

Note

Chemische Unterscheidungsmerkmale der Samen von *Trifolium repens* L. und *Trifolium repens* L. var. *giganteum*

J. SACHSE

Eidgenössische Forschungsanstalt für landwirtschaftlichen Pflanzenbau, Reckenholzstrasse 191/211, CH-8046 Zürich (Schweiz)

(Eingegangen am 26. September 1986)

Trifolium repens L. und *Trifolium repens* L. var. *giganteum* sind wertvolle Futterpflanzen, die sich in ihren agronomischen Eigenschaften deutlich unterscheiden¹.

In der Liste der empfohlenen Gräser und Kleesorten waren in der Schweiz seit 1976 die Sorten Ladino und Milkanova aufgeführt^{2,3}. Milkanova entspricht *T. repens* L. und Ladino *T. repens* L. var. *giganteum*. Seitdem wurde die Liste um einige Weisskleearten erweitert, die ihrem Habitus nach zu dem einen oder anderen Typ gehören. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal bietet der Blausäuregehalt in der Weisskleepflanze, der bei *T. repens* L. ein mittlerer, hingegen bei *T. repens* L. var. *giganteum* niedrig ist (siehe Tabelle I).

Obgleich Weisskleeasamen verschiedene Farben aufweisen, können diese nicht als Sortenmerkmal gewertet werden, weil sie von der Reife und der Lagerzeit der Samen abhängen. Ebenso wenig charakteristisch ist ihr Tausendkorngewicht und ihr sehr geringer Blausäuregehalt. Aus diesen Gründen kommt es gelegentlich zu Verwechslungen von Saatgut. Bisher ist eine Identifizierung nach Aussaat der Samen erst in einigen Wochen an Hand der grünen Pflanze möglich gewesen. Da in der Literatur von Unterscheidungsmerkmalen in Weisskleeasamen bis jetzt noch nichts berichtet wurde, soll versucht werden, individuelle Kennzeichen im Saatgut dieser Futterpflanzen zu finden.

EXPERIMENTELLES

Reagentien

Petroläther (Kp. 40–70°C), Seesand feinkörnig, Natriumsulfat rein, wasserfrei, Hexan p.a., 2 N methanolische Kalilauge, Ölsäure-, Linolsäure- und Linolensäuremethylester, Stickstoff 99,99%, Pressluft, Wasserstoff.

Geräte

Elektrische Kaffeemühle, Heizkalotten, Kühler, Rundkolben 250 ml mit Schliff, Soxhletapparat und -hülsen, Vakuumtrockenschrank, Tischzentrifuge, Zentrifugenrohre 10 ml mit Plastikstopfen, Tablettenröhrchen 5 ml mit Plastikstopfen, Gaschromatograph Hewlett-Packard 5830 A mit Flammenionisationsdetector, GC-Terminal Hewlett-Packard 18 850 A, GC-Säule, 1,8 m × 2 mm I.D., Chromosorb W AW 100–200 mesh, belegt mit 6% SP-2300.

TABELLE I

UNTERSCHIEDSMERKMALE AM SPROSS VON *TRIFOLIUM REPENS* L. UND *TRIFOLIUM REPENS* L. VAR. *GIGANTEUM*

Botanische Bezeichnung	Wuchs	Blätter	Kleekrebsanfälligkeit	Landwirtschaftl. Ertrag	Blausäuregehalt	Sorten
<i>Trifolium repens</i> L.	Niedrig bis mittelhoch	Mittelgross bis klein	Gering bis mittel	Mittel	Mittel bis hoch	Milkanova Sandra Nesta Alban Sonja
<i>Trifolium repens</i> L. var. <i>giganteum</i>	Hoch	Gross	Hoch	Hoch	Gering	Ladino Regal Merit Sacramento Titan

Extraktion

Gemahlene Kleesamen (10–15 g) in einer Soxhlet-Apparatur mit Petroläther 48 h extrahieren. Den Soxhlethülsen etwa 3 g wasserfreies Natriumsulfat beigegeben, um den Petroläther während der Extraktion zu trocknen. Den Rundkolben gegen einen eventuellen Siedeverzug einige Seesand-Körnchen beifügen. Vom erhaltenen Extrakt den Petroläther schonend abdestillieren, einen kleinen Rest mit Stickstoff ausblasen und das Öl im Vakuumtrockenschrank 2 h bei 85°C trocknen.

