

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Demonstrationsprojekt Arzneipflanzen (KAMEL); Machbarkeitsstudie zur Erfassung der Chancen und Risiken für die Züchtung einer triploiden Kamillesorte

Zuwendungsempfänger und ausführende Stelle:

Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) - Abt. Cytogenetik und Genomanalyse - AG Apomixis

Förderkennzeichen:

10NR103 bzw. 22010310

Laufzeit:

15.02.2011 bis 14.08.2011

Datum der Veröffentlichung: **12.09.2011**

Gefördert durch:



Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft
und Verbraucherschutz

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMELV für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Machbarkeitsstudie zur Erfassung der Chancen und Risiken für die Züchtung einer triploiden Kamillesorte

FKZ: 22010310

Projektlaufzeit: 15.02. bis 14.08. 2011

Abschlussbericht

per 14.08.2011

Antragsteller:

Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)
Herr Dr. Timothy Sharbel

Weitere Teilnehmer:

Institut für Angewandte Botanik der Veterinärmedizinischen Universität Wien
Herr o. Univ. Prof. Dr. Chlodwig Franz
Pharmaplant Arznei- und Gewürzpflanzen Forschungs- und Saatzucht GmbH Artern
Herr Dr. Andreas Plescher

Ziel der Machbarkeitsstudie:

Die Ertragsfähigkeit des deutschen Kamilleanbaus bedarf dringend einer Verbesserung, um auf dem Weltmarkt ausreichend konkurrenzfähig zu sein. Eine triploide Sorte hätte einen absoluten Neuheitswert. Triploide Sorten anderer Kulturpflanzenarten haben aufgrund ausbleibender Samenbildung, damit einhergehender längerer Blühdauer und angeregter Blütenbildung eine feste Anbauposition eingenommen. Auch für den Kamilleanbau könnte die Nutzung der Vorteile Triploider zu einem entscheidenden Qualitätsfortschritt im Anbau führen.

Das in Mitteleuropa verstreute und größtenteils unpublizierte Wissen zur Kamillezüchtung und zur Triploidenzüchtung soll zusammengetragen und ausgewertet werden. Kleinere experimentelle Versuche ergänzen dieses. Diese fachliche Studie ist die Grundlage für eine Machbarkeitsbewertung, die Chancen und Risiken eines Vorhabens zur „Züchtung einer triploiden F₁-Kamillesorte“ miteinander vergleicht und abwägt. Die aus dem Vorhaben resultierende Machbarkeitsstudie soll eine der Entscheidungsgrundlagen für den Beginn eines längerfristigen Züchtungsvorhabens auf der Basis von Triploidie sein.

Zu erwartende Vorteile triploider Kamille-Sorten gegenüber vorhandenen diploiden und tetraploiden Sorten:

Triploide Sorten ergeben wegen ihrer Sterilität nach Bestäubung durch andere Kamillesorten und -arten keinen Samenansatz. Daraus folgen:

- Längere Blühdauer der Einzelblüte und damit Verbreiterung des Erntefensters je Pflücke,
- längere Blühperiode der Bestände und dadurch Realisierung zusätzlicher Pflücktermine,
- kein Ausfall von Saatgut. Kamille bereitet als schwer zu bekämpfendes Beikraut große Probleme. Die bis zu 15 Jahre anhaltende Keimfähigkeit der Samen und das Fehlen wirksamer Herbizide führen zu einer eingeschränkten Fruchtfolge, zur Verknappung von Anbauflächen für Kamille, zur Akkumulation von bodenbürtigen Krankheitserregern in kontinuierlich genutzten Anbauflächen und zu einem hohen, wenig wirksamen Einsatz von Herbiziden in den Fruchtfolge-Kulturen.

Die Erhaltungszüchtung einer triploiden Kamillesorte beschränkt sich auf die Isolierung der flächenmäßig sehr begrenzten Elternkomponenten von anderen Kamillepflanzen. Sie ist deshalb im Vergleich mit den herkömmlichen Kamillesorten mit großer Effizienz möglich.

Der Bericht ist in zwei Teile aufgeteilt:

Teil 1 umfasst das lt. Auftrag zusammenzutragende Grundlagen- und Erfahrungswissen,

Teil 2 enthält zur Umsetzung der Ergebnisse der Machbarkeitsstudie einen Ablaufplan zur Züchtung einer triploiden Kamillesorte.

