

## **Erarbeitung der Voraussetzungen zur Entwicklung einer sterilen Kamillesorte - Phase 1**

<b>Laufzeit</b>	01.06.2012 - 28.02.2014 / 01.10.2015 – 30.11.2018
<b>Forschungsstelle 1</b>	Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Corrensstraße 3 06466 Gatersleben
<b>Projektleitung</b>	Dr. Lars-Gernot Otto
<b>Forschungsstelle 2</b>	PHARMAPLANT Arznei- und Gewürzpflanzen Forschungs- und Saatzucht GmbH Straße am Westbahnhof 4 06556 Artern
<b>Projektleitung</b>	Dr. Andreas Plescher
<b>Forschungsstelle 3</b>	Veterinärmedizinischen Universität Wien Institut für Tierernährung und Funktionelle Pflanzenstoffe Veterinärplatz 1 A - 1210 Wien
<b>Projektleitung</b>	Ao. Univ. Prof. Johannes Novak
<b>Förderung</b>	Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz unter den Förderkennzeichen 22038911 und 22006314 aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages.

Gefördert durch:  
 Bundesministerium  
für Ernährung  
und Landwirtschaft  
aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages



### **Problemstellung/Zielsetzung**

Im dem Projekt werden methodische und materielle Grundlagen zur Züchtung einer sterilen Kamillesorte (*Matricaria recutita* L.) erarbeitet. Während sterile triploide Sorten in der Obst- und Zierpflanzenzüchtung seit langem einen festen Platz haben, wären sie bei Arznei- und Gewürzpflanzen, d. h. auch bei Kamille, eine absolute Neuheit.

Eine sterile Kamillesorte würde einen echten Qualitätssprung einleiten, verbunden mit einer neuen Generation von Kamillesorten. Ein Vorteil einer sterilen samenlosen Kamillesorte wäre der fehlende Ausfall von Saatgut aus den bei der praxisüblichen maschinellen Pflücke nicht erfassten Blüten. Kamille bereitet große Probleme in den Folgekulturen, da die Samen im Boden bis zu 15 Jahre keimfähig bleiben und es ein sehr schwer bekämpfbares Beikraut ist, was eine intensive Herbizidanwendung zur Folge hat. Neue Flächen für den Kamilleanbau lassen sich aufgrund dessen meistens nur schwer gewinnen. Eine sterile Kamillesorte könnte die

Vorraussetzung dazu schaffen, die Anbaufläche für Kamille auszuweiten, während gleichzeitig die Verfügbarkeit von ehemaligen Kamilleanbauflächen für andere Kulturpflanzen gesteigert werden könnte. Durch den einfacheren Fruchtwechsel könnte somit die Vielfalt der landwirtschaftlichen Kulturen (Agrobiodiversität) erhöht und die Akkumulation von Kamillekrankheiten in den Anbauflächen unterbunden werden. Letzteres stellte in den letzten Jahren ein zunehmendes Problem dar.

Desweiteren könnte das Ausbleiben der Samenbildung zu einer Verlängerung der Blühdauer der Einzelblüten und in Folge zu einem erweiterten Erntezeitfenster für die einzelnen Pflücktermine, einer längeren Blühperiode der Bestände und insgesamt zu verbesserter Ertragsfähigkeit führen.

Ein Ziel der Projektphase 1 ist es, Triploide als ein Weg zu einer sterilen Kamillesorte in Sorten, Populationen und Zuchtmaterial zu identifizieren, selektieren und charakterisieren. Es soll nachgewiesen werden, dass diese den geforderten Voraussetzungen hinsichtlich Ploidiestabilität, Sterilität, Ertrag und Blühverhalten entsprechen und eine ausreichende Regenerationsfähigkeit aufweisen.

Das zweite Arbeitsziel besteht darin, einen für Kamille funktionierenden Sterilitätsmechanismus aufzufinden, der es erlaubt, für die Triploidenzüchtung stabile männlich sterile und weiblich fertile Mutterlinien zu entwickeln. Bei geschlossenem Feldanbau als sterile Population könnten diese Linien ggf. bereits die angestrebten Ziele erreichen.

## **Sachstand**

### **Selektion und Erzeugung von triploiden Pflanzen als ein Weg zur Erzeugung einer sterilen Kamillesorte**

Es wurden triploide Kamillepflanzen identifiziert und selektiert. Neben der Identifizierung von spontan entstandenen triploiden Pflanzen in Sorten und Populationen wurden ebenfalls Analysen an Saatgut sowie gezielte Kreuzungen zwischen di- und tetraploiden Kamillepflanzen durchgeführt.