Umesterung

Das getrocknete Fett (200 mg) in kleine Zentrifugenrohre einwiegen, das Öl in 5 ml Hexan lösen und mit 0,6 ml 2 N methanolischer Kalilauge versetzen. Das Zentrifugenrohr verschliessen, sofort 20 s kräftig schütteln, genau 40 s stehen lassen und sofort 2 min zentrifugieren. Einen Teil der oberen Phase in kleine Tablettenröhrchen dekantieren, mit wenig wasserfreiem Natriumsulfat versetzen und bis zur gaschromatographischen Untersuchung im Kühlschrank aufbewahren. Die Proben für das vollständige Chromatogramm unverdünnt verwenden, für das Teilchromatogramm 1:30 vor der Injektion verdünnen.

Gaschromatographische Bedingungen

Injizierte Probenmenge für unverdünnte Proben 0,5 µl, für verdünnte 0,3 µl. Für das Teilchromatogramm 30 ml Stickstoff/min, Injektortemperatur 230°C, Detektortemperatur 250°C, Ofentemperatur 200°C, Dämpfung 6, Peakschwellenwert 0,3, Papiervorschub 1 cm/min, Integrationsunterdrückung 3 min am Anfang des Laufs, Stopp nach 7 min. Für das vollständige Chromatogramm 60 ml Stickstoff/min, Ofentemperatur 4 min 175°C, Anstieg auf 200°C in Raten von 2°C/min, 10 min, bei 200°C belassen, Integrationsunterdrückung 0,4 min nach dem Start, Stopp nach 25 min. Die übrigen Bedingungen sind die gleichen wie für das Teilchromatogramm.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Auf der Suche nach einem Unterscheidungsmerkmal zwischen den Weisskleetypen *T. repens* L. und *T. repens* L. var. *giganteum* bot sich die Extraktion der Samen mit verschiedenen Lösungsmitteln und die Untersuchung der Extrakte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie an.

Zur Extraktion wurden polare bis apolare Lösungsmittel, nämlich je 50 ml Wasser, Äthanol, Essigsäureäthylester, Chloroform und Petroläther für 1 g Kleesamen verwendet. Eine Extraktion wurde mit Aceton vorgenommen, nachdem das Material 1 h mit 2 N Salzsäure hydrolysiert worden war.

Die Dünnschichtchromatographie wurde sowohl auf Kieselgel Merck Typ 60 ohne Aktivierung als auch auf Polyamid Woelm Eschwege durchgeführt. Als Fließmittel dienten *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (100:10:30) für den wässrigen, Petroläther-Aceton (50:50) für den äthanolischen bzw. Essigesterextrakt, dasselbe Fließmittel im Verhältnis 40:30 für den Chloroformextrakt und für den Petrolätherextrakt im Verhältnis 40:20. Die Extrakte wurden im Vakuum eingedampft und der Rückstand in 1 ml entsprechendem Lösungsmittel gelöst. Die Auftragsmenge betrug 100 μ l. Neben der Flüssigextraktion wurde noch der gepulverte Samen im TAS-Ofen nach E. Stahl bei verschiedenen Temperaturen erhitzt und flüchtige Substanzen direkt auf der Dünnschichtplatte aufgefangen. Als Sprühmittel wurden folgende nach Stahl⁴ ausgewählt: Ninhydrin No. 176, Schwefelsäure-Methanol No. 217, Naturstoffreagens nach Neu No. 80 sowie 10%ige Ammoniaklösung. Die Dünnschichtplatten wurden vor und nach dem Besprühen bei Tages- und UV-Licht betrachtet. Von all den Versuchen, einschliesslich des hydrolysierten Acetonextraktes, ergaben der Chloroformextrakt und das Naturstoffreagens die eindrucklichsten Dünnschichtplatten. Gelbe, orangefarbene, rote, grüne und blaue Flecken waren unter der UV-Lampe sichtbar, die ersten auch bei Tageslicht, die wohl auf Flavonoide vor allem aus der Samenschale zurückzuführen sind. Vergleiche zwischen den Sorten Milkanova und Ladino zeigten zwar quantitative aber keine qualitativen Unterschiede. Da das ungleiche Aussehen der Samen schon durch die Samenreife und ihre Lagerzeit bedingt ist, dürften die quantitativen dünnschichtchromatographischen Unterschiede ebenfalls diesen Einflüssen zuzuschreiben sein. Auch das TAS-Verfahren liess keine Differenzen zwischen den untersuchten Sorten erkennen.