Das Ergebnis der Machbarkeitsstudie wurde anlässlich der Sitzung des Wissenschaftlichen Beirates der FAH (Forschungsvereinigung der Arzneimittelhersteller e.V.) am 28.Juni 2011 in Artern vorgestellt.

Ergebnisbericht Teil 1:

Zusammenfassung des zusammengetragenen Grundlagen- und Erfahrungswissens

Teil 1 des Ergebnisberichtes enthält die von den Teilnehmern der Machbarkeitsstudie vorgelegten Ergebnisse ihrer jeweiligen Arbeitsaufträge.

Die Ergebnisse wurden anlässlich dreier Treffen aller Beteiligten am 22.2.2011, 11.5.2011 und 28.06.2011 eingehend analysiert und das Gesamtvorhaben diskutiert. Zusätzlich fanden mehrere Treffen einzelner Teilnehmer statt.

Nachfolgend wird das Ergebnis getrennt nach den im Projektantrag aufgeführten Arbeitspaketen dargestellt.

Arbeitspaket I (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben)

Aufgabenstellung: **Rechercharbeiten**

Zu I.1: Recherche in Literatur und Datenbanken zur Thematik „Triploidie bei Pflanzen“ und zu bekannten oder denkbaren Methoden zu ihrer Herstellung

Triploide treten in vielen Pflanzenfamilien, auch innerhalb der *Asteraceae* (Noyes 2007, Peckert und Chrtek 2006) auf. Bei Zierpflanzen- und Obstarten sind triploide F1-Hybridsorten etabliert (z. B. Tagetes, Melone (*Citrullus lanatus*), Weintraube (*Vitis vinifera*), Obstbanane (*Musa x paradisiaca*)). Beschreibende Berichte über triploide Kamillepflanzen sind zu finden, beziehen sich aber nicht auf deren weitere Verwendung (Grunewaldt, pers. Mitteilung). Triploide Hybridsorten können vegetativ oder generativ vermehrt werden. Bei generativer Vermehrung ist ein Hybridzüchtungs-System etabliert, z. B. bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*, OWEN 1945). Auch die Züchtung triploider Kamille setzt die Entwicklung von F1-Hybriden voraus. Innerhalb der Entwicklung des Hybridzüchtungs-Systems kann die vegetative Vermehrung von Elternteilen *in vitro* oder über Apomixie Bedeutung haben. Die *in vitro* Vermehrung und Konservierung sind für Kamille etabliert (siehe Arbeitspaket III); Informationen über das Auftreten von Apomixie bei Kamille liegen in der Literatur nicht vor.

Generell ist zu erwarten, dass Triploide, wenn überhaupt, stark gestörte Meioseteilungen zeigen. Diese Störung begrenzt die Ausbildung von funktionsfähigem Pollen und intakten Eizellen und führt zu der im Vorhaben „Triploide Kamille“ erwünschten Sterilität.

Neben Berichten von spontanen Triploiden (z. B. durch atypische Zellteilung der Zygote, Doppelbefruchtung der Eizelle, unreduzierte diploide Gameten aufgrund Störung der Meiose II) wird deren Herstellung vor allem durch Kreuzung von Eltern diploider und tetraploider Ploidiestufe beschrieben. Deren Frequenz kann durch Selektion erhöht und stabilisiert werden. Für Kamille ist dieser Zusammenhang im Sinne der Entwicklung triploider Sorten vordringlich zu prüfen.

Zu I.2: Recherche in Literatur und Datenbanken zu bekannten ms-Systemen und Bewertung ihrer Nutzungsmöglichkeiten bei der Herstellung von triploiden Kamillen

Um eine triploide F1-Hybridsorte zu produzieren, müssen männlich sterile Mutterpflanzen erzeugt werden. Bei Pflanzen sind diverse Systeme männlicher Sterilität (MS) umfangreich belegt. In Bezug auf deren spontane Entstehung und deren Induktion wird von Beispielen aus unterschiedlichsten Pflanzenfamilien berichtet. Soweit männliche Sterilität in Pflanzen-

züchtungsvorhaben verwendet wird, beziehen sich die Berichte auf landwirtschaftliche Arten und gartenbaulich genutzte Gemüse und wenige Zierpflanzenarten. Für Kamille sind jedoch in der Literatur und den ausgewerteten Zuchtbüchern keine verwertbaren Informationen zu finden. Es ist aber nicht anzunehmen, dass Kamille innerhalb des Pflanzenreiches eine so isolierte Stellung einnimmt, dass MS hier nicht auftritt oder etabliert werden könnte. Die breite genetische Variabilität in Herkünften und Arten (z. B. Taviana et al. 2002, Wagner et al. 2005, Pirkhezri et al. 2010), die für andere Merkmale als männliche Sterilität beschrieben ist, spricht für die Potenz zu diesem Merkmal. Ein umfangreiches Screening ist daher zur Klärung dieses Sachverhaltes erforderlich.