Die Sorte 'Bodegold' erwies sich bei den durchgeführten Untersuchungen mehrheitlich als eine Mischung von di- und tetraploiden Pflanzen. Saatgut höherer Ploidie war dabei tendenziell schwerer. Die Fraktionierung von Saatgut der Sorte 'Bodegold' nach Gewicht offenbarte eine Anreicherung von Samen mit triploiden Embryonen in der schweren Saatgutfraktion. Nach Aussaat dieser Fraktion wurden identifizierte triploide Pflanzen zur Erhaltung und Vermehrung in die *in-vitro* Kultur überführt und nachfolgend für die Versuche genutzt.

180 gezielte interploide Kreuzungen zwischen di- und tetraploiden Pflanzen und in reziproker Kreuzungsrichtung wurden ohne Kastration und unter Isolation mit Crispac-Beuteln durchgeführt. Unter den Nachkommen wurden in geringem Umfang triploide Pflanzen identifiziert. Die Anzahl an erhaltenen Nachkommen aus den einzelnen Kreuzungskombinationen variierte erheblich und könnte zu einem großen Teil auf Selbstungen zurückzuführen sein. 16 gezielte interploide Kreuzungen ohne Kastration in freier isolierter Abblüte (Isolierstellen bzw. Isolierkabinen im Gewächshaus) führten zu einem deutlich höheren Anteil an Triploiden unter den Nachkommen (bis zu 17 %). Zwischen den verschiedenen Kombinationen konnten dabei signifikante Unterschiede bzgl. des Anteils Triploider identifiziert werden, was als Hinweis auf eine unterschiedliche Kreuzbarkeit der verschiedenen Elternpflanzen gewertet werden kann. Die erfolgreiche gezielte Erzeugung triploider Kreuzungsnachkommen belegt, dass grundsätzlich die Erzeugung einer triploiden Kamillesorte möglich ist.

Für die erfolgreiche Erzeugung einer triploiden, sterilen Kamillesorte ist ein funktionierender Mechanismus für männliche Sterilität/Selbstinkompatibilität bei den mütterlichen Kreuzungseltern notwendig, um Selbstungen auszuschließen.

#### Stabilität der Ploidie

Es ließen sich keine Anzeichen für deutliche Unterschiede in der Frequenz Triploider zwischen frühem (Embryo) und spätem (Pflanze) Entwicklungsstadium finden ( $X^2$ -Test für gleiche Frequenz bei 'Bodegold' „schwere Fraktion“,  $p=0,6$ ). Dies kann als Indiz dafür gewertet werden, dass sich erzeugte triploide Embryonen regulär aus reifen Samenkörnern entwickeln und nicht abortieren.

Die Ploidie der Triploiden erwies sich als stabil. Die wiederholte durchflusszytometrische Analyse (auch nach mehrjähriger *in-vitro* Kultur und Feldversuch) von den verklonten triploiden sowie di- und tetraploiden Pflanzen hat die Ploidie bestätigt. Veränderungen wurden nicht gefunden. Stichprobenartig wurden die durchflusszytometrischen Einzelmessungen durch mikroskopische Bestimmung der Chromosomenzahl verifiziert.

#### Prüfung von triploiden Pflanzen

13 der identifizierten triploiden Pflanzen sowie di- und tetraploide Vergleichspflanzen wurden in der *in-vitro* Kultur per Verklonung vermehrt und in verschiedenen Jahren im Parzellen-Freilandversuch getestet. Desweiteren wurden triploide Genotypen jeweils mit mehreren Klonpflanzen in einer rein triploiden Population an drei verschiedenen Freilandstandorten getestet (Simulation des Feldbestandes einer triploiden Kamillesorte) sowie als Einzelgenotypen in freier isolierter Abblüte untersucht. Da die gewünschte triploide Sorte nicht nur hochgradig steril sein muss, sondern agronomisch auch hinreichend leistungsfähig zu sein hat, wurde insbesondere auch der Ertrag untersucht. Es zeigte sich bei Kamille - unabhängig von der Ploidie - oft eine hohe Variabilität zwischen den Genotypen hinsichtlich der untersuchten Merkmale (starke Individualunterschiede zwischen Einzelpflanzen im Kamillesortiment vorhanden). Die großen Unterschiede lassen sich damit erklären, dass die vorhandenen Kamillesorten Populationen sind, die sich speziell im tetraploiden Sortiment durch Inhomogenität auszeichnen.

