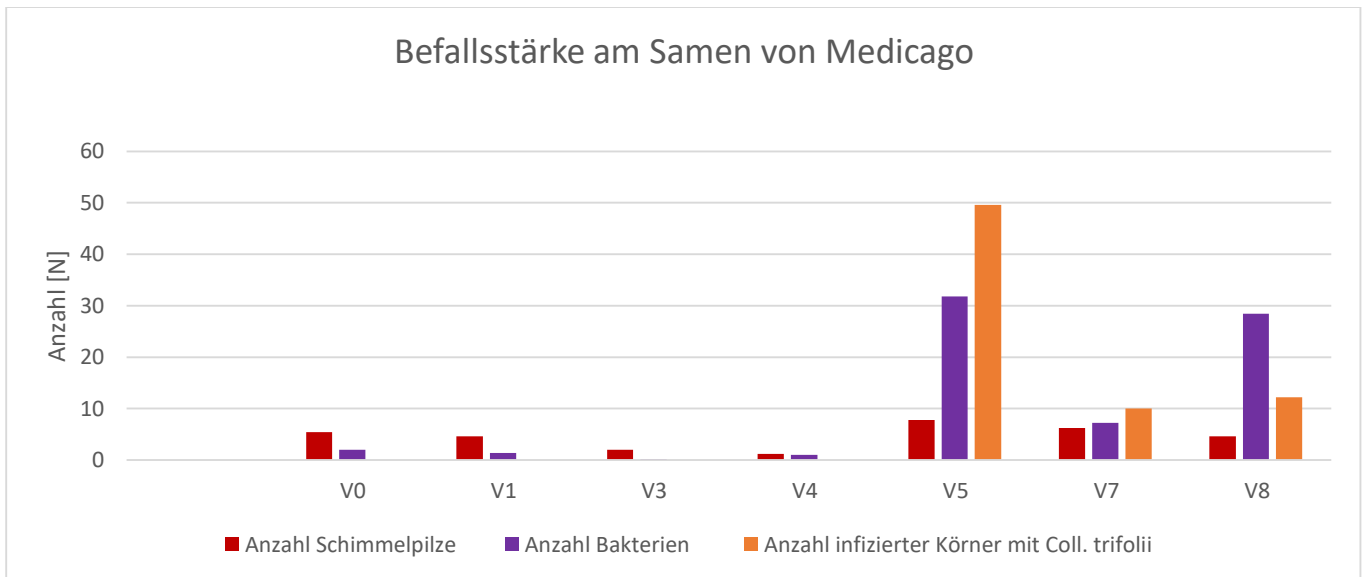


Abbildung 6: Mittlere Befallsstärke vom Medicago-Samen in den Varianten V0 bis V8

Die Keimfähigkeit der Samen ist von den Behandlungsvarianten V0-V8 nicht beeinflusst (Abb.7). In den Varianten V4 und V8 ist das Filterpapier rötlich gefärbt, das ist auf die Farbe des Beizmittels zurückzuführen.

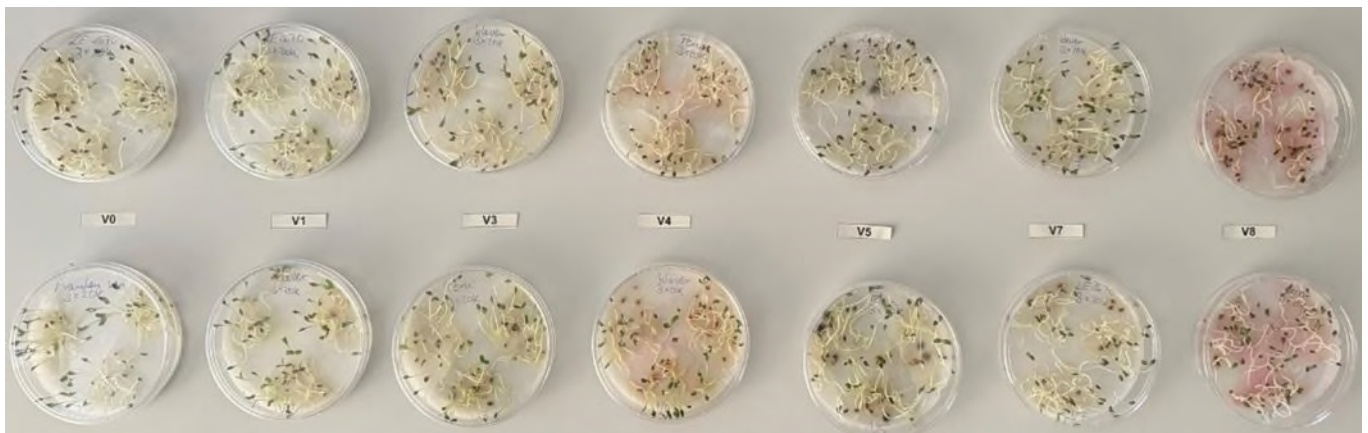


Abbildung 7: Ermittlung des Keimverhaltens von Medicago-Samen in den Varianten V0-V8

Ein weiterer Versuch mit inokulierten Samen wurde als Kontrollversuch mit Restsaatgut (17-25 Korn) aller Prüfglieder aus den Feldversuchen durchgeführt. Zur Ermittlung des Erfolgs der Sameninokulation wurde Anthraknosesymptome an Jungpflanzen ermittelt. Nach 4-6 Wochen wurden die typischen Blattläsionen und Eintrocknungen an Stängel und Blättern an Pflanzen der Variante V5 (Pilzinokulation) nachgewiesen (Abb. 8).



Abbildung 8: Symptome an Jungpflanzen im Gewächshaus nach Sameninokulation

Die Auswertung des Gewächshausversuchs hat ergeben, dass anthraknose-spezifische Symptome an Blatt und Stängel ausschließlich an Pflanzen auftraten, deren Samen zuvor mit *C. trifolii* infiziert wurden. Sekundärinfektionen konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 9).

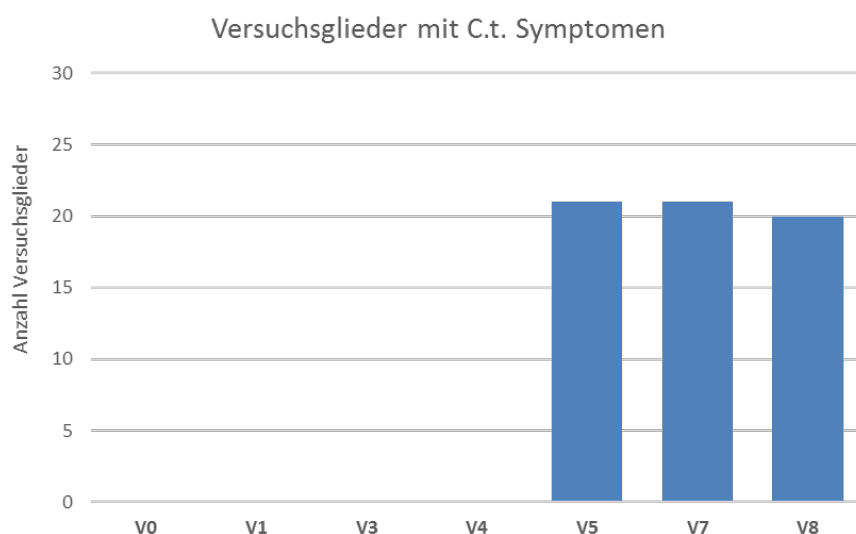


Abbildung 9: Nachweis von anthraknose-spezifischen Symptomen an Gewächshauspflanzen nach Sameninokulation

4.3 PCR-Nachweis des Pilzes an Blattmaterial (ModulB-B2)

Mit Hilfe von pilzspezifischen Primern (s. 3.4) wurde in verschiedenen Geweben *Colletotrichum trifolii* im PCR-Test nachgewiesen.

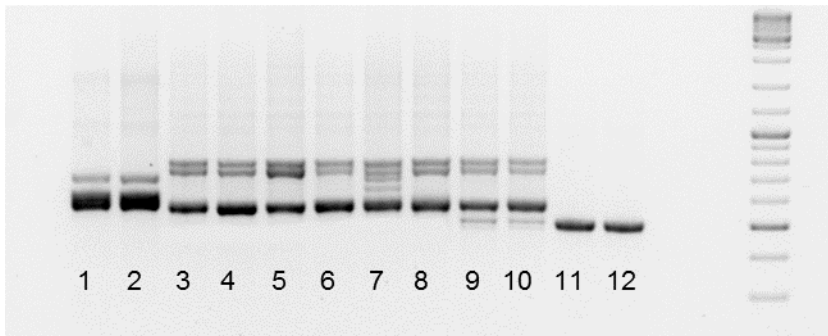


Abbildung 10: 1-2=Blattmaterial nicht infizierter *Lupinus albus*, 3-4=Blattmaterial nicht infizierter *M. sativa* (cv. Roxana), 5-6 Blattmaterial nicht infizierter *M. sativa* (cv. Madalina), 7-8=Blattmaterial infizierter *M. sativa* (cv. Madalina), 9-10 Blattmaterial infizierter *M. sativa* (cv. Roxana), 11-12 Konidien von *C. trifolii*

Mittels des Primerpaares *EF1 alpha_1* konnte gezeigt werden, dass in nicht infizierten Pflanzen von *M. sativa* kein Pilz nachzuweisen ist (Abb. 10, Spur 1-4). Die amplifizierten Fragmente sind nicht pilzspezifisch. Hingegen in Blattmaterial mit anthraknose-spezifischen Symptomen konnten eine *C. trifolii*-spezifisches PCR-Fragment nachwiesen werden (Spur 9-10). Wird hingegen reine Konidienkultur von *C. trifolii* als DNA-Template verwendet, wird exklusiv nur das *C. trifolii*-spezifische Fragment amplifiziert. Das fehlende *C. trifolii*-spezifische Amplifikat in Spur ist wahrscheinlich darin begründet, dass die Pflanze zu wenige Symptome, also Läsionen, ausgebildet hat.

4.4 Resistenztests an Ganzpflanzen (ModulB-B2)

Im Projektjahr 2021 ist es gelungen einen Resistenztest über Sprüheinokulation für *M. sativa*-Jungpflanzen im Gewächshaus zu etablieren. Für die Versuche wurden sieben Prüfglieder von *Medicago* und eine als anfällig eingestufte Zuchtlinie vom Rotklee verwendet. Nach 35-40 Anzuchttagen im Gewächshaus erfolgte ein Rückschnitt der Pflanzen (Abb.11). Die im Anschluss durchgeführte Sprüheinokulation erfolgte in Anlehnung an die für Lupinen beschriebene Methode



Abbildung 11 Rückschnitt der Gewächshauspflanzen direkt vor der Inokulation mit *C. trifolii*

(Fischer et al. 2015). Die Ermittlung optimaler Infektionsbedingungen wurde durch Vorversuche getätigt, dabei wurde die Anpassung des Pilzisolates, Isolatkonzentration, pflanzliches Entwicklungsstadium, mit/ohne Schnitt und Inkubationsdauer angepasst (siehe Zwischenbericht 2021). Die für den Test definierte Konzentration der Inokulationssuspension betrug 6×10^5 Konidien des Stamms CTR2 pro ml. Die Pflanzen wurden 14-21 Tage im lichtdurchlässigen Folientunnel bei hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert und anschließend unter Verwendung des unter 3.7 beschriebenen Schemas bonitiert.

Die als Kontrolle für den Infektionserfolg integrierte Rotklee-Zuchtlinie zeigt starke anthraknose-spezifische Symptome an Blatt und Stängel nach etwa 14 Tagen (Abb. 12). Die Pflanzen reagieren sehr homogen auf die Inokulation. Von 20 infizierten Pflanzen ist keine Einzelpflanze komplett symptomfrei. Die Boniturnoten 7 und 9 erhielten 65% der Rotkleepflanzen. Nach weiteren 2-3 Wochen kommt es häufig zum kompletten Absterben der Pflanzen (Abb.12)



Abbildung 12: Pflanzen der anthraknose-anfälligen Rotklee-Zuchtlinie 2-3 Wochen nach Infektion

Das Ergebnis der anfälligen Rotkleelinie zeigt, dass die Inokulationsmethode grundsätzlich erfolgreich etabliert werden konnte. Die auf das Infektionsgeschehen untersuchen Linien von *Medicago sativa* zeigten ein anderes Bild. Die typischen Anthraknosesymptome an Stängel und Blatt (Abb.13) konnten bei allen Linien nachgewiesen werden. Eine genotypenabhängige Variabilität im Niveau der Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber dem Erreger konnte nicht nachgewiesen werden (Abb.13). Die Varianz der Befallstärke innerhalb einer Linie war sehr groß. So zeigten Einzelpflanzen



Abbildung 13: Anthraknosesymptome an Stängel und Blatt von Einzelpflanzen der Sorte Franken-Neu

der Sorten Franken_Neu und Fraver Symptome bis zu einer BN9, andere Pflanzen des gleichen Prüfglieds wiesen nur sporadische Symptome auf. Diese Inhomogenität innerhalb der Pflanzen eines Prüfglieds zeigte sich bei allen 29 Prüfgliedern. Keine der getesteten Linien war komplett befallsfrei. Die Methode wird als nicht zuverlässig eingestuft und die Gewächsresistenztests verworfen. Alternativ wurden Feldtests durchgeführt, die eine Erfassung des Resistenzphänotyps über die gesamte Vegetationsperiode und praxisnahen Bedingungen ermöglichen (s. 4.5).

4.5 Feldresistenztests (ModulB-B2)

Feldresistenztests zur Ermittlung des Resistenzniveaus von *Medicago sativa* gegenüber *C. trifolii* wurden zweijährig (2022, 2023) am JKI in Groß Lüsewitz durchgeführt. In den Versuch 2023 wurden noch zwei weitere Behandlungsvarianten (V9 und V10) mit Applikation plasmabehandelten Wassers integriert (Tabelle 2). Die Samen der 30 Prüfglieder wurden wie unter 3.3 dargestellt, behandelt. Die Unkrautbekämpfung erfolgte mechanisch (Abb.14). Fungizide wurden nicht appliziert.



Abbildung 14: Freilandtest 2022 als Mikroparzellen, Parzellenpflege

Die erste Bonitur des Freilandversuchs erfolgte ca. 10 Wochen nach der Aussaat mittels des unter 1.7. beschriebenen Boniturschemas mit einer Skala von BN1 (symptomfrei) bis BN9 (starke Symptome, Absterben). Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt. Gezeigt werden die Mittelwerte des Infektionsniveaus über die Jahre 2022, 2023 aller Prüfglieder, ausgenommen der Rotklee-Zuchtlinie. Verrechnet wurden zwei Wiederholungen pro Jahr mit jeweils zwei Boniturterminen (vor/nach dem Schnitt). Dargestellt sind die Varianten V1 bis V8.

Die statistische Verrechnung der erhobenen Boniturnoten (Feldversuch 2022) zeigt, dass das Befallsniveau der Pflanzen aller Prüfglieder in den Varianten V5 bis V8 signifikant über dem Niveau von V0 bis V4 liegt. Die Darstellung des Befallslevels als Maxiplot kann dieses Ergebnis bestätigen (Abb.16). Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da nur das Saatgut der Varianten V5-V8 mit dem Erreger infiziert wurden (Sameninokulation). Damit kann gezeigt werden, dass die Sameninokulation einen signifikanten Einfluss auf die Ausprägung der Befallssymptome der Feldpflanzen hat. Einen signifikanten Effekt von Plasmabehandlung (V7) oder chemischer Beize (V8) auf das Infektionsgeschehen in den Parzellen ist nicht nachzuweisen.

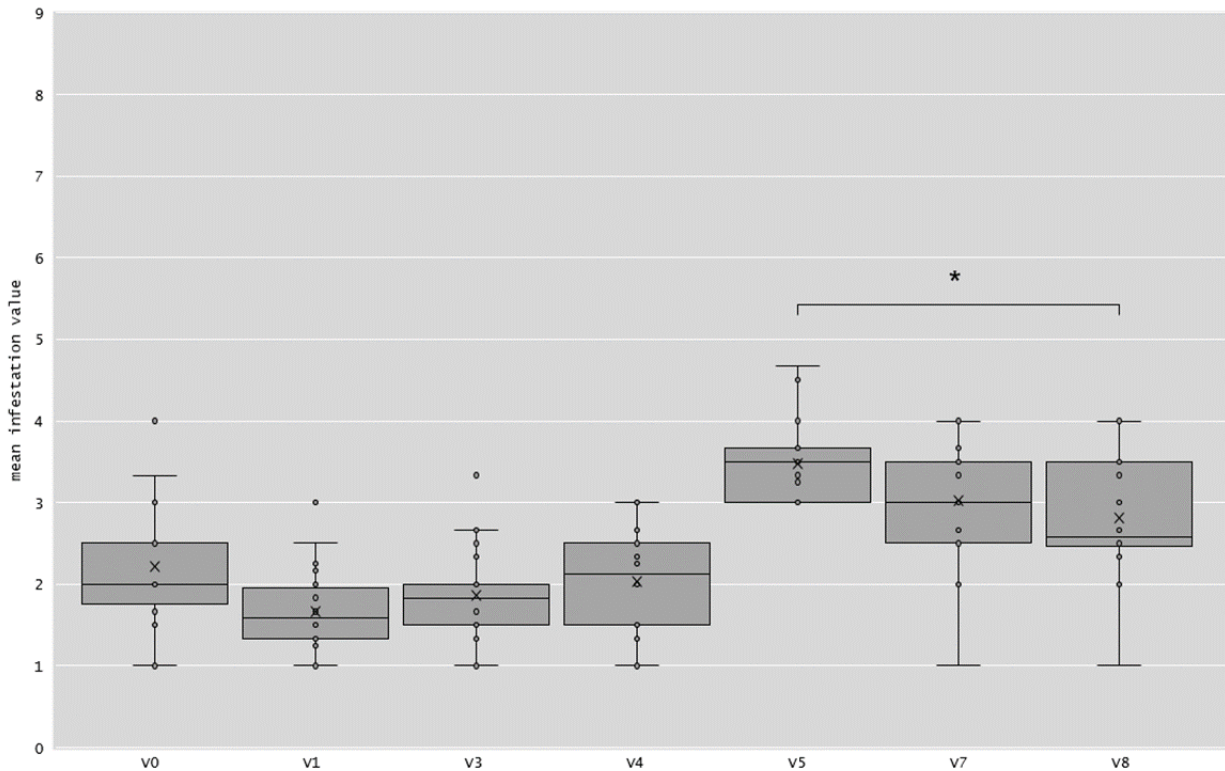


Abbildung 15: Mittelwertsvergleich des Befallsniveaus 2022 über alle 29 Prüfglieder und den Varianten V0 bis V8

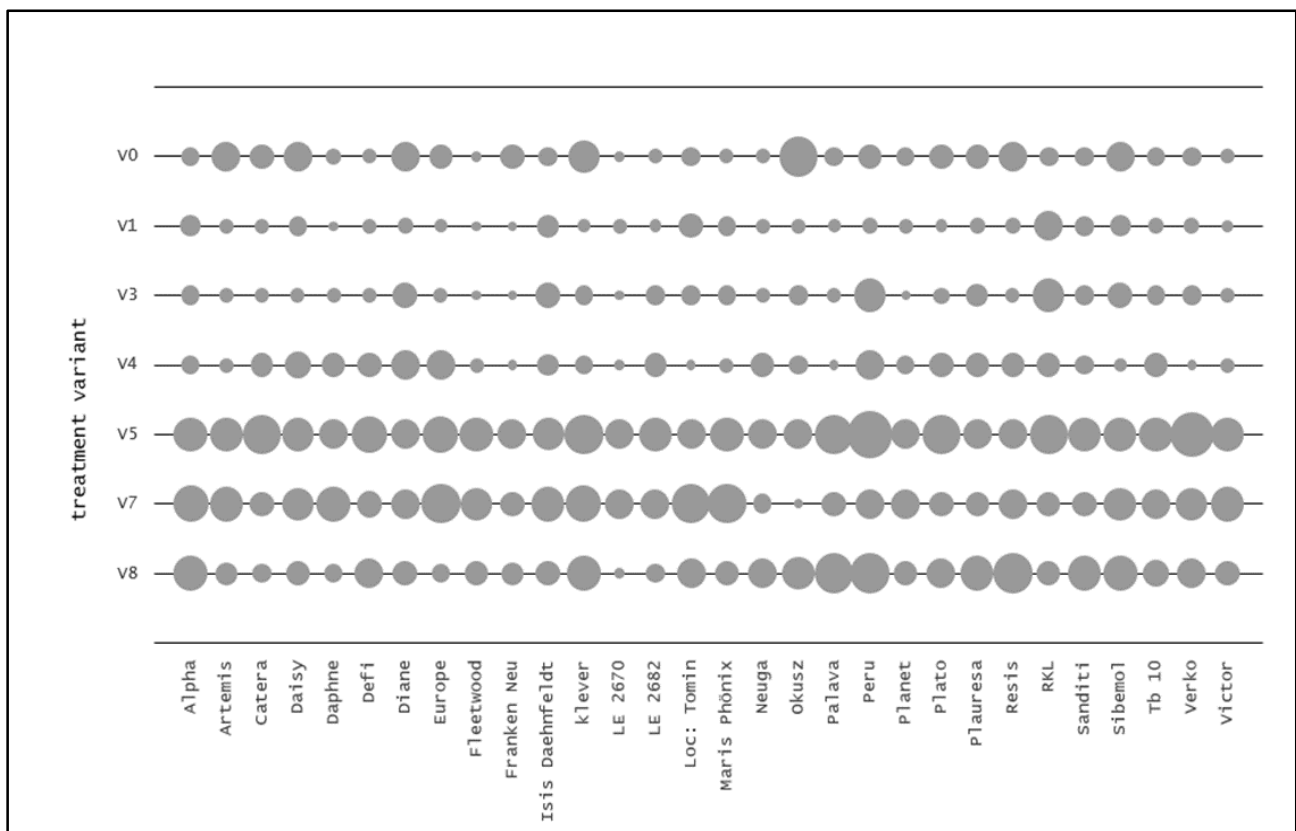


Abbildung 16: Mittleres Befallsniveau aller Prüfglieder und Varianten dargestellt als Maxiplot, die Größe der dargestellten Punkte stellt die Befallsstärke des jeweiligen Prüfglieds und Vorbehandlungsvariante dar.

Ebenso wenig gibt es signifikante Genotypeneffekte zwischen den Prüfglieder. Es können nur Tendenzen gezeigt werden. Stark anfällig scheint die Sorte Peru zu sein, ebenso die als anfällig eingestufte Rotkleezuchtlinie RKL. Als weniger anfällig zeigt sich die Linie LE2670 (Abb. 16). Der Anthraknosebefall in den Varianten V0-V4 entsteht sehr wahrscheinlich durch eine Sekundärinfektion der Pflanzen innerhalb der Versuchsanlage und den steigenden Infektionsdruck bzw. Verbreitung über die gesamte Vegetationsperiode.

Mit mittleren Befallswerten (BN3) ist das Befallsniveau der Varianten V5-V8 insgesamt als eher niedrig einzustufen, da es keine absterbenden Pflanzen gibt und somit der Trockenmasseertrag der Luzernepflanzen kaum eingeschränkt sein wird. Die Streuung um den Mittelwert ist gerade in der Variante V8 hoch. Begründet ist diese Tatsache u.a. durch die starke genetische Heterogenität des Material (s. 4.6). Luzerne wird in der Landwirtschaft als mehrjährige Kultur angebaut, so dass es möglich war, den Versuch von 2022 im nächsten Jahr nach Aufwuchs erneut zu bonitieren. Das Ziel war es die Vermehrung und Etablierung des Pathogens in im Bestand nachzuweisen und den möglichen Einfluss auf praxisnahe Anbausysteme darzustellen.

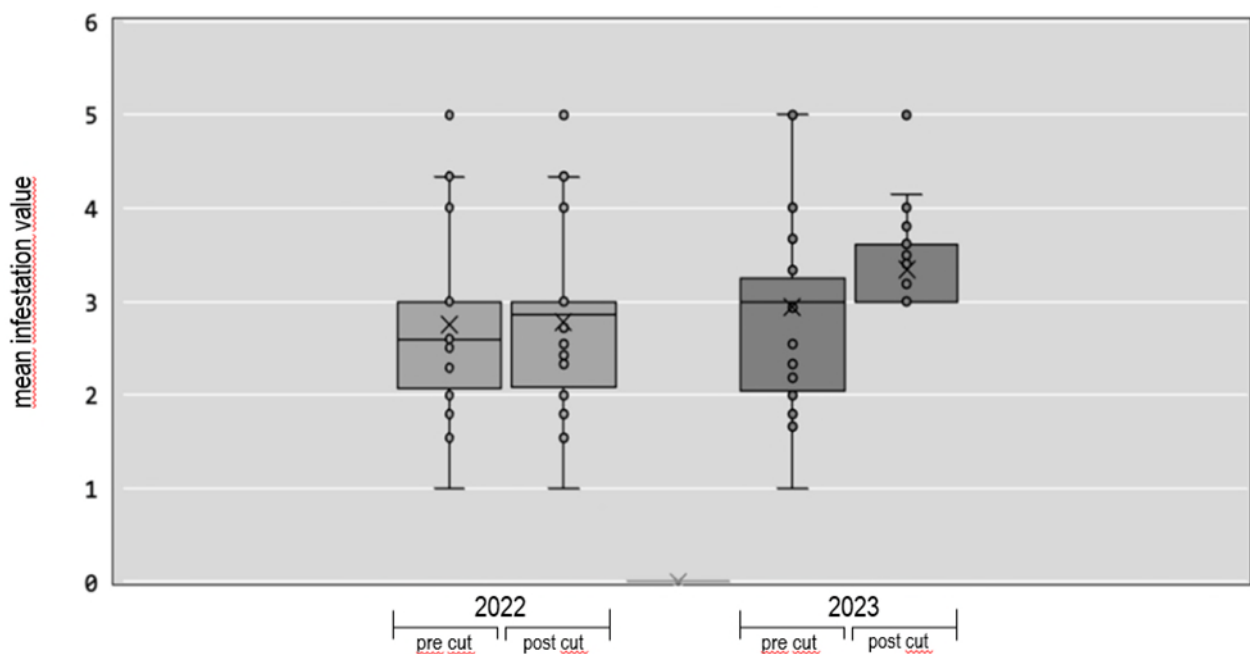


Abbildung 17: Mittelwerte über alle Prüfglieder und Varianten in den Versuchsjahren 2022, 2023 jeweils vor (je Versuchsjahr links) und nach dem Rückschnitt (je Versuchsjahr rechts)

In der Abbildung 17 ist ein leichter Anstieg des Befallsniveau vor dem Schnitt im zweiten Vegetationsjahr der Luzerne zu erkennen (Abb.17, Boxplot 3). Ein deutlicher Anstieg des Befalls wurde nach dem Schnitt im zweiten Vegetationsjahr erfasst (Abb.17, Boxplot 4). Die Intensität der Symptome hat, mit geringer Streuung, über alle Prüfglieder zugenommen. Der Rückschnitt des Bestands wurde mechanisch für jedes Prüfglied getrennt durchgeführt, dennoch kann es zu einer erhöhten Übertragung von *C. trifolii*-Konidien von einem zum nächsten Prüfglied kommen.

Im Versuchsjahr 2023 wurde der Freilandversuch erneut angelegt und durchgeführt. In den Versuch wurden zusätzlich die Varianten V9 und V10 aufgenommen. In der Variante V9 wurden die Pflanzen unbehandelter Samen auf dem Feld mit einer Plasmasuspension besprüht. In der Variante V10 wurden die Samen zuvor mit *Colletotrichum* inokuliert und dann die Feldpflanzen mit Plasma

besprüht. Die Applikation erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen.

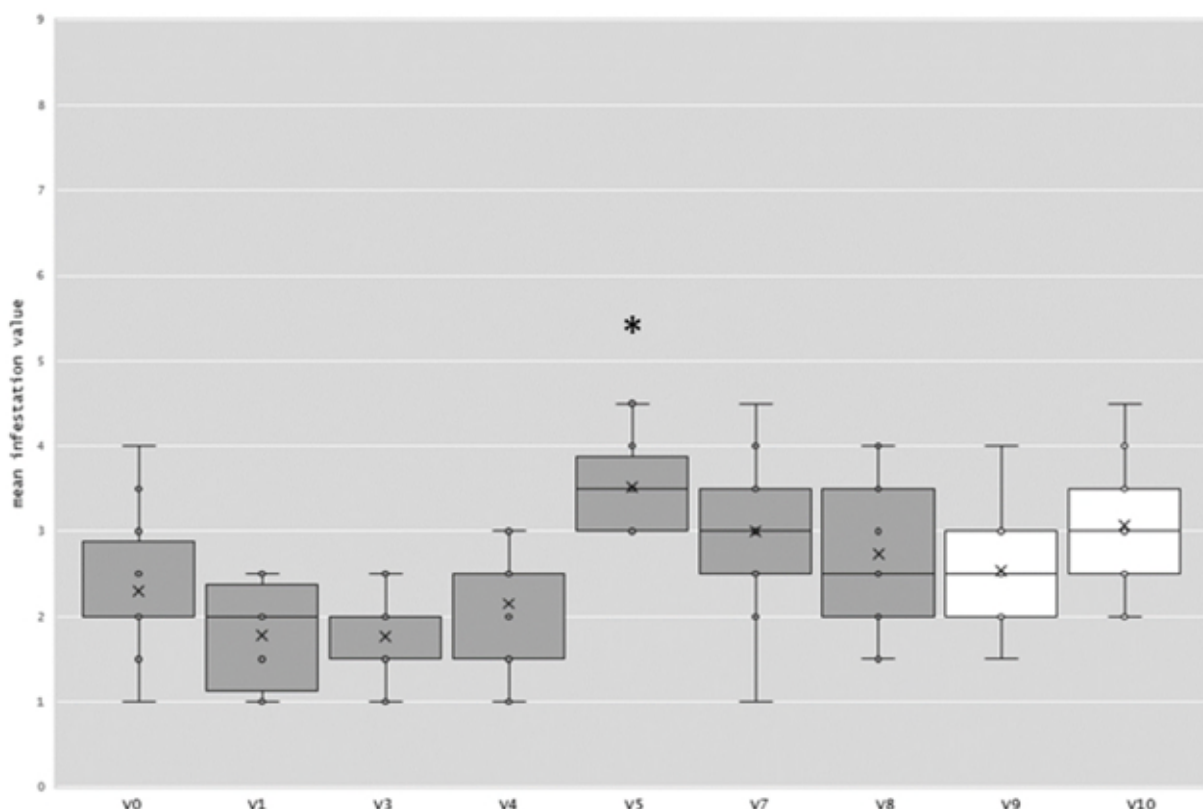


Abbildung 18: Mittelwertsvergleich des Befallsniveaus 2023 über alle 29 Prüfglieder und den Varianten V0 bis V10

Die Versuchsauswertung der Felddaten 2023 (Abb. 18) zeigt ein vergleichbares Bild zu dem aus dem Feldversuch 2022. Die Variante V5 weist wiederholt ein signifikante höheres Befallsniveau im Vergleich zu V0 bis V4, in denen das Saatgut unbehandelt war. Die Varianten V7 und V10 befinden sich auf einem vergleichbaren Befallslevel, dass unter dem von V5 liegt und somit auf den Effekt von Plasma auf die Reduktion des Pilzes *Colletotrichum* hinweist. Das Befallsgeschehen im Bestand insgesamt ist sicher durch Sekundärinfektionen zwischen den Parzellen beeinflusst.