Elektrophorese der Samenproteine

Eine weitere Möglichkeit, verschiedene Wesensmerkmale zwischen hoch- und niedrigwachsenden Weisskleesorten zu finden, bot die Elektrophorese der Samenproteine. Drei Verfahren wurden getestet:

(1) Die Auftrennung wasserlöslicher Proteine bei pH 7,9 in Polyacrylamid nach Stegemann und Loeschke⁵. Hier bestand bei Haupt- und Nebenbanden kein Unterschied zwischen den Sorten.

(2) Die Trennung von Proteinen, die in 70%igen Äthanol löslich sind, bei pH 3,1 auf Polyacrylamid⁶. Bei diesem Versuch waren überhaupt keine Banden sichtbar, d.h. es sind keine alkohollöslichen Proteine vorhanden.

(3) Die Elektrophorese pufferlöslicher Proteine bei pH 6,8 mit Natriumdodecylsulfatzusatz in Polyacrylamidgel⁷ bei pH 8,3 ergab viele Banden, aber keine Abweichungen im Proteilmuster.

Fettsäuremuster

Da Samen meist Fett enthalten, Kleesamen etwa 6%, lag es nahe, das Fettsäuremuster der Sorten zu prüfen. Wie im experimentellen Teil ersichtlich, wurde das Rohfett nach Soxhlet gewonnen, und die Fettsäuren wurden zu Methylestern umgeestert. Ein Vergleich der Ergebnisse, die mit der beschriebenen Umesterungsmethode und mit dem Bortrifluorid-Verfahren nach van Wijngaarden⁸ erzielt wurden, zeigten Übereinstimmung. Die Reproduzierbarkeit der Umesterung liegt für die interessierenden Fettsäuren bei *T. repens* L. und *T. repens* L. var. *giganteum* über 99%.

Wie das Gaschromatogramm (Fig. 1) zeigt, sind mindestens 15 Fettsäuren im Kleesamen enthalten, die nahezu in allen untersuchten Sorten vertreten sind. Hauptkomponenten sind die Palmitinsäure (11–13%), die Stearinsäure (etwa 3%), die Ölsäure (6–15%), die Linolsäure (54–67%) und Linolensäure (4–8%) bezogen auf die Gesamtfettsäuremenge. Die Ansprechbarkeit des Flammenionisationsdetektors auf die verschiedenen Fettsäuren wurde in diesem Versuch nicht berücksichtigt. Neben den genannten Fettsäuren wurden noch die Arachinsäure und die Erucasäure nach ihren Retentionszeiten identifiziert.

Die Unterscheidung der Weisskleearten an ihrem Samen Fett ist durch die Untersuchung des Fettsäuremusters nicht qualitativ, wohl aber quantitativ am Prozentgehalt zweier Fettsäuren, der Öl- und Linolsäure, innerhalb der gesamten Fettsäuremenge möglich. Wir konnten feststellen, dass hochwüchsige Sorten im Samen