Die Prüfung der Triploiden stellte den Meilenstein 1 des Vorhabens dar und entschied darüber, ob Triploide zur Entwicklung steriler Kamillesorten geeignet sind. Die wichtigsten Ergebnisse hierzu waren:

- (1) Die Sterilität der Triploiden war sehr hoch bis vollständig ausgeprägt (vereinzelt oder keine Nachkommen). An den Standorten des Populationsversuchs und den Isolierstandorten wurde keine Auflaufkamille beobachtet.
- (2) Der Ertrag war bei den Triploiden mindestens auf dem gleichen Niveau wie bei den Tetraploiden, mit einzelnen triploiden Genotypen von deutlich höherem Ertrag.
- (3) Die Blühdauer von di-, tri- und tetraploiden Pflanzen war im Durchschnitt als gleich zu bewerten, d. h. eine längere Blühdauer konnte bei den Triploiden nicht beobachtet werden.
- (4) Die Regenerationsfähigkeit war mindestens gleich gut.
- (5) Die Blütengröße von tetraploiden Pflanzen (Durchmesser Blütenboden Röhrenblüten) war im Durchschnitt größer als die von di- und triploiden. Triploide wiesen einen geringfügig größeren Durchmesser als Diploide auf.
- (6) Die Bestandeshöhe der Triploiden war vergleichbar mit der von Di- und Tetraploiden, mit einer gewissen Tendenz zu etwas größerer Höhe. Bei diesem Merkmal waren die individuellen Unterschiede allerdings sehr hoch, so dass sich keine sichere Aussage bzgl. einer durchschnittlich größeren Bestandeshöhe triploider Pflanzen treffen ließ.

Auf Grundlage der erzielten Ergebnisse wurden Triploide als geeignet zur Entwicklung steriler Kamillesorten angesehen; die Weiterverfolgung dieses Züchtungswegs wurde als sinnvoll erachtet. Die Sterilität der Triploiden war sehr hoch bis vollständig ausgeprägt und der Ertrag mindestens auf dem Niveau di- und tetraploider Sorten mit der Aussicht einer Ertragssteigerung durch die Triploidie. Gleichwohl sind alternativ andere Wege zur Entwicklung steriler Kamillesorten vorhanden, vor allem die geschlossene Abblüte männlich steriler Bestände.

### **Selektion/Erzeugung eines Sterilitätsmechanismus bei Kamille**

Für die erfolgreiche Erzeugung einer sterilen Kamillesorte sind männlich sterile, weiblich fertile Pflanzen nötig. Diese können entweder als Mutterpflanzen zur Erzeugung triploider Kamille dienen oder könnten ggfls. direkt bei geschlossenem Feldanbau als sterile Population die angestrebten Ziele (fehlender Samenausfall, längere Blühdauer) erreichen. Arbeiten an verschiedenen Systemen männlicher Sterilität wurden und werden im Gewächshaus und Freiland durchgeführt. Als aussichtsreich hierzu werden aufgrund der Ergebnisse (1) die männliche Sterilität (MS), (2) die cytoplasmatisch-männliche Sterilität (CMS) und (3) die Selbstinkompatibilität (SI) bewertet.

- Eine spontan entstandene männlich sterile, weiblich fertile Pflanze wurde gefunden. Nach Bestäubung mit fertilem Pollen von diversen Kamillesorten, wurden in der F<sub>2</sub>-Generation bislang 32 MS-Pflanzen identifiziert. Die MS wird folglich vererbt. Die Arbeiten sind aussichtsreich und werden fortgeführt.
- Saatgutbestrahlung zur Induktion von männlicher Sterilität war nicht erfolgreich, Versuche mit höherer Strahlendosis werden durchgeführt.
- Nach wiederholten Selbstungen im Gewächshaus und Freiland konnten Pflanzen ohne fertilen Samen bzw. ohne Nachkommen identifiziert werden. 9 selbstinkompatible Genotypen wurden erfolgreich in *in-vitro* Kultur zur Vermehrung und Erhaltung überführt. Die Weiterarbeit hinsichtlich Selbstinkompatibilität als mögliche Sterilitätsquelle ist zielführend und wird durchgeführt.
- Ein signifikant erhöhter Anteil männlich steriler Pollenkörner bei Nachkommen von Kreuzungen bestimmter Kamilleherkünfte wurde detektiert. Eine einfache Form der CMS ließ sich nicht bestätigen.
- Die Applikation von fünf getesteten Gametoziden zur chemischen Kastration war nicht aussichtsreich.