4.6 Genetische Variabilität auf Genomebene (ModulB-B2)

Für die Analyse der genetischen Variabilität wurden insgesamt 29 SSR-Marker verwendet. Als Template wurde DNA von je 20 Einzelpflanzen pro Linie sowie ein Bulk mit je 20 EZ pro Prüfglied untersucht. Die Darstellung der SSR-Marker im Agarosegel zeigt, dass zwischen den Prüfgliedern aber auch innerhalb einer Sorte oder Akzession Polymorphismen nachweisbar sind (Abb. 19). Tetraploide Genotypen können bis zu vier unterschiedliche Allele an einem Genort (hier SSR-Marker) ausprägen. Eine solche genetische Variabilität kann unter Verwendung des SSR-Markers MEST110 dargestellt werden (Abb.19) Eine Auswahl von 10 Genotypen pro Prüfglied ist ausreichend, um in der Sorte Isis vier verschiedene Allele darzustellen. Zusätzlich zu den Einzelpflanzen wurden eine Bulk-Analyse der 10 Einzelpflanzen durchgeführt. Nicht in jedem Fall repräsentiert der Bulk alle Allele der

untersuchten 10 Einzelpflanzen (Abb. 19).

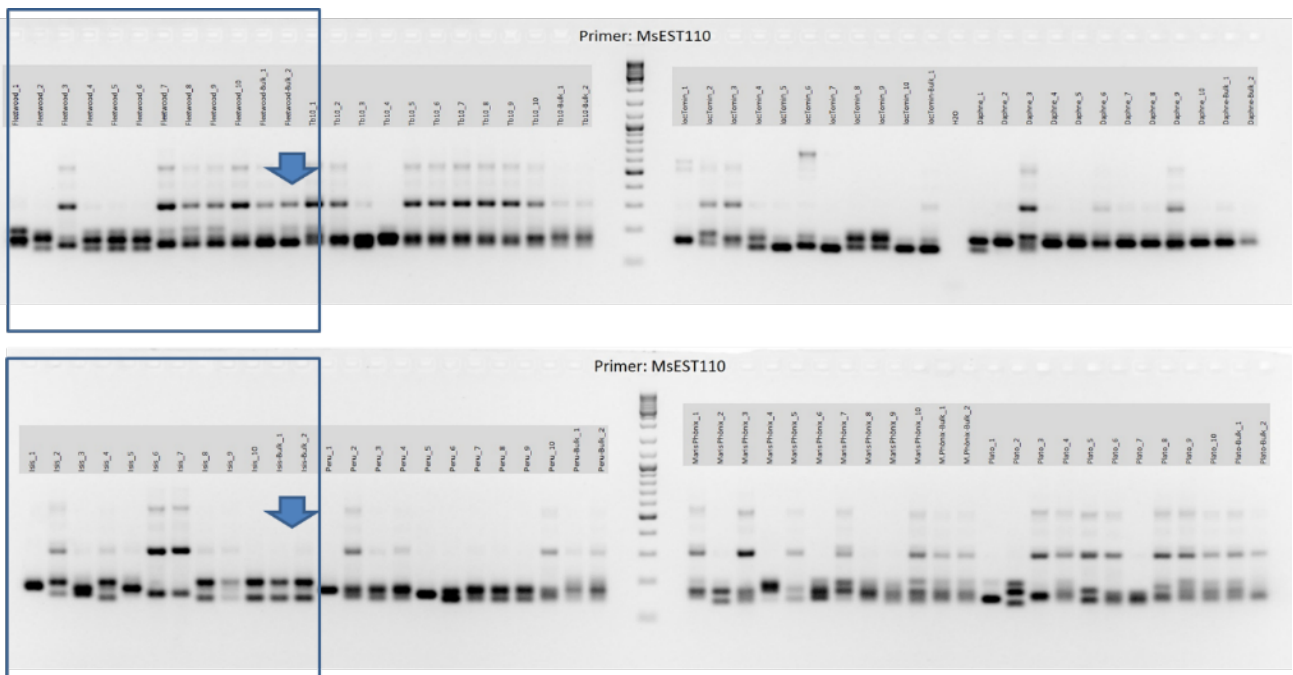


Abbildung 19: Markerpolymorphismen des SSR-Markers MsEST110 in einer Auswahl von Prüfgliedern

Zur Abschätzung der Allel-Variabilität in einer größeren Stichprobe wurden 50 Individuen von ausgewählten Prüfgliedern mit SSR-Markern getestet, die schon im vorherigen Screening einen hohen Grad an Polymorphismus zeigten. Mit dem Marker MsEST110 konnten unter 50 analysierten Individuen des Prüfglieds LE2670 insgesamt 5 verschiedene Allele nachgewiesen werden (Abb. 20). Das Ergebnis zeigt, dass die untersuchte *M. sativa*-Linie genetisch sehr heterogen ist.

Ein schematischer Überblick über die amplifizierten Allele über SSR-Marker ist in Abbildung 21 dargestellt.

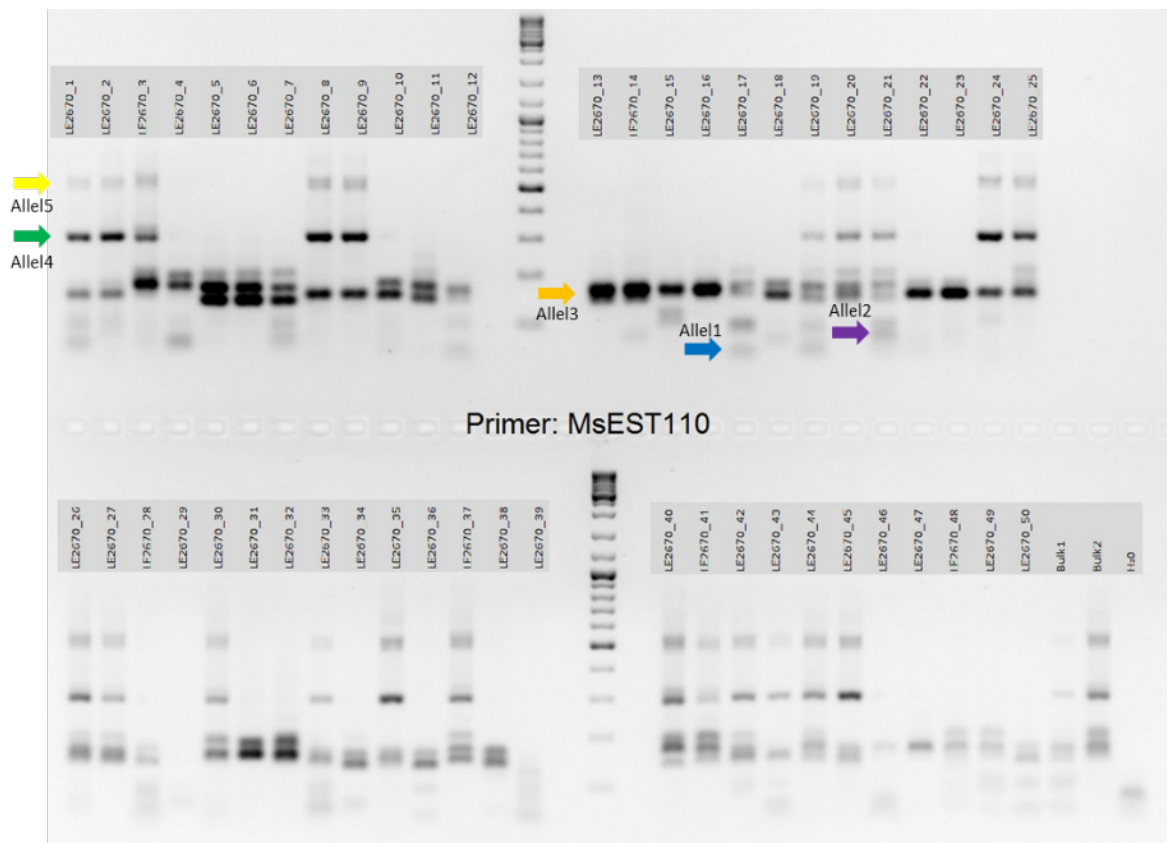


Abbildung 20: Markerpolymorphismen des SSR-Markers MsEST110 innerhalb von 50 Individuen der Linie LE2670

Das Screening aller 29 Linien von *M. sativa* mit insgesamt 29 SSR-Markern zeigt, wie polymorph das Material im Hinblick auf die amplifizierten Mikrosatellitenmotive im Genom ist. Luzerne ist ein autotetraploider, strenger Fremdbefruchter und auf Pollen anderer Pflanzen angewiesen. Somit ist die Entwicklung einer homogenen Sorte, wie wir es von selbstbefruchtenden Leguminosen, z.B. Lupinen her kennen, nur schwer möglich. Um ein Gendrift von außen zu vermeiden, werden Luzerne-Populationen in Isolationszelten und Insekten als Bestäuber, vermehrt.

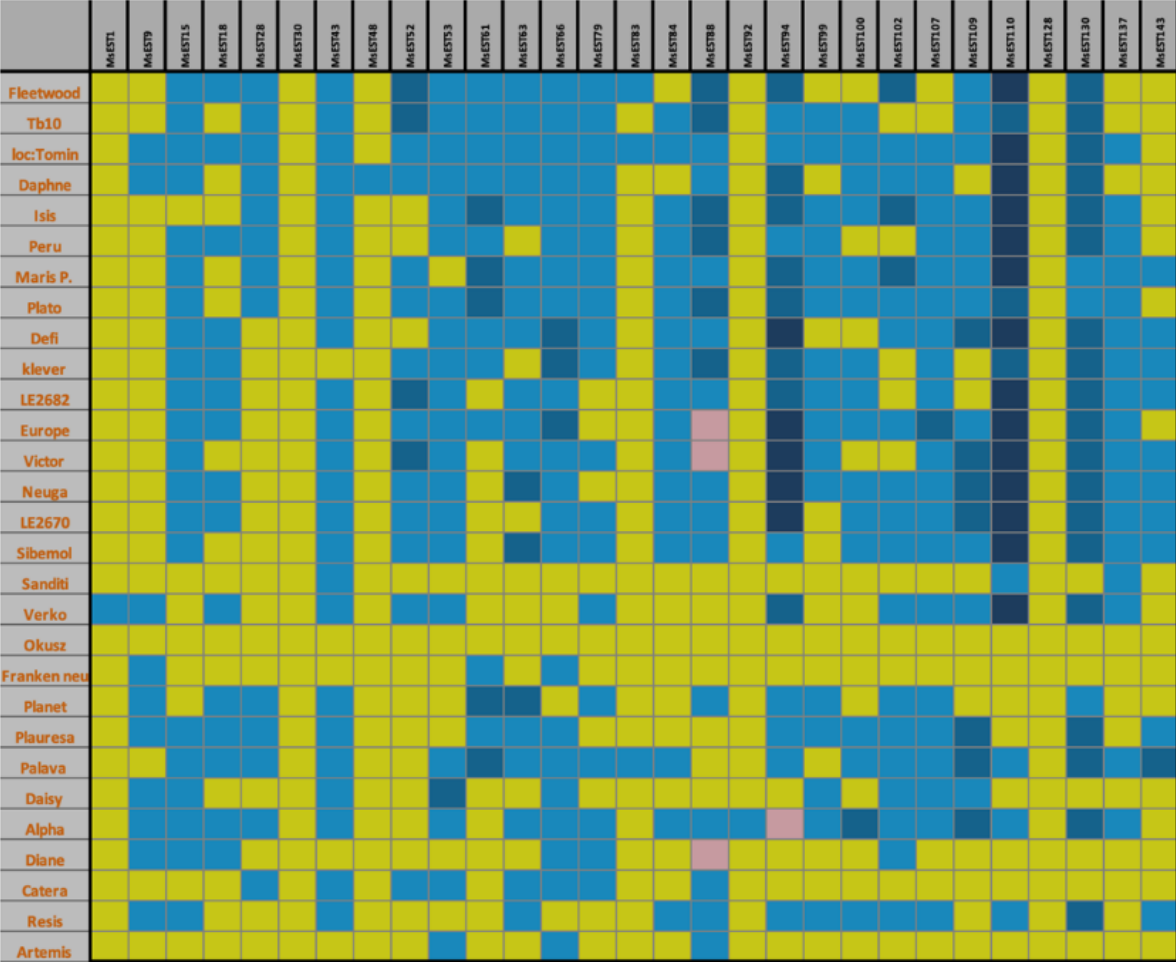


Abbildung 21: Anzahl Allele pro SSR-Marker im Set von 29 Prüfgliedern (gelb= 1Allel, hellblau= 2 Allel, mittelblau= 3 Allele, dunkelblau= 4 Allele, rosa = N/A)

5 Diskussion der Ergebnisse

5.1 Genetische Variation des Sets

Im vorliegenden Projekt konnte für Luzerne (*M. sativa*) ein Sortiment aus Sorten, Zuchtstämmen und Genbankakzessionen zusammengestellt und umfangreiche phänotypische (s. auch Modul A) und genotypische Daten für dieses Sortiment erhoben werden. Das Sortiment zeigt sowohl phänotypisch als auch genotypisch eine breite Diversität. Die in Modul C (Zusatz) durchgeführten Analysen des genetischen Sets mit SSR-Markern und die vom Projektpartner IPK durchgeführten GBS- und Stammbaumanalysen zeigen die hohe genetische Variabilität des Sets. Einzelpflanzenanalysen mit SSR-Markern innerhalb einer Linien wiesen auf eine starke Heterogenität innerhalb eines Prüfglieds hin. Diese Tatsache erschwert auch die phänotypische Einschätzung des Materials. Eine einheitliche Reaktion der Linien z.B. auf eine Pflanzenpathogen ist aufgrund der unterschiedlichen Allelkonstitution an vielen Genorten nicht zu erwarten.

Einerseits ermöglicht die Vielfalt an Allelen die Einkreuzung neuer Merkmalsvarianten in aktuelle Sorten, andererseits ist es aufgrund des Status der tetraploiden Luzerne als obligater Fremdbefruchter nur schwer möglich einen homogenen Sortencharakter zu erzielen. Daher sollte die Sortenentwicklung in Zukunft von molekulargenetischen Techniken begleitet werden, um den Sortencharakter kontrollieren zu können.

5.2 Resistenztests

Gewächshaus

Resistenztests im Gewächshaus wurden an Jungpflanzen mittels einer Sprühinokulation mit *Colletotrichum trifolii* durchgeführt. Die in 3.1. diskutierte Variabilität innerhalb der Linien bzw. Sorten spiegelt sich auch in den Phänotypisierungsdaten im Hinblick auf das Befallslevel wieder. Die Einzelpflanzen eines Prüfgliedes reagierten sehr unterschiedlich nach der Infektion. Zusätzlich erschwert der schnelle Wiederaufwuchs der Luzerne nach Schnittinfektion in Kombination mit der langsamen Vermehrung des Erregers die einheitliche Phänotypisierungen von Luzerne-Akzessionen. Im Gegensatz dazu ergaben die Infektionsversuche bei der Rotkleelinie durchaus ein einheitliches Bild. Die im Projektverlauf gesammelten Erfahrungen bei der Gewächshauskultivierung von Luzerne lässt den Schluss zu, dass eine phänotypische Einschätzung von Genotypen im Gewächshaus keine zuverlässige Erhebung von Phänotypisierungsdaten ermöglichen. Bestätigt wurde diese Einschätzung durch die Nutzung einer weiteren Inokulationsmethode über Saatgutinfektion. Die Boniturdaten von Luzerne-Jungpflanzen, die aus inokulierten Samen herangezogen wurden wiesen ebenfalls eine starke Heterogenität auf. Auch in diesem Fall wiesen die untersuchten Rotklee-Sorten nach der Keimung aus inokuliertem Saatgut eine einheitliche Symptomatik auf. Die angewandte Methode erweist sich demnach grundsätzlich als anwendbar, allerdings ist sie für die Prüfung von Luzerne nicht geeignet.

Als Konsequenz aus den erzielten Ergebnissen der Gewächshausresistenztests wurden vom JKI eine Anpassung der verwendeten Methodik zur Resistenzphänotypisierung vorgenommen und Freiland-Feldversuche über zwei Versuchsjahre durchgeführt. Die Anzahl der Prüfglieder

war aufgrund der Saatgutverfügbarkeit sowie des Versuchsumfangs limitiert (N = 30), sodass Resistenzdaten nicht für das gesamte Variabilitätsset zur Verrechnung in Modul C bereitgestellt werden konnten. Das methodische Vorgehen ermöglicht jedoch eine valide Einschätzung der Anfälligkeit von Luzerne gegenüber *Colletotrichum trifolii* sowie des Einflusses unterschiedlicher Saatgutvorbehandlungsvarianten unter praxisnahen Bedingungen.

Freiland

Die Feldversuche erforderten diverse Saatgutbehandlungen im Vorfeld, um u.a. die Wirkung von Plasma auf das Infektionsgeschehen nach Sameninokulation mit *C. trifolii* zu prüfen. Alle Varianten wurden auf Keimfähigkeit und Ausprägung von Symptome an Jungpflanzen im Gewächshaus überprüft. Keine der Behandlungsvarianten (V0-V8) hatte einen negativen Einfluss auf die Keimung, so dass die Methoden zur Saatgutbehandlung als erfolgreich eingestuft werden konnten. Restsaatgut aus den Varianten V0 bis V8 wurden im Gewächshaus herangezogen und wie erwartet zeigten nur die Varianten V5-V8, deren Saatgut mit dem Pilz inokuliert wurde, anthraknosespezifische Symptome. Somit ist der Nachweis erbracht, dass sich aus inokulierten Samen (*Colletotrichum*) Pflanzen mit typischen anthraknose-spezifischen Symptome entwickeln. Dies wiederum weist darauf hin, dass nach der Sameninokulation auch *C. trifolii*-Symptome an Feldpflanzen auftreten. Die Auswertung der Boniturergebnisse spiegelt genau diese Annahme wieder. Die Varianten V5-V8 zeigen im Feld ein signifikant höheres Befallslevel als die Kontrollvarianten V0-V4. Symptomfreie Prüfglieder konnten nicht beobachtet werden. Im Hinblick auf das Merkmal Anthraknose gibt keine starke Differenzierung im Material.

Insgesamt ist das Befallsniveau jedoch im Feld als gering einzustufen, da keines der Prüfglieder so starke Symptome zeigt, dass es zum Absterben und zum Totalausfall der Parzellen kommen würde. Daher ist der wirtschaftliche Schaden durch Anthraknose im Luzerneanbau in Nordostdeutschland als eher gering einzustufen. Die Versuche hätten sicherlich in Bayern (Donaudelta) am Standort des Wirtschaftspartners Saat-zucht Steinach zu höheren Infektionsraten geführt.

Das Auftreten von Symptomen an Feldpflanzen der Varianten V0-V4 ist sicherlich durch Sekundärinfektionen zwischen den Parzellen zu erklären. Der Versuch war als randomisierte Blockanlage aufgebaut, so dass zwischen den Wiederholungen auch Parzellen mit Genotypen der Variante V5-V8 neben solchen Parzellen mit nicht behandeltem Saatgut angebaut wurden. Die Annahme wird auch durch die Auswertung des Feldversuchs von 2022 im Folgejahr bestätigt. So zeigte sich im Versuchsjahr 2023 nach Neuaufwuchs ein höheres Befallsniveau als 2022.

6 Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die im Bericht dargestellten Ergebnisse liefern einerseits neue Erkenntnisse zur genetischen Variabilität des Materials und geben so den Züchtern die Möglichkeit bei der Entwicklung neuer Zuchtlinien die starke Heterogenität in den Materialgruppen zu berücksichtigen. Es ist zu empfehlen, bei der Vermehrung von Material auf ausreichende Isolierung der Zuchtlinie zu achten, um so einen gewissen Grad an Homogenität zu bewahren. Die Sortenentwicklung auf diploiden *Medicago sativa*-Materials würden den Schritt in Richtung Homogenität ebenfalls erleichtern.

Die vom JKI durchgeführten zweijährigen Freilandresistenzversuche mit inokulierten Saatgut haben ergeben, dass die Ausprägung der Anthraknose-Symptome nach Primärinfektion im Aussaatjahr eher gering ist. Selbst unter Berücksichtigung der Sekundärinfektionen im Folgejahr konnte nur ein mittlerer Befallsgrad an den Prüfglieder beobachtet werden. Das bedeutet für den Landwirt, dass er hier im Nordosten mit relativ kühlen Temperaturen und einer seit Jahren ausgeprägten Frühsommertrockenheit mit wenig Quantitäts- (Trockmasse) und Qualitäts- (Protein) Einbußen zu rechnen hat. Andererseits gibt es Hinweise, dass das Ertragsniveau im Norden geringer ist als im Süden (s. Modul A). Für die Praxis ist eine Erweiterung des Anbaus dieser kleinsamigen Futterpflanze in milden Zonen Deutschlands durchaus empfehlenswert. Jedoch können sich längere kühle Wetterperioden nach der Aussaat, im Nordosten nicht ungewöhnlich, negativ auf die Keimung und den Aufwuchs im Aussaatjahr auswirken.

Das vorliegende Projekt und seine Projektergebnisse sind eine wertvolle Ausgangsbasis für die verbesserte und wissensbasierte Umsetzung weiterer Forschungsprojekte und Kooperationen.

7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Mit dem vorliegenden LuzNutz-Projekt ist es gelungen die genetische Variabilität dieser Kulturart darzustellen sowie neue Erkenntnisse über das Befallslevel des genetischen Sets von Luzerne gegenüber Anthraknose (*Colletotrichum trifolii*) zu gewinnen. Für die erfolgreiche Durchführung von Resistenztests wurden eine Reihe von Techniken zur Saatgutinokulation mit dem Pilz entwickelt. Um einen Eindruck über die Wirksamkeit von Plasma und chemischer Beize auf die Infektionsraten der Pflanzen aus infizierten Samen zu erhalten wurden hierfür ebenfalls Techniken in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner INP entwickelt.

Nach Validierung der Ergebnisse der Gewächshausresistenztests war es notwendig das geplante methodische Vorgehen zur Resistenzprüfung anzupassen um die zuverlässige Erhebung wissenschaftlicher Daten zu sichern. Dies begründete sich einerseits in der genetischen Heterogenität innerhalb der Luzerne-Genotypen, wurde andererseits auch durch den Infektionsdruck des Erregers *C. trifolii* auf Luzerne unter den definierten GH-Bedingungen vermittelt. Durch die Durchführung zweijähriger Feldversuche konnte das Infektionsgeschehen für ein Teilsortiment über die gesamte Vegetationsperiode und unter praxisnahen Bedingungen erfolgen. Diese Ausweitung der Feldversuche auf zweijährige Parzellenversuche ermöglichte die Erhebung und statistische Auswertung von umfangreichen Datensätzen zur Primär- und Sekundärinfektion am genetischen Set von *Medicago sativa* (Modul B-1) und ermöglichte die wissenschaftliche Beurteilung der Wirkung von Saatgutvorbehandlungsmethoden unter Freilandbedingungen. Für den Projektpartner JKI bedeutete die Durchführung der Versuche ein Mehraufwand (Versuchsfeldlogistik, Personal, Versuchbetreuung und Bonituren).

Aufgrund der Saatgutverfügbarkeit der Luzerne-Akzessionen und dem Versuchsumfang konnte nur ein Subset von *Medicago* im Hinblick auf Anthraknose im Feld phänotypisiert werden. Der erhobene Datensatz konnte demnach nicht für die Verrechnung im Modul C4 unter Einbeziehung genomischer Sequenzdaten genutzt werden. Aufgrund der geringen phänotypischen Unterschiede zwischen den Prüfgliedern, ist die Detektion von QTLs jedoch für Anthraknoseresistenz bzw. –Anfälligkeit als eher gering einzustufen. Eingeplante Personal und Sachmittel im Modul C4 sind davon unberührt, weil die genomweite Assoziationsstudie durch den Projektpartner IPK für weitere relevante Merkmale, sowie strukturelle Diversitätsberechnungen vollständig durchgeführt wurde.

Schlussbericht zum Thema:

**“Erhöhung der Anbauwürdigkeit von Luzerne (*Medicago sativa* L.)
als Futterpflanze-
Neue Impulse für die Königin der Futterpflanzen (LuzNutz)“**



II. Bericht zum Teilvorhaben IPK

Förderkennzeichen: 2818EPS035

Laufzeit: 01.02.2021 bis 31.01.2024

Projektnehmer: Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK),
Inselstraße 9,
23999 Malchow/Poel

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen der BMEL Eiweißpflanzenstrategie.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	36
Tabellenverzeichnis	37
1 Einführung.....	38
2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	38
3 Material und Methoden	38
3.1 Genetisches Material und GBS-Analysen.....	38
3.2 Phänotypisierungen zu P-Aufnahme-Effizienz und Wurzelsystem.....	39
3.3 Feldversuche	40
4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse.....	41
4.1 GBS-Analyse der <i>Medicago</i> -Sammlung	41
4.2 Phänotypisierung der Phosphoraufnahme-Effizienz und der Wurzelsystem-Architektur ..	46
4.3 Feldversuche.....	51
5 Diskussion der Ergebnisse (Teilvorhaben IPK).....	53
6 Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	54
7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen.....	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neighbor-Joining (NJ)-Baum, der die phylogenetischen Beziehungen der <i>Medicago</i> -Muster aus Gatersleben (MED, grüne Nodien) und Malchow (blaue Nodien) darstellt; rot: MED-Muster, die im Bereich der Malchower LE-Kulturmuster gruppieren.	42
Abbildung 2: Hauptkomponentenanalyse, beruhend auf GBS-Daten der 40 untersuchten <i>Medicago</i> -Arten.	43
Abbildung 3: PCA Pie Chart, das die genetische Zusammensetzung der <i>Medicago</i> -Akzessionen darstellt. Genetische Gruppen wurden mit Hilfe von k-means identifiziert (k=9).	44
Abbildung 4: Hauptkomponenten-Gruppierung von <i>Medicago</i> -Mustern mit drei Hauptgruppen, die im Wesentlichen den geografischen Ursprungsregionen entsprechen.	44
Abbildung 5: SH-Test zur Identifikation von sehr ähnlichen/identischen Akzessionen, basierend auf SNP-Daten; rot: identifiziertes Akzessionspaar mit hohem SH-Wert.	45
Abbildung 6: PCA zur Darstellung der genetischen Diversität der 200 ausgewählten <i>Medicago</i> -Muster.	46
Abbildung 7 Ergebnisse der Bayes'schen Zuordnungsanalyse, die Vermischung und genetische Differenzierung von 200 <i>Medicago</i> -Mustern zeigt (K=3).	47
Abbildung 8 Box plot-Darstellungen von signifikanter Variation von Spross- und Wurzel-Trockenmasse unter hoch- und niedrig P-Bedingungen sowie des Quotienten aus Wurzel- und Sprossbiomasse.	47
Abbildung 9 Rechteckiges Manhattan-Diagramm, das signifikante Assoziationen zwischen Markern und Merkmalen für a) maximale Pflanzenhöhe, b) Frischmasse der Triebe, und c) Wurzeltrockenmasse unter phosphorarmen Bedingungen zeigt; Chromosomen 1 bis 8 von rechts nach links aufgetragen.	48
Abbildung 10: Auf Grundlage der Differenz zwischen hoher (kräftige Farben) und niedriger (blasse Farben) Wurzeltrockenmasse ausgewählte Akzessionen; links: große Unterschiede; rechts: geringe Unterschiede (grün: Spross, braun: Wurzel.	49
Abbildung 11: P-Konzentrationen in den Sprossen der 20 ausgewählten Akzessionen.	50
Abbildung 12: Spross- und Wurzeltrockenmasse der in Rhizotronen angezogenen Akzessionen; Anordnung analog zu Abbildung 10.	50
Abbildung 13: Korrelationen zwischen Biomasseparametern der Topf- und Rhizotronexperimente.	50
Abbildung 14: PCA von Parametern der Wurzelsystemarchitektur, die die Variation verschiedener Wurzelmerkmale unter hohem und niedrigem P-Gehalten darstellt.	51
Abbildung 15: Balkendiagramm der Trockenmasseertrages über vier Ernten in den Jahren 2021 und 2022 an den Standorten Malchow und Steinach; die vier Ernten pro Jahr sind in unterschiedlichen Grüntönen dargestellt.	52
Abbildung 16: PCA-Biplot zu Beziehungen zwischen Parametern der Futtermittelqualität. Quadrate: Malchow, Kreise: Steinach; ungefüllte Symbole: Daten aus 2021, gefüllte Symbole: Daten aus 2022; verschiedene Grüntöne kennzeichnen unterschiedliche Ernten. Symbole, die nahe zusammen liegen, weisen auf ähnliche Merkmale zwischen den Datenpunkten hin.	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: taxonomische Übersicht über die <i>Medicago</i> -Sammlung der IPK-Genbank.....	38
---	----

1 Einführung

Eine Einführung zum Verbundvorhaben befindet sich im gemeinsamen Teil des Abschlussberichtes.

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der wissenschaftliche und technische Stand, an den in diesem Verbundvorhaben angeknüpft wurde, ist in dem gemeinsamen Teil des Abschlussberichtes dargestellt.

3 Material und Methoden

3.1 Genetisches Material und GBS-Analysen

Im Rahmen des Projekts LuzNutz wurde die komplette, 1.236 Akzessionen umfassende *Medicago*-Sammlung der IPK-Genbank bezüglich ihrer molekularen Diversität mittels GBS-Analyse (Genotyping by Sequencing, Elshire et al, 2011) untersucht; die taxonomische Zusammensetzung der Sammlung ist in Tabelle 1 überblicksmäßig zusammengefasst.

Tabelle 1: taxonomische Übersicht über die *Medicago*-Sammlung der IPK-Genbank

Botanische Art	Anzahl Akzessionen
<i>Medicago sativa</i> L.	400
<i>Medicago x varia</i> Martyn	343
<i>Medicago polymorpha</i> L.	42
<i>Medicago doliata</i> Carmign.	20
<i>Medicago falcata</i> L.	17
<i>Medicago tornata</i> (L.) Mill.	15
<i>Medicago truncatula</i> Gaertn.	15
<i>Medicago lupulina</i> L.	13
<i>Medicago minima</i> (L.) Bartal.	8
<i>Medicago rigidula</i> (L.) All.	7
<i>Medicago arabica</i> (L.) Huds.	6
<i>Medicago murex</i> Willd.	6
andere (28 Arten)	41
unbestimmt	303
gesamt	1.236

Keimung und Blatternte

Etwa 100 Samen pro Akzession wurden in einem kontrollierten Umfeld mit einer elfstündigen Lichtperiode bei 22°C und einer 13-stündigen Nachtperiode bei 15°C über einen Zeitraum von 10 Tagen in einem Keimschrank angekeimt. Junge Keimblätter von 50 Keimlingen pro Akzession wurden geerntet, als Mischprobe zusammengefasst und sofort eingefroren. Anschließend wurden die gefrorenen Blattproben 24 Stunden lang lyophilisiert.

DNA-Extraktion und -Quantifizierung

Die genomische DNA wurde aus den lyophilisierten Blattproben mit der von Doyle und Doyle (1990) beschriebenen CTAB-Methode extrahiert. Der Extraktionsprozess wurde in einem 96-Well-Plattenformat mit Hilfe einer Janus-Workstation durchgeführt. Die extrahierte DNA wurde in 100 µl Tris-EDTA (TE)-Puffer aufgelöst. Die DNA-Qualität und -Konzentration wurde durch Elektrophorese auf 1%igen Agarosegelen bestimmt und mit einem VICTOR Nivo Multimode-Plattenlesegerät quantifiziert. Die DNA-Konzentrationen wurden auf 20 ng/µl eingestellt und für die Vorbereitung der Genotypisierungsbibliothek durch Sequenzierung (GBS) verwendet.