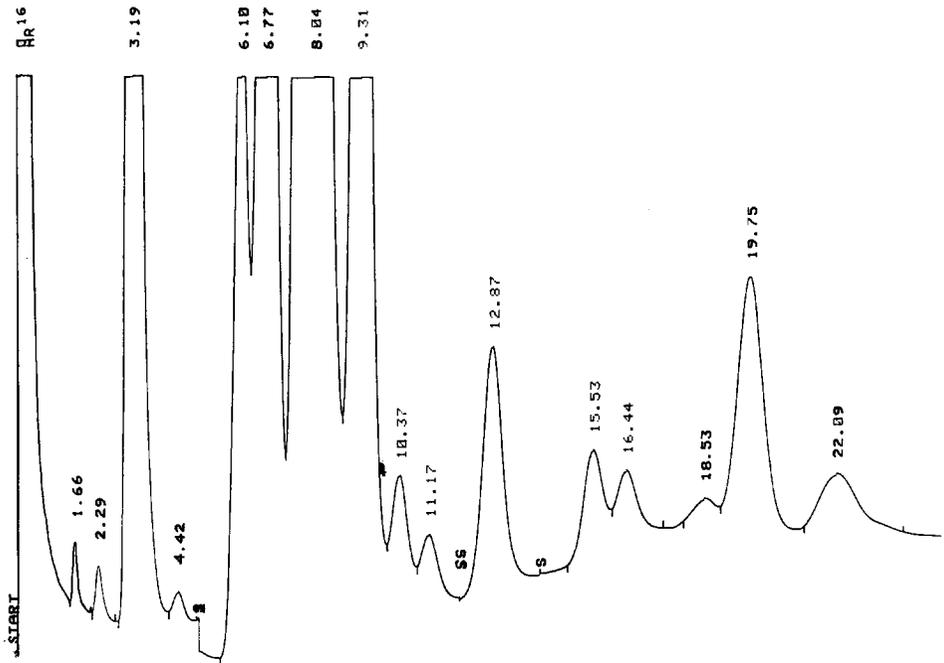


Fig. 1. Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester aus Milkanovasamen. Gaschromatographische Bedingungen siehe experimentellen Teil. Palmitinsäure ($t_R = 3,19$ min); Stearinsäure (6,10 min); Ölsäure (6,77 min); Linolsäure (8,04 min); Linolensäure (9,31 min); Arachinsäure (10,37 min); Heneicosansäure (zusgesetzt) (12,87 min); Erucasäure (16,44 min).

TABELLE II

RELATIVER GEHALT AN AUSGEWAHLTEN FETTSÄUREN IN WEISSKLEESAMEN VERSCHIEDENER SORTEN

Relativer Gehalt bezogen auf die gesamte Fettsäuremenge. \bar{x} = Mittelwert aus zwei Einzelwerten, Einzelwerte aus einer Fettextraktion, einer Veresterung und zwei Einspritzungen in den Gaschromatographen. d = Prozentuale Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert \bar{x} ; \bar{d} = mittlere prozentuale Abweichung.

Weisskleeart	Ernte- jahr	Züchter	Ölsäure (%)	\bar{x}	d
<i>Trifolium repens L.</i>					
Milkanova	1983	Dansk Plante- foraedling (Dänemark)	11,20	11,19	0,1
			11,18		
	1984	Dansk Plante- foraedling (Dänemark)	7,48	7,65	2,2
Milo	1985	Dansk Plante- foraedling (Dänemark)	7,82	8,90	0,6
			8,85		
	1982	Dansk Plante- foraedling (Dänemark)	8,95		
DP 79-S-6	1983	Dansk Plante- foraedling (Dänemark)	10,95	11,23	1,5
			11,40		
WW V 14	1979	Weibullsholm (Schweden)	11,01	10,99	0,2
			10,96		
	1982	Weibullsholm (Schweden)	9,08	9,02	0,7
Sandra	?	Svalöf (Schweden)	8,96	12,20	0,9
			11,29		
			11,42		
Sv 0437	1984	Svalöf (Schweden)	11,14	9,49	0,8
			10,91		
Nesta	1983	Nat. Seed Develop. Organisation (Grossbritannien)	12,31	10,21	1,3
			12,08		
	1984	Nat. Seed Develop. Organisation (Grossbritannien)	9,57	10,52	0,05
Alban	1984	Daehnfeldt (Dänemark)	10,51	7,09	1,0
			7,16		
Sonja	1984	Weibullsholm (Schweden)	7,02	10,58	1,8
			10,38		
			10,77		
<i>Trifolium repens L. var. giganteum</i>					
Ladino	1983	Cal/West Seeds (U.S.A.)	17,90	17,88	0,1
			17,85		
Regal	1982	Cal/West Seeds (U.S.A.)	17,28	17,42	0,8
			17,56		
	1983	Cal/West Seeds (U.S.A.)	15,83	15,90	0,4
Merit	1984	Cal/West Seeds (U.S.A.)	15,97	16,15	2,1
			15,80		
	1985	Cal/West Seeds (U.S.A.)	16,50	16,79	3,2
Sacramento	1983	Sacramento Milling (U.S.A.)	17,34	14,46	0,3
			16,24		
	1983	Sacramento Milling (U.S.A.)	14,42	17,70	0,1
Titan	1983	Northrup King (U.S.A.)	14,50	16,51	0,1
			17,71		
			17,68		
			16,53		
			16,48		
					$\bar{d} = 0,9$