#### Die Arbeiten im Detail:

Während im Freiland in einem Bestand von 2.000 Pflanzen aus Züchtungsmaterial der Pharmaplant Arznei- und Gewürzpflanzen Forschungs- und Saatzucht GmbH keine MS-Pflanzen aufgefunden werden konnten, wurde in Gewächshauskultur eine Pflanze mit spontan entstandener MS in der Sorte 'Bona' identifiziert. Es wurde jeweils di- und tetraploide Kamille unterschiedlichster genetischer Herkunft untersucht. Die MS-Pflanze hat nur verkümmerte Antheren ohne Pollen ausgebildet. Nach Bestäubung mit fertilem Pollen von diversen Kamillesorten wurde das Saatgut der MS-Pflanze geerntet und nach Einhaltung der Samenruhe ausgesät. Die 49 erhaltenen blühenden F<sub>1</sub>-Nachkommen waren alle männlich fertil. In der F<sub>2</sub>-Generation wurden bislang 32 MS-Pflanzen identifiziert (ca. 10 %), d. h. die MS wird vererbt.

Zur Induktion von männlicher Sterilität bei Kamille wurden Bestrahlungsversuche an Saatgut mit einer Bestrahlungsdosis von 350 und 400 Gy Röntgenstrahlung durchgeführt. 150 m<sup>2</sup> des 400 Gy M<sub>2</sub>-Saatguts wurden dünn ausgedrillt, um die Auffindungsrate an Mutanten zu ermitteln. Untersuchungen des Bestandes auf abnormale morphologische Eigenschaften waren ohne Ergebnis. Eine weitere Bestrahlung durch eine Co-60-Quelle (vorwiegend  $\gamma$ -Strahlung) wurde durchgeführt, wobei die LD<sub>50</sub> wie bei der Röntgenstrahlung bei 400 Gy lag. Es wurde M<sub>2</sub>-Saatgut der 300 Gy und 400 Gy-Bestrahlungsstufen angebaut. Untersuchungen zur Ermittlung morphologischer Abweichungen in der M<sub>2</sub> sind noch nicht abgeschlossen.

In einem Versuch mit 280 Pflanzen aus 6 Herkünften („Herkunft USA“, 'Degumille', 'Germania', 'Bona', 'Lutea', 'Manzana') wurden unter Bestäubung mit Hilfe von Fliegen Pflanzen ohne Selbstungsnachkommen identifiziert. Da das Merkmal „Selbstinkompatibilität“ umweltabhängig sein kann, wurden Pflanzen, die nach Selbstung keine Nachkommen hatten, ein zweites Mal isoliert und bestäubt, um das Ergebnis zu verifizieren. Es wurden 21 potentielle selbstinkompatible Pflanzen identifiziert, wovon 9 mit Stecklingen und parallel erfolgreich in *in-vitro* Kultur überführt werden konnten. Um die Anzahl der vorhandenen Allele abschätzen zu können, wurden 8 SI-Pflanzen diallel miteinander gekreuzt. Es gab nur in zwei Kreuzungen keinen Samenansatz. Da davon ausgegangen werden kann, dass Kreuzungen mit Samenansatz unterschiedliche SI-Allele haben, spricht dies für eine sehr hohe Anzahl unterschiedlicher Allele der SI bei „Echter Kamille“. Die Anzahl an Allelen liefert Anhaltspunkte für die Komplexität der Selbstinkompatibilität. Die neun identifizierten SI-Pflanzen werden erhalten und über Stecklingsschnitt vermehrt, um für weitere Versuche zur Verfügung zu stehen. Eine Wiederholung der Überprüfung auf SI unter standardisierten Bedingungen ist geplant um festzustellen, bei welchen Umweltbedingungen die SI bei diesen Pflanzen stabil ist.

Desweiteren wurden in einem Feldversuch Kornansatz und Keimfähigkeit von 250 isoliert abblühenden Pflanzen erfasst, die aus 8 Kamilleherkünften aus Vorjahresversuchen stammten und als erfolgversprechend identifiziert wurden. Die Einzelpflanzen wurden mittels Gaze-Käfigen isoliert und die Bestäubung wurde durch Fliegen sichergestellt. Insgesamt 16 Genotypen aus 7 der 8 Herkünfte hatten in wiederholter Auswertung keine Nachkommen. Weitere Freilandversuche unter paralleler vegetativer Erhaltung der Pflanzen mittels Stecklingen werden durchgeführt, so dass identifizierte SI-Pflanzen anschließend dauerhaft vegetativ erhalten werden können (*in-vitro*) und somit für weitere Arbeiten zur Verfügung stehen.