Bibliotheksvorbereitung und GBS

Die GBS-Bibliotheksvorbereitung wurde mit der Restriktionsenzymkombination *Pst* I und *Mse* I durchgeführt, um eine genomweite Abdeckung zu erreichen.

Datenanalyse und -visualisierung

Die GBS-Rohdaten wurden mithilfe von FastQ-Tools einer Qualitätsbewertung unterzogen, um hochwertige Reads zu gewährleisten. Die De-novo-Zusammenstellung der GBS-Daten wurde mit ipyrad v0.9.71 durchgeführt (Eaton und Overcast, 2020). Die minimale Probenanzahl pro Locus wurde auf 620 festgelegt, wobei der Schwellenwert für die Clusterbildung innerhalb der Proben auf 0,85 gesetzt wurde. Es wurden die von ipyrad generierten Standardparametereinstellungen verwendet und zwei Ausgaben generiert: eine mit *Trifolium pratense* als Außengruppe für phylogenetische Analysen und eine zweite Ausgabe ohne *T. pratense* für die Hauptkomponentenanalyse (PCA) und die Populationsstrukturanalyse.

3.2 Phänotypisierungen zu P-Aufnahme-Effizienz und Wurzelsystem

Phänotypische Charakterisierung (PUE)

Insgesamt 200 ausgewählte Akzessionen wurden im IPK-Gewächshaus in 7-Liter-Töpfen phänotypisiert, um die Biomassebildung unter zwei P-Versorgungsstufen zu bewerten: hoher P-Gehalt (1 g P als Triple-Superphosphat, TSP) und niedriger P-Gehalt (0,05 g P als TSP) unter Verwendung einer speziellen, P-freien Substratmischung mit Perlite (Klasmann-Deilmann, Geeste). Jede Akzession wurde beiden Behandlungen mit drei Wiederholungen unterzogen. Die Versuche wurden von April bis Juli 2023 durchgeführt. Die Samen wurden zunächst in einer Keimkammer unter den zuvor beschriebenen Bedingungen angekeimt. Am elften Tag wurden die gekeimten Sämlinge in Töpfe verpflanzt, zunächst mit 13 Sämlingen pro Topf, die später auf zehn Pflanzen pro Topf reduziert wurden. Die Töpfe wurden regelmäßig bewässert.

Pflanzenwachstum und Ernte

Die Pflanzen wurden bis zu einer Dauer von etwa acht Wochen (55 Tage) kultiviert, wobei sie regelmäßig auf Nährstoffmangel untersucht wurden. Die Pflanzenhöhe (Maximum und Minimum pro Topf) wurde vor der Ernte gemessen. Nach der Ernte wurden Sprosse und Wurzeln getrennt geerntet. Die Sprosse wurden sofort gewogen, um das Frischgewicht zu ermitteln, und anschließend 24 Stunden lang bei 60 °C im Heißluftofen getrocknet, bevor das Trockengewicht ermittelt wurde. Bei den Wurzeln wurden die Töpfe manuell gedreht und die Wurzeln vorsichtig geschüttelt, um das Substratgemisch zu entfernen. Die geramschten Wurzeln pro Topf wurden dann gründlich gewaschen, grob getrocknet und 24 Stunden lang in einem Heißluftofen bei 60 °C getrocknet; anschließend wurde das Trockengewicht ermittelt.

Analyse der P-Konzentration

Pflanzenhöhe, Sprossfrisch- und -trockengewicht und Wurzeltrockengewicht wurden für jede Akzession ermittelt. Akzessionen, die eine hohe bzw. geringe Wurzeltrockenmasse-Differenz (HP-LP) aufwiesen, wurden identifiziert und je zehn dieser Akzessionen für die weitere Analyse ausgewählt. Getrocknetes Pflanzenmaterial der ausgewählten Akzessionen wurde zu einem feinen Pulver vermahlen. Die Proben wurden in einem Porzellantiegel aufbewahrt, erneut bei 105°C getrocknet, gewogen und bei 550°C für vier bis fünf Stunden in einem Muffelofen verascht. Der Gesamt-P-Gehalt wurde in 25%iger Salzsäure extrahiert. Die P-Konzentrationen wurden mittels induktiv gekoppelter Plasma-Atomemissionsspektroskopie (ICP OES Optima 8300, Perkin Elmer) bei einer Wellenlänge von 214 nm gemessen.

Phänotypische Charakterisierung (Architektur des Wurzelsystems, RSA)

Zwanzig ausgewählte Akzessionen (siehe oben) wurden in Rhizotronversuchen mit zwei Behandlungen (Hoch-P und Niedrig-P) und fünf Wiederholungen getestet. Die verwendeten Rhizotrone hatten eine Länge von 44 cm, eine Breite von 29 cm sowie eine Tiefe von 2 cm, was ein Volumen von 2552 Kubikzentimetern pro Rhizotron ergab. Umgerechnet in Liter, enthielten die Rhizotrone etwa 2,5 Liter Substrat.

P-Behandlung

Bei der Behandlung mit hohem P-Gehalt erhielt jedes Rhizotron 1,0 g P in Form von TSP zugesetzt. Im Gegensatz dazu erhielt jedes Rhizotron mit niedrigem P-Gehalt nur 0,05 g P als TSP. Die Rhizotrone wurden in regelmäßigen Abständen mit einer Weithalsspritze bewässert.

Pflanzenwachstum und Ernte

Die Versuche wurden über einen Zeitraum von drei Wochen durchgeführt. Am Ende des Versuchs wurden die Rhizotrone zusammen mit den Spross- und Wurzelsystemen dokumentiert. Die Sprosse wurden dann separat geerntet und sowohl das Frischgewicht als auch das Trockengewicht ermittelt. Die Wurzeln wurden vorsichtig auf einen Scanner gelegt und mit 600 dpi gescannt. Die gescannten Wurzelbilder wurden anschließend mit der Software Semi-automated Root Image Analysis (saRIA) analysiert (Narisetti et al., 2019).

Erfassung phänotypischer Daten

Verschiedene Wurzelmerkmale wurden mit Hilfe von saRIA quantifiziert, einschließlich Wurzelfläche, Gesamtlänge, Gesamtvolumen, Gesamtoberfläche, Anzahl der Verzweigungspunkte und Anzahl der Endpunkte, Wurzeltiefe und Wurzelbreite.

3.3 Feldversuche

Versuchsplanung

Die Feldversuche wurden von 2021 bis 2023 durchgeführt, wobei die Versuche sowohl in Malchow als auch in Steinach stattfanden. In Malchow wurden die Versuche in allen drei Jahren durchgeführt, in Steinach nur in den Jahren 2021 und 2022. Insgesamt wurden 60 Luzerne-Muster bewertet, darunter 50 Genbankakzessionen und zehn aktuelle Sorten. Jede Akzession wurde pro Standort zweimal in einem vollständig randomisierten Design repliziert.

Parzellengröße

Die Parzellengröße in Malchow betrug 7,5 x 1,5 Meter, also insgesamt 11,25 Quadratmeter, während die Parzellen in Steinach 6 x 1,3 Meter groß waren (7,8 Quadratmeter).

Ernten

Jedes Jahr wurden vier Ernten durchgeführt, wobei Parameter wie Pflanzenhöhe, Bestandsdichte, vegetatives Wachstum und Krankheiten drei Wochen nach jeder Ernte erfasst wurden. Die Ernte wurde mit einem Feldhäcksler durchgeführt, und die grüne Biomasse wurde pro Parzelle gemessen. Zusätzlich wurden von jeder Parzelle Proben mit einem Gewicht zwischen 500 und 1.000 Gramm für Futterwertanalysen entnommen.

Analyse der Futterqualität

Die Proben wurden zwei Tage lang in einem Heißluftofen bei 60 Grad Celsius getrocknet und anschließend gewogen, um das Trockengewicht zu ermitteln. Die Proben jeder Ernte wurden zur Analyse der Futterqualitätsparameter an den Landeskontrollverband Berlin-Brandenburg e.V. (LKV) geschickt. Die vom LKV erhaltenen Daten umfassten Parameter wie Rohprotein, Fasergehalt, Kohlenhydrate, Fette, Zucker, Netto-Laktationsenergie und metabolisierbare Energie.

Datenanalyse

Die Daten aus den Feldversuchen wurden mit Excel und R-Software unter Verwendung von Paketen wie ggplot, tidyverse und corrplot analysiert.

4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

4.1 GBS-Analyse der *Medicago*-Sammlung

Alle 1.236 Akzessionen wurden einer Genotypisierung durch Sequenzierung (GBS) unterzogen, was zu etwa 11.000 Loci und insgesamt 128.566 SNPs führte. Dieser Datensatz wurde verwendet, um die genetische Vielfalt der Sammlung zu bewerten. Mithilfe der ipyrad-Analysepipeline wurden die SNPs aus den GBS-Daten identifiziert. Die .phylip-Ausgabedatei von ipyrad wurde verwendet, um einen Neighbor-Joining (NJ)-Baum zu erstellen (Abbildung 22), der die phylogenetischen Beziehungen zwischen allen beprobten Akzessionen veranschaulicht. In dem Baum sind die Akzessionen aus Gatersleben (Präfix MED), die im Wesentlichen nicht-verwandte Wildarten repräsentieren, durch grüne Knoten hervorgehoben, während die blauen Knoten das Kulturmateriale aus Malchow bezeichnen (Präfix LE), das hauptsächlich für Futterzwecke verwendet wird.

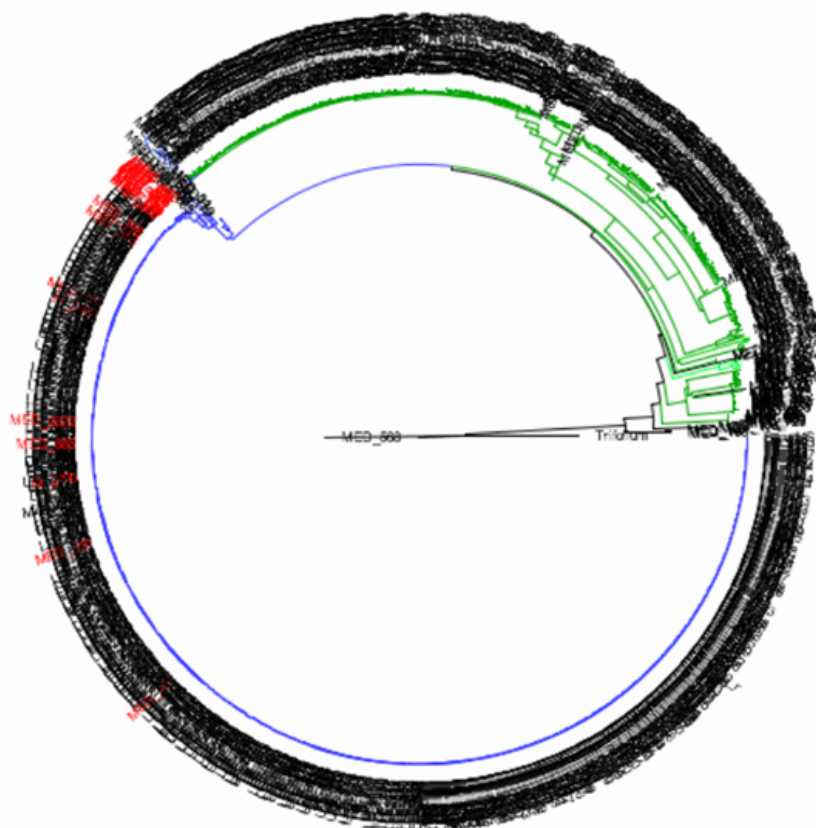


Abbildung 1: Neighbor-Joining (NJ)-Baum, der die phylogenetischen Beziehungen der *Medicago*-Muster aus Gatersleben (MED, grüne Nodien) und Malchow (blaue Nodien) darstellt; rot: MED-Muster, die im Bereich der Malchower LE-Kulturmuster gruppieren.

Auffällig ist, dass mehrere MED-Akzessionen aus Gatersleben mit den LE-Mustern aus Malchow geclustert sind. Diese rot markierten MED-Muster, die zu Arten wie *Medicago falcata*, *M. lupulina*, *M. hemicycla* und *M. polychroa* gehören, zeigen enge phylogenetische Beziehungen zu den beiden Kulturarten *M. sativa* und *M. x varia*, was auf genetische Ähnlichkeiten und Beziehungen zwischen diesen *Medicago*-Arten hinweist.

Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Die PCA-Analyse ergab eine deutliche genetische Differenzierung zwischen den 40 *Medicago*-Arten. Hauptkomponente 1 (PC1) und Hauptkomponente 2 (PC2) erklärten 64,7% bzw. 26,1% der Gesamtvariation (Abbildung 2). Bemerkenswert ist, dass die LE-Akzessionen (*M. sativa*, *M. x varia*) vorwiegend auf der linken Seite des Diagramms geclustert waren, während die Kulturpflanzenverwandten (MED-Muster) auf der rechten Seite geclustert waren. Insbesondere waren die *M. polymorpha*-Muster (schwarze Quadrate) auf der rechten Seite verstreut und eng mit *M. truncatula* (rote Dreiecke oben und unten), *M. tornata* (hellgrüne Raute plus) und *M. turbinata* (gelbes Quadrat plus) verbunden.

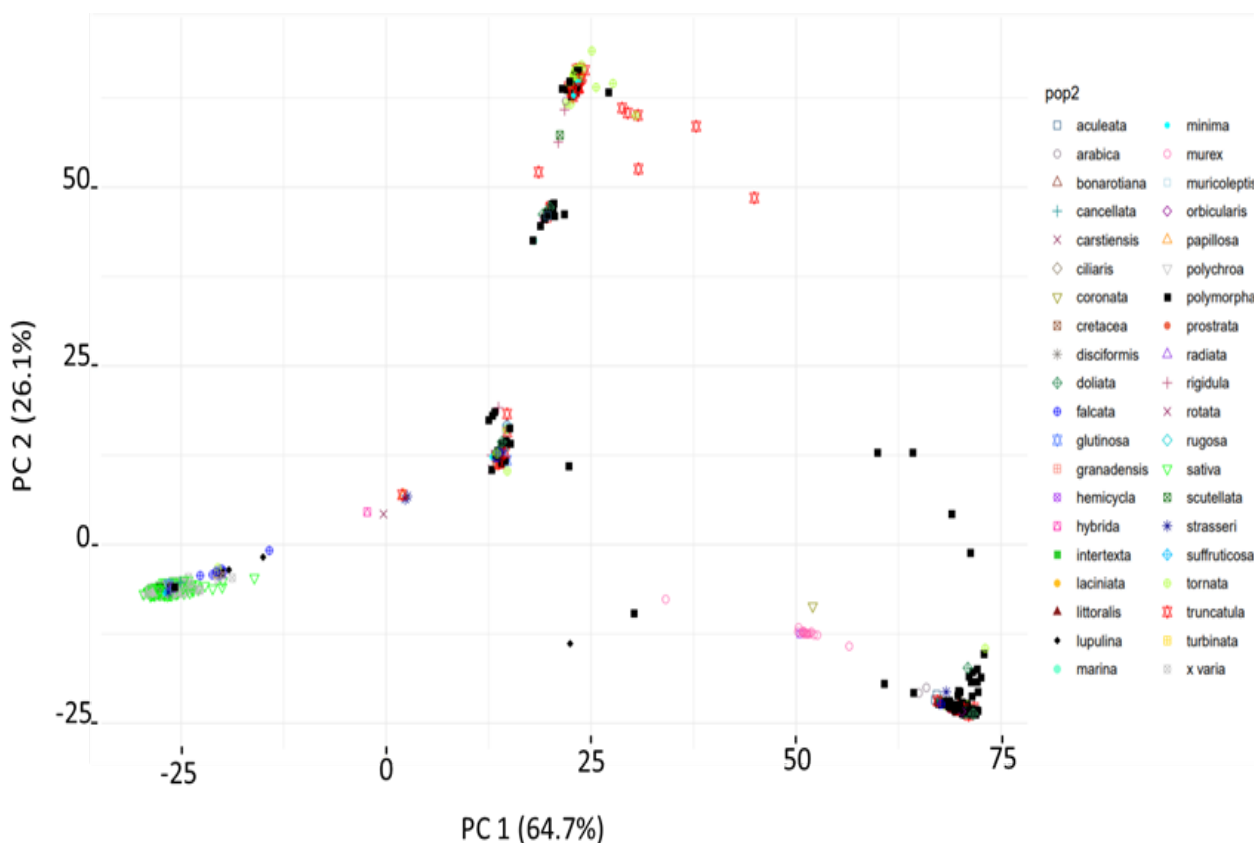


Abbildung 2: Hauptkomponentenanalyse, beruhend auf GBS-Daten der 40 untersuchten *Medicago*-Arten.

Analyse der genetischen Zusammensetzung mit PCA pie charts:

Genetische Gruppen innerhalb der *Medicago*-Akzessionen wurden durch k-means-Clustering identifiziert, mit dem Ziel, die Variation zwischen den Gruppen zu maximieren und gleichzeitig das Bayes'sche Informationskriterium (BIC) zu minimieren. Die mit dieser Methode ermittelte optimale Anzahl von Gruppen wurde mit k=9 bestimmt. Anschließend wurden PCA pie charts erstellt (Abbildung 3), um die genetische Zusammensetzung innerhalb der Akzessionen darzustellen. Zur Darstellung der Homogenität oder Vermischung der einzelnen Muster sind diese in einheitlichen oder gemischten Farben aufgetragen und stellen die gleiche Variation dar, die in den Hauptkomponenten PC1 und PC2 der vorherigen PCA-Darstellung beobachtet wurde.

Clustering der Akzessionen auf der Grundlage der Hauptkomponentenanalyse

Die PCA, die mit dem Genotypisierungsdatensatz durchgeführt wurde, ergab deutliche Gruppierungen unter den *Medicago*-Akzessionen (Abbildung 4). Es wurden drei Hauptcluster identifiziert, die durch Ellipsen hervorgehoben sind und die geografische Herkunftsregionen darstellen. Die größte, in Rot dargestellte Ellipse enthält aus Afrika stammende Akzessionen. Diese Gruppe umfasst die meisten Wildtypen und schließt eine Untergruppe der europäischen Kulturpflanzenverwandten sowie einige Akzessionen unbekannter Herkunft ein.

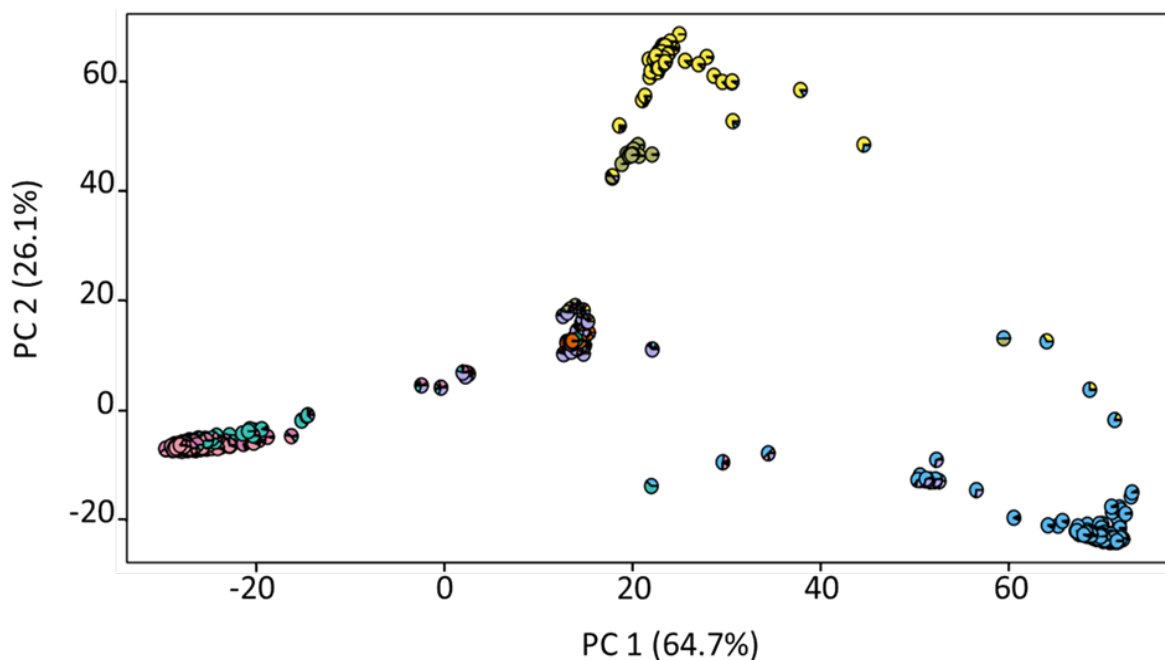


Abbildung 3: PCA Pie Chart, das die genetische Zusammensetzung der *Medicago*-Akzessionen darstellt. Genetische Gruppen wurden mit Hilfe von k-means identifiziert (k=9).

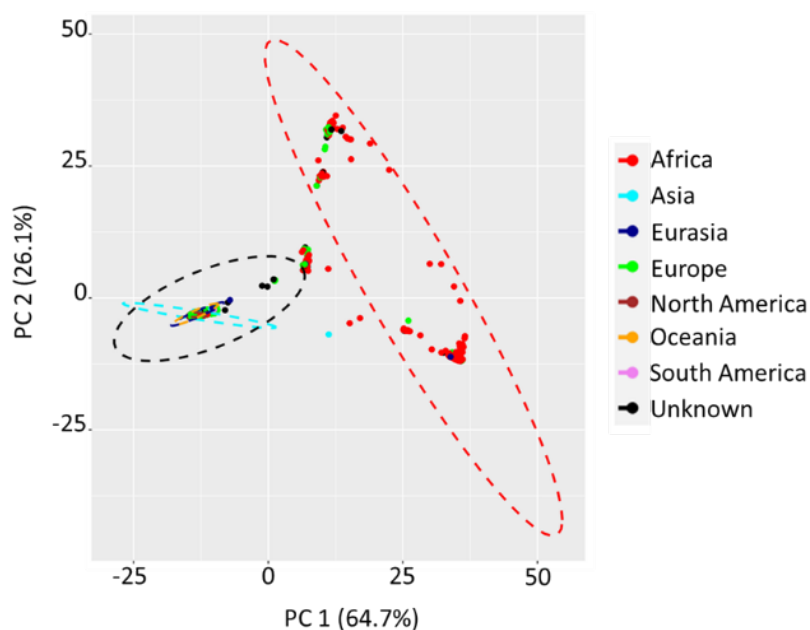


Abbildung 4: Hauptkomponenten-Gruppierung von *Medicago*-Mustern mit drei Hauptgruppen, die im Wesentlichen den geografischen Ursprungsregionen entsprechen.

Die schwarze Ellipse stellt Akzessionen unbekannter Herkunft dar, während die türkisfarbene Ellipse hauptsächlich Akzessionen aus Asien umfasst. Beide Gruppen umfassen ein breites Spektrum an geografischen Herkünften, darunter Asien, Europa, Süd- und Nordamerika sowie Ozeanien. Interessanterweise sind mehrere Akzessionen afrikanischer und europäischer Herkunft zwischen den Clustern Afrika und Asien positioniert, was auf eine mögliche genetische Vermischung oder eine einzigartige Evolutionsgeschichte hinweist. Diese PCA-basierte Clusterbildung bietet Einblicke in die genetische Vielfalt und die Populationsstruktur der *Medicago*-Akzessionen und verdeutlicht den

Einfluss geografischer Faktoren auf die genetische Variation innerhalb der *Medicago*-Ressourcensammlung.

Shared Heterozygosity (SH)-Tests

Bei der Analyse der gemeinsamen Heterozygotie wurden Klonemate-Paare auf der Grundlage der Anzahl der SNPs identifiziert, bei denen zwei Proben identische Heterozygotie (NSH) aufwiesen. Jeder Datenpunkt auf dem Diagramm (Abbildung 5) steht für ein Probenpaar, wobei technische Replikate blau (Extraktion der analysierten DNAs aus unterschiedlichen Individuen einer Akzession) und technische Duplikate (Extraktion der analysierten DNAs aus identischen Individuen einer Akzession) rot hervorgehoben sind. Der Modus nahe einer SH=1 weist auf Klonemate hin. Während bei dem technischen Duplikat der erwartete hohe SH-Wert von über 0,9 beobachtet wurde, lag dieser bei den technischen Replikaten unter 0,5; die Ursachen hierfür müssen noch genauer analysiert werden. Dank der SH-Tests konnte auch ein Akzessionspaar ermittelt werden, bei dem ebenfalls ein SH-Wert von über 0,9 festgestellt wurde (roter Kreis in Abb. 5). Beide Muster (MED 37, MED 54) gehören zur Art *M. rugosa* und sind unbekannter Herkunft.

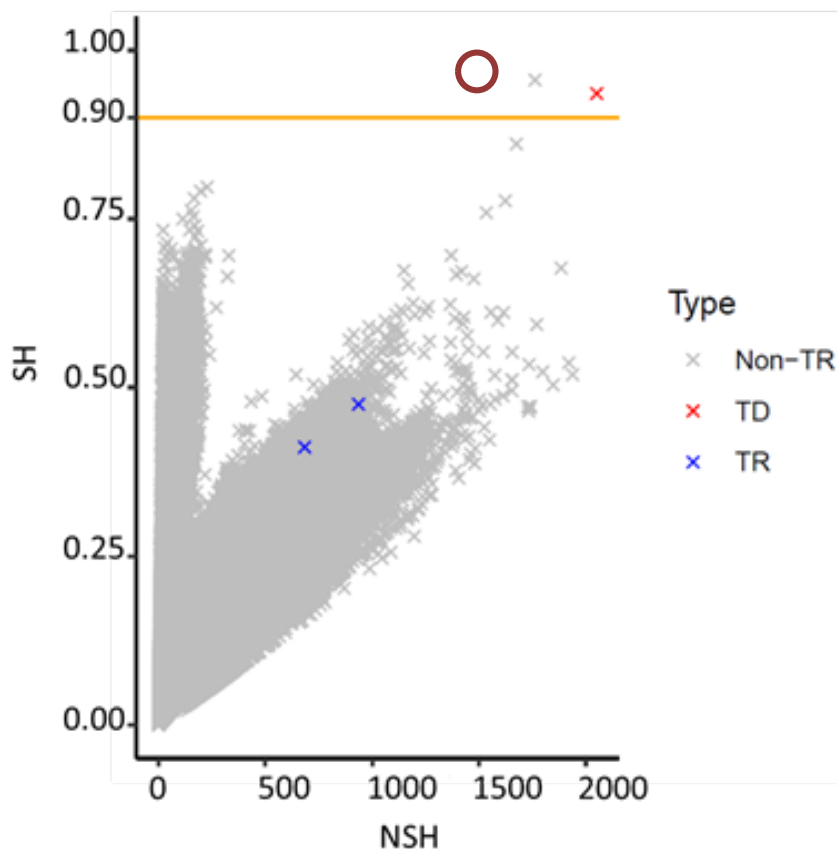


Abbildung 5: SH-Test zur Identifikation von sehr ähnlichen/identischen Akzessionen, basierend auf SNP-Daten; rot: identifiziertes Akzessionspaar mit hohem SH-Wert.

4.2 Phänotypisierung der Phosphoraufnahme-Effizienz und der Wurzelsystem-Architektur

Aus den 1.236 Akzessionen, die mittels GBS genotypisiert wurden, wurden mit Hilfe des phylogenetischen Baums aus Abb. 1 die 200 genetisch vielfältigsten Akzessionen selektiert, die für die Wurzeluntersuchungen in einem Topfexperiment eingesetzt wurden. Sie umfassten die Arten *M. sativa*, *M. x varia*, *M. falcata*, *M. glutinosa*, *M. hemicycla* und *M. polychroa*. Eine neuerliche PCA, die nur die ausgewählten 200 Muster enthielt, erklärte 49,8% (PC1) und 22,7% (PC2) der Variation (Abbildung 6).

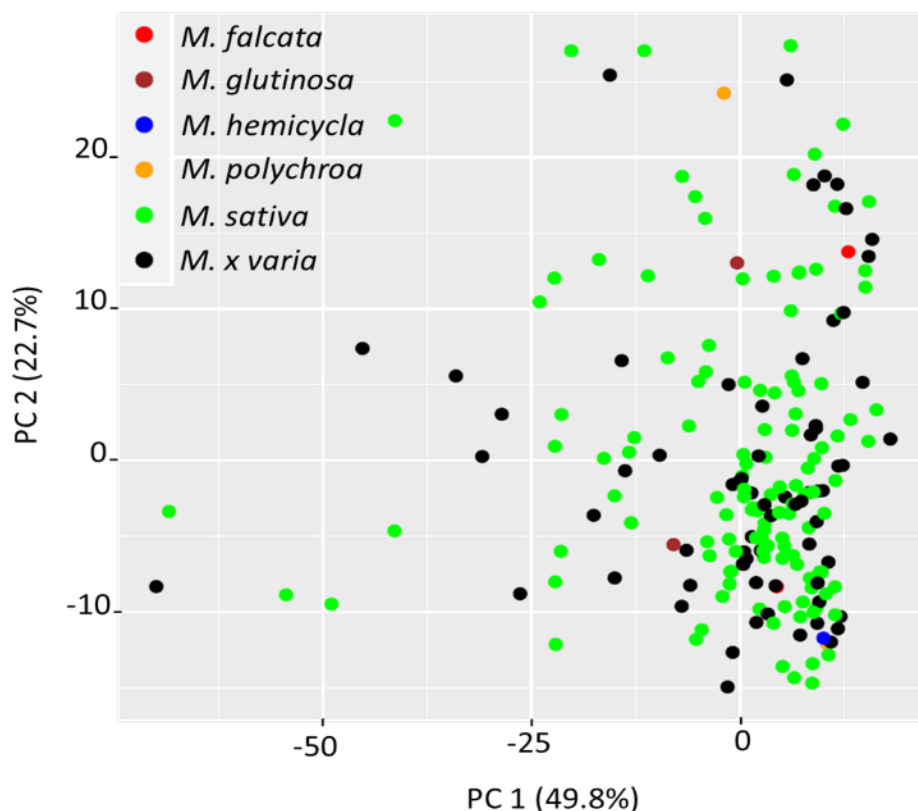


Abbildung 6: PCA zur Darstellung der genetischen Diversität der 200 ausgewählten *Medicago*-Muster.

Sie verdeutlicht einen Mangel an klarer genetischer Differenzierung zwischen den obigen sechs Arten. *M. sativa* und *M. x varia*, die aber auch mit der höchsten Anzahl an Mustern vertreten sind, weisen eine große genetische Vielfalt auf, wie ihre breite Verteilung in der PCA-Darstellung zeigt. Um sowohl Vermischungen als auch genetische Unterschiede zwischen den Akzessionen aufzudecken, wurde für die 200 ausgewählten Akzessionen eine Bayes'sche Zuordnungsanalyse mit dem LEA-Paket in der R-Software durchgeführt. Jede Akzession wird durch einen horizontalen Balken dargestellt, der in drei Segmente unterteilt ist und die Wahrscheinlichkeit widerspiegelt, dass sie zu den drei durch K=3 definierten Klassen gehört (Abbildung 7).