Von den unterschiedlichen Systemen männlicher Sterilität erscheinen die kerngenetische männliche Sterilität (MS), die zytoplasmatisch kontrollierte männliche Sterilität (CMS), die Selbstinkompatibilität (SI) und die chemische Kastration (s. II.2) für die Entwicklung einer triploiden F1-Kamillesorte am meisten Erfolg versprechend.

Innerhalb der Asteraceae wird die Existenz von kerngenetisch männlicher Sterilität bei apomiktischen *Taraxacum*-Pflanzen angenommen (Meirmans et al. 2006).

Ein System von zytoplasmatisch kontrollierter männlicher Sterilität (CMS) ist bereits bei diversen Kulturpflanzen etabliert, z. B. innerhalb der Asteraceae bei der Sonnenblume aus Kreuzungen von *Helianthus petiolaris* und *Helianthus annuus*. Als Ursache der CMS werden Mutationen, Restrukturierungen und Rekombinationen innerhalb des Mitochondriengenoms angesehen. Eine CMS-Linie kann z. B. durch Kreuzung (alloplasmatische Hybride) oder durch Protoplastenfusion erzeugt werden (Carlsson und Glimelius 2010). Bei einer Linie von CMS *Brassica napus* hat sich gezeigt, dass die männliche Sterilität stabil vererbt wurde und nur Nachkommen von männlich fertilen Pflanzen sich in MS- und MF-Pflanzen aufspalteten (Leino et al. 2004). Eine derartige MS Kamille-Elternlinie könnte problemlos erhalten werden. Da eine große genetische Breite innerhalb der Art Echter Kamille (*Matricaria recutita*) vorhanden ist (s. o.), erscheint es aussichtsreich, bereits durch Kreuzungen von Pflanzen unterschiedlicher Herkunft innerhalb der Art *Matricaria recutita* CMS erzeugen zu können.

Selbstinkompatibilität (SI) ist bei Kamille als fremdbefruchtende Art in der Literatur nicht belegt. Sie ist jedoch, wie in anderen Fremdbefruchtern, sehr wahrscheinlich vorhanden.

Bei den Asteraceae wurde für *Taraxacum spec.* eine Temperatur abhängige männliche Sterilität (hohe Temperaturen) gefunden (van der Hulst et al. 2004). Dieses ist ebenfalls für Kamille zu prüfen. Vergleichbar könnte die bei einigen Phänotypen von *Triticum aestivum* beobachtete, von der Photoperiode abhängende CMS sein (Murai und Tsunewaki 1993).

Ein zusätzlicher Ansatz wäre die Erzeugung von MS durch gentechnische Methoden, z. B. durch gezielte Ausschaltung eines für männliche Fertilität nötigen Genes oder durch Transfer eines neuen Genes (z. B. Beta-Ketothiolase, Khan 2005). Dieser methodische Ansatz erscheint allerdings nicht sinnvoll, da die Verwendung einer gentechnisch veränderten Kamillesorte letztendlich in der Öffentlichkeit und nach den Bestimmungen im Arznei- und Heilpflanzenbereich keine Akzeptanz finden dürfte. Ein gangbarer Weg hingegen könnte das Screening von verschiedenen Kamillepopulationen nach natürlich auftretenden Genen sein, die bei anderen Arten in Zusammenhang mit der Ausprägung von MS stehen (Übersicht s. Carlsson und Glimelius 2010, Khan 2005).

Insgesamt bestehen sehr gute Aussichten, ein geeignetes System männlicher Sterilität durch Selektion, Kreuzung oder Induktion zu etablieren.