Der Mechanismus der Selbstinkompatibilität bei Kamille ist momentan noch ungeklärt. Die Hauptfrage ist dabei, wie eine SI-Pflanze einen Pollen als ihren eigenen (oder mit einem bestimmten SI-Allel) erkennt. Dazu bedarf es – neben einer bestimmten Konstellation des Pollens – auch einer bestimmten Konstellation der Narbe.

Dementsprechend wurden Arbeiten zum Auffinden von Unterschieden von SI- und SK-Pflanzen durchgeführt. Unter anderem wurden in den Proteinextrakten von Kamillenpollen zwei Proteine identifiziert, die einer Aldehydoxidase (*GLOX1*) entsprechen. *GLOX1* bei *Arabidopsis* ist mit für den programmierten Zelltod der Tapetumzellen und für die Pollenentwicklung verantwortlich (Phan et al., 2011). Dies könnte somit ein Ansatzpunkt sein, um der Ursache für die Selbstinkompatibilität bei der „Echten Kamille“ auf den Grund zu gehen.

Neben *GLOX1* könnten Cutinasen für den Unterschied verantwortlich sein. Cutinasen sind eine Untergruppe der Esterasen, die in der Lage sind, Cutin zu hydrolisieren. Nach ersten Literaturhinweisen könnten diese bei der SI eine Rolle spielen. Es wurden zwar mittels spektroskopischem Essay signifikante Unterschiede in der Aktivität und Substratspezifität der Esterasen von SI- und SK-Pflanzen detektiert, allerdings lieferte die gezielte Hemmung der Cutinasen im Substrat mit Jodacetamid keine schlüssigen Ergebnisse. Die Versuche erlauben somit keine Rückschlüsse auf unterschiedliche Cutinase-Aktivität bei SI und SK. Zusätzlich zu den Untersuchungen des Pollenproteins wurden RNA-Sequenzierungen von zwei Blühstadien einer SK- und einer SI-Pflanze durchgeführt, um mögliche Unterschiede aufzufinden. Weitere Untersuchungen hierzu sind geplant.

Die F<sub>1</sub>-Generation aus Kreuzungen der Sorte 'Bona' mit der Herkunft 'HUN 2' wies in vorangegangenen Versuchen eine erhöhte Pollensterilität auf (MW: 22%; reziproke Kreuzung: MW: 20%). Rückkreuzungen der F<sub>1</sub> sowohl in mütterlicher als auch in väterlicher Richtung wurden erneut auf Pollensterilität untersucht (49 Individuen HBH, 46 Individuen BHH). Ein erhöhter Anteil steriler Pollenkörner bei diesen Kreuzungspartnern konnte in der F<sub>2</sub>-Generation bestätigt werden, allerdings war die durchschnittliche Pollensterilität kaum höher als in der F<sub>1</sub> (MW: 24% BHH, MW: 32% HBH). Insgesamt wurden zehn Pflanzen (3 BHH, 7 HBH) mit einer Pollenfertilität < 30% gefunden. Einzelindividuen beider Kreuzungsrichtungen wiesen nicht nur eine Reduktion fertiler Pollenkörner, sondern auch eine reduzierte oder verzögerte Freisetzung

der Pollenkörner auf. Von zwei der identifizierten Individuen mit erhöhter Sterilität konnten Nachkommen erzeugt werden, der Erhalt der restlichen Genotypen durch Stecklingsschnitt, Selbstung und/oder Rückkreuzung war erfolglos. Die vorläufigen Ergebnisse bestätigen eine erhöhte Pollensterilität auch bei Nachkommen dieser Einzelpflanzen, allerdings lag die Sterilität bei den bisherigen Untersuchungen nicht höher als bei der Elternpflanze.

Um den Mechanismus bzw. die Ursache für die erhöhte Sterilität von Nachkommen aus dieser Kreuzung aufzuklären, wurden wiederholt Selbstungen einer neuen F<sub>1</sub>-Generation aus je 5 Individuen 'Bona' und 'HUN2' erzeugt und die jeweiligen Elternpflanzen durch Stecklingsschnitt in einem vegetativen Stadium erhalten. Durch die schlechte Keimrate der Folgegenerationen stehen allerdings nur einzelne Individuen für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Von jeweils drei Elternpflanzen wurde die Mitochondrien-DNA sequenziert, um mögliche Mutationen aufzufinden. Da die oben angeführten Ergebnisse nicht richtungsgebunden waren, kann in diesem Fall zwar nicht von einer einfachen Form der CMS ausgegangen werden, Unterschiede im Mitochondriengenom können dennoch wichtige Informationen liefern.