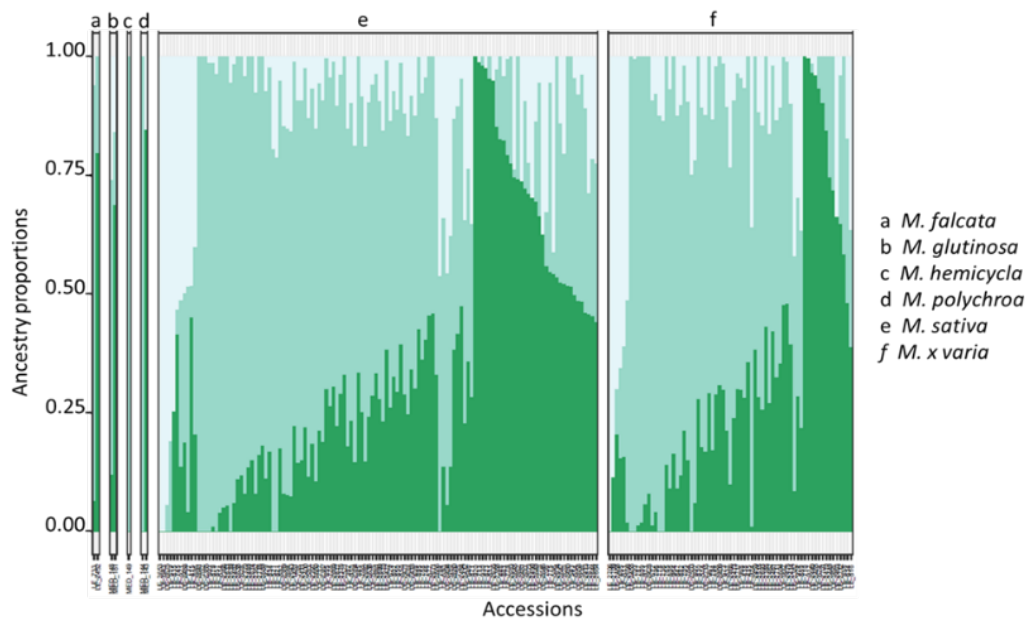


Abbildung 7 Ergebnisse der Bayes'schen Zuordnungsanalyse, die Vermischung und genetische Differenzierung von 200 *Medicago*-Mustern zeigt (K=3).

Phänotypisierung für Biomasse und Phosphornutzungseffizienz

Es wurden Boxplots erstellt, um die Variation der Spross- und Wurzeltrockenmasse unter den beiden Stufen der Phosphorversorgung zu veranschaulichen (Abbildung 8). Unter hoher P-Versorgung reichte die Spross-Trockenmasse von 2,48 g bis 7,42 g (Durchschnitt 4,81 g), während sie unter niedrigen P-Bedingungen zwischen 1,65 g und 5,86 g lag, mit einem Durchschnitt von 3,67 g ($p_{\text{Behandlung}} < 0,001$, $p_{\text{Akzession}} < 0,001$).

Auch die Wurzeltrockenmasse wies eine signifikante Variation auf: Sie reichte von 0,51 g bis 2,33 g mit einem Durchschnitt von 1,43 g bei hohem P-Niveau und von 0,37 g bis 2,17 g (Durchschnitt 1,10 g) unter niedrigen P-Bedingungen ($p_{\text{Behandlung}} < 0,001$, $p_{\text{Akzession}} < 0,001$). Diese Ergebnisse unterstreichen den signifikanten Einfluss der P-Versorgung auf die Bildung von Spross- und Wurzeltrockenmasse. Der Quotient aus Wurzel- und Spross-Trockenmasse war hingegen bei beiden P-Niveaus annähernd gleich.

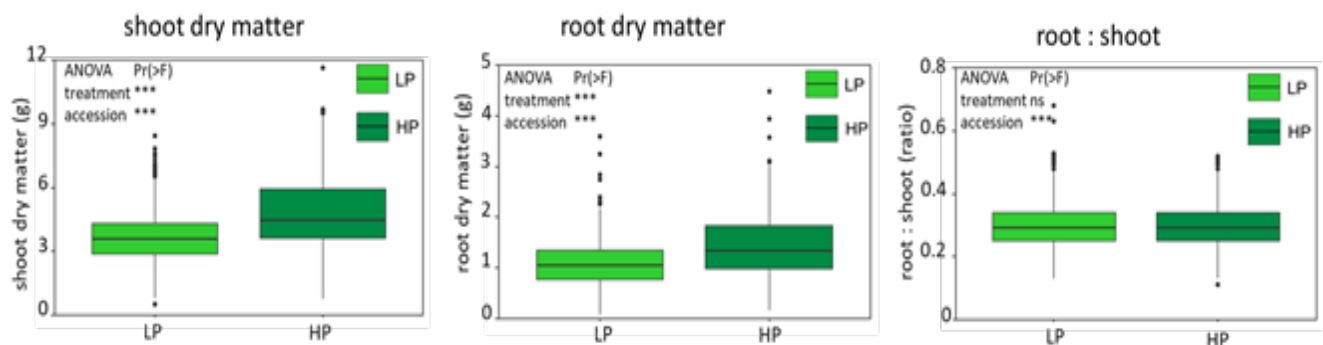


Abbildung 8 Box plot-Darstellungen von signifikanter Variation von Spross- und Wurzel-Trockenmasse unter hoch- und niedrig P-Bedingungen sowie des Quotienten aus Wurzel- und Sprossbiomasse.

Genomweite Assoziationsstudie (GWAS) für Merkmale unter phosphorarmen Bedingungen

GWAS wurde für die maximale Pflanzenhöhe unter phosphorarmen Bedingungen mit dem rmvp-

Paket CV.FarmCPU durchgeführt, wobei Kovarianten in FarmCPU hinzugefügt wurden. Die Bonferroni-Methode wurde angewendet, um signifikante Marker-Eigenschafts-Assoziationen zu identifizieren. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde ein rechteckiges Manhattan-Diagramm (Abbildung 9) erstellt. Das Diagramm hebt zwei signifikante Marker-Eigenschafts-Assoziationen hervor, die durch unterschiedliche Farben auf den Chromosomen 1 und 2 gekennzeichnet sind. Die Assoziation auf Chromosom 1 wird durch die blaue Farbe gekennzeichnet, während die Assoziation auf Chromosom 2 in Gelb dargestellt ist. Darüber hinaus wurden auf Chromosom 1 Marker-Merkmal-Assoziationen für die Frischmasse des Sprosses und die Wurzeltrockenmasse identifiziert.

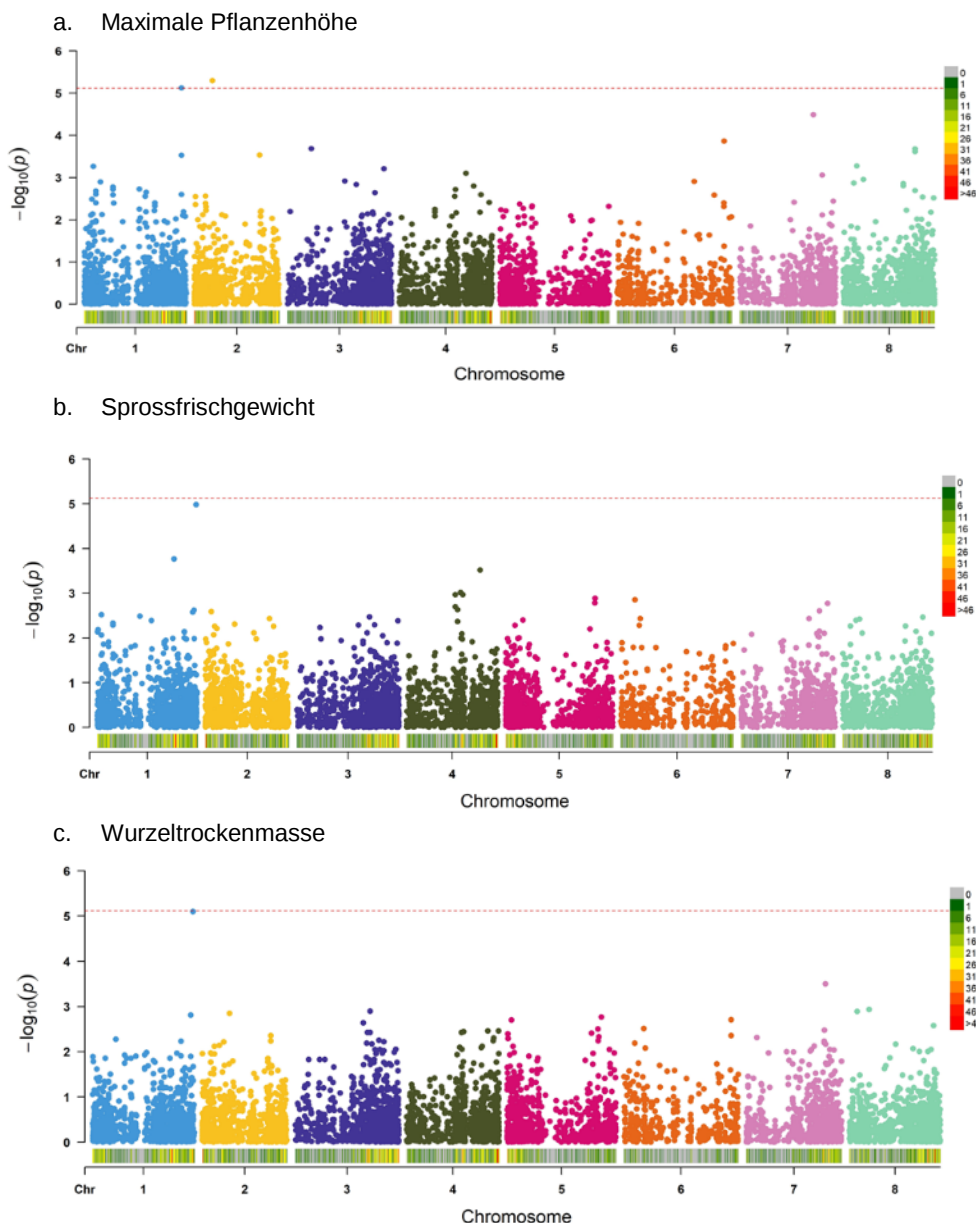


Abbildung 9 Rechteckiges Manhattan-Diagramm, das signifikante Assoziationen zwischen Markern und Merkmalen für a) maximale Pflanzenhöhe, b) Frischmasse der Triebe, und c) Wurzeltrockenmasse unter phosphorarmen Bedingungen zeigt; Chromosomen 1 bis 8 von rechts nach links aufgetragen.

P-Konzentrationen und Studien zur Architektur des Wurzelsystems:

Im Anschluss an die obigen Untersuchungen wurden 20 der 200 Akzessionen auf der Grundlage von großen bzw. geringen Unterschieden bei der Wurzeltrockenmasse-Bildung unter hoher bzw. niedriger P-Versorgung ausgewählt (Abbildung 10). Akzessionen mit großen Unterschieden in der Wurzeltrockenmasse wiesen sowohl bei Behandlungen mit niedrigem als auch mit hohem Phosphorgehalt (P) Unterschiede im Trockenmassegewicht auf, während jene mit geringen Unterschieden in der Wurzeltrockenmasse unabhängig von der Behandlung ähnliche Trockenmassegewichte aufwiesen. Bei der Untersuchung der P-Konzentrationen in den Sprossen wurden bei den meisten Proben höhere P-Konzentrationen bei Behandlungen mit hohem P-Gehalt und niedrigere Konzentrationen bei Behandlungen mit niedrigem P-Gehalt festgestellt. Die Akzession LE 2459 wies jedoch einen ungewöhnlichen Trend auf, da sie bei der Behandlung mit niedrigem P eine höhere P-Konzentration aufwies als bei der Behandlung mit hohem P (Abbildung 11). Diese Beobachtungen verdeutlichen den erwarteten Einfluss der P-Behandlung auf die P-Konzentration, wobei zwischen den einzelnen Akzessionen erhebliche Unterschiede beobachtet wurden. Die 20 ausgewählten Akzessionen wurden in mittelgroße Rhizotronen gepflanzt und dort detaillierter bezüglich der Architektur ihres Wurzelsystems untersucht. Interessanterweise wurden bei den Akzessionen mit hohen und niedrigen Unterschieden in der Wurzeltrockenmasse leichte Variationen im Spross- und Wurzeltrockenmassegewicht festgestellt (Abbildung 12). Die Korrelationsanalyse zwischen Topfversuchen und Rhizotronversuchen (Abbildung 13) ergab mäßige (Spross- bzw. Wurzel-Vergleich zwischen Experimenten) bis positive Korrelationen (Spross- und Wurzel-Vergleich innerhalb der Experimente), was auf konsistente Wachstumsmuster in beiden Versuchsanordnungen hindeutet.

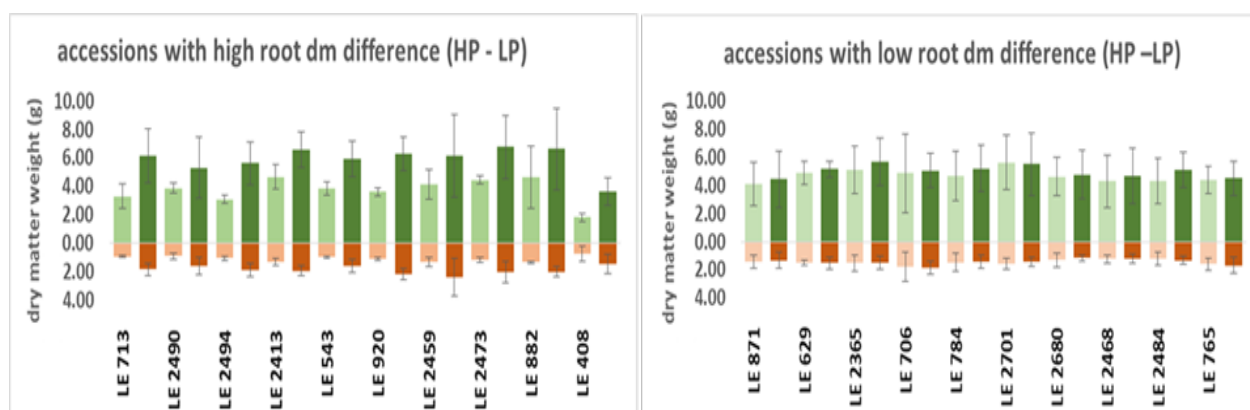
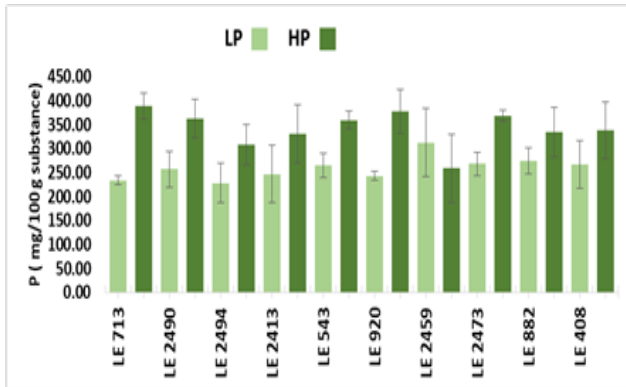


Abbildung 10: Auf Grundlage der Differenz zwischen hoher (kräftige Farben) und niedriger (blasse Farben) Wurzeltrockenmasse ausgewählte Akzessionen; links: große Unterschiede; rechts: geringe Unterschiede (grün: Spross, braun: Wurzel).

Shoot P concentrations in high difference accessions



Shoot P concentrations in low difference accessions

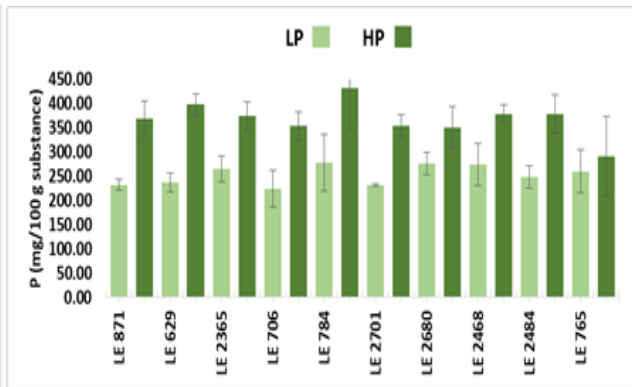


Abbildung 11: P-Konzentrationen in den Sprossen der 20 ausgewählten Akzessionen.

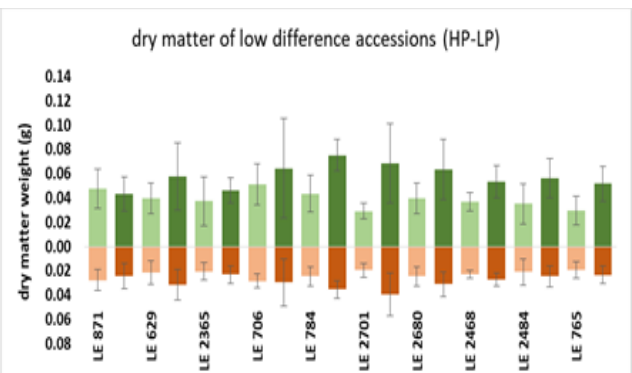
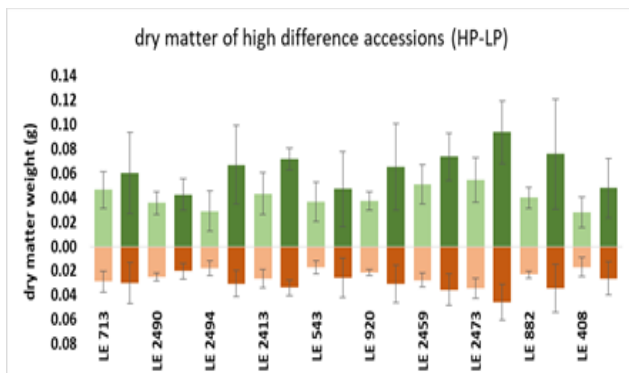


Abbildung 12: Spross- und Wurzeltrockenmasse der in Rhizotronen angezogenen Akzessionen; Anordnung analog zu Abbildung 10.

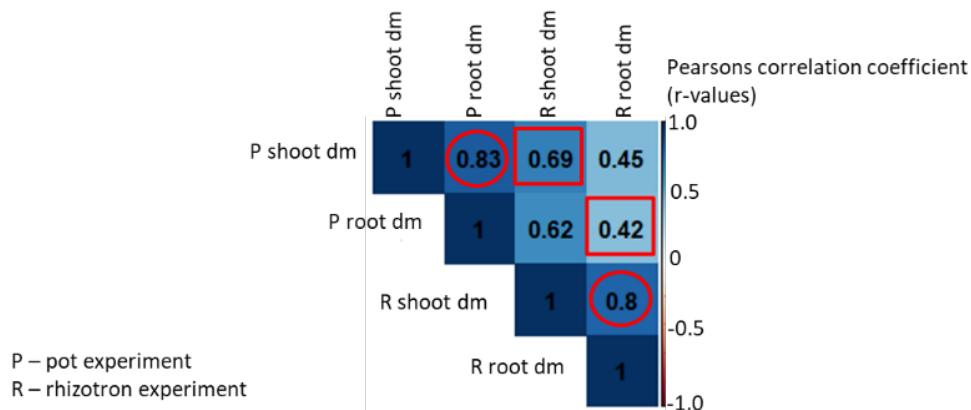


Abbildung 13: Korrelationen zwischen Biomasseparametern der Topf- und Rhizotronexperimente.

Anhand der Daten zur Architektur des Wurzelsystems wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt, um Parameter wie Fläche, Gesamtlänge, Gesamtvolumen und geometrisches Mittel sowie die Fläche und Breite der konvexen Hülle der Wurzeln zu bewerten. Die daraus resultierende PCA-Darstellung (Abbildung 14) zeigt deutliche Muster, wobei PC1 54,4% der Varianz und PC2 20,7% erklärt. Die hellgrünen Punkte im Diagramm stellen Proben mit niedrigem P-Gehalt dar, während die dunkelgrünen Punkte Proben mit hohem P-Gehalt repräsentieren. Jedes Merkmal

ist durch einen entsprechenden Buchstaben (a bis m) gekennzeichnet, wobei farbige Punkte, die nahe beieinander liegen, ähnliche Merkmalswerte anzeigen. Bemerkenswert ist, dass die meisten Merkmale auf der rechten Seite von PC1 liegen, was auf eine positive Korrelation hinweist. Die spezifische Wurzellänge (gekennzeichnet durch den Buchstaben m) und die spezifische konvexe Hüllenfläche (e) befinden sich jedoch auf der linken Seite von PC2. Dies deutet auf einen Zielkonflikt zwischen Wurzellänge und Wurzeldurchmesser hin, bei dem Pflanzen mit längeren Wurzeln (e) einen geringeren Durchmesser (h) aufweisen können, und umgekehrt. Die Richtung und Länge der Pfeile im Diagramm veranschaulichen die Merkmalsvariationen, wobei längere Pfeile höhere Merkmalswerte anzeigen.

4.3 Feldversuche

Die in den Jahren 2021 und 2022 in Malchow und Steinach durchgeführten Feldversuche zeigten deutliche Unterschiede in der Biomasseproduktion und im Ertrag. Im Jahr 2021 schwankte die

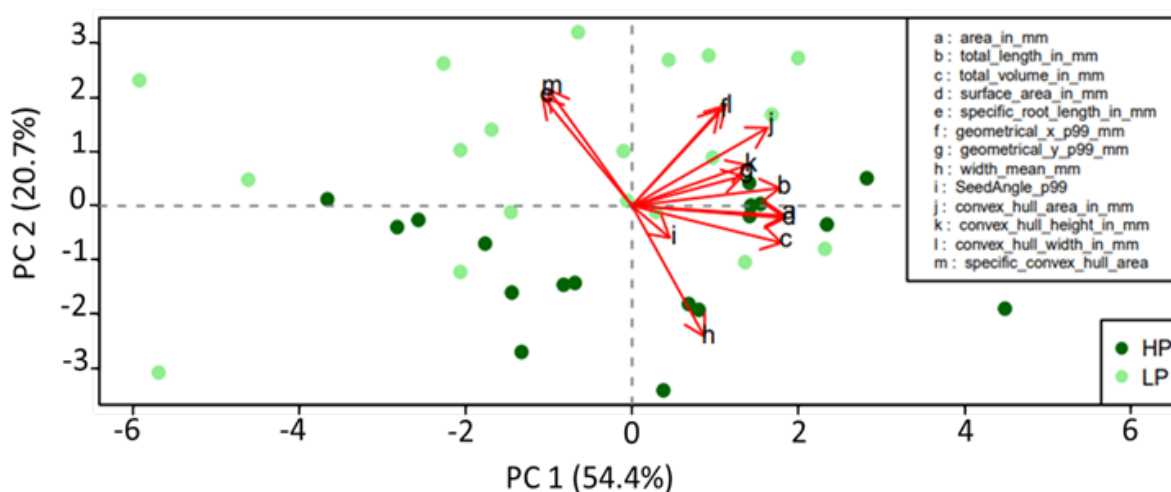


Abbildung 14: PCA von Parametern der Wurzelsystemarchitektur, die die Variation verschiedener Wurzelmerkmale unter hohem und niedrigem P-Gehalten darstellt.

Produktion von frischer Biomasse in Malchow zwischen 0,5 und 3,5 kg/m² und sank im Jahr 2022 auf 0,3 bis 2,7 kg/m². In Steinach lag die Produktion zwischen 0,9 und 3,4 kg/m² im Jahr 2021 und sank auf 1,0 bis 3,0 kg/m² im Jahr 2022, wobei in den letzten Ernten eines jeden Jahres ein Rückgang zu verzeichnen war. Die Gesamttrockenmasseerträge (Abbildung 15) variierten ebenfalls, wobei die Luzerne in Malchow im Jahr 2021 142,5 dt/ha produzierte und 2022 auf 123,8 dt/ha zurückging. Umgekehrt produzierten die Luzerne-Muster in Steinach 142,4 dt/ha im Jahr 2021 und 170,3 dt/ha im Jahr 2022, was höhere und stabilere Erträge als Malchow zeigt. Die Varianzanalyse bestätigte, dass sowohl die Ernte als auch der Standort einen signifikanten Einfluss auf den Gesamttrockenmasseertrag in den Jahren 2021 und 2022 haben. Eine weitere Analyse der Rohproteinkonzentration, die von 188 g/kg TM bis 256 g/kg TM reichte, zeigte, dass der Proteingehalt in der zweiten Ernte am niedrigsten war. In Malchow stiegen die Proteinkonzentrationen bis zur vierten Ernte an, während in Steinach die höchsten Konzentrationen durchweg in der ersten Ernte beobachtet wurden.

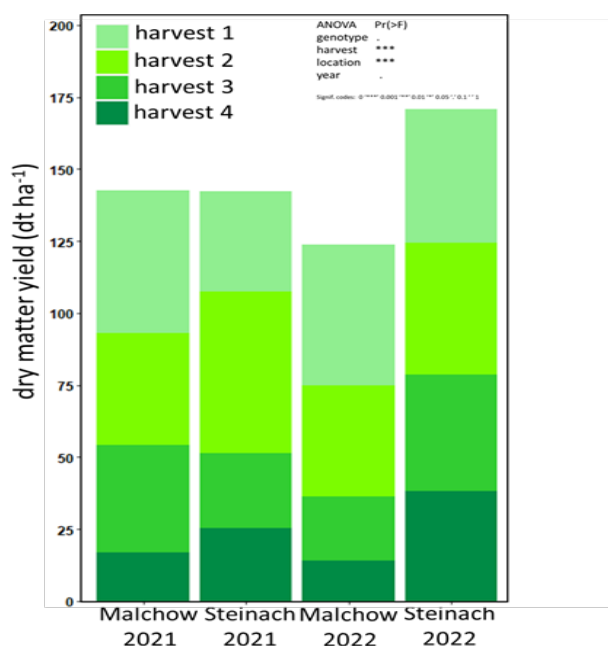


Abbildung 15: Balkendiagramm der Trockenmasseertrages über vier Ernten in den Jahren 2021 und 2022 an den Standorten Malchow und Steinach; die vier Ernten pro Jahr sind in unterschiedlichen Grüntönen dargestellt.

Um die Futterqualitätsparameter über verschiedene Ernten und Standorte hinweg zusammenzufassen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt und in einem Biplot visualisiert (Abbildung 16).

In dieser Analyse sind der Trockenmasseertrag, die Frischmasse und mehrere Futterqualitätsparameter enthalten. Die Richtung der Pfeile auf dem Diagramm zeigt, in welche Richtung die Werte entlang der Achsen zunehmen. Entlang der Hauptkomponente 1, die 62,7% der Varianz erklärt, sind Parameter wie Verdaulichkeit, Rohprotein, metabolisierbare Energie (ME) und Netto-Energie-Laktation (NEL) aufeinander abgestimmt, was darauf hindeutet, dass diese eng miteinander verbunden sind. Neutrale Detergentienfasern (NDF), die in die entgegengesetzte Richtung weisen, deuten auf einen Kompromiss mit diesen Qualitätsparametern hin. Die Hauptkomponente 2, auf die 20,7% der Varianz entfallen, betrifft in erster Linie die sauren Detergentienfasern (ADF), die keine direkte Beziehung zum NDF- oder Proteingehalt aufweisen. Die Darstellung zeigt auch, dass die Ertragsparameter in gewissem Maße negativ mit dem NEL korreliert sind, was darauf hindeutet, dass höhere Erträge zu niedrigeren Nettoenergie-Laktationswerten im Futter führen können. Die Daten der ersten Ernte umfassen in erster Linie den Trockenmasseertrag, die Biomasse und die ADF, während die vierte Ernte die mit der Energie verbundenen Parameter, nämlich NEL und ME, hervorhebt.

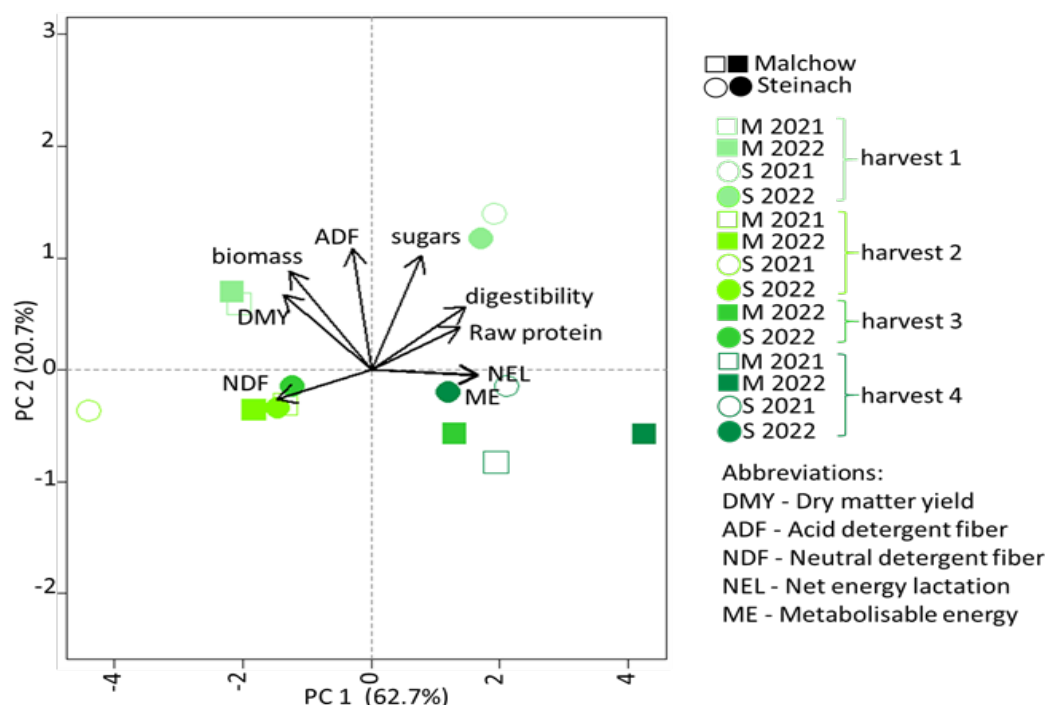


Abbildung 16: PCA-Biplot zu Beziehungen zwischen Parametern der Futtermittelqualität. Quadrate: Malchow, Kreise: Steinach; ungefüllte Symbole: Daten aus 2021, gefüllte Symbole: Daten aus 2022; verschiedene Grüntöne kennzeichnen unterschiedliche Ernten. Symbole, die nahe zusammen liegen, weisen auf ähnliche Merkmale zwischen den Datenpunkten hin.

Futterqualitätsdaten Malchow 2023 (erste Analyse; Daten erst vor Kurzem erhalten)

Die Gesamttrockenmasseerträge in Malchow schwankten von 142,5 dt/ha (2021) über 123,8 dt/ha (2022) bis 129,0 dt/ha (2023). Dem Trend der vorangegangenen Jahre folgend, lag die Proteinkonzentration 2023 zwischen 177 und 273 g pro kg Trockenmasse und stieg mit der vierten Ernte an. Von allen vier Ernten in den drei Jahren wies jeweils die vierte Ernte höhere Proteinkonzentrationen auf und hatte dadurch niedrigere Faserkonzentrationen (ADF und NDF) und höhere Energiewerte (NEL und ME), was mit den Daten aus den Jahren 2021 und 2022 übereinstimmt, die im PCA-Biplot der Abbildung 16 dargestellt sind.