Arbeitspaket II (Veterinärmedizinische Universität Wien)

Aufgabenstellung: **Informationsbereitstellung der Veterinärmedizinischen Universität Wien**

Zu II.1: Aufarbeitung der eigenen Literatur- und Faktensammlung einschließlich unpublizierter Unterlagen und Darstellung von Erfahrungen zur Kamillezüchtung

Die Erfahrungen in der Kamillenzüchtung am Institut für Angewandte Botanik und Pharmakognosie an der Veterinärmedizinischen Universität Wien reichen lange zurück. Prof. Dr. Chlodwig Franz, bzw. weitere Mitarbeiter des Instituts, betreiben Forschung auf diesem Gebiet seit mehr als 20 Jahren (Prof. Franz schon seit den 1970er Jahren, damals in Weihenstephan). Es gibt zahlreiche Publikationen, Beiträge, Posterpräsentationen und Projekte zu diesem Thema (z. B. Franz und Massoud 1989, Massoud und Franz 1990a, 1990b, Mader 1998, Mader et al. 2007, Franz 1992, Franz et al. 1981).

Detailergebnisse beinhalten nachfolgende Punkte:

Zur Induktion von gefüllt blühenden, rein weiblichen Kamillengenotypen wurden mutagene Behandlungen mit EMS, Nitrosamin und Natriumazid durchgeführt. Selektierte Pflanzen zeigten nach generativer Vermehrung in der nachfolgenden M1-Generation (noch) keine der erwünschten Eigenschaften. Folgegenerationen aus einer mutagenen Behandlung mit radioaktiver Bestrahlung sind noch in Beobachtung.

In dem verwendeten Versuchsmaterial treten gelegentlich Pflanzen mit fehlender Pollenentwicklung und verkümmelter Röhrenblütenentwicklung auf. Diese Pflanzen werden isoliert und in nachfolgenden Generationen beobachtet.

Aus vegetativ vermehrten triploiden Pflanzen eines Genotyps (s. II.3) wurde versucht, durch Behandlung mit Colchizin hexaploide zu erzeugen. Dies ergab jedoch keine brauchbaren Ergebnisse, da sich als Veränderung nur undifferenziertes Gewebe entwickelte und die Pflanzen nicht lebensfähig blieben.

Gemäß zytologischer Untersuchungen betrug die Pollenvitalität in den untersuchten Kamillenpflanzen bei diploiden 89,2%, bei tetraploiden 94,0% und bei der triploiden 81,6%. Der Anteil an infertilem Pollen der triploiden Pflanze war also relativ gering.

Zu II.2: Recherche zu Methoden und Möglichkeiten der chemischen Kastration, insbesondere bei Korbblütlern

Berichte in der Literatur über die Anwendung von Gametoziden beziehen sich insbesondere auf die Sonnenblume und Getreidearten (Jan und Rutger 1988, Chakraborty und Devakumar 2006, Patent-DE 2008). Stabile Kulturbedingungen, vor allem eine kontrollierte Umgebungstemperatur, sind hierbei sehr wichtig, da der Erfolg stark von dem Witterungsverlauf nach der Behandlung abhängig ist. Bisher waren Methoden der chemischen Kastration nicht zuverlässig für die Produktion von Hybridsaatgut verwendbar.

Nach eingehender Literaturrecherche der bisherigen Erfahrungen zur chemischen Kastration bei Korbblütlern im Speziellen (Spirova 1975, Schuster et al. 1983, Miller et al. 1978, Chakraborty und Devakumar 2006) und basierend auf Ergebnissen zu Versuchen bei Färberdistel (*Carthamus tinctorius*, Baydar und Gökmen 2003) wurden im Rahmen der Machbarkeitsstudie – angepasst an das kürzere Intervall zwischen Knospenbildung und Aufblühen bei Kamille – zwei Versuche mit Gibberellinsäure (GA_3 , Merck, $C_{19}H_{22}O_6$; 0,1g/l, Sprühlösung) als Gametozid an ca. 50 Pflanzen aus vier Kamillesorten ('Degumille', 'Manzana', 'Bona' und 'Lutea') im Vergleich zu unbehandelten Vergleichspflanzen durchgeführt. Als Ergebnisse lassen sich fotografisch dokumentierte Veränderungen und Schädigungen an den Röhrenblüten, möglicherweise jedoch auch Beeinträchtigungen der Zungenblüten, sowie eine wesentliche Reduktion der Samenbildung (und damit auch der weiblichen Fertilität) gegenüber unbehandelten Pflanzen erkennen. Es erscheint möglich, die Ausbildung von Röhrenblüten vollständig zu verhindern.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wird noch ein dritter Versuch durchgeführt, wobei als Merkmale geschädigte/normalen Blüten, ausgezählter Samenansatz sowie die Pollenvitalität in mehrfacher Wiederholung gemessen und statistisch ausgewertet werden.