Zusätzlich wurde das Mitochondriengenom von Kamilleherkünften, die auf Grundlage von vorliegenden Daten genetischer Analysen ausgewählt wurden (Otto et al., 2017), sequenziert. Die Analysen erstreckten sich auf drei Individuen pro Herkunft und neun Herkünfte.

Es wurden für detektierte Mutationen molekulare Marker entwickelt (SNPs), aus denen 33 ausgewählt wurden, um eine umfassendere Analyse der Akzessionen (10-15 Individuen pro Herkunft) durchzuführen. Zusätzlich wurden je zehn Individuen der Sorte 'Manzana' und einer Population aus Deutschland (zur Verfügung gestellt von Pharmaplant), sowie die fünf Elternpflanzen der Herkünfte 'Bona' und 'Hun2' in die Analysen mit aufgenommen. Anhand der SNP-Analysen wurden Kreuzungspartner mit möglichst unterschiedlichem Kern- und Mitochondriengenom für Kreuzungen ausgewählt, um die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von CMS in einer Folgegeneration zu erhöhen.

Diese ist umso größer, je größer die genetische Distanz der beiden Elternpflanzen ist. Dementsprechend wurden ebenfalls 5 Kamillearten (*Matricaria matricarioides* (Less.) Porter, *Matricaria nigellaefolia* DC., *Matricaria perforata* Mérat, *Matricaria disciformis* (C.A.Mey.) DC. und *Matricaria trichophylla* (Boiss.) Boiss.) aus 7 verschiedenen Herkünften im Glashaus angezogen, um sie unter Bestäubung mit Hilfe von Fliegen mit Pflanzen der Sorte 'Bona' zu kreuzen. Pro Art wurden zehn Kreuzungen durchgeführt (Ausnahmen: *Matricaria disciformis* (C.A.Mey.) DC.: n=4, *Matricaria trichophylla* (Boiss.) Boiss.: n=6). Die erfolgreiche Einkreuzung der Fremdart wurde in der F<sub>1</sub>-Generation mittels GC, individuellem DC-Profil und Morphologie überprüft. Es wurden bei drei Individuen (alle *M. recutita* x *M. matricarioides*) Merkmale gefunden, die auf eine erfolgreiche Einkreuzung hindeuten, allerdings konnte die morphologische Beurteilung die Hybridisierung bislang nicht bestätigen. Diese Individuen wurden trotzdem mittels Stecklingsschnitt vermehrt und mit *M. recutita* der Sorte 'Bona' rückgekreuzt.

In Hinblick auf die Möglichkeit zur chemischen Kastration der Kamilleblüten erfolgte eine Prüfung fünf unterschiedlicher Gametozide (Trijodbenzoesäure,  $\alpha$ -Naphthylethylsäure, Gibberellinsäure, Ethephon sowie Clofencet) auf ihre Wirksamkeit. Die getesteten Substanzen hatten in bei anderen Arten wirksamen Konzentrationen eine starke Schädigung der Pflanzen zur Folge oder zeigten trotz Aufnahme in die Pflanze keinen Effekt bei Kamille (Clofencet). Sofern sich nicht zukünftig anderweitig neue Erkenntnisse ergeben, wird dieser Ansatz daher nicht weiterverfolgt.

Die experimentellen Arbeiten zur Bestimmung des genetischen Hintergrundes und der Erfassung der genetischen Diversität bei Echter Kamille mittels AFLP-Analyse sowie GBS (Genotyping-by-Sequencing) und SNP-Markern (single nucleotide polymorphism) wurden abgeschlossen. Die Auswertung der Daten ist weitgehend erfolgt. Zur Bestimmung des genetischen Hintergrundes innerhalb der Art „Echte Kamille“ (*Matricaria recutita*) mittels AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) wurden je 4-8 Pflanzen von 46 Kamilleherkünften herangezogen. Desweiteren wurden 91 Genotypen aus 33 Herkünften mit 6.495 hochqualitativen SNP-

Markern charakterisiert, um eine sehr tiefgehende Analyse der genetischen Struktur bei Kamille zu erhalten. Ausgehend von der AFLP- und SNP-Analyse können die aussichtsreichsten Kreuzungskombinationen für die spezifischen Kreuzungsziele empfohlen werden, z.B. Generierung von CMS, aber auch für die potenzielle Nutzung von Heterosis.