5 Diskussion der Ergebnisse (Teilvorhaben IPK)

In dieser Studie sollte die genetische und phänotypische Vielfalt der kompletten *Medicago*-Sammlung des Leibniz-IPK umfassend untersucht werden, wobei sich das IPK auf genetische Vielfalt, Effizienz der Phosphoraufnahme, Wurzelsystemarchitektur, Feldertrag und Qualität konzentrierte. Die genetische Analyse ergab eine hohe genetische Vielfalt zwischen den Akzessionen, wobei im phylogenetischen Baum und in der Hauptkomponentenanalyse unterschiedliche Cluster beobachtet wurden, die im Wesentlichen auf den Kulturpool und den Wildpool zurückgehen. Diese Vielfalt unterstreicht, wie wichtig es ist, genetische Ressourcen zu erhalten und sie für die Verbesserung von Kulturpflanzen zu nutzen.

Die phänotypische Charakterisierung verdeutlichte die Biomassebildung der *Medicago*-Muster unter unterschiedlicher P-Versorgung. Die Topfversuche lieferten wertvolle Daten zur Biomassebildung, zur Spross- und Wurzeltrockenmasse und zur P-Konzentration. In erster Linie reagierten die Akzessionen unterschiedlich auf die P-Behandlung, wobei ihre Biomasse unter P-limitierten Bedingungen variierte. Die Rhizotronversuche ergänzten die Topfversuche, indem sie eine

detailliertere Bewertung der Architektur des Wurzelsystems ermöglichen. Die PCA von Wurzelmerkmalen ergab einen Kompromiss zwischen Wurzellänge und -durchmesser, was das komplexe Zusammenspiel zwischen verschiedenen Wurzelmerkmalen verdeutlicht.

Durch eine Kombination aus Genotypisierung durch Sequenzierung (GBS), Phänotypisierungsexperimenten und genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) konnten Erkenntnisse über die Faktoren gewonnen werden, die Pflanzenhöhe, Biomasse, P-Verwertung und Wurzelentwicklung bei *Medicago*-Arten beeinflussen. GWAS identifizierte signifikante Marker-Merkmal-Assoziationen für die maximale Pflanzenhöhe unter niedrigen P-Bedingungen, was die genetische Grundlage der P-Nutzungseffizienz bei *Medicago* beleuchtet. Diese Ergebnisse haben wichtige Auswirkungen auf Züchtungsprogramme, die darauf abzielen, die P-Nutzungseffizienz und die Gesamtproduktivität der Pflanzen zu steigern.

Darüber hinaus lieferte die Analyse der Futterqualitätsparameter wertvolle Einblicke in die Inhaltsstoffzusammensetzung der Luzerne-Biomasse. Es zeigten sich deutliche Cluster, die verschiedenen Ernten und Standorten entsprechen und die Variationen bei den Ertrags- und Qualitätsmerkmalen in verschiedenen Umgebungen widerspiegeln.

Insgesamt bietet der integrierte Ansatz des Leibniz-IPK ein umfassendes Verständnis der pflanzengenetischen Ressourcen der Gattung *Medicago*, welches Hinweise für künftige Züchtungsstrategien liefert und den Luzernefutteranbau positiv beeinflussen kann.

6 Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die im Bericht dargestellten Ergebnisse liefern neue Erkenntnisse zur genetischen Variabilität des *Medicago*-Genpools und geben so den Züchtern die Möglichkeit, bei der Entwicklung neuer Zuchtlinien die starke Heterogenität in den Materialgruppen zu berücksichtigen. Es ist zu empfehlen, bei der Vermehrung von Material auf ausreichende Isolierung der Zuchtlinie zu achten, um so einen gewissen Grad an Homogenität zu bewahren. Die Sortenentwicklung auf der Basis diploiden *Medicago sativa*-Materials würden den Schritt in Richtung Homogenität ebenfalls erleichtern.

Die Untersuchungen zur Phosphoraufnahme-Effizienz sowie zur Wurzelarchitektur zeigen eine große Variationsbreite für beide Merkmale selbst im Kulturpool der Gattung *Medicago*, was eine gezielte Nutzung der Positiv-Typen für die Luzerne-Züchtung ermöglicht.

An Hand der im Rahmen der dreijährigen Feldversuche des IPKs gewonnenen Kenntnisse zur negativen Korrelation von Biomasse-Ertrag und Futterqualität wird es der praktischen Landwirtschaft ermöglicht, das für die jeweils priorisierte Komponente optimale Schnittregime zu etablieren und so den Luzerne-Anbau effektiver als bisher zu gestalten.

Das vorliegende Projekt und seine Projektergebnisse sind somit eine wertvolle Ausgangsbasis für die verbesserte und wissensbasierte Züchtung neuer Sorten sowie die Umsetzung weiterer Forschungsprojekte und Kooperationen bei der Futterleguminose Luzerne.

7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Mit dem vorliegenden LuzNutz-Projekt ist es wie im Projektantrag geplant gelungen, die genetische

Variabilität der Kulturart Luzerne sowie verwandter *Medicago*-Arten darzustellen und in dreijährigen Feldversuchen neue Erkenntnisse über das Ertrags- und Futterqualitätsniveau der Luzerne zu gewinnen.

Die Untersuchungen zur Phosphoraufnahme-Effizienz und Wurzelsystem-Architektur, die an 200 Akzessionen des Kulturpools durchgeführt wurden, ermöglichten die Erhebung und statistische Auswertung von umfangreichen Datensätzen zu diesen beiden Merkmalen. Aufgrund der in Vorversuchen festgestellten großen Variabilität beider Merkmale bereits im Kulturpool – und ihrer dadurch schnelleren züchterischen Nutzbarkeit - wurden im Gegensatz zur ursprünglichen Planung 200 statt 120 Luzerne-Akzessionen (Kultursorten, Landrassen bzw. Ökotypen) geprüft, während die vorgesehenen 30 Wildart-Muster im Projektrahmen nicht mehr untersucht wurden; der Prüfumfang lag somit deutlich höher als zunächst geplant.

Schlussbericht zum Thema:

**“Erhöhung der Anbauwürdigkeit von Luzerne (*Medicago sativa* L.)
als Futterpflanze-
Neue Impulse für die Königin der Futterpflanzen (LuzNutz)“**



III. Bericht zum Teilvorhaben INP

Förderkennzeichen: 2818EPS036

Laufzeit: 01.02.2021 bis 31.01.2024

Projektnehmer: Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e. V.
Felix-Hausdorff-Straße 2,
17489 Greifswald

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen der BMEL Eiweißpflanzenstrategie.

Kurzfassung

Das Ziel des hier vorgestellten Teilprojektes war es, die Anwendung von Kaltplasmabehandlung als Saatgut/Pflanzenschutzmittel, bzw. Pflanzenstärkungsmittel zu testen. Hierzu wurden zunächst geeignete Plasmaquellen und Parameter im Labor hinsichtlich ihrer Eignung zur Saatguthygiene anhand des Modellorganismus *Bacillus atrophaeus*, sowie deren möglicher Auswirkungen auf die Saatgutvitalität getestet. Der identifizierte Parameter, der die Saatgutvitalität nicht negativ beeinflusste, wurde für die Gewächshaus- und Feldversuche angewendet (indirekte Plasmabehandlung). Die am JKI verorteten Gewächshaus- und Feldversuche zeigten eine Eignung in der Inaktivierung des Erregers der Anthraknose *Colletotrichum trifolii* nach indirekter Plasmabehandlung, wenn dieser direkt auf dem Saatgut lokalisiert war. Die direkte Plasmabehandlung zeigte im Proof-of-concept eine Stimulation der Saatgutkeimung, sowie verbesserte Saatgutbenetzbarkeit, die indirekte Behandlung mittels plasmabehandeltem Wasser (PBW) zeigte ebenfalls eine Beschleunigung der Keimung im frühen Stadium. Neben der Behandlung von Saatgut, erfolgten auch Untersuchungen zum Effekt von plasmabehandeltem Wasser auf wachsende Pflanzen. Hier konnte in Klimaschrankversuchen gezeigt werden, dass eine PBW-Applikation keine negativen Effekte auf die Physiologie der Pflanzen hat. Vielmehr konnten positive Effekte auf Biomasseparameter festgestellt werden. Eine Modulation von Stressmarkern wurde sowohl unter nicht-Stressbedingungen als auch unter Trockenstress beobachtet werden.

Summary

The aim of the sub-project presented here was to test the use of cold plasma treatment as a seed/plant protection agent or plant strengthening agent. For this purpose, suitable plasma sources and parameters were first tested in the laboratory with regard to their suitability for seed hygiene using the model organism *Bacillus atrophaeus*, as well as their possible effects on seed vitality. The identified parameter that did not negatively affect seed vitality was used for the greenhouse and field trials (indirect plasma treatment). The greenhouse and field trials conducted at the JKI showed a suitability for inactivation of the anthracnose pathogen *Colletotrichum trifolii* after indirect plasma treatment when it was localized directly on the seed. The direct plasma treatment showed in the Proof-of-concept effects a stimulation of germination, as well as improved seed wettability, the indirect treatment by means of plasma-treated water also showed an acceleration of germination in the early stage. In addition to the treatment of seeds, the effect of plasma-treated water on growing plants was also investigated. It was shown in climate chamber tests that PBW application had no negative effects on the physiology of the plants. On the contrary, positive effects on biomass parameters were observed. A modulation of stress markers was observed both under non-stress conditions and under drought stress.

Autoren

Dr. Nicola Wannicke

nicola.wannicke@inp-greifswald.de

Dr. Henrike Brust

henrike.brust@inp-greifswald.de

Felix-Hausdorff-Straße 2, 17489 Greifswald

Inhaltsverzeichnis Teilvorhaben INP

1	Einführung.....	60
2	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	60
3.	Material und Methoden.....	60
4.	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	62
5.	Diskussion der Ergebnisse	73
6.	Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse. Wurden im Projekt praxisrelevante Ergebnisse erzielt?	75
7.	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen	75
8.	Zusammenfassung.....	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Im Teilprojekt untersuchte Plasmaquellen	60
Abbildung 2: Ergebnisse zum Keimungsverlauf inklusive maximaler Keimung über einen Zeitraum von 7 Tagen für die Sorten Antane, Birute, Catera, Dakota und Fleetwood nach indirekter Plasmabehandlung mittels plasmabehandelte Luft im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. ...	63
Abbildung 3: Box-plot der Inaktivierungseffizienz für zwei verschiedene Prozessparameter der PPL Behandlung für Fleetwood und Catera. Die gestrichelte Linie in den Boxen stellt den Mittelwert dar. ** kennzeichnet signifikante Unterschiede mit dem Signifikanzniveau $p \leq 0.01$	65
Abbildung 4: Wasserkontaktwinkel für drei verschiedene Prozessparameter der PBL Behandlung für vier verschiedene Luzerne- Sorten. Die gestrichelte Linie bei 90° kennzeichnet den Schwellenwert für hydrophile Oberflächen ($<90^\circ$ = hydrophil, $>90^\circ$ = hydrophob).....	65
Abbildung 5: Ergebnisse zum Keimungsverlauf inklusive maximaler Keimung für die Sorten Fleetwood und Catera nach direkter Plasmabehandlung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. ...	67
Abbildung 6: Wasserkontaktwinkel für drei Plasmaquellen und verschiedene Prozessparameter für Luzerne-Sorte Plato. Die gestrichelte Linie bei 90° kennzeichnet den Schwellenwert für hydrophile Oberflächen ($<90^\circ$ = hydrophil, $>90^\circ$ = hydrophob). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ Signifikanzniveau. ...	69
Abbildung 7: Keimungsverlauf der Kontrolle und für drei verschiedene Behandlungszeiten von PTW 10, 20 und 30 min. Die Keimung wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen anhand von 50 Samen pro Petrischale und jeweils 5 Replikaten verfolgt.	70
Abbildung 8: Effekt der Behandlungszeit von PTW (10, 20, 30 min) auf die Keimung der Sorte Plato. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung von der unbehandelten Kontrolle (100%). Werte über 100% weisen auf eine bessere Keimung im Vergleich zur Kontrolle hin, Werte unter 100% weisen auf einen negativen Effekt hin.....	71
Abbildung 9: Überblick Pflanzenanzucht und Behandlungsablauf zur PBW-Applikation und Trockenstress der Sorte Plato. Linkes Bild: ca. 14 Tage alte Jungpflanzen im Klimaschrank. Rechtes Schema: Behandlungsablauf und Erntezeitpunkte für PBW-Behandlung ohne Stress (obere Teilabbildung) und für PBW-Behandlung mit Trockenstress (untere Teilabbildung)..	71
Abbildung 10: Biomasseparameter nach 55-tägigem Wachstum im Klimaschrank. Gezeigt sind Frischgewichte (A), Trockengewichte (B) und Länge von Spross und Wurzel (C), sowie die Blattzahl (D).	72
Abbildung 11: Biochemische Parameter nach 48-tägigem Wachstum im Klimaschrank. Dargestellt ist eine Heatmap mit den jeweiligen Signifikanzen ($p < 0,05$) der verschiedenen metabolischen Marker und Enzymmarker. Abk. n.b. – nicht bestimmt	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Keimungsparameter maximale Keimung und mittlere Keimungsgeschwindigkeit nach Behandlung des Saatgutes mit plasmabehandelte Luft für fünf verschiedene Luzerne-Sorten. Signifikante Unterschiede in den Mittelwerten relativ zur unbehandelten Kontrolle sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet mit $p \leq 0.05$ (One Way ANOVA mit Turkey HSD PostHoc, $n=5$) und zudem durch fettgedruckt hervorgehoben.	64
Tabelle 2: Keimungsparameter maximale Keimung und mittlere Keimungsgeschwindigkeit (MGT) nach direkter Plasmabehandlung des Saatgutes mit drei verschiedenen Plasmaquellen für die Sorten Catera und Fleetwood. Signifikante Unterschiede in den Mittelwerten relativ zur unbehandelten Kontrolle sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet mit $p \leq 0.05$ (Student's T-Test, $n=5$) und zudem durch fettgedruckt hervorgehoben.	68

1 Einführung

Eine Einführung zum Verbundvorhaben befindet sich im gemeinsamen Teil des Abschlussberichtes.

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der wissenschaftliche und technische Stand, an den in diesem Verbundvorhaben angeknüpft wurde, ist in dem gemeinsamen Teil des Abschlussberichtes dargestellt.

3. Material und Methoden

a) Plasmaquellen und Behandlung des Saatgutes

Die im Projekt getesteten Plasmaquellen (Abbildung 1) und Prozessparameter wurden anhand von aus vorliegenden Ergebnissen der Arbeitsgruppe Plasma-Agrarkultur am INP, u.a. BMBF gefördertes Projekt Physics for Food, ausgewählt. Die Saatgutbehandlung zur Saatguthygiene erfolgte mittel indirekter Plasmabehandlung über plasmabehandelte Luft (PBL). Die Untersuchungen zur Stärkung beinhalteten die Applikation direkter Plasmaquellen mit dem Arbeitsgas Argon (Volumen- DBD, Corona Entladung) oder Luft (Oberflächen-DBD), sowie dem indirekten Verfahren mittels plasmabehandeltem Wasser (Pin-to-liquid Entladung) oder Luft (Mikrowellenplasma Luft ~ 3700°C, Drehbare Schottflaschen).

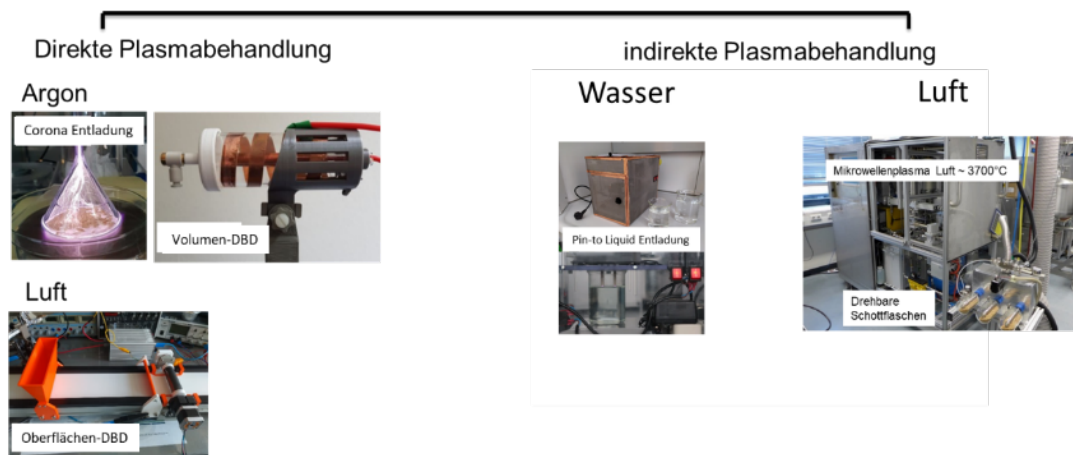


Abbildung 1: Im Teilprojekt untersuchte Plasmaquellen

b) Saatguthygiene

Die Erfahrungen der Arbeitsgruppe PAK für die Effizienz der Dekontamination bei Raps, Gerste und Weizen zeigte eine um die Hälfte geringere Effizienz der direkten Plasmabehandlung im Vergleich zur indirekten Plasmabehandlung mittels PBL (Wannicke et al in prep). Aus diesem Grund, und weil es zudem Einschränkungen in der Anzahl der Prüfglieder auf dem Feld gab, wurden für die weiteren Untersuchungen nur die indirekte Plasmabehandlung in Betracht gezogen.

Untersuchungen zur Saatguthygiene erfolgten anhand semi-trockener Inokulation des Saatgutes mit dem Modellorganismus *B. athropheus*. Nach der Plasmabehandlung erfolgte die Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten, um die Reduktion überlebensfähiger Sporen bestimmen zu können und die Effektivität der Behandlung zu ermitteln (Methoden siehe Wannicke et al 2020). Die Parameterfindung zur Inaktivierungseffizienz im Labor erfolgte an zwei verschiedenen Sorten. Zeitgleich erfolgte die Bestimmung der Saatgutvitalität an fünf verschiedenen Sorten, um schädigende Effekte besser einschätzen zu können (siehe 3 c).

Für die Gewächshaus und Feldversuche wurde das Saatgut unbehandelt bzw mit mit *Colletotrichum trifolii* inokuliert in gasdurchlässige Tyvek Beutel eingeschweißt und mittels plasma-behandelter Luft und einem Prozessparameter von 63 slm (standard liter per minute) Durchflussgeschwindigkeit durch

den Plasma Mikrowellengenerator), 10 min inkubiert.

c) Saatgutvitalität

• Saatgutkeimung

Die Bestimmung des Keimverhaltens wurde standardisiert auf Zellulosepapier mit definierter Wasserzugabe durchgeführt, jeweils 5 Replikate pro Behandlungsparameter für zwei bis fünf verschiedene Sorten. Die Bestimmung erfolgte in einem Brutschrank bei 21 °C und 50% Feuchtigkeit (HPP260eco, Memmert). Die Saatgutkeimung wurde an verschiedenen Zeitpunkten protokolliert (Keimung ab Austritt Keimwurzel >1 mm). Aus diesen Daten wurden die Parameter Keimungsgeschwindigkeit und maximale Keimung ermittelt, sowie statistische Vergleiche durchgeführt. Hierzu wurde das Software-Paket Germinator (Joosene et al 2010) herangezogen.

• Wasserkontaktwinkel

Um eine Aussage über eine mögliche Veränderung der physikochemischen Beschaffenheit der Saatgutoberfläche nach der Plasmabehandlung treffen zu können, wurde der Wasserkontaktwinkelmessungen (WCA) unter Verwendung der Sessile-Drop-Methode analysiert. Die Bestimmung wurde mit einem Goniometer OCA 30 (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland) mit deionisiertem Wasser (ein Tropfen von 0,5 l) durchgeführt. Zehn Samen wurden pro Wiederholung analysiert. Die Bildauswertung und Winkelbeurteilung erfolgten mit der Software SCA 20 (Data-Physics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland) durchgeführt.

d) Stärkung

• Saatgutkeimung in PBW

Zur Testung wurde zunächst PBW (PTW) mittels Pin-to-Liquid Entladung (Abbildung 1) hergestellt mit drei verschiedenen Behandlungszeiten, 10, 20 und 30 min. Eine Mischung aus Trinkwasser (25% v/v) und einfach entionisiertem Wasser (75% v/v) wurde hierfür verwendet, da die Zündung der Pin-to-liquid Entladung nur ab einem bestimmten Gehalt an Ionen zündet und somit Reinstwasser nicht ausreichend ist.

Der Saatgutkeimtest erfolgte wie unter 3. c) beschrieben. Die Keimung der Kontrollgruppen erfolgte mit unbehandeltem Wassermix.

• Effekt PBW auf wachsender Pflanzen inkl. abiotischer Stress

Die Wirkung einer PBW-Applikation über den Spross auf wachsende Luzernepflanzen war bis dato noch nicht bekannt. Deshalb war es notwendig, mögliche negative Effekte als auch mögliche fördernde Wirkungen auf die Physiologie wachsender Luzernepflanzen im Vorwege zu den Gewächshaus-/Feldversuchen festzustellen. Die Versuche zur Parameterfindung wurden am INP um den Parameter Trockenstress erweitert, um zeit- und kosteneffektiv zu arbeiten. Es entstand dadurch kein finanzieller Mehraufwand. Der bestehende Versuchsaufbau im Labor des INPs (Klimaschrankversuche) wurde unter Einbeziehung von Trockenstress als auch die Herstellungsweise von PBW mittels Pin-to-liquid Entladung übernommen, welcher Untersuchungen zur Gerste und blauer Süßlupine beinhalteten. Die Arbeiten im Teilprojekt nehmen daher Bezug auf die Arbeiten und Erkenntnisse des Verbundvorhabens „Physics for Food“.

PBW wurde, wie oben beschrieben (3 d, Herstellungszeit 20 min) hergestellt. Zum Besprühen der Pflanzen wurde das PBW jeweils frisch angesetzt. Die Komponenten des PBW, Nitrat, Nitrit, Wasserstoffperoxid als auch die Leitfähigkeit und der pH-Wert wurden mittels Schnellteststreifen bestimmt.

Luzerne der Sorte Plato wurde im Klimaschrank (Flohr Instruments) angezogen und nach 28-tägigen Wachstum jeweils 3 Tage hintereinander mit PBW besprüht. Pflanzen ohne Trockenstress wuchsen

für weitere 20 (Ernte 1) bzw. 27 (Ernte 2) Tage, um biochemische Parameter (Ernte 1) und Biomasseparameter (Ernte 2) zu bestimmen. Untersuchungen zu Effekten von PBW auf die Trockenstressanpassung wurden 3 Tage nach der letzten PBW-Applikation die Pflanzen nicht mehr gegossen. Nach 14 Tagen wurde der Trockenstress beendet indem die Pflanzen wieder bewässert wurden. Eine Probennahme erfolgte nach 14 Tagen im Trockenstress (Ernte 1) und nach weiteren 7 Tagen in der Erholungsphase (Ernte 2). Die Analyse der biochemischen Parameter (Ernte 1) des Sprosses umfasste die Bestimmung des Proteingehalts, des Chlorophyllgehalts sowie auch Untersuchungen zum antioxidativen System. Hier sind die Erfassung von Metaboliten wie Flavonoid-, Phenol- und Malondialdehydgehalte zu nennen. Zudem wurden Enzymaktivitäten wie die Katalase, Superoxiddismutase und die Ascorbatperoxidase zu nennen. Diese biochemischen Parameter dienen als Stressmarker, um PBW- als auch Trockenstress-Effekte in den Pflanzen festzustellen. Des Weiteren wurden Biomasseparameter (Ernte 2) wie die Frisch- und Trockengewichte, sowie Länge von Wurzel und Spross als auch die Blattanzahl bestimmt.

Für den Feldversuch wurde für die Varianten V9 und V10 (2023) 5 Wochen nach Aussaat 5 Liter plasmabehandeltes Wasser an zwei Folgetagen mit der Rückenspritze auf die entsprechenden Parzellen ausgebracht.

e) Statistik

Unterschiede in den Behandlungsparametern wurden entweder mittels Student's t-Test (zwei Gruppen) durchgeführt oder über One-Way ANOVA (mehrere Gruppen) mit anschließendem Post-Hoc Test (Turkey HSD, Bonferroni t-test) relativ zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. Die Analysen wurden entweder mit Microsoft Excel (Office LTSC Standard 2021) oder Sigma Plot 13 durchgeführt.

4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

a) *Behandlung mittels PBL zur Saatguthygiene und Bestimmung der Saatgutvitalität*

Die artifizielle Inokulation des Saatgutes mit dem Modellorganismus wurde an den Sorten Caterna und Fleetwood durchgeführt. Um negative Effekte der PBL Behandlung auszuschließen, wurde im Vorfeld **die Saatgutvitalität** anhand des Keimungsverlauf für mehrere Sorten bestimmt. Im Zuge dieser Untersuchungen fiel der Behandlungsparameter 93 slm, 10 min negativ in der maximalen Keimung bei der Sorte Fleetwood auf und wurde für die weiteren Untersuchungen zur Inaktivierungseffizienz ausgeschlossen, um eine Verringerung in der Saatgutvitalität auszuschließen (Abbildung 2, Tabelle 1).

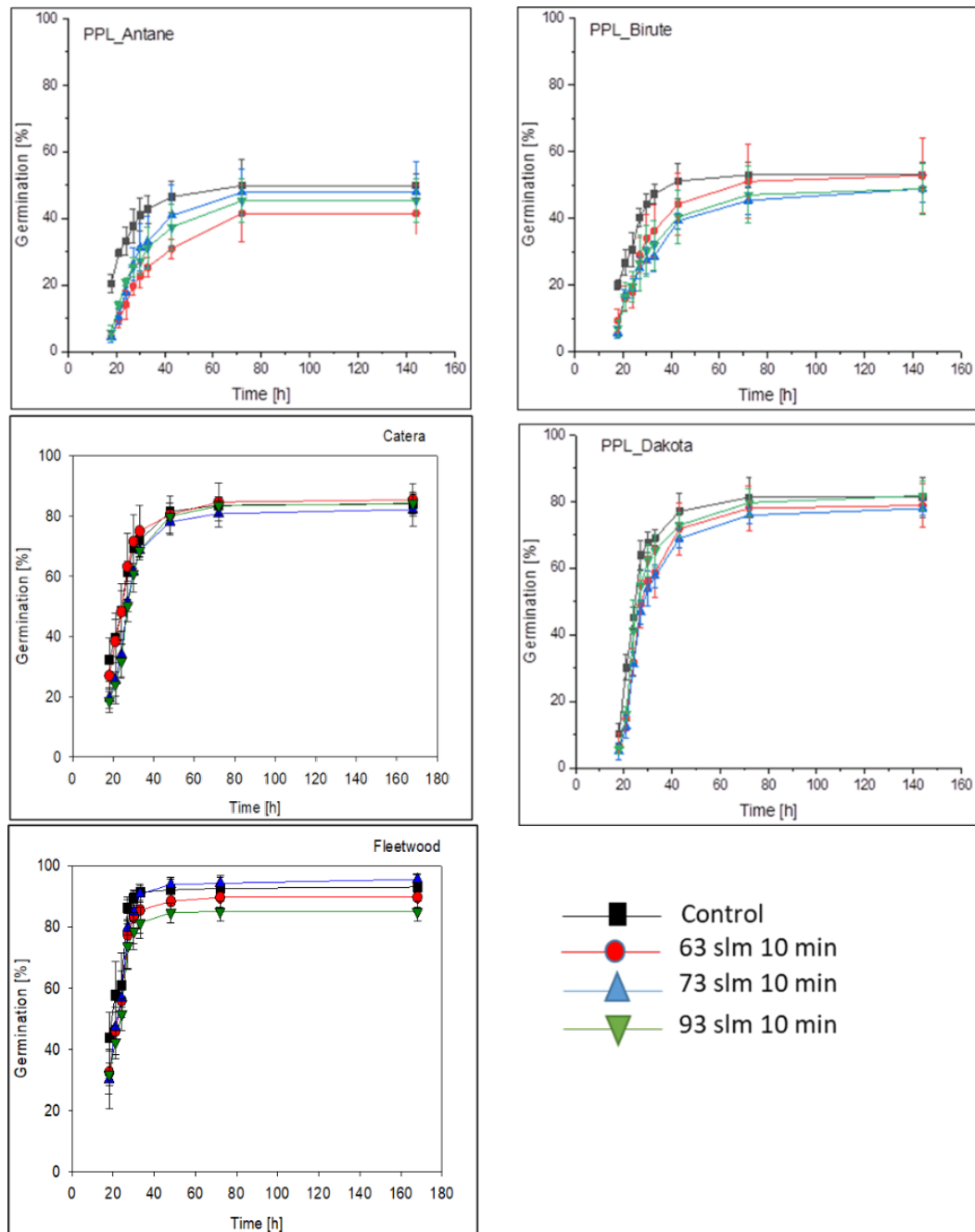


Abbildung 2: Ergebnisse zum Keimungsverlauf inklusive maximaler Keimung über einen Zeitraum von 7 Tagen für die Sorten Antane, Birute, Caterna, Dakota und Fleetwood nach indirekter Plasmabehandlung mittels plasmabehandelter Luft im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle.

Zudem war die Keimungsgeschwindigkeit signifikant erhöht bei allen PBL Behandlung der Sorte Birute, sowie bei 63 slm 10 min der Sorte Antane (Tabelle 1). Da sich diese Verlangsamung in der Keimung nicht in der maximalen Keimung widerspiegelte wurden die Parameter 63 slm 10 min und 73 slm 10 min nicht für weitere Untersuchungen ausgeschlossen.

Tabelle 1: Keimungsparameter maximale Keimung und mittlere Keimungsgeschwindigkeit nach Behandlung des Saatgutes mit plasmabehandelte Luft für fünf verschiedene Luzerne-Sorten. Signifikante Unterschiede in den Mittelwerten relativ zur unbehandelten Kontrolle sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet mit $p \leq 0.05$ (One Way ANOVA mit Turkey HSD PostHoc, $n=5$) und zudem durch fettgedruckt hervorgehoben.

Sorte	Behandlung	Mittlere Keimungs- geschwindigkeit MGT [h]		Maximal Keimung [%]	
		Mittelwert	STBW	Mittelwert	STBW
Antane	Kontrolle	30.9b	3.9	51.1a	4.4
	63 slm 10 min	50.1a	4.7	45.0a	10.1
	73 slm 10 min	48.4a	12.7	52.6a	7.6
	93 slm 10 min	43.1ab	9.8	48.0a	7.2
Birute	Kontrolle	28.7b	3.3	53.9a	4.0
	63 slm 10 min	40.4a	3.4	55.6a	14.6
	73 slm 10 min	43.0a	5.4	50.7a	5.3
	93 slm 10 min	43.6a	4.5	51.6a	8.5
Catera	Kontrolle	31.4a	3.0	83.3a	3.5
	63 slm 10 min	28.4a	4.7	85.4a	6.2
	73 slm 10 min	31.1a	3.7	82.2a	6.6
	93 slm 10 min	31.4a	1.3	84.3a	3.5
Dakota	Kontrolle	31.5a	2.0	83.4a	5.7
	63 slm 10 min	37.1a	5.1	81.5a	5.5
	73 slm 10 min	35.2a	3.6	78.8a	2.8
	93 slm 10 min	32.9a	1.9	82.3a	5.2
Fleetwood	Kontrolle	27.2a	2.0	91.0a	3.2
	63 slm 10 min	24.2a	2.5	89.7ab	3.8
	73 slm 10 min	26.1a	1.2	95.7a	2.1
	93 slm 10 min	24.0a	1.4	85.1b	3.8

Die mikrobielle Inaktivierung des Modellorganismus *B. athropheus* lag bei beiden untersuchten Sorten (Fleetwood, Catera) bei den angewendeten Prozessparametern 63 slm 10 min und 73 slm 10 min im Mittel bei ~90% (~1 lg Stufe Reduktion, Abbildung 3). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Sorten. Lediglich das Signifikanzniveau der Reduktion innerhalb der Sorten nach Plasmabehandlung unterschied sich. Es war ein Trend zur höheren Reduktion bei Fleetwood bei 63 slm, 10 min (1.3 ± 0.7 log Einheiten) im Vergleich zu 73 slm 10 min (1.0 ± 0.4 log Einheiten) erkennbar und eine signifikant höhere Inaktivierung bei Catera bei 63 slm, 10 min (1.1 ± 0.4 versus 0.7 ± 0.4 , log Einheiten Student's t-test, $p=0.006$, $n=18$) (Abbildung 3).