Geplante Versuchsserien mit einem Gametozid der Firma Bayer auf Sulfonylharnstoffbasis. konnten wegen nicht lieferbarer Substanz nicht durchgeführt werden.

Zu II.3: Kreuzungsexperimente von di- und tetraploiden Kamillen

Die Kreuzung von diploiden und tetraploiden Kamillen der Sorten 'Degumille' und 'Manzana' ergab nach manueller Kastration bei geringer Ernte unter 89 Pflanzen nur eine triploide. Vegetative Nachkommen dieser Pflanze bildeten vitalen diploiden und tetraploiden Pollen aus. Es erscheint daher nötig, diesen Sachverhalt an einem sehr breiten Material zu überprüfen.

Im Rahmen der Machbarkeitsstudie wurden diallele, reziproke Kreuzungen unterschiedlicher Ploidiestufen zwischen den Sorten 'Degumille' (diploid), 'Manzana' (tetraploid), 'Bona' (diploid) und 'Lutea' (tetraploid) nach manueller Kastration und mehrfacher Bestäubung an ca. 40 Pflanzen durchgeführt. Die Kreuzungsprodukte wurden ausgesät, entstehende Pflanzen werden auf etwaige Triploide hin untersucht.

Eine Möglichkeit, die Ploidiestufe von Kamillenotypen durch Pollenmessungen festzustellen, ist bestens etabliert und verfügbar. Diploide und Tetraploide lassen sich damit eindeutig charakterisieren. Durchflusszytometrische Analysen zur Feststellung aller Ploidiestufen von Kamillepflanzen sind ebenfalls etablierte Methoden am Institut.

Zu II.4: Entwicklung eines Zeitplanes für die Züchtung von triploiden Kamillesorten

Erfahrungen dazu sind in den Züchtungsablaufplan eingearbeitet (siehe Anlage 1).

Arbeitspaket III (PHARMAPLANT GmbH Artern)

Aufgabenstellung: **Informationsbereitstellung der PHARMAPLANT GmbH**

Zu III.1: Aufbereitung der eigenen Literatur- und Faktensammlung sowie Darstellung der eigenen Erfahrungen in der Kamillezüchtung

Die Firma PHARMAPLANT GmbH hat in den Unterlagen der Vorgängerinstitutionen bis 1959 zurückgehend recherchiert und dabei vornehmlich die Entstehung der Sorten 'Bodegold' und 'Mabamille' nachvollziehen können. Weitere Literatur zur Kamillezüchtung wurde einbezogen. Hinweise auf unterschiedliche Einzelpflanzenenerträge geben Anhaltspunkte für die benötigte Anzahl von Mutterpflanzen in dem Zuchtschema für eine triploide Sorte.

In den Firmenunterlagen fand sich keine Information zur männlichen Sterilität bzw. Inkompatibilität. Über die erfolgreiche mechanische Kastration wird mehrfach berichtet. Firmeneigene Ergebnisse über die Verwendung von Colchizin zur Anhebung des Ploidiegrades werden berichtet.

Bezüglich der *in vitro*-Vermehrbarkeit und *in vitro*-Lagerung von Kamille liegen umfangreiche Erfahrungen in der Firma PHARMAPLANT vor. Das Verfahren der *in vitro*-Erhaltung und Vermehrung nimmt in der Züchtung besonders bei Auslesen züchterisch wertvoller Einzelpflanzen einen bedeutenden Platz ein. Speziell bei Kamille wird das *in vitro*-Verfahren langjährig praktiziert und ist grundsätzlich unproblematisch. Bei der Etablierung von Einzelindividuen kann mit einer Vermehrungsrate von 1:5 gerechnet werden. Von der Explantatentnahme bis zur Spross- und Wurzelbildung vergehen vier bis sechs Wochen. Das *in vitro*-Vermehrungssystem ist relativ sicher gegen genetische Veränderungen, da nur angelegte Meristeme zum Austrieb gebracht werden. Wird davon ausgegangen, dass eine für den Züchtungsprozess wichtige Einzelpflanze zu vermehren ist, so ist zur Erzeugung von 100 Klonpflanzen von der Explantatentnahme bis zur Freilandtauglichkeit ein Zeitbedarf von 19 Wochen zu veranschlagen.