Basierend auf dem Transkriptom in Kamilleblüten wurden Schritte zur Identifizierung molekularer Marker für männliche Sterilität bei Kamille durchgeführt. Die experimentellen Arbeiten mittels Microarrays zum Vergleich der Genexpression von männlich sterilen Zungenblüten mit den männlich fertilen Röhrenblüten bei 4 Genotypen und jeweils 3 verschiedenen Entwicklungsstadien wurden abgeschlossen. Zusätzlich wurden Röhrenblüten der 3 entsprechenden Entwicklungsstadien von der verwandten Art *M. discoidea* mit einbezogen, welche keine Zungenblüten ausbildet. Die stärksten Unterschiede in der Genexpression ließen sich im jüngsten Entwicklungsstadium nachweisen, während im ältesten Entwicklungsstadium (wenige Tage vor der Blüte) keine signifikanten Genexpressionsunterschiede identifiziert wurden. Es waren mehr Contigs in Röhrenblüten stärker exprimiert als in Zungenblüten. In die Arbeiten zur Identifizierung genetischer Faktoren für MS bei Kamille werden künftig die MS-Pflanzen der Sorte 'Bona' einbezogen (s.o.).

#### Nebenergebnisse

Im Rahmen des Vorhabens wurden Daten zur Genetik von Kamille gewonnen (z.B. Anteil vermuteter Selbstinkompatibilität, MS-Systeme bei Kamille, genetische Diversität innerhalb *Matricaria recutita*, Sequenzdaten Kamilletranskriptom), die vielfältig in der Kamillezüchtung und bei weiteren Arzneipflanzen genutzt werden können. Neben der Nutzung der Ergebnisse für die aktuelle Kamillezüchtung und -vermehrung sowie im Rahmen laufender anderer Projekte, wie z.B. die Bestimmung der Fremdbefruchtungsrate im Rahmen des Projektes „klassische Kamillezüchtung“, können die gewonnenen Erkenntnisse dazu dienen, züchtungsmethodische Grundlagen für Kamille zu erstellen und den Züchtungsprozess zu optimieren, z. B. durch markergestützte Selektion.

Die Verwendung von Fliegen (*Lucilia sericata* und *Calliphora erythrocephala*) zur gezielten Bestäubung wurde bei Kamille erfolgreich etabliert. Diese Methodik kann generell bei der Züchtung von Kamille Verwendung finden, da sie sich als effizient und kostengünstig erwiesen hat im Vergleich zu Bestäubungstechniken per Pinsel o.ä. Hilfsmitteln.

Erarbeitete methodische Schritte können auf andere Arznei- und Gewürzpflanzen übertragen werden. Als Beispiel können (1) das entwickelte Protokoll zur durchflusszytometrischen Untersuchung von Kamille im Hochdurchsatz genannt werden, das für weitere Arznei- und Gewürzpflanzen (an Melisse erfolgreich getestet) übernommen werden kann, die ebenfalls durch einen hohen Anteil sekundärer Inhaltsstoffe gekennzeichnet sind oder (2) die etablierte Genotypisierung per GBS-SNP Analyse an Kamillepflanzen.

### **Projektbezogene Veröffentlichungen**

#### Wissenschaftliche Zeitschriften

Otto, L-G.; Mondal, P.; Brassac, J.; Preiss, S.; Degenhardt, J.; He, S.; Reif, J. C.; Sharbel, T.F. Use of genotyping-by-sequencing to determine the genetic structure in the medicinal plant chamomile, and to identify flowering time and alpha-bisabolol associated SNP-loci by genome-wide association mapping  
BMC Genomics (2017), 18:599. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3991-0>.

Faehnrich, B.; Wagner, S.; Franz, C.

Vegetative and generative maintenance of self-incompatibility in six accessions of German chamomile

Breeding Science (2016), 66 (3), 450-455, DOI:10.1270/jsbbs.15133

Otto, L.-G.; Junghanns, W. R.; Plescher, A.; Sonnenschein, M.; Sharbel, T. F.

Towards breeding of triploid chamomile (*Matricaria recutita* L.) - Ploidy variation within German chamomile of various origins

Plant Breeding Journal (2015), 134(4), 485-493, DOI: 10.1111/pbr.12285

Faehnrich, B.; Kraxner, C.; Kummer, S. Franz, C.

Pollen tube growth and self incompatibility in *Matricaria recutita*

Euphytica (2015), 206, 357-363

Faehnrich, B.; Dobes, C.; Franz, C.

Ploidy level and reproductive trait analysis in three *Matricaria recutita* cultivars

Cytologia (2013), 78(2), 173-179

Faehnrich, B.; Nemaz., P; Franz, C.