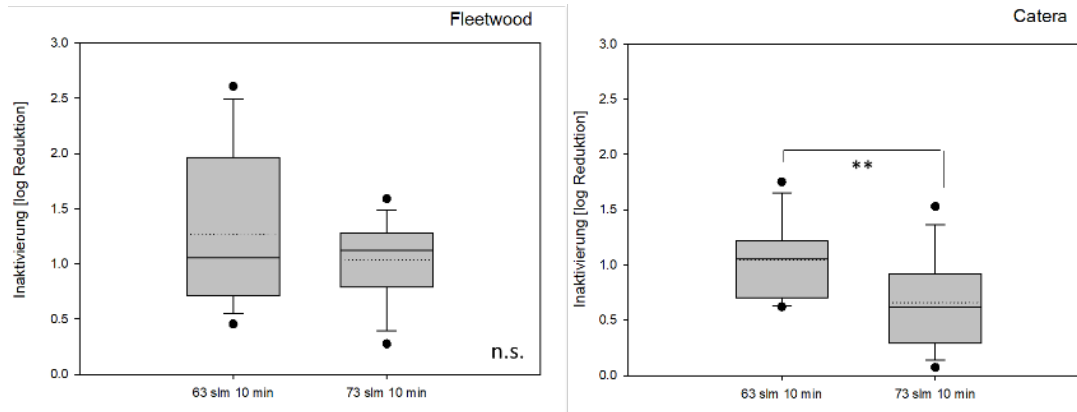


Abbildung 3: Box-plot der Inaktivierungseffizienz für zwei verschiedene Prozessparameter der PPL Behandlung für Fleetwood und Caterna. Die gestrichelte Linie in den Boxen stellt den Mittelwert dar. ** kennzeichnet signifikante Unterschiede mit dem Signifikanzniveau $p \leq 0.01$.

Die Bestimmung der **Benetzbarkeit der Saatgutoberfläche** nach Plasmabehandlung zeigte bei keiner der untersuchten Sorten Veränderungen im Kontaktwinkel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p > 0.05$, One-Way ANOVA, $n = 10$, Abbildung 4). Ebenso gab es keine Unterschiede in den Kontaktwinkeln der vier Sorten. Die Benetzbarkeit der Saatgutoberfläche nach indirekter Plasmabehandlung mittel PBL wird somit nicht beeinflusst.

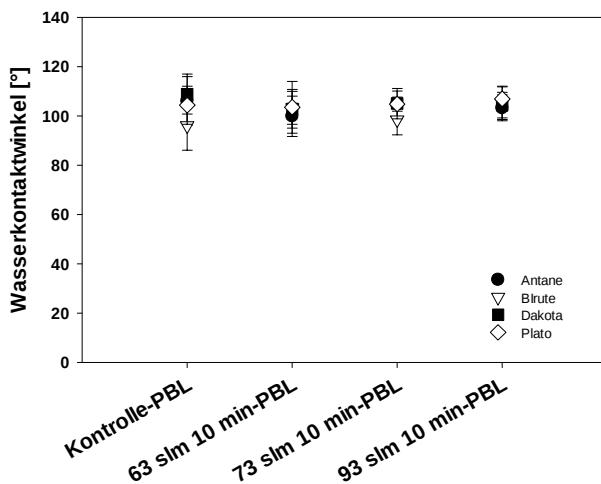


Abbildung 4:
Wasserkontaktwinkel für drei
verschiedene
Prozessparameter der PBL
Behandlung für vier
verschiedene Luzerne-
Sorten. Die gestrichelte Linie
bei 90° kennzeichnet den
Schwellenwert für hydrophile
Oberflächen (<90° =
hydrophil, >90° =
hydrophob).

• Auswahl des Parameters für die Freilandversuche anhand der vorliegenden Ergebnisse

Anhand der Kombination von Effizienz der Dekontaminationsleistung durch die PBL Behandlung, als Hauptaugenmerk, sowie der Nicht-Beeinträchtigung der Keimungsfähigkeit des Luzerne-Saatgutes, wurde der folgende Parameter für die Feldversuche ausgewählt: 63 slm (standard liter per minute), Durchflussgeschwindigkeit durch den Plasma Mikrowellengenerator), 10 min Inkubationszeit des Saatgutes in der plasmabehandelten Luft. Aufgrund der Beschränkungen in der Anzahl der parallelen Prüfglieder auf dem Feld, wurde lediglich eine Plasmavariante ausgewählt.

- **Behandlung Saatgut für Gewächshaus und Feldversuche mit geeignetem Parameter**

Die Etablierung und Durchführung und Auswertung der Gewächshaus- und Freilandversuche im 2022 bis 2023 fand durch den Partner JKI statt. Die Übersendung der behandelten Saatgut-Chargen erfolgte termingerecht am 2.5.2022 und 5.4.2023. Für die Auswertung der Ergebnisse verweisen wir auf den Bericht des JKI. Es zeigte sich jedoch anhand des Befallsschema Luzerne mit Anthraknose ein geringer Befall. Die Aussagefähigkeit zur Effizienz der Saatgutbehandlung ist somit nur bedingt möglich. Eine Inaktivierung auf dem Saatgut zeichnete sich im Trend im Gewächshaus ab, jedoch verringerte sich dieser Effekt mit zunehmendem Wachstum und des Auftretens von Sekundärinfektionen im Bestand.

b) Pflanzenstärkung

- **Saatgutkeimung nach direkter Plasmabehandlung**

Im Proof-of-concept Labormaßstab wurde neben der indirekten Plasmabehandlung, die Effizienz der direkten Behandlung von Saatgut an zwei Sorten hinsichtlich stimulierender Effekte untersucht.

Hier war keine direkte Anwendung in Gewächshaus und Feldversuchen auf Grund beschränkter Kapazitäten in der Feldversuchsanstellung und dem Fokus des Projektes vorgesehen. Die Ergebnisse sind allerdings relevant für mögliche Folgeprojekte. Die Benutzbarkeit nach Plasmabehandlung der Saatgutoberfläche wurde an der Sorte Plato bestimmt, da es für diesen Parameter keine Sortenunterschiede gibt.

Catera und Fleetwood zeigten keine Veränderungen in der maximalen Keimung nach den Behandlungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 5, Tabelle 2).

Es zeigte sich jedoch signifikant beschleunigte Keimung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle für die Plasmaquellen Corona Entladung und Volumen-DBD für Catera und Oberflächen-DBD für Fleetwood (Tabelle 2).

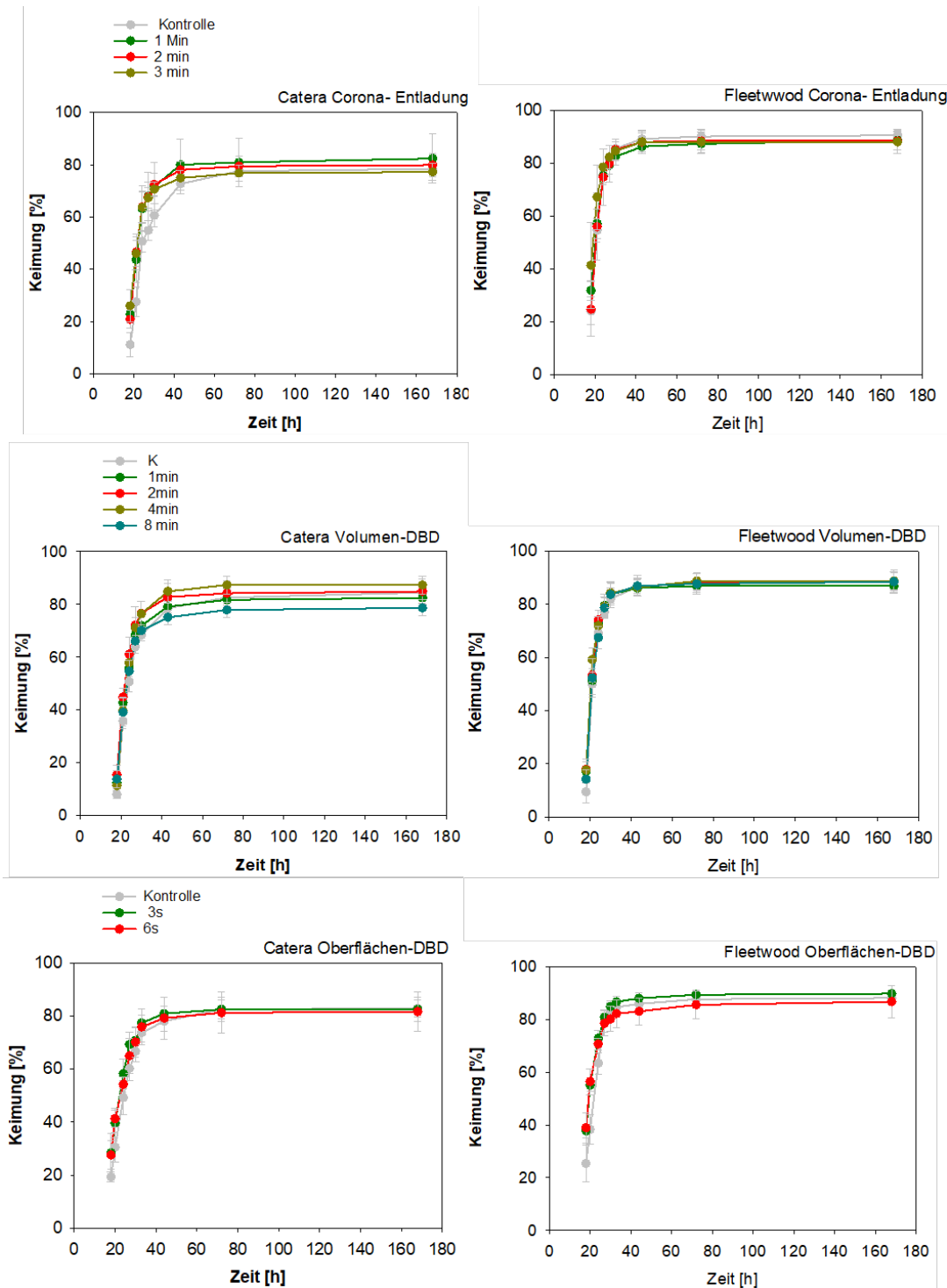


Abbildung 5: Ergebnisse zum Keimungsverlauf inklusive maximaler Keimung für die Sorten Fleetwood und Catera nach direkter Plasmabehandlung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle.

Tabelle 2: Keimungsparameter maximale Keimung und mittlere Keimungsgeschwindigkeit (MGT) nach direkter Plasmabehandlung des Saatgutes mit drei verschiedenen Plasmaquellen für die Sorten Catera und Fleetwood. Signifikante Unterschiede in den Mittelwerten relativ zur unbehandelten Kontrolle sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet mit $p \leq 0.05$ (Student's T-Test, $n=5$) und zudem durch fettgedruckt hervorgehoben.

Sorte	Plasmaquelle	Parameter	Mittlere Keimungsgeschwindigkeit MGT [h]		Maximal Keimung [%]	
			Mittelwert	STBW	Mittelwert	STBW
Catera	Corona-Entladung	Kontrolle	23.77a	0.4	78.4a	1.0
		1 min	21.4b	0.8	82.4a	5.4
		2 min	20.8b	0.4	79.9a	2.5
		3 min	20.3b	0.4	77.2a	1.9
Fleetwood		Kontrolle	20.4a	0.06	90.6a	1.3
		1 min	19.8a	0.3	88.7a	2.0
		2 min	20.3a	0.7	88.5a	1.9
		3 min	18.7a	0.8	88.1a	2.5
Catera	Oberflächen-DBD	Kontrolle	23.9a	0.8	82.9a	1.9
		3 s	21.7a	0.61	82.6a	2.6
		6 s	22.0a	0.4	81.6a	4.3
Fleetwood		Kontrolle	21.7a	0.3	88.1a	0.8
		3 s	20.0b	0.3	89.8a	0.7
		6 s	19.5b	0.5	86.7a	3.6
Catera	Volumen-DBD	Kontrolle	23.2a	0.4	84.5a	2.3
		1 min	22.0b	0.1	82.5a	0.6
		2 min	21.6b	0.2	85.0a	2.7
		4 min	22.5a	0.4	87.3a	2.0
		8 min	21.8b	0.3	78.7a	1.8
Fleetwood		Kontrolle	21.1a	0.3	88.4a	2.2
		1 min	20.7a	0.1	87.0a	1.1
		2 min	20.5a	0.2	88.6a	1.7
		4 min	20.2a	0.3	88.8a	1.9
		8 min	21.0a	0.4	88.5a	2.5

• Benetzbarkeit der Saatgutoberfläche nach direkter Plasmabehandlung

Die Benetzbarkeit der Saatgutoberfläche war nach direkter Plasmabehandlung für die Sorte Plato signifikant erhöht, erkennbar an der Reduktion des Wasserkontaktwinkels unter 90° (Abbildung 6). Dieser Effekt war bei allen untersuchten Plasmaquellen gleich, wobei Volumen-DBD und Corona Entladung die höchste Absenkung des WCA zeigte.

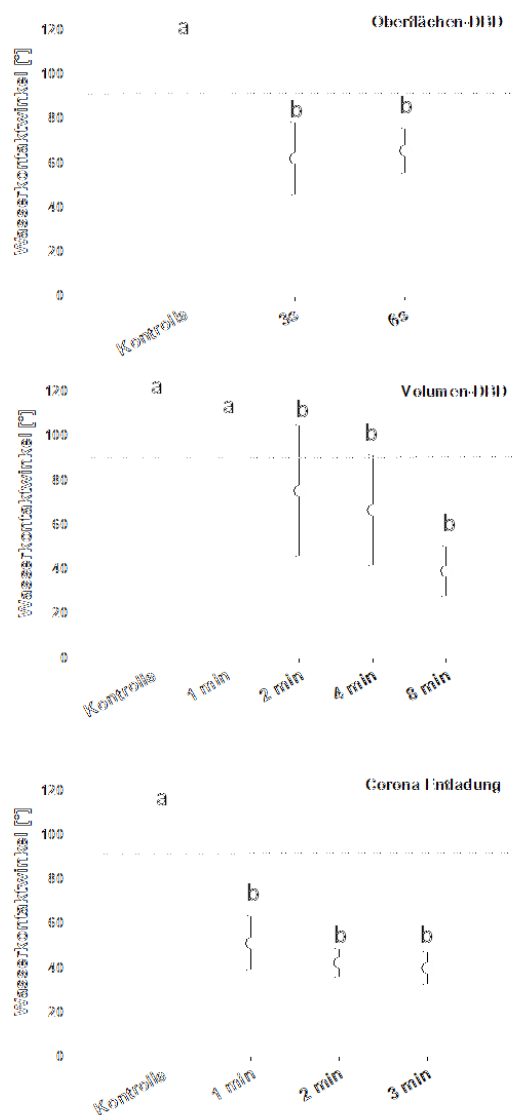


Abbildung 6: Wasserkontaktwinkel für drei Plasmaquellen und verschiedene Prozessparameter für Luzerne-Sorte Plato. Die gestrichelte Linie bei 90° kennzeichnet den Schwellenwert für hydrophile Oberflächen (<90° = hydrophil, >90° = hydrophob). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ Signifikanzniveau.

• Saatgutkeimung in PBW

Ebenfalls im Proof-of-concept zur Stärkung und zur Klärung von möglichen negativen Effekten auf die Samenkeimung, erfolgten Untersuchungen im Labor zur Saatgutkeimung in PBW. Hier sollte aufgrund beschränkter Kapazitäten in der Feldversuchsanstellung und dem Fokus des Projektes keine Anwendung in Gewächshaus und Feldversuchen stattfinden.

Die Ergebnisse zur Keimung der Sorte Plato zeigen keinen negativen Einfluss von PTW auf die Keimung von Plato (Abbildung 7). Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass es zum frühen Zeitpunkt der Keimung (20h) zu einer signifikanten Verbesserung der Keimung in PPW 10 und 30 min im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kam ($t_{10min} = 3.564$, $p = 0.012$, $n = 5$ und $t_{30min} = 3.555$, $p = 0.008$, $n = 5$, One-Way ANOVA mit anschließendem Post-Hoc Test Holm-Sidak Methode, Abbildung 8). Dieser Effekt zeigt sich noch im Trend im weiteren Keimungsverlauf, war jedoch auf Grund der hohen Standardabweichung nicht mehr signifikant ($p > 0.05$).

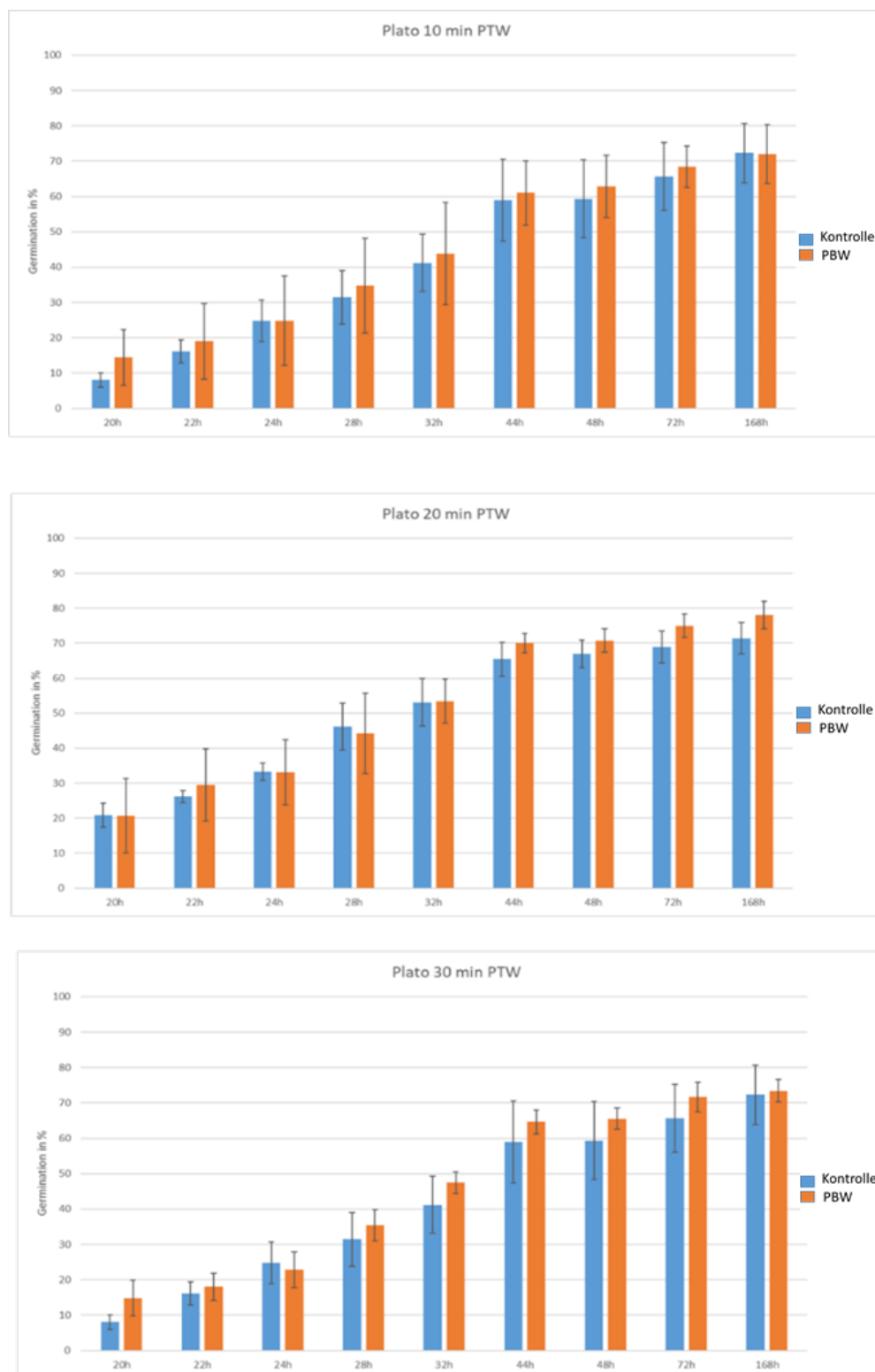


Abbildung 7: Keimungsverlauf der Kontrolle und für drei verschiedene Behandlungszeiten von PTW 10, 20 und 30 min. Die Keimung wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen anhand von 50 Samen pro Petrischale und jeweils 5 Replikaten verfolgt.

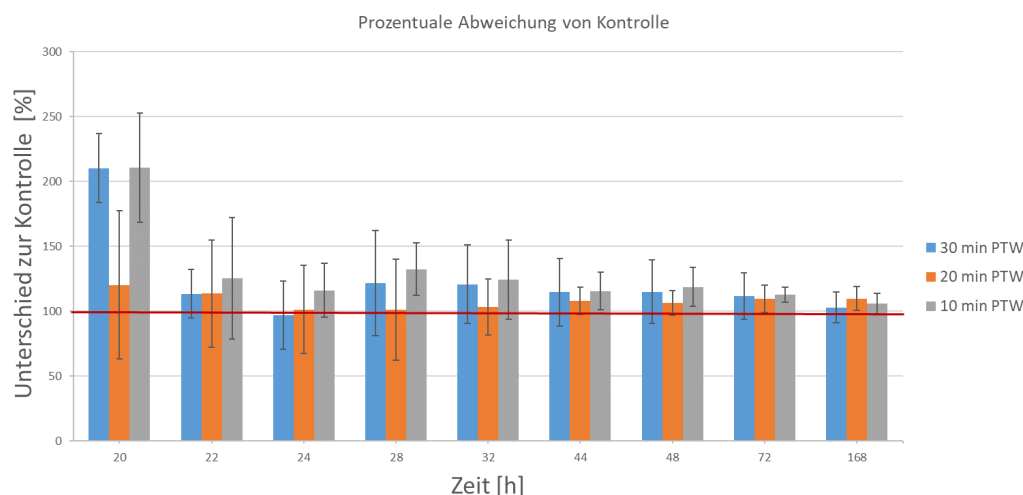


Abbildung 8: Effekt der Behandlungszeit von PTW (10, 20, 30 min) auf die Keimung der Sorte Plato. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung von der unbehandelten Kontrolle (100%). Werte über 100% weisen auf eine bessere Keimung im Vergleich zur Kontrolle hin, Werte unter 100% weisen auf einen negativen Effekt hin.

• **Behandlung wachsender Pflanzen mit PBW**

Im Berichtszeitraum fanden darüber hinaus Arbeiten zur Wirkung von plasmabehandeltem Wasser (PBW, pin-to-liquid Entladung) auf wachsende Luzernepflanzen im Klimaschrank statt, um eventuelle negative Wirkungen für die Feld/Gewächshausversuche auszuschließen. Nach Rücksprache mit der Projektleitung wurde die Applikation von PTW auf wachsende Pflanzen in den Gewächshaus-/Feldversuchen, aufgrund von Verzögerungen durch die Corona-Pandemie, auf das Projektjahr 2023 verschoben.

Um weitere Vortests zur Applikation von PBW auf wachsende Pflanzen durchzuführen, wurde die Sorte Plato im Klimaschrank (Flohr Instruments) angezogen und entsprechend dem Schema in Abbildung 3 mit PBW behandelt und geerntet.

Das für die wachsende Pflanzen genutzte PBW hatte folgende physikochemischen Eigenschaften: Leitfähigkeit 246 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH 5,5; 10 mg/L Wasserstoffperoxid, 40 mg/L Nitrit- und 100-250 mg/L Nitrationen. Für alle Versuche mit wachsenden Pflanzen wurden vergleichbare Werte für die verschiedenen PBW-Chargen gemessen.

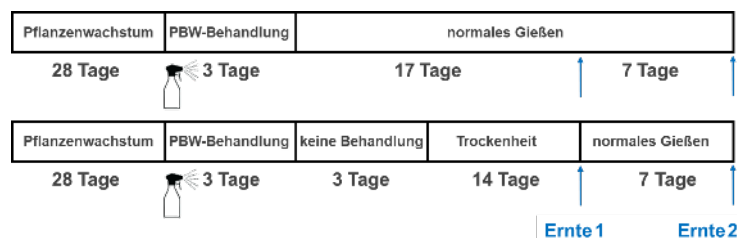


Abbildung 9: Überblick Pflanzenanzucht und Behandlungsablauf zur PBW-Applikation und Trockenstress der Sorte Plato. Linkes Bild: ca. 14 Tage alte Jungpflanzen im Klimaschrank. Rechtes Schema: Behandlungsablauf und Erntezeitpunkte für PBW-Behandlung ohne Stress (obere Teilabbildung) und für PBW-Behandlung mit Trockenstress (untere Teilabbildung).

Diese Untersuchungen wurden u.a. im Rahmen einer von LuzNutz unabhängigen Masterarbeit durchgeführt die den Schwerpunkt auf die Wirkung von PBW auf die Trockenstressreaktion von Luzernepflanzen hatte. Es wurden verschiedene Behandlungsgruppen (Kontrolle – unbehandelte Pflanzen, PBW – mit PBW behandelte Pflanzen, Trockenstress – ohne PBW-Behandlung, Trockenstress+PBW – trockengestresste Pflanzen, die vor dem Stress mit PBW behandelt wurden) über einen Wachstumszeitraum von 55 Tagen untersucht. Ein negativer Effekt der PBW Behandlung auf die Biomasse konnte visuell nicht beobachtet werden. Jedoch gab es positive Tendenzen auf einige Biomasseparameter des Sprosses (Frisch-, Trockengewicht, Blattzahl), die jedoch nicht signifikant waren (siehe Abbildung 10). Ein deutlicher Effekt des Trockenstresses auf die Biomasse konnte beobachtet werden (Abbildung 10). Eine Plasmabehandlung führte hierbei zu keiner signifikanten Veränderung unter Trockenstressbedingungen.

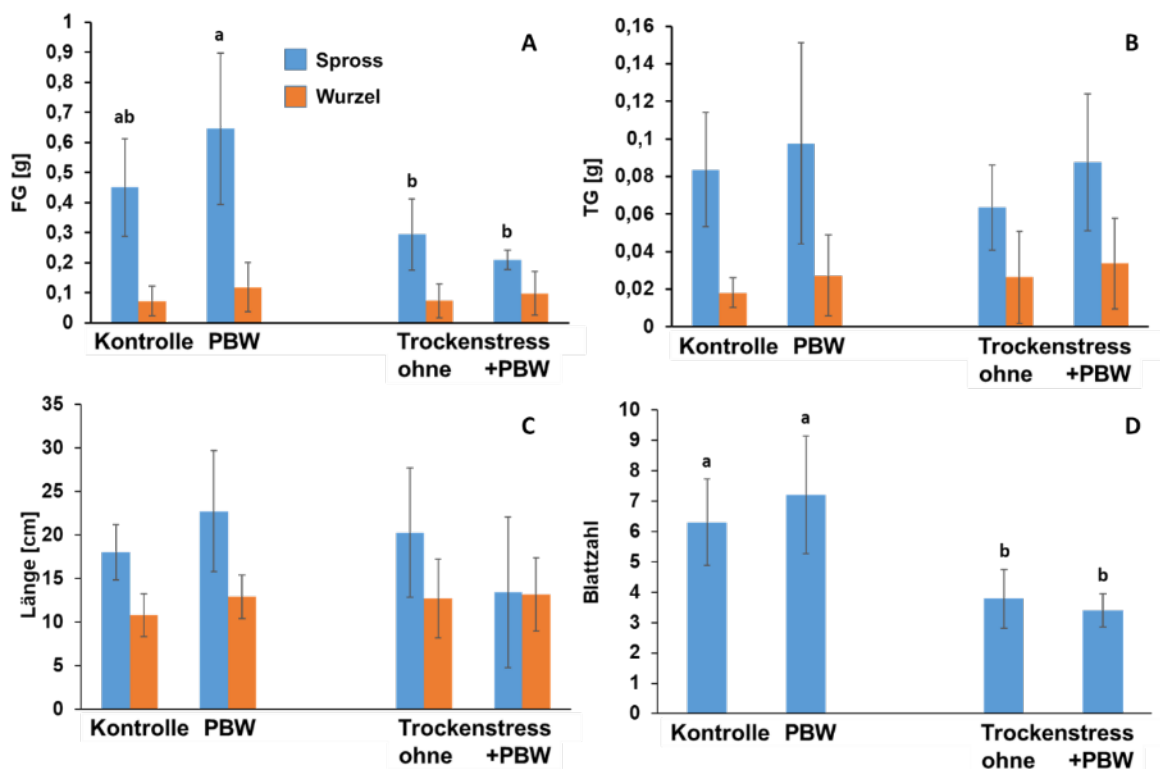


Abbildung 10: Biomasseparameter nach 55-tägigem Wachstum im Klimaschrank. Gezeigt sind Frischgewichte (A), Trockengewichte (B) und Länge von Spross und Wurzel (C), sowie die Blattzahl (D).

Die Analyse der verschiedenen biochemischen Marker zeigte z.T. signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 11). Hervorzuheben ist, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollpflanzen und den PBW-behandelten Pflanzen für alle Marker gab. Im Vergleich zwischen nicht-gestressten und den trockengestressten Pflanzengruppen gab es jedoch eine signifikante Erhöhung in den Phenol- und Flavonoidgehalten als auch in der Superoxiddismutase- und Katalaseaktivität. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den Trockenstressgruppen, mit oder ohne PBW-Behandlung, festgestellt.