<i>Linol- säure</i> (%)	\bar{x}	d	<i>Linolen- säure</i> (%)	\bar{x}	d	<i>Öl- u. Linolens.</i> (%)	<i>Linolsäure/- Öls. u. Linolens.</i>
78,84			6,77				
78,88	78,86	0,03	6,75	6,76	0,1	17,95	4,39
80,77			9,24				
80,23	80,50	0,3	9,40	9,32	0,9	16,97	4,74
79,45			8,88				
79,51	79,48	0,04	8,81	8,85	0,3	17,75	4,47
78,83			6,34				
80,07	79,45	0,8	6,06	6,20	2,2	17,43	4,55
78,47			7,86				
78,55	78,51	0,05	7,86	7,86	0	17,85	4,40
79,55			8,74				
79,73	79,64	0,1	8,79	8,77	0,2	17,79	4,48
79,08			6,30				
78,60	78,84	0,3	6,47	6,39	1,2	17,75	4,41
77,91			7,98				
79,16	78,54	0,8	7,16	7,52	5,2	18,60	4,22
77,36			7,03				
78,15	77,76	0,5	6,51	6,77	3,7	18,97	4,10
79,76			7,91				
79,72	79,74	0,03	8,08	8,00	1,0	17,49	4,56
79,32			7,33				
78,89	79,11	0,3	7,52	7,43	1,2	17,64	4,48
79,19			7,34				
79,10	79,15	0,05	7,41	7,38	0,4	17,90	4,42
80,53			10,05				
80,13	80,33	0,2	10,65	10,35	2,8	17,44	4,61
79,83			7,35				
79,42	79,63	0,3	7,15	7,25	1,4	17,83	4,47
71,40			7,37				
71,74	71,57	0,03	7,42	7,40	0,3	25,28	2,83
73,74			5,32				
74,00	73,87	0,2	4,90	5,11	4,0	22,53	3,28
74,65			5,46				
75,21	74,93	0,4	5,94	5,70	4,0	21,60	3,47
75,03			5,01				
75,50	75,27	0,3	5,51	5,26	4,5	21,41	3,52
74,31			5,58				
73,77	74,04	0,4	5,90	5,74	2,8	22,53	3,29
74,85			8,15				
74,76	74,81	0,05	8,13	8,14	0,1	22,60	3,31
72,24			6,86				
72,84	72,54	0,4	6,39	6,63	3,4	24,33	2,98
73,25			6,91				
73,64	73,58	0,1	6,84	6,88	0,4	23,39	3,15
		$d = 0,3$			$\bar{d} = 1,8$		

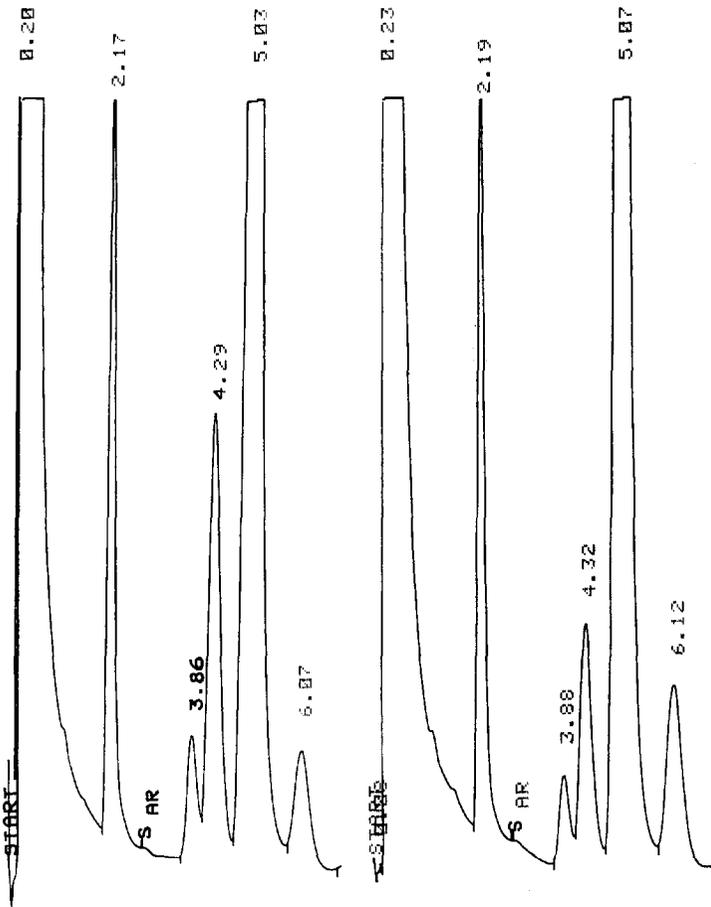


Fig. 2. Gekürztes Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester aus Samen von *Trifolium repens* L. var. *giganteum* (links) und *Trifolium repens* L. (rechts). Gaschromatographische Bedingungen siehe experimentellen Teil. Palmitinsäure ($t_R = 2,17/2,19$ min); Stearinsäure (3,86/3,88 min); Ölsäure (4,29/4,32 min); Linolsäure (5,03/5,07 min); Linolensäure (6,07/6,12 min).