Self-Incompatibility and male sterility in six *Matricaria recutita* varieties

Journal of Applied Botany and Food Quality (2013), 86, 167-171

#### Tagungsbeiträge u.ä.

Otto, L.-G.; Mondal, P.; Brassac, J.; He, S.; Preiss, S.; Degenhardt, J.; Reif, J.C.; Sharbel, T.F.  
Analysis of Genetic Diversity and Marker-Trait Associations in the Medicinal Non-Model Plant Chamomile (*Matricaria recutita* L.) using Genome-Wide SNP-Markers

Vortrag auf dem XIX International Botanical Congress (IBC 2017), 23.-29. Juli 2017, Shenzhen, China

Otto, L.-G., Sonnenschein, M., Brassac, J., Plocharski, B., Fährnich, B., Ruzicka, J., Plescher, A., Franz, C., Novak, J. & Sharbel, T.F.

Demonstrationsprojekt Arzneipflanzen: Entwicklung einer sterilen Kamillensorte

Vortrag auf dem 2. FNR-Kongress "Mit Pflanzenzüchtung zum Erfolg", 3.-4. April 2017, Berlin, Tagungsband S. 41-66

Otto, L.-G.; Junghanns, W.R.; Plescher, A.; Sonnenschein, M.; Plocharski, B.; Sharbel, T.F.  
Ploidy variation within cultivated *Matricaria recutita* L. – Towards breeding of sterile triploid chamomile

Vortrag auf dem Treffen 'Chromosome biology and genome engineering in the context of plant breeding' der GPZ study group 'Cytogenetics', 30.-31. März 2017, Gatersleben

Otto, L.-G.; Plescher, A.; Sonnenschein, M.; Faehnrich, B.; Franz, C.; Sharbel, T.F.

Towards the development of a sterile chamomile variety (*Matricaria recutita* L.) using breeding, molecular and genomic tools

Posterpräsentation auf dem 20<sup>th</sup> Eucarpia General Congress "Plant Breeding, the Art of Bringing Science to Life", 29. August - 1. September 2016, Zürich, Schweiz

Otto, L.-G.; Brassac, J.; Mondal, P.; Preiss, S.; Degenhardt J.; Sharbel, T.F.

Use of Genotyping by Sequencing (GBS) in chamomile (*Matricaria recutita* L.) to enhance breeding

Vortrag auf dem 6<sup>th</sup> International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants (Breedmap 6), 19.-23. Juni 2016, Quedlinburg, DOI 10.5073/jka.2016.453.004

Faehnrich, B.; Wagner, S.; Franz, Ch.

Vegetative and generative maintenance of self-incompatibility in six accessions of German chamomile

Poster auf dem 6<sup>th</sup> International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants (Breedmap 6), 19.-23. Juni 2016, Quedlinburg, DOI 10.507/jka.2016.453.061

Otto, L.G.; Sharbel, T. F.

Charakterisierung genetischer Ressourcen von Kamille (*Matricaria recutita* L.) mit Hilfe molekularer Techniken

Vortrag auf der 7. Tagung Arznei- und Gewürzpflanzenforschung des Deutschen Fachausschusses für Arznei-, Gewürz- und Aromapflanzen und der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Wien, Österreich, 14.-17. September 2014, DOI 10.5073/jka.2014.446.017

Fährnich, B.; Kraxner, C.; Kummer, S.; Franz, C.

Aspekte zur Selbstinkompatibilität bei Kamille

Poster auf der 7. Tagung Arznei- und Gewürzpflanzenforschung des Deutschen Fachausschusses für Arznei-, Gewürz- und Aromapflanzen und der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Wien, Österreich, 14.-17. September 2014, DOI 10.5073/jka.2014.446.040

Otto, L.-G.; Bocchini, M.; Lazarro, M.; Albertini, E.; Sharbel, T. F. (2013)

Analysis of genetic diversity in German Chamomile (*Matricaria recutita* L.) by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) and ploidy variation

Poster auf dem 57th Annual Congress der Societa' Italiana Di Genetica Agraria (SIGA), 16.-19. September 2013, Foggia, Italien

#### Abschlussarbeiten

Milker, Sheila (2017) Untersuchung von männlicher Sterilität und Selbstinkompatibilität bei *Matricaria chamomilla* L. zur Bestäubunglenkung. (Bachelor Thesis) Jena, Ernst-Abbe-Hochschule Jena, Fachbereich Medizintechnik und Biotechnologie, Studiengang Biotechnologie (2017) 56 pp.