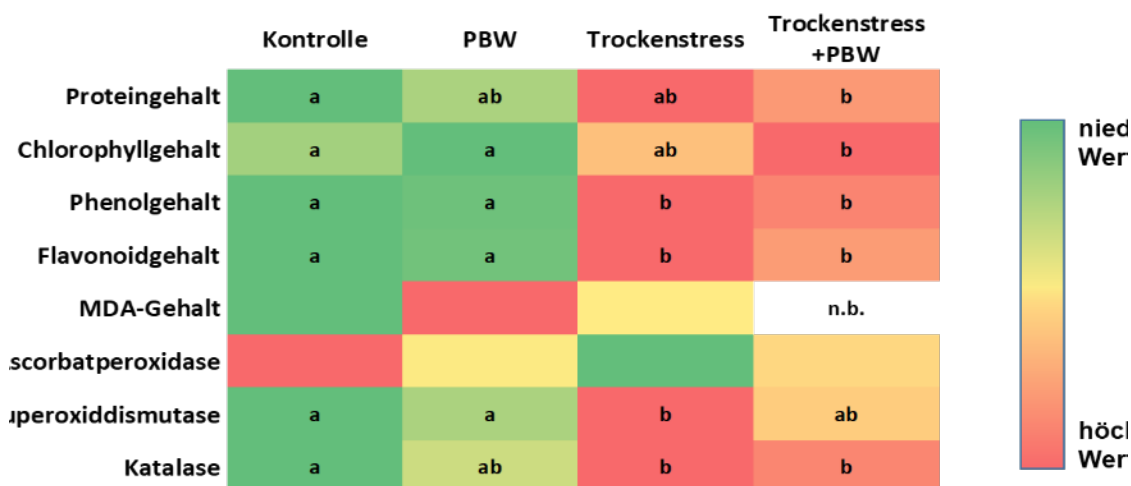


Abbildung 11: Biochemische Parameter nach 48-tägigem Wachstum im Klimaschrank. Dargestellt ist eine Heatmap mit den jeweiligen Signifikanzen ($p < 0,05$) der verschiedenen metabolischen Marker und Enzymmarker. Abk. n.b. – nicht bestimmt

Die Herstellung des PBW und Anlieferung für die Gewächshaus-/Feldversuche am bei dem Projektpartner JKI erfolgte am 5.6.2023. Die Behandlung der Luzerne Sorten und Akzession im Feldbestand erfolgte somit, wie mit dem Projektpartner JKI abgesprochen, im Frühjahr 2023 durch das JKI. Die Auswertung und Präsentation der Ergebnisse der Feldversuche sind im Schlussbericht des Projektpartners JKI dargestellt.

5. Diskussion der Ergebnisse

• Indirekte Plasmabehandlung (PBL) und Saatguthygiene

Der in den Labortests identifizierte Parameter der PBL Behandlung von Saatgut führte zu einer mäßigen Inaktivierung der Sporen von *B. atropheus* bei gleichzeitig nicht beeinträchtigter Saatgutvitalität. Auch in den Gewächshaus-Experimenten zeigte sich eine Inaktivierung des Erregers *C. trifolii* auf dem Saatgut. Im Feldbestand kam es zu Sekundärinfektionen, die nicht durch Saatgutbehandlung zu bekämpfen sind. Somit stellt die Saatgutbehandlung mittels plasmabehandelte Luft ein vielversprechendes Tool zur Inaktivierung samenbürtiger, auf der Saatgutoberfläche sitzender Erreger dar und sollte in weiteren Untersuchungen systematisch geprüft werden.

In eigenen Studien konnte die Inaktivierung des Modellorganismus auf dem Saatgut mehrere Kulturpflanzenarten nachgewiesen werden (Wannicke et al 2020). Ebenso die Inaktivierung des Erregers der Weichfäule *Pythium ultimum* auf Agarplatten (Wannicke und Brust 2023). Die generellen Mechanismen der Inaktivierung von Mikroorganismen auf der Saatgutoberfläche umfassen zum einen die Oxidation von Zellwandbestandteile und/oder Lipidperoxidation durch die reaktiven Spezies des Plasmas (RONS). Dies führt zum Verlust der Zellintegrität, gefolgt von morphologischer Degeneration (z.B. Adhikari et al 2020). Wahrscheinlich sind zudem Schädigung der Zellmembran durch reaktive Spezies, die in das Zellinnere eindringen können, aufgetreten und haben zu einer Beeinträchtigung intrazelluläre Enzyme und andere zelluläre Makromoleküle geführt.

Generell spielen reaktive Stickstoffspezies eine entscheidende Rolle bei der Inaktivierung von Mikroorganismen durch Oxidation der Zytoplasmamembran, der Proteine und der DNS (z.B. Mravlje et al 2021, Ehlbeck et al 2008). Es wurde gezeigt, dass PBL, das durch Mikrowellenentladung erzeugt wird, aus hochreaktiven Stickstoffspezies besteht einschließlich Stickstoffdioxid, salpetriger Säure

und Salpetersäure. Schnabel et al. (2015) veröffentlichten die qualitative Gaszusammensetzung von PBL (Prozessparameter 16-slm), wobei hauptsächlich sechs verschiedene Moleküle und Radikale nachgewiesen wurden: Stickstoffmonoxid und Stickstoffdioxid (NO, NO₂), Kohlendioxid (CO₂), Wasser (H₂O), Salpetersäure (HNO₃) und salpetrige Säure (HNO₂).

Im Allgemeinen kann sowohl die indirekte als auch die direkte Behandlung mit kaltem Plasma zu einer Inaktivierung von Mikroorganismen einschließlich Bakterien, Viren und Pilzen (z.B. Brust et al 2023) durch morphologische Degeneration, einschließlich Schädigung der Zellhüllenstrukturen führen.

- **Direkte Plasmabehandlung zur Stimulation**

Die Proof- of- concept Pilotstudie dieses Teilprojektes zu den Effekten der direkten Kaltplasmabehandlung auf die Keimung des Luzerne Saatguts untersuchte drei Plasmaquellen zur direkten Behandlung und jeweils zwei bis vier Prozessparametern. Eine beschleunigte Keimung konnte im Trend nachgewiesen werden, sowie eine Steigerung der maximalen Keimung in einigen Fällen nach direkter Plasmabehandlung, einhergehend mit der Reduktion im WCA. Diese Effekte beruhen wahrscheinlich auf einer physikochemischen Veränderungen der Saatgutoberfläche, wie in früheren Studien ebenfalls berichtet (z.B. Brust et al 2023). Die verbesserte Benetzbarkeit der Saatgutoberfläche kann zu einer verbesserten und beschleunigten Aufnahme von Wasser, dem initialen Startpunkt der Keimung, führen. Zudem wurde gezeigt, dass plasma-generiertes H₂O₂ und NO den Stoffwechsel des Samens beeinflussen können und z.B. die Biosynthese der Gibberelin Phytohormon-Gruppe stimulieren, was zu einer Hemmung der Keimruhe führen kann und die Keimung beschleunigt (z.B. Attri et al 2021). Generell, führt die Plasmabehandlung zu erhöhter antioxidativen Aktivität, Veränderungen in den Phytohormonen und Metaboliten, was in früher Keimung, erhöhter maximaler Keimung, verbessertem Keimlingswachstum (Wurzel, Spross, Blätter) und erhöhtem Ertrag resultieren kann (z.B. Starič et al 2020, Attri et al 2021).

- **Indirekte Plasmabehandlung (PBW) zur Stimulation**

Effekt PBW auf Saatgutkeimung im Labor

Die Keimung im Proof-of-concept im Labor zeigte eine Beschleunigung im Anfangsstadium der Keimung. Generell wurden unterschiedliche Effekte in der Literatur beschrieben, in Abhängigkeit von der Plasmaquelle den Prozessparametern und den verwendeten Flüssigkeiten (z.B. Leitungswasser, entionisiertes Wasser, z.B. Girard et al 2016, Verlackt et al 2018, Heriman et al 2019). Unabhängig von der Flüssigkeit sind die stabilen Endprodukte Wasserstoffperoxid, Nitrat- und Nitriten, wie auch in unserer Studie belegt, vorhanden (z.B. Lukes et al 2014). Diese können, wie bei der direkten Plasmabehandlung, einen Einfluss auf die Keimung nehmen, entweder als Signalmoleküle selbst, aber auch über die Beeinflussung von Phytohormonen (z.B. Mildažienė et al 2019). Eine Veränderung der physikochemischen Eigenschaften der Saatgutoberfläche erfolgt bei der indirekten Behandlung über Wasser/Flüssigkeiten nicht.

Effekt Applikation PBW im Labor

Die PBW-Applikation über den Spross scheint sowohl das Wachstum als auch physiologischer Marker des Stressstoffwechsels in Luzernepflanzen zu modulieren. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits anhand von Gerstenpflanzen beobachtet werden (Bussmann et al., 2023). Hervorzuheben ist jedoch, dass eine PBW-Applikation weder unter nicht-gestressten als auch unter Trockenstressbedingungen keine zusätzlichen Stressreaktionen in den Luzernepflanzen hervorrief. Allerdings konnten in den verschiedenen Versuchsgruppen zwar Tendenzen gegenüber der PBW-Applikation aber keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Da die im Rahmen des Projekts durchgeführten Arbeiten zunächst nur im Proof-of-concept und einer Pilotstudie mit

geringer Kapazität an Anzuchtmöglichkeiten durchgeführt werden konnte, konnten nur wenige Pflanzenproben untersucht werden. Um fundierte Aussagen bezüglich der Nutzbarkeit der PBW-Applikation für die Luzerne treffen zu können, sind weitere Untersuchungen die auch u.a. das Wurzelsystem als auch weitere Biomarker näher einbezieht, notwendig.

6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse. Wurden im Projekt praxisrelevante Ergebnisse erzielt?

Nein. Die Arbeiten im Teilprojekt des INP fokussierten sich auf den Proof-of-concept und den Wirknachweis der Kaltplasmabehandlung zur Saatguthygiene und Biostimulanz. Hier lag das Hauptaugenmerk auf der Testung der möglichen Plasmaquellen und der Identifizierung geeigneter Behandlungsparameter um in einer Pilotstudie die Eignung unter Feldbedingungen auszutesten.

7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

Die ursprünglichen Ziele, Testung der Eignung der Kaltplasma zur Saatguthygiene, sowie Stärkung wurden erreicht. Eine erste Aussage zur Effizienz kann getroffen werden und entsprechende Weiterführung geplant werden. Vor allem die Testung unter Realbedingungen muss noch ausgeweitet werden, da bisher vor allem die Applikation im Labor erfolgte, sowie wenige Proof-of-concept Versuche im Gewächshaus und Freiland (Durchführung und Auswertung durch Partner JKI), die jedoch mit einem Versuchsjahr zur Testung von Saatgutbehandlung und Behandlung mit plasmabehandeltem Wasser im Feldbestand keine allgemeine Aussagefähigkeit bieten.

8. Zusammenfassung

• Teilvorhaben INP

Die Testung der Dekontamination und Inaktivierungseffizienz im Labor erfolgte anhand des Modellorganismus *B. atropheus*. Ein geeigneter Parameter mit guter Inaktivierung bei gleichzeitig unbeeinträchtigter Saatgutvitalität wurde identifiziert und für weitere Versuche im Gewächshaus/Feld angewendet.

In den Gewächshaus Experimenten zeigte sich eine gute Inaktivierung des Erregers *C. trifolii* auf dem Saatgut. Im Feldbestand traten allerdings Sekundärinfektionen auf, die nicht durch Saatgutbehandlung zu bekämpfen sind. Dementsprechend ist die Saatgutbehandlung mittels plasmabehandelte Luft ein vielversprechendes Tool zur Inaktivierung samenbürtiger, auf der Saatgutoberfläche sitzender Erreger.

Darüber hinaus zeigt sich im Proof-of-concept eine beschleunigte Keimung der Luzerne, sowie verbesserte Benetzbarkeit der Saatgutoberfläche nach direkter Plasmabehandlung des Saatgutes. Auch die Applikation von PBW während der Saatgutkeimung zeigte eine anfangs beschleunigte Keimung.

Das Proof-of-concept der Applikation von PBW im Labor und im Feldbestand zur Stärkung ergaben keine Veränderung von Ertragsparametern oder Krankheitssymptomatik im Feldbestand. Im Labor konnte belegt werden, dass eine Sprühapplikation über den Spross keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum der Luzernepflanzen hat. Vielmehr war eine positive Tendenz zu beobachten. Auch die biochemischen Marker u.a. für das antioxidative System und weiterer Stressmarker deuten darauf hin, dass eine PBW-Applikation zu keiner Distressreaktion in den Pflanzen geführt hat. Auch PBW-Behandlungen mit anschließendem Trockenstress führte zu keiner signifikanten Veränderung der biochemischen Marker, die auf eine Verstärkung des Stresses für die Pflanzen hindeuten.

Schlussbericht zum Thema:

**“Erhöhung der Anbauwürdigkeit von Luzerne (*Medicago sativa* L.)
als Futterpflanze-
Neue Impulse für die Königin der Futterpflanzen (LuzNutz)“**



IV. Bericht zum Teilvorhaben SZS

Förderkennzeichen: 2818EPS036

Laufzeit: 01.02.2021 bis 31.01.2024

Projektnehmer: Saatzucht Steinach GmbH & Co. KG (SZS)
Wittelsbacherstraße 15
94377 Steinach

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen der BMEL Eiweißpflanzenstrategie.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	78
Tabellenverzeichnis	78
1 Material und Methoden (in Kooperation mit dem IPK)	79
1.1 Feldversuche (Arbeitspaket 1).....	79
2 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse (in Kooperation mit dem IPK)	79
2.1 Feldversuche (Arbeitspaket 1).....	80
3 Diskussion der Ergebnisse: Feldversuche (Arbeitspaket 1) in Kooperation mit dem IPK)	82
4 Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	83
5 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	83

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Balkendiagramm der Trockenmasseertrages über vier Erntetermine (harvest 1 bis harvest 4) in den Jahren 2021 und 2022 an den Standorten Malchow und Steinach; die vier Erntetermine sind in unterschiedlichen Grüntönen dargestellt. 80
- Abbildung 2: PCA-Biplot zu Beziehungen zwischen Parametern der Futtermittelqualität. Quadrate: Malchow, Kreise: Steinach; ungefüllte Symbole: Daten aus 2021, gefüllte Symbole: Daten aus 2022; verschiedene Grüntöne kennzeichnen unterschiedliche Ernten. Symbole, die nahe beieinander liegen, weisen auf ähnliche Merkmale zwischen den Datenpunkten hin. 82

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Ausgewählte Futterqualitätsparameter (alle Angaben in g/kg TM) für den Standort Steinach, aufgeschlüsselt nach Jahr und Erntetermin (Schnitt). Anmerkung: Der 3. Schnitt im Jahr 2021 wurde nicht untersucht. 81

1 Einführung

Eine Einführung zum Verbundvorhaben befindet sich im gemeinsamen Teil des Abschlussberichtes. Die vom Projektpartner SZS durchgeführten Versuche wurden in enger Zusammenarbeit an den Projektpartner IPK weitergeleitet und statistisch verrechnet.

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der wissenschaftliche und technische Stand, an den in diesem Verbundvorhaben angeknüpft wurde, ist in dem gemeinsamen Teil des Abschlussberichtes dargestellt.

3 Material und Methoden (in Kooperation mit dem IPK)

3.1 Feldversuche (Arbeitspaket 1)

Versuchsplan

Die Feldversuche wurden von 2021 bis 2023 an den Standorten Malchow (IPK) und Steinach (SZS) durchgeführt. In Malchow wurden die Versuche in allen drei Jahren durchgeführt, am Standort der SZS in Steinach nur in den Jahren 2021 und 2022. Insgesamt wurden 60 Luzerne-Muster bewertet, darunter 50 Genbankakzessionen und zehn aktuelle Sorten. Jede Akzession wurde pro Standort zweimal in einem vollständig randomisierten Design wiederholt.

Parzellengröße

Die Parzellen in Steinach waren 6 Meter lang und 1,3 Meter breit, was einer Fläche von 7,8 Quadratmetern entspricht.

Ernte

Jedes Jahr wurden vier Ernten durchgeführt, wobei Parameter wie Pflanzenhöhe, Bestandsdichte, vegetatives Wachstum und Krankheiten drei Wochen nach jeder Ernte erfasst wurden. Die Ernte wurde mit einem Feldhäcksler durchgeführt, und die grüne Biomasse wurde pro Parzelle gemessen. Zusätzlich wurden von jeder Parzelle Proben mit einem Gewicht zwischen 500 und 1.000 Gramm für Futterwertanalysen entnommen.

Analyse der Futterqualität

Die Proben wurden zwei Tage lang in einem Heißluftofen bei 60°C getrocknet und anschließend gewogen, um das Trockengewicht zu ermitteln. Die Proben jeder Ernte wurden zur Analyse der Futterqualitätsparameter an den Landeskontrollverband Berlin-Brandenburg e.V. (LKV) geschickt. Die vom LKV ermittelten Qualitätsdaten umfassten Parameter wie Rohprotein, Fasergehalt, Kohlenhydrate, Fette, Zucker, Netto-Laktationsenergie und metabolisierbare Energie.

Datenanalyse

Die Daten der Feldversuche an beiden Standorten wurden vom Projektpartner IPK mit Excel und R-Software unter Verwendung der Pakete ggplot, tidyverse und corrplot ausgewertet.

4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse (in Kooperation mit dem IPK)

4.1 Feldversuche (Arbeitspaket 1)

Die in den Jahren 2021 und 2022 in Malchow und Steinach durchgeführten Feldversuche zeigten deutliche Unterschiede in der Biomasseproduktion und im Ertrag.

Im Jahr 2021 schwankten die Parzellen-Frischmasseerträge in Malchow zwischen 0,5 und 3,5 kg/m² und sanken im Jahr 2022 auf 0,3 bis 2,7 kg/m² ab. In Steinach lagen die Frischmasse-Erträge zwischen 0,9 und 3,4 kg/m² im Jahr 2021 und gingen im Jahr 2022 auf 1,0 bis 3,0 kg/m² zurück, wobei in den letzten Schnitten eines jeden Jahres ein Rückgang in der Frischmasse zu verzeichnen war.

Die Gesamttrockenmasseerträge (GTM) variierten ebenfalls zwischen den Orten und Jahren (Abbildung 1). Während in Malchow die GTM von 142,5 dt/ha im Jahr 2021 auf 123,8 dt/ha im Jahr 2022 zurückging, stieg in Steinach der GTM 142,4 dt/ha im Jahr 2021 auf 170,3 dt/ha im Jahr 2022 an, was auf ein höheres und stabileres Ertragsniveau in Steinach als in Malchow hindeutet. Die Varianzanalyse (ANOVA) ergab sowohl für den Erntetermin (Schnitt) als auch für den Faktor Standort einen signifikanten Einfluss auf den Gesamttrockenmasseertrag in den Jahren 2021 und 2022.

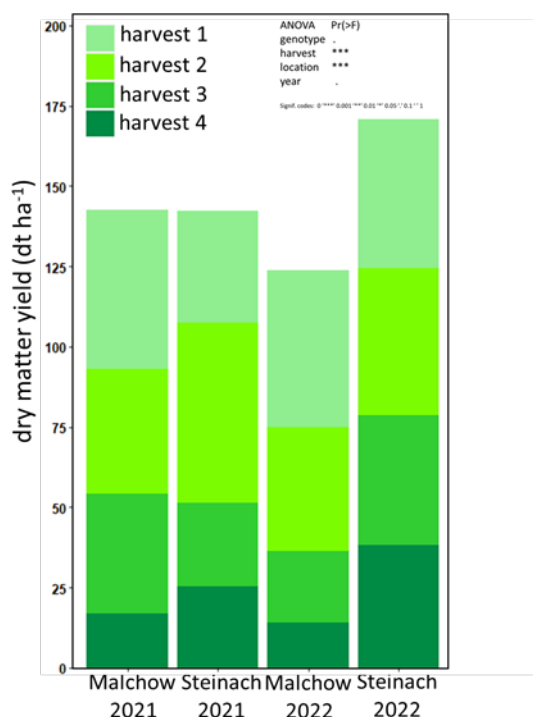


Abbildung 22: Balkendiagramm der Trockenmasseertrages über vier Erntetermine (harvest 1 bis harvest 4) in den Jahren 2021 und 2022 an den Standorten Malchow und Steinach; die vier Erntetermine sind in unterschiedlichen Grüntönen dargestellt.

Im Hinblick auf die Futterqualität zeigt die Analyse des Rohproteingehaltes (RP-Gehalt; XP), der zwischen 188 g/kg TM und 256 g/kg TM schwankte, dass dieser zum zweiten Erntetermin am niedrigsten war. In Malchow stiegen die RP-Gehalte bis zum vierten Erntetermin an, während in Steinach die höchsten RP-Gehalte durchweg zum ersten Erntetermin beobachtet wurden (Tabelle 1).

Tabelle 2: Ausgewählte Futterqualitätsparameter (alle Angaben in g/kg TM) für den Standort Steinach, aufgeschlüsselt nach Jahr und Erntetermin (Schnitt). Anmerkung: Der 3. Schnitt im Jahr 2021 wurde nicht untersucht.

Jahr	Schnitt	RP		ADF		NDF	
		Median	Spanne	Median	Spanne	Median	Spanne
2021	1	246,6	220,8-265,5	291,3	238,6-311,2	396,0	341,5-444,9
	2	201,0	180,6-224,8	403,9	356,1-441,6	520,2	462,9-562,4
	4	234,0	209,9-250,6	289,6	262,8-323,1	410,6	377,2-449,2
2022	1	249,4	205,9-291,3	304,6	252,4-371,2	414,4	339,1-459,1
	2	223,9	193,4-247,1	357,9	323,2-413,5	485,0	416,5-525,2
	3	230,5	198,2-252,7	354,2	330,4-401,2	482,0	410,1-561,3
	4	236,4	213,4-254,7	307,9	281,0-345,8	438,7	398,8-491,1

Aus Tabelle 1 lässt sich außerdem die negative Beziehung des RP-Gehalts zu ADF und NDF ablesen. Um die Futterqualitätsparameter aus der erweiterten Weender Analyse (Auftragnehmer LKV) über die verschiedenen Ernten und beide Standorte hinweg zusammenzufassen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt und in einem Biplot visualisiert (Abbildung 2).

In dieser Analyse sind der Trockenmasseertrag, die Frischmasse („biomass“) und mehrere Futterqualitätsparameter enthalten. Die Richtung der Pfeile auf dem Diagramm zeigt an, in welche Richtung die Werte entlang der beiden Achsen zunehmen. Entlang der Hauptkomponente 1 (PC 1), die 62,7% der Varianz erklärt, sind Parameter wie Verdaulichkeit („digestibility“), Rohprotein, metabolisierbare Energie (ME) und Netto-Energie-Laktation (NEL) aufeinander abgestimmt, was darauf hindeutet, dass diese auch funktionell eng assoziiert sind. Die NDF (Neutral Detergent Fibre organic matter, d.h. aschefreier Rückstand nach Behandlung mit neutralen Lösungsmitteln), die in die entgegengesetzte Richtung weist, deutet auf einen Kompromiss mit diesen Qualitätsparametern hin. Die Hauptkomponente 2 (PC 2), auf die 20,7% der Varianz entfallen, betrifft in erster Linie die ADF (Acid Detergent Fibre organic matter, d.h. aschefreier Rückstand nach Behandlung mit sauren Lösungsmitteln), die keine direkte Beziehung zu NDF oder zum Rohproteingehalt aufweist. Die Darstellung zeigt auch, dass die Ertragsparameter in gewissem Maße negativ mit der NEL korreliert sind, was darauf schließen lässt, dass höhere Erträge zu niedrigeren Nettoenergie-Laktationswerten im Futter führen können. Die Daten des ersten Erntetermins (in beiden Jahren) charakterisieren in erster Linie den Ertrag (Trocken- und Frischmasse), die ADF, und für den Standort Steinach auch den Zuckergehalt, während der vierte Erntetermin die mit der Energie assoziierten Parameter, nämlich NEL und ME, hervorhebt.

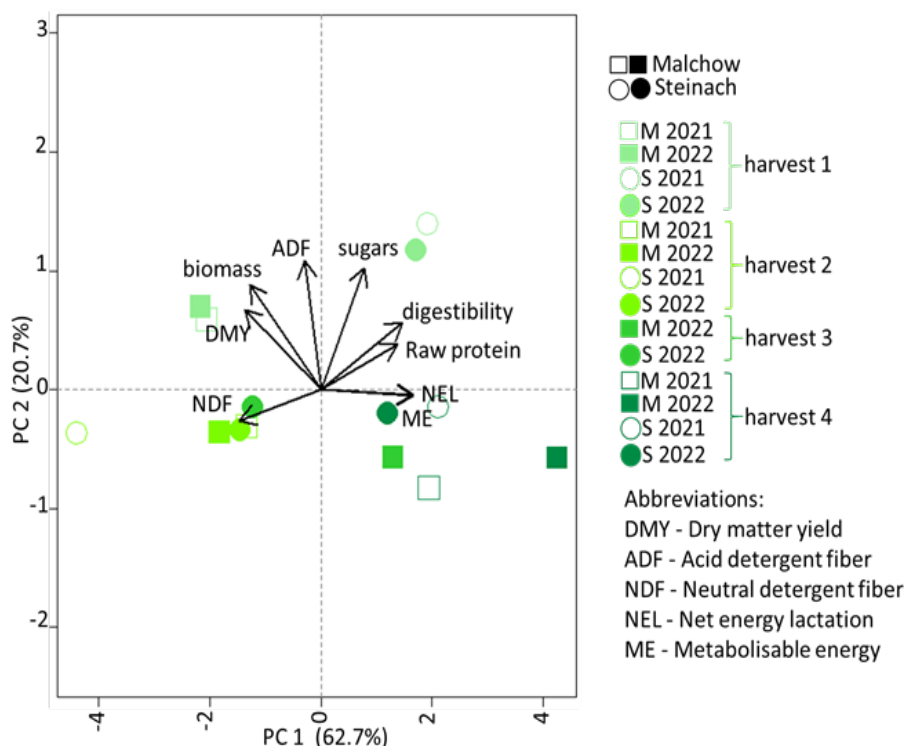


Abbildung 23: PCA-Biplot zu Beziehungen zwischen Parametern der Futtermittelqualität. Quadrate: Malchow, Kreise: Steinach; ungefüllte Symbole: Daten aus 2021, gefüllte Symbole: Daten aus 2022; verschiedene Grüntöne kennzeichnen unterschiedliche Ernten. Symbole, die nahe beieinander liegen, weisen auf ähnliche Merkmale zwischen den Datenpunkten hin.

5 Diskussion der Ergebnisse: Feldversuche (Arbeitspaket 1) in Kooperation mit dem IPK)

Im Arbeitspaket 1 des Vorhabens sollte in einem gemeinsamen Feldversuch der Projektpartner IPK und SZS an einem repräsentativen Set an Herkünften unterschiedlicher Provenienz und Züchtungshistorie die Ertragsleistung und Futterqualität an 2 Standorten zu 4 Schnitterminen in jeweils 2 Jahren (2021 und 2022) erfasst werden, um durch Nutzung genetischer Diversität eine züchterische Verbesserung in diesen Zuchtzielen für eine nachhaltige Erzeugung zu erreichen.

Für das Zuchtziel Trockenmasseertrag konnten erhebliche Unterschiede zwischen den Prüfgliedern gezeigt werden. Dabei schnitten moderne Sorten wie ‚Catera‘ oder ‚Alpha‘ als ältere Sorten und nicht an das Anbaug Gebiet angepasste Herkünfte. Es wurden aber auch ertragreiche Herkünfte wie LE 930, LE 2367 oder LE 2397 identifiziert werden, die für die weitere Züchtung von Interesse wären.

Darüber hinaus lieferte die Analyse der Futterqualitätsparameter wertvolle Einblicke in die Inhaltsstoffzusammensetzung der Luzerne-Biomasse. Es zeigten sich deutliche Cluster, die verschiedenen Ernten und Standorten entsprechen und die Variationen bei den Ertrags- und Qualitätsmerkmalen in verschiedenen Umgebungen widerspiegeln.

Insgesamt bietet der integrierte Ansatz des Projektes, die phänotypische und genomische Diversität mittels genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) für eine beschleunigte Züchtung zu nutzen, das Potenzial dass innovative Züchtungsstrategien eine Ausweitung des Luzernefutteranbaus deutlich

befördern können.

6 Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse

An Hand der im Rahmen der zweijährigen Feldversuche der SZS und des IPKs gewonnenen Erkenntnisse zur Ertragsbildung durch zweijährige Mehrschnittnutzung einerseits und den aufgetretenen schwach bis stark negativen Korrelationen zwischen Trockenmasseertrag und Futterqualitätsparametern wird es der praktischen Landwirtschaft ermöglicht, das für die jeweils priorisierte Komponente optimale Schnittregime zu etablieren und so den Luzerne-Anbau effektiver als bisher zu gestalten.

Für die Züchtung ermöglichen neue Erkenntnisse zur genetischen Variabilität des *Medicago*-Genpools die Berücksichtigung der starken Heterogenität in den Materialgruppen bei der Entwicklung neuer Zuchtlinien und Sorten. Daraus leitet sich für die praktische Züchtung die Empfehlung ab, bei der Vermehrung von Zuchtstämmen auf ausreichende Isolierung der Zuchtlinie zu achten. Die Sortenentwicklung auf der Basis diploiden *Medicago sativa*-Materials, d.h. durch Aufdoppelung des Chromosomensatzes könnte den Schritt in Richtung Homogenität ebenfalls erleichtern.

Das vorliegende Projekt und seine Projektergebnisse sind somit eine wertvolle Ausgangsbasis für die verbesserte und wissensbasierte Züchtung neuer Sorten sowie die Umsetzung weiterer Forschungsprojekte und Kooperationen bei der Futterleguminose Luzerne.

7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Mit dem vorliegenden LuzNutz-Projekt ist es wie im Projektantrag geplant gelungen, die genetische Variabilität der Kulturart Luzerne sowie verwandter *Medicago*-Arten darzustellen und in zwei- (SZS) bzw. dreijährigen (IPK) Feldversuchen neue Erkenntnisse über das Ertrags- und Futterqualitätsniveau der Luzerne zu gewinnen.

Die Feldversuche mit 60 für das Anbaugebiet repräsentativen Akzessionen des landwirtschaftlich genutzten Genpools ermöglichten die Erhebung und statistische Auswertung von Daten zur agronomischen Leistung zu Merkmalen der Futterqualität. Im Rahmen dieser Versuche konnten Herkünfte identifiziert werden, welche sich als Kreuzungspartner für die zukünftige Sortenentwicklung eignen.

Darüber hinaus liefern die gewonnenen genomischen Informationen (mittels GBS) und erzielten Ergebnisse der GWAS die Grundlage für die Anwendung molekularer Werkzeuge in der Luzernezüchtung.

5 Gemeinsame Diskussion der Ergebnisse

Das Projekt LuzNutz ist ein Verbundprojekt aus Partnern der Wissenschaft (JKI, IPK, INP) und dem Wirtschaftspartner Saatucht Steinach. Es wurden Aspekte der Grundlagenforschung zur genetischen Variabilität von Luzerne (IPK, JKI) sowie der Wirkung von Plasma auf Samen der Luzerne (INP, JKI) erhoben. Über die Erhebung von Phänotypisierungsdaten im Hinblick auf Ertrag und Krankheitsresistenz (IPK, SZS; JKI) und deren Analyse in der GWAS (IPK) ergeben sich für den beteiligten Züchter (SZS) neue Genotypen für die Sortenzüchtung zu nutzen und den Züchtungsfortschritt der Luzerne in Deutschland zu verbessern.

Im folgendem werden die Schwerpunkte der einzelnen Partner diskutiert.

JKI

Das am JKI analysierte Teilsortiment (N= 30) zeigt sowohl phänotypisch als auch genotypisch eine breite Diversität. Die in Modul C (Zusatz) durchgeführten Analysen des genetischen Sets mit SSR-Markern und die vom Projektpartner IPK durchgeführten GBS- und Stammbaumanalysen zeigen die hohe genetische Variabilität innerhalb von *Medicago*. Einzelpflanzenanalysen mit SSR-Markern innerhalb einer Linien wiesen auf eine starke Heterogenität innerhalb eines Prüfglieds hin. Einerseits ermöglicht die Vielfalt an Allelen die Einkreuzung neuer Merkmalsvarianten in aktuelle Sorten, andererseits ist es aufgrund des Status der tetraploiden Luzerne als obligater Fremdbefruchter nur schwer möglich einen homogenen Sortencharakter zu erzielen. Daher sollte die Sortenentwicklung in Zukunft von molekulargenetischen Techniken begleitet werden, um den Sortencharakter kontrollieren zu können.