einen höheren Ölsäuregehalt (etwa 13–16%) und einen tieferen Linolsäuregehalt (etwa 54–63%) aufweisen als niedrig wachsende Weisskleesorten (7–10 bzw. 64–67%). Zwischen den Gehalten an Palmitinsäure besteht in den zwei Weisskleetypen kein Unterschied. Wohl aber ein geringer im Linolensäurevorkommen, der bei *T. repens* L. zwischen 5 und 8%, bei *T. repens* L. var. *giganteum* zwischen 4 und 6% liegt. Allerdings ist die Schwankungsbreite der Messergebnisse bei diesen geringen Säureanteilen höher als bei Öl- und Linolsäure.

Um die Untersuchung zu vereinfachen, haben wir uns auf die quantitative Erfassung der Fettsäuren beschränkt, die in den zwei Weisskleetypen in unterschiedlicher Menge vorkommen, das sind die Öl- und Linolsäure. Da die erwähnten Fettsäuren sehr ähnliche Retentionszeiten haben, konnten wir am Anfang des Chromatogramms die Peakintegration 3 min unterdrücken und nach 7 min auf die später

elierten Fettsäuren verzichten (Fig. 2). Ausserdem mussten die gewonnenen Methyl-ester 30-fach verdünnt werden, da die für uns wesentlichen Fettsäuren in sehr hoher Konzentration vorliegen. Aus dem veränderten Chromatographieverfahren resultieren andere Prozentgehalte der gesuchten Fettsäuren, die in Tabelle II von den untersuchten Sorten aufgeführt sind. Um die Schwankungen der Ergebnisse gering zu halten, wurde der Gehalt von Öl- und Linolensäure addiert und diese Summe in Beziehung zum Gehalt an Linolsäure gesetzt. Der sich daraus ergebende Quotient kann zur Unterscheidungen von Sorten aus *T. repens* L. und *T. repens* L. var. *giganteum* dienen. Allerdings ist zu prüfen, ob sich dieser Quotient tatsächlich aus den in Tabelle II erhaltenen Werten ergeben hat. Die Unterschiede im Öl- und Linolsäuregehalt der beiden Kleetypen sind nach dem *t*-Test zu mehr als 99% gesichert, der im Linolensäuregehalt zu mehr als 95%. Werden die Prozente an Öl- und Linolensäure für jede Sorte addiert, so unterscheiden sich die Summen von *T. repens* L. und *T. repens* L. var. *giganteum* ebenfalls mit 99%iger Sicherheit. Dasselbe gilt für die jeweiligen Quotienten aus dem Verhältnis der Summe Öl- und Linolensäure zu Linolsäure.

Für die Sorten, deren Ölsäure- und Linolsäuregehalt zwischen den angegebenen Richtwerten liegt, z.B. für Menna, Luclair, Astra, Rena, Aran, Ross und Lune de Mai, dürften keine Zuordnungen möglich sein. Durch das freundliche Entgegenkommen einiger Saatzuchtfirmen waren wir in der Lage, das gefundene Unterscheidungsmerkmal für die zwei Weisskleetypen an weiteren Sorten verschiedener Herkunft und Anbaujahre zu testen. Ihr Einfluss auf das Fettsäuremuster war sehr gering, weshalb geschlossen werden kann, dass dieser deutliche Gehaltsunterschied an Öl- und Linolsäure genetisch bedingt ist und in Zukunft für die Unterscheidung von niedrig- und hochwüchsigen Weisskleesorten an Hand ihrer Samen in der Regel benutzt werden kann.

LITERATUR

1. J. Lehmann und U. Zihlmann, *Mitt. Schweiz. Landwirtschaft.*, 28 (1980) 130.
2. J. Lehmann und J. P. Charles, *Mitt. Schweiz. Landwirtschaft.*, 25 (1977) 103.
3. J. Lehmann, H. U. Briner, E. Meister und D. Joggi, *Mitt. Schweiz. Landwirtschaft.*, 32 (1984) 96.
4. E. Stahl, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, S. 815.
5. H. Stegemann und V. Loeschcke, *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft., Berlin-Dahlem*, 168 (1967).
6. R. Tkachuk und V. J. Methlish, *Ann. Technol. Agric.*, 29 (1980) 207.
7. P. T. Payne, K. G. Corfield und J. A. Blackman, *Theor. Appl. Genet.*, 55 (1979) 153.
8. D. van Wijngaarden, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 848.