Diese Tatsache der Inhomogenität der Linien erschwert auch die phänotypische Einschätzung des Materials im Hinblick auf einzelne Merkmale. Die wurde besonders bei der Reaktion der Pflanzen auf den Erreger *C. trifolii* deutlich (Modul B). Im Projekt gelang es einen Gewächshaus Infektionstest zu etablieren, der Symptome nach Sprühinfektion hervorruft. Hierzu wurden auch *C. trifolii* Isolate verschiedener Herkünfte morphologisch, physiologisch charakterisiert, mit dem Ziel ein Isolat mit möglichst hohem Virulenzvermögen für die Resistenzphänotypisierung zu nutzen. Nach dem Inokulationsversuch reagierten die Einzelpflanzen einer Sorte/Linie sehr heterogen auf die Infektion mit dem Erreger. Im Gegensatz dazu ergaben die Infektionsversuche bei der Rotkleelinie, die als anfällige Referenz diente, ein einheitliches Symptombild. Die im Projektverlauf gesammelten Erfahrungen zeigen, dass eine phänotypische Einschätzung von Genotypen im Gewächshaus nicht zuverlässig erfolgen kann, dies kann einerseits auf die Heterogenität des Materials zurückgeführt werden. Andererseits zeigte sich in den wiederholten Versuchen die notwendige lange Infektionszeit des Erregers, welche durch langsame Vermehrungsrate bedingt ist und daher in einem Kurzzeitversuch (Topfkultur Gewächshaus) von der raschen Bestockung der Luzerne überwachsen wird. Nach Ergebnisvalidierung wurde sich für die Durchführung von zweijährigen Feldversuchen entschieden, die es ermöglichen das Infektionsverhalten innerhalb der Prüfglieder über die gesamte Vegetationsperiode unter praxisnahen Bedingungen zu erfassen. Aufgrund der Saatgutkapazitäten und des Umfang des Feldversuch konnte dieser für ein Teilsortiment von N=30 Akzessionen durchgeführt werden, sodass Resistenzdaten nicht für die Verrechnung im Modul C zur Verfügung stehen, jedoch wichtige Erkenntnisse über Resistenzvariabilität im Teilsortiment und den Einfluss der

Saatgutbehandlungsvarianten erbringen. Die Feldversuche erforderten diverse Saatgutbehandlungen im Vorfeld, um u.a. die Wirkung von Plasma auf das Infektionsgeschehen nach Sameninokulation mit *C. trifolii* zu prüfen. Alle Varianten wurden auf Keimfähigkeit und Ausprägung von Symptomen an Jungpflanzen im Gewächshaus überprüft. Keine der Behandlungsvarianten (V0-V8) hatte einen negativen Einfluss auf die Keimung, so dass die Methoden zur Saatgutbehandlung als erfolgreich eingestuft werden konnten. Restsaatgut aus den Varianten V0 bis V8 wurden im Gewächshaus herangezogen und wie erwartet zeigten nur die Varianten V5-V8, deren Saatgut mit dem Pilz inokuliert wurde, anthraknosespezifische Symptome. Somit ist der Nachweis erbracht, dass sich aus inokulierten Samen (*Colletotrichum*) Pflanzen mit typischen anthraknose-spezifischen Symptome entwickeln. Dies wiederum weist darauf hin, dass nach der Sameninokulation auch *C. trifolii*-Symptome an Feldpflanzen auftreten. Die Auswertung der Boniturergebnisse spiegelt genau diese Annahme wieder. Die Varianten V5-V8 zeigen im Feld ein signifikant höheres Befallslevel als die Kontrollvarianten V0-V4. Symptomfreie Prüfglieder konnten nicht beobachtet werden. Im Hinblick auf das Merkmal Anthraknose gibt keine starke Differenzierung im Material. Insgesamt ist das Befallsniveau jedoch im Feld als gering einzustufen, da keines der Prüfglieder so starke Symptome zeigen, dass es zum Absterben und zum Totalausfall der Parzellen kommen würde. Daher ist der wirtschaftliche Schaden durch Anthraknose im Luzerneanbau in Nordostdeutschland als eher gering einzustufen. Die Versuche hätten sicherlich in Bayern (Donaudelta) am Standort des Wirtschaftspartners Saatzucht Steinach zu höheren Infektionsraten geführt.

Das Auftreten von Symptomen an Feldpflanzen der Varianten V0-V4 ist durch Sekundärinfektionen zu erklären. Der Versuch war als randomisierte Blockanlage aufgebaut, so dass zwischen den Wiederholungen auch Parzellen mit Genotypen der Variante V5-V8 neben solchen Parzellen mit nicht behandeltem Saatgut angebaut wurden. Zusätzlich ist die Vermehrung des Erregers im gesamten Bestand über die Vegetationszeit angestiegen. Dies wird auch durch die Auswertung des Feldversuchs von 2022 im Folgejahr bestätigt. So zeigte sich im Gesamtbestand im Versuchsjahr 2023 nach Neuaufwuchs ein höheres Befallsniveau als im Jahr der Versuchsanlage 2022.

IPK und SZS

Hauptaufgaben des Leibniz-IPK im LuzNutz-Projekt zur umfassenden Analyse der genetischen und phänotypischen Vielfalt der IPK-*Medicago*-Sammlung waren die Ermittlung der genotypischen Diversität (Modul C), der Phosphoraufnahme-Effizienz (Modul C), der Wurzelsystemarchitektur (Modul C), des Feldertrags sowie der Futter-Qualität (Modul A). Die Phänotypisierungsdaten (Modul A) wurden am Standort Malchow vom IPK und am Standort Steinach von der Saatzucht Steinach erfasst. Für die statistische Analyse hat die Saatzucht ihre Daten dem IPK zu Verrechnung zur Verfügung gestellt.

Die zur Ermittlung der genetischen Diversität durchgeführte GBS-Analyse (Modul C) ergab eine hohe genetische Vielfalt zwischen den Akzessionen, wobei im phylogenetischen Baum und in der Hauptkomponentenanalyse verschiedene Cluster beobachtet wurden, die im Wesentlichen auf einen Kulturpool und einen Wildpool zurückgehen. Diese Diversität unterstreicht die Wichtigkeit der Erhaltung von genetischen Ressourcen sowie von deren Nutzung für die Verbesserung der Kulturformen.

Die phänotypische Charakterisierung eines Teil-Sets der Sammlung verdeutlichte die unterschiedlichen Potenziale der *Medicago*-Muster bei der Biomassebildung unter unterschiedlicher P-Versorgung (Modul C). Topfversuche lieferten wertvolle Daten zur Biomassebildung, zur Spross- und Wurzeltrockenmasse und zur P-Konzentration. In erster Linie

reagierten die Akzessionen unterschiedlich auf die P-Behandlung, wobei ihre Biomasse unter P-limitierten Bedingungen variierte. Rhizotronversuche ergänzten die Topfversuche, indem sie eine detailliertere Bewertung der Architektur des Wurzelsystems ermöglichten. Die Hauptkomponentenanalyse von Wurzelmerkmalen wies auf einen Kompromiss zwischen Wurzellänge und -durchmesser hin, was das komplexe Zusammenspiel zwischen verschiedenen Wurzelmerkmalen verdeutlicht.

Durch eine Kombination aus Genotypisierung durch Sequenzierung (GBS), Phänotypisierungsexperimenten und genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) konnten Erkenntnisse über die Faktoren gewonnen werden, die Pflanzenhöhe, Biomasse, P-Verwertung und Wurzelentwicklung bei *Medicago*-Arten beeinflussen (Modul C). GWAS identifizierte signifikante Marker-Merkmal-Assoziationen für die maximale Pflanzenhöhe unter niedrigen P-Bedingungen, was die genetische Grundlage der P-Nutzungseffizienz bei *Medicago* beleuchtet. Diese Ergebnisse haben wichtige Auswirkungen auf Züchtungsprogramme, die darauf abzielen, die P-Nutzungseffizienz und die Gesamtproduktivität der Pflanzen zu steigern.

Darüber hinaus lieferte die Analyse der Futterqualitätsparameter (Modul A) wertvolle Einblicke in die Inhaltsstoffzusammensetzung der Luzerne-Biomasse. Es zeigten sich deutliche Cluster, die verschiedenen Ernten und Standorten entsprechen und die Variationen bei den Ertrags- und Qualitätsmerkmalen in verschiedenen Umgebungen widerspiegeln. Für die landwirtschaftliche Praxis konnten hochrelevante Empfehlungen zur Erzielung eines maximalen Biomasseertrags bzw. eines optimalen Futterwerts erarbeitet werden.

Insgesamt bietet der integrierte Ansatz des Leibniz-IPK ein umfassendes Verständnis der pflanzengenetischen Ressourcen der Gattung *Medicago*, welches Hinweise für künftige Züchtungsstrategien liefert und den Luzernefutteranbau positiv beeinflussen kann.

Die im Projekt bearbeiteten genetischen Ressourcen der Blauen Saatluzerne (*Medicago sativa* L.) bieten ausreichend genetische Variabilität für die Erstellung günstiger Kreuzungskombinationen. Das Projekt im Züchtungsmaßstab ermöglicht die unmittelbare Durchführung von Kreuzungen basierend auf den Projektergebnissen und damit die Grundlage für zukünftige Luzerne-Sorten.

INP

In den Gewächshaus Experimenten zeigte sich eine gute Inaktivierung des Erregers *C. trifolii* auf dem Saatgut (Modul B). Im Feldbestand traten allerdings Sekundärinfektionen auf, die nicht durch Saatgutbehandlung zu bekämpfen sind (s. auch JKI). Dementsprechend ist die Saatgutbehandlung mittels plasmabehandelter Luft ein vielversprechendes Tool zur Inaktivierung samenbürtiger, auf der Saatgutoberfläche sitzender Erreger.

Darüber hinaus zeigt sich im Proof-of-concept eine beschleunigte Keimung der Luzerne, sowie verbesserte Benetzbarkeit der Saatgutoberfläche nach direkter Plasmabehandlung des Saatgutes. Auch die Applikation von PBW während der Saatgutkeimung zeigte eine anfangs beschleunigte Keimung. Das Proof-of-concept der Applikation von PBW im Labor und im Feldbestand zur Stärkung ergaben keine Veränderung von Ertragsparametern oder Krankheitssymptomatik im Feldbestand. Im Labor konnte belegt werden, dass eine Sprühapplikation über den Spross keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum der Luzernepflanzen hat. Vielmehr war eine positive Tendenz zu beobachten. Auch die biochemischen Marker u.a. für das antioxidative System und weiterer Stressmarker deuten darauf hin, dass eine PBW-Applikation zu keiner Distressreaktion in den Pflanzen geführt hat. Auch PBW-Behandlungen mit anschließendem Trockenstress führte zu keiner signifikanten Veränderung der biochemischen Marker, die auf eine Verstärkung des Stresses für die Pflanzen hindeuten.

Bei den im Verbundvorhaben realisierten wissenschaftlichen Versuchen konnte eine starke

phänotypische Variabilität in den genetischen Ressourcen im Artkomplex *Medicago* sp. festgestellt werden. Durch die Erhebung genotypischer Daten konnte die zugrundeliegende genetische Variabilität durch populationsgenetische Analysen und die Berechnung von Assoziationen agronomischer Merkmale bestätigt werden. Zusammen mit den entwickelten und getesteten Methoden zur Erkennung von Anthraknose-Resistenzen und Sterilisierung von infiziertem Saatgut bildet dieses Projekt eine gute Grundlage zur weiteren züchterischen Bearbeitung dieser wichtigen Futterpflanze.

8 Zusammenfassung (alle Projektmodule)

Das Gesamtziel des vorliegenden Forschungsprojekts bestand in der Gewinnung neuer Erkenntnisse zur züchterischen Nutzung von Luzerne (*Medicago sativa*) in Deutschland. Hierbei standen Aspekte des Ertragspotentials (Trockenmasse) und Ertragsstabilität (Protein, Krankheitsresistenz) im Vordergrund. Phänotypische und GBS-basierte genotypische Daten wurden an einem umfangreichen Set an genetischen Ressourcen statistisch verwertet. Für diese GWAS –Analyse standen mehr als 122.000 SNPs für ca. 10.000 Loci zur Verfügung. Phänotypische Daten aus sechs Umwelten wurden für Trockenmasse, Gesamtproteingehalt, Rohfett und Rohfaser sowie der Phosphor-Aufnahme-Effizienz ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede konnten sowohl zwischen den Linien, als auch zwischen den Versuchsjahren und Versuchsorten ermittelt werden. Über die GWAS-Analyse wurden zwei Loci für Pflanzenhöhe (Mehrertrag) auf Chromosom 1 und 2 detektiert werden, die für die Züchtung eingesetzt werden können.

Zusätzlich lieferte die GBS-Analyse umfangreiche Daten zur genetischen Diversität. Es zeigte sich in der Stammbaumanalyse, dass *M. sativa* und *M. varia* eng miteinander verwandt sind, sich jedoch deutlich von *Medicago*-Wildarten abgrenzen lassen.

Markeranalysen mit SSR-Markern auf genomischer Ebene zeigten, dass innerhalb einer Linien des genetischen Sets bereits unter 50 Individuen bis zu fünf verschiedene Markerallele nachzuweisen sind und somit der Beleg erbracht werden konnte, dass innerhalb eines Prüfglieds eine hohe genetische Variabilität vorliegt. Insgesamt wurden 29 SSR-Marker über das gesamte Set geprüft, von denen 27 als informative, polymorphe Marker einzustufen sind.

Die Ertragsstabilität ist für eine Futterpflanze wie Luzerne von hoher Bedeutung. Die Anfälligkeit von *Medicago sativa* gegenüber Anthraknose (*Colletotrichum trifolii*) war daher ein weiterer Aspekt des Projekts. Zur Realisierung dieser Teilziele wurden verschiedene Resistenztests etabliert. Ein Gewächshausresistenztest wurde entwickelt, in dem das Befallsniveau von Pflanzen, die aus inokulierten Samen (*C. trifolii*) stammen, beurteilt wurde. Ebenso konnte ein Test mit Sprühinokulation (Suspension) an Jungpflanzen etabliert werden. Zur Verifizierung der Daten wurden die Ergebnisse von zweijährigen Freilandversuchen am JKI integriert. Die statistische Auswertung der Freilandversuche hat ergeben, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgliedern (Genotypen) gibt. Ein höheres Befallsniveau ließ sich in den Versuchsvarianten nachweisen, die im Vergleich zu den Kontrollvarianten mit *C. trifolii* inokuliert wurden. Sowohl die chemische Beize als auch die Plasmabehandlung reduziert die Befallsstärke der Pflanzen im Feld. Im Rahmen der Resistenzversuche wurde neben der chemischen Beize auch die vom Projektpartner INP genutzte, plasmabehandelte Luft überprüft. Im Labor wurde zuvor die Inaktivierungseffizienz anhand des Modellorganismus *Bacillus atrophaeus* durchgeführt und ein geeigneter Prozessparameter für die Feldversuche ausgewählt. Im Labor des Projektpartners INP konnte zudem belegt werden, dass eine Sprühapplikation von plasmabehandeltem Wasser über den Spross keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum der Luzernepflanzen hat. Vielmehr war eine positive Tendenz zu beobachten.

Die hier gewonnenen Ergebnisse bieten die Grundlage für weitere züchtungsrelevante Projekte, gerade auch vor dem Hintergrund des Klimawandels, die eine Ausweitung der Anbaufläche für Luzerne bedingen könnten.

9 Literaturverzeichnis

- Adhikari, B., Pangomm, K., Veerana, M., Mitra, S., & Park, G. (2020). Plant disease control by non-thermal atmospheric-pressure plasma. *Frontiers in Plant Science*, 11, 504001.
- Attri, P., Koga, K., Okumura, T., & Shiratani, M. (2021). Impact of atmospheric pressure plasma treated seeds on germination, morphology, gene expression and biochemical responses. *Japanese journal of applied physics*, 60(4), 040502.
- Berendonk, C (2013): Erfolgreicher Luzerneanbau 2013. Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, Bundessortenamt (2016): Beschreibende Sortenliste Futtergräser, Esparssette, Klee, Luzerne, Hannover
- Brust, H., Nishime, T. M. C., Wannicke, N., Mui, T. S. M., Horn, S., Quade, A., & Weltmann, K. D. (2021). A medium-scale volume dielectric barrier discharge system for short-term treatment of cereal seeds indicates improved germination performance with long-term effects. *Journal of Applied Physics*, 129(4).
- Brust, H., Wannicke, N., & Park, G. (2023). Agriculture and Food Processing Applications. In *Plasma Biosciences and Medicine* (pp. 111-227). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Bussmann, F., Krüger, A., Scholz, C., Brust, H., & Stöhr, C. (2023). Long-Term Effects of Cold Atmospheric Plasma-Treated Water on the Antioxidative System of *Hordeum vulgare*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(5), 3274-3290.
- Eaton DAR und Overcast I (2020): ipyrad: Interactive assembly and analysis of RADseq datasets. *Bioinformatics*; 36(8):2592-2594.
- Elgin JH und Ostazeski SA, 1982. Evaluation of selected Alfalfa Cultivars and related *Medicago* Species for Resistance to Race 1 and Race 2 Anthracnose. *Crop Science* 22: 39-42
- Ehlbeck, J.; Brust, H.; Wannicke, N.; Schnabel, U.; Andrasch, M.; Stachowiak, J.; Kolb, J.; Weltmann, K.-D.(2018) Potential of non-thermal plasma techniques for decontamination of wheat grains for agricultural use, DOI:10.23789/1869-2303-2018-4-244, *Cereal Technol.*4, 244-255
- Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE (2011): A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6 (5): e19, 379, DOI 10.1371/journal.pone.0019379
- Filatova, I., Azharonok, V., Kadyrov, M., Beljavsky, V., Gvozдов, A., Shik, A., & Antonuk, A. (2011). The effect of plasma treatment of seeds of some grain and legumes on their sowing quality and productivity. *Rom. J. Phys*, 56, 139-143
- Filatova, I., Azharonok, V., Lushkevich, V., Zhukovsky, A., Gadzhieva, G., Spasic, K. & Petrovic, Z. L. (2013, July). Plasma seeds treatment as a promising technique for seed germination improvement. In *Proceeding of the 31st International Conference on Phenomena in Ionized Gases*
- Fischer, Kristin; Dieterich, Regine; Nelson, Matthew N.; Kamphuis, Lars G.; Singh, Karam B.; Rotter, Björn et al. (2015): Characterization and mapping of LanRBo: a locus conferring anthracnose resistance in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). In: *Theoretical and applied genetics* 128 (10), S. 2121–2130. DOI: 10.1007/s00122-015-2572-3.
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb J-F, Dougherty BA, Merrick JM, McKenney K, Sutton G, FitzHugh W, Fields C, Gocayne JD, Scott J, Shirley R, Liu L-J, Glodek A, Kelley JM, Weidman JF, Phillips CA, Spriggs T, Hedblom E, Cotton MD, Utterback TR, Hanna MC, Nguyen DT, Saudek DM, Brandon RC, Fine LD, Fitchman JL, Fuhrmann JL, Geoghagen NSM, Gnehm CL, McDonald LA, Small KV, Fraser CM, Smith HO, Venter JC (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*. 269: 496–512
- Frick, R, Mosimann, E, Aebi, P, Suter, D, Hirschi, H-U (2014): Ergebnisse der Sortenversuche 2011-2013 mit Luzerne. *Pflanzenbau, Agrarforschung Schweiz* 5 (9), 358-365
- Girard, F., Badets, V., Blanc, S., Gazeli, K., Marlin, L., Authier, L., ... & Arbault, S. (2016). Formation of reactive nitrogen species including peroxynitrite in physiological buffer exposed to cold atmospheric plasma. *Rsc Advances*, 6(82), 78457-78467.
- Hahn, V., Dikyol, C., Altrock, B., Schmidt, M., Wende, K., Ercan, U. K., ... & von Woedtke, T. (2019). Plasma-mediated inactivation of *E. coli*: Influence of protein on wet surface and in liquid medium. *Plasma Processes and Polymers*, 16(5), 1800164.
- Heirman, P., Van Boxem, W., & Bogaerts, A. (2019). Reactivity and stability of plasma-generated oxygen and nitrogen species in buffered water solution: A computational study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(24), 12881-12894.
- Joosen, R.V.; Kodde, J.; Willems, L.A.; Ligterink, W.; van der Plas, L.H.; Hilhorst, H.W. (2010) GERMINATOR: A software package for high-throughput scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. *Plant J.*, 62, 148–159.
- Krishnakumar V, Kim M, Rosen BD, Karamycheva S, Bidwell SL, Tang H, Town CD (2015): MTGD: The *Medicago truncatula* Genome Database. *Plant Cell Physiol*. 56(1):e1
- Li, X, Wei, Y, Acharya, A, Jiang, Q, Kang, J, Brummer, EC (2014): A saturated genetic linkage map of autotetraploid

- alfalfa (*Medicago sativa* L.) developed using genotyping-by-sequencing is highly syntenous with the *Medicago truncatula* genome. *Genes, Genomes, Genetics* 4, 1971-1979
- Lin, S., Medina, C. A., Norberg, O. S., Combs, D., Wang, G., Shewmaker, G., Fransen, S., Llewellyn, D., & Yu, L. (2021). Genome-Wide Association studies identifying multiple LOCI associated with alfalfa forage quality. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.648192>
- Ling, Li, et al. "Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean." *Scientific reports* 4 (2014): 5859.
- Lukes, P., Dolezalova, E., Sisrova, I., & Clupek, M. (2014). Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation of peroxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H₂O₂ and HNO₂. *Plasma Sources Science and Technology*, 23(1), 015019.
- Mackie JM, Musial JM, O'Neill NR und Irwin JAG, 2003. Pathogenic specialisation within *Colletotrichum trifolii* in Australia, and lucerne cultivar reactions to all known Australian pathotypes. *Australian Journal of Agricultural Research* 54 (9): 829-836
- Mackie, JM, Musial, JM, Armour, DJ, Phan, HTT, Ellwood, SE, Aitken, KS, Irwin, JAG (2007): Identification of QTL for reaction to three races of *Colletotrichum trifolii* and further analysis of inheritance of resistance in autotetraploid lucerne. *Theor Appl Genet* 114, 1417–1426
- Mildažienė, V., Aleknavičiūtė, V., Žūkienė, R., Paužaitė, G., Naučienė, Z., Filatova, I., ... & Baniulis, D. (2019). Treatment of common sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds with radio-frequency electromagnetic field and cold plasma induces changes in seed phytohormone balance, seedling development and leaf protein expression. *Scientific reports*, 9(1), 6437.
- Mravlje, J.; Regvar, M.; Starić, P.; Mozetič, M.; Vogel-Mikuš, K. (2021) Cold Plasma Affects Germination and Fungal Community Structure of Buckwheat Seeds. *Plants*, 10, 851.
- Munjal, G, Hao, J, Teuber, LR, Brummer, EC (2018): Selection mapping identifies loci underpinning autumn dormancy in alfalfa (*Medicago sativa*). *Genes, Genomes, Genetics* 8, 461-468
- Narisetti N., Henke M., Seiler C., Shi R., Junker A., Altmann T. & Gladilin E. (2019): Semi-automated Root Image Analysis (saRIA). *Sci Rep* 9, 19674
- Nelson MN, Moolhuijzen PM, Boersma JG, Chudy M, Lesniewska K, Bellgard M, Oliver RP, Swiecicki W, Wolko B, Cowling WA, Ellwood SR (2010) Aligning a New Reference Genetic Map of *Lupinus angustifolius* with the Genome Sequence of the Model Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res* 17:73–83
- Pfannkuchen, HJ (2007): Luzerne – die Königin der Futterpflanzen! *Innovation1/ 2007, Feldfutter, DSV-Saaten*, S. 20-21
- Rocher S, Jean M, Castonguay Y, Belzile F (2015): Validation of Genotyping-By-Sequencing Analysis in Populations of Tetraploid Alfalfa by 454 Sequencing. *PLoS ONE* 10(6): e0131918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131918>
- Saha, MC, Bhandari, HS, Bouton, JH (2013): *Bioenergy feedstocks: Breeding and genetics*. John Wiley & Sons, Inc., Blackwell Publishing, USA, 207-231
- Sakiroglu M, Brummer EC (2017): Identification of loci controlling forage yield and nutritive value in diploid alfalfa using GBS-GWAS. *Theor Appl Genet* 130: 261-268
- Schmidt, M., Hahn, V., Altmann, B., Gerling, T., Gerber, I. C., Weltmann, K. D., & von Woedtke, T. (2019). Plasma-Activation of Larger Liquid Volumes by an Inductively-Limited Discharge for Antimicrobial Purposes. *Applied Sciences*, 9(10), 2150.
- Schmidtke, K (2016): *Futterleguminosen: Bestandesetablierung, Düngung und Nutzungsregime*. Bioland Bayern e.V., Wintertagung
- Schnabel, U.; Andrasch, M.; Weltmann, K.-D.; Ehlbeck, J. (2015) Inactivation of Microorganisms in Tyvek® Packaging by Microwave Plasma Processed Air. *Glob. J. Biol. Agric. Health Sci.*, 4, 185–19
- Starić, P., Vogel-Mikuš, K., Mozetič, M., & Junkar, I. (2020). Effects of nonthermal plasma on morphology, genetics and physiology of seeds: A review. *Plants*, 9(12), 1736.
- Stein, N., Herren, G., & Keller, B. (2001). A new DNA extraction method for high-throughput marker 715 analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding*, 120(4), 354–356. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00615>
- Sterilization of health care products - Biological indicators - Part 1: General requirements (ISO 11138-1:2017); German version EN ISO 11138-1:2017.
- Stuteville, DL, Erwin, DC (1990): *Compendium of alfalfa diseases*, APS Press, USA
- Thaysen, J (2013): Luzerne braucht gute Standorte. *Bauernblatt Schleswig-Holstein*, 39
- Verlactt, C. C. W., Van Boxem, W., & Bogaerts, A. (2018). Transport and accumulation of plasma generated species in aqueous solution. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(10), 6845-6859.
- Wannicke, N., Wagner, R., Stachowiak, J., Nishime, T. M., Ehlbeck, J., Weltmann, K. D., & Brust, H. (2021). Efficiency of plasma-processed air for biological decontamination of crop seeds on the premise of unimpaired seed germination. *Plasma Processes and Polymers*, 18(1), 2000207.
- Wannicke, N., & Brust, H. (2023). Inactivation of the plant pathogen *Pythium ultimum* by plasma-processed air (PPA).

Applied Sciences, 13(7), 4511.

Wüstholtz JK (2017): Silage von jung genutzter Luzerne (*Medicago sativa*) als heimisches Proteinfutter in der ökologischen Geflügel- und Schweinefütterung. Dissertation, Universität Kassel

Xueyang Min, Zhengshe Zhang, Yisong Liu, Xingyi Wei, Zhipeng Liu, Yanrong Wang, Wenxian Liu (2017) Int. J. Mol. Sci. 2017, 18, 2440

Young ND, Debellé F, Oldroyd GE, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KF, Gouzy J, Schoof H, Van de Peer Y, Proost S, Cook DR, Meyers BC, Spannagl M, Cheung F, De Mita S, Krishnakumar V, Gundlach H, Zhou S, Mudge J, Bharti AK, Murray JD, Naoumkina MA, Rosen B, Silverstein KA, Tang H, Rombauts S, Zhao PX, Zhou P, Barbe V, Bardou P, Bechner M, Bellec A, Berger A, Bergès H, Bidwell S, Bisseling T, Choisne N, Couloux A, Denny R, Deshpande S, Dai X, Doyle JJ, Dutez AM, Farmer AD, Fouteau S, Franken C, Gibelin C, Gish J, Goldstein S, González AJ, Green PJ, Hallab A, Hartog M, Hua A, Humphray SJ, Jeong DH, Jing Y, Jöcker A, Kenton SM, Kim DJ, Klee K, Lai H, Lang C, Lin S, Macmil SL, Magdelenat G, Matthews L, McCorrison J, Monaghan EL, Mun JH, Najar FZ, Nicholson C, Noirot C, O'Brien M, Paule CR, Poulain J, Prion F, Qin B, Qu C, Retzel EF, Riddle C, Sallet E, Samain S, Samson N, Sanders I, Saurat O, Scarpelli C, Schiex T, Segurens B, Severin AJ, Sherrier DJ, Shi R, Sims S, Singer SR, Sinharoy S, Sterck L, Viollet A, Wang BB, Wang K, Wang M, Wang X, Warfsmann J, Weissenbach J, White DD, White JD, Wiley GB, Wincker P, Xing Y, Yang L, Yao Z, Ying F, Zhai J, Zhou L, Zuber A, Dénarié J, Dixon RA, May GD, Schwartz DC, Rogers J, Qué-tier F, Town CD, Roe BA. The Medicago Genome Provides Insight into the Evolution of Rhizobial Symbioses. Nature 480: 520–524

Yu L-X, Zheng P, Zhang T, Rodringuez J, Main D (2017): Genotyping-by-sequencing-based genome-wide association studies on *Verticillium* wilt resistance in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). Molecular Plant Pathology, 18: 187–194. doi:10.1111/mpp.12389

Zan Wang, Hongwei Yan, Xinnian Fu, Xuehui Li, Hongwen Gao (2013) Development of simple sequence repeat markers and diversity analysis in alfalfa (*Medicago sativa* L.) Mol Biol Rep 40: 3291-3298

10 Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt, bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

Vorträge

- Devabhakthini, N.: Ertrags- und Qualitätsparameter des Luzerne-Feldversuchs 2021. LFA Dummerstorf, 20.06.2022
- Dehmer, K.J.: Das LuzNutz-Projekt zur Erhöhung der Anbauwürdigkeit von Luzerne als Futterpflanze - erste Ergebnisse zu neuen Impulsen für die Königin der Futterpflanzen. 4. Nossener Fachgespräch Leguminosen, online, 04.10.2022
- Dehmer, K.J.: Neue Impulse für die „Königin der Futterpflanzen“ - erste Ergebnisse des LuzNutz-Projektes zur Erhöhung der Anbauwürdigkeit von Luzerne in Deutschland. Leguminosentage Ost, online, 06.12.2022
- Devabhakthini, N.: Erhöhung der Anbauwürdigkeit von Luzerne (*Medicago sativa* L.) als Futterpflanze. Schwerpunkt: Feldversuch 2022. LFA Dummerstorf, 22.05.2023
- Devabhakthini, N.: Exploring the genetic diversity of the IPK *Medicago* germplasm collection using GBS. 35th EUCARPIA Fodder Crop and Amenity Grasses Section Conference, Brno, 12.09.2023
- Devabhakthini, N.: From shoots to roots: Phosphorus Phenotyping in the Leibniz IPK *Medicago* accessions. P campus symposium, Rostock-Warnemünde, 10.10.2023

Poster

- Devabhakthini, N., M. Kavka, C. Böhm, E. Willner & K.J. Dehmer: Exploring Alfalfa Diversity: Yield, Quality and Potential as a Forage Crop. PSSC Conference, Gatersleben, 03.-04.07.2023
- Devabhakthini, N., D. Harpke, R. Haghi, M. Kavka, E. Willner & K.J. Dehmer: Genotyping for Diversity and Phenotyping for Phosphorus Utilisation efficiency in IPK's *Medicago* Germplasm Collection. GPZ Conference, Geisenheim, 19.-21.03.2024

Publikationen

- aktuell sind drei referierte Publikationen von N. Devabhakthini in verschiedenen Fachzeitschriften geplant; diese werden im Lauf des Jahres 2024 eingereicht.