Der Kostenfaktor für *in vitro* vermehrte Pflanzen ist hoch. Geht man davon aus, dass z. B. ein männlich steriler Hybridpartner produktionsmäßig zur Gewinnung von F1-Saatgut für den Anbau ausschließlich *in vitro* vermehrt werden muss, so würden bei Kamille zur Produktion von drei Kilogramm F1-Hybridsaatgut, entsprechend dem Bedarf für 1 ha Anbaufläche, Kosten von ca. 40.000 € allein für die *in vitro*-Vermehrung entstehen.

Im Gegensatz dazu ist das *in vitro* Verfahren für die Erhaltung von Kreuzungspartnern als Vorstufe der Saatguterzeugung, z. B. einer Bestäuberlinie, sinnvoll und kostengünstig. Die Kosten für eine *in vitro* zu erstellende Pflanzen betragen etwa 6,70 €. Der Erhalt eines *in vitro* etablierten Klones beträgt etwa 900 € p. a. und kann damit in ein zu entwickelndes Zuchtprogramm für triploide Kamille-Sorten eingeplant werden.

Zu III.2: Ableitung des FuE-Bedarfs, der erforderlichen technischen Voraussetzungen und des Personalbedarfs für die Entwicklung triploider Systeme der Kamille

Aus den Informationen der Literaturrecherche, den Ergebnissen der Versuchsanstellung im Rahmen der Machbarkeitsstudie und langjähriger, wissenschaftlicher und praktischer Erfahrung der an der Machbarkeitsstudie beteiligten Partner wurden der FuE-Bedarf, die erforderlichen technischen Voraussetzungen und der Personalbedarf für die Entwicklung triploider Systeme der Kamille abgeleitet und in einem Züchtungsablaufplan detailliert zusammengefasst (siehe Anlage 1).

Der Züchtungsablauf umfasst drei Phasen:

In der ersten Phase die Erarbeitung des Ausgangsmaterials, in der zweiten die Entwicklung der Elternkomponenten und in der dritten die Testung der Kombinationseignung, die Prüfung von F1-Hybriden und die Entwicklung einer triploiden Sorte. (siehe Anlage 1)

Die drei an der Machbarkeitsstudie beteiligten Projektpartner haben großes Interesse geäußert, sich an der Durchführung eines Züchtungsvorhabens „Triploide Kamillesorte“ zu beteiligen. Die Aufteilung der anfallenden FuE-Teilaufgaben und die Abschätzung des Kostenrahmens erfolgten daher in Abstimmung unter den drei Partnern.

Geschätzter Kostenrahmen (nach Phase I, II und III aufgeteilt)

Phase I: Erarbeitung des Ausgangsmaterials

Teilnehmer 1: Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)

Herr Dr. Timothy Sharbel

Personalkosten: 1 Postdoktorand (12 Pers.-Monate p. a.), 1 techn. Assistenz (4 Pers.-Monate p. a., finanziert durch IPK) 175.500,-€

Materialkosten, Reisekosten, Gemeinkosten: 114.050,-€

Gesamtkosten: **289.550,- €**

Mit der Postdoktorandenstelle sind in allen drei Phasen des Forschungsvorhabens die technische Gesamtorganisation, das Controlling des zeitlichen Ablaufes der Teilvorhaben nach Zuwendungsbescheid und die Berichterstattung an den Zuwendungsgeber verbunden.

Teilnehmer 2: Institut für Angewandte Botanik der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Herr O. Univ. Prof. Dr. Chlodwig Franz

Personalkosten: 1 wiss. Mitarbeiter/in (6 Pers.-Monate p. a.), 1 techn. Assistenz (3 Pers.-Monate p. a., finanziert durch Vet.med. Universität Wien) 95.000,-€

Materialkosten, Reisekosten, Gemeinkosten: 46.000,-€

Gesamtkosten: **141.000,- €**

Teilnehmer 3: PHARMAPLANT Arznei- und Gewürzpflanzen Forschungs- und Saatzucht GmbH Artern

Herr Dr. Andreas Plescher

Personalkosten: 1 wiss. Mitarbeiter/in (5 Pers.-Monate p. a.), 1 techn. Assistenz (4 Pers.-Monate p. a.), 1 techn. Hilfskraft (5 Pers.-Monate p. a.) 94.270,-€

Materialkosten, Reisekosten, Gemeinkosten, sonst. Vorhabenskosten: 139.030,-€

Gesamtkosten: 233.300,- €

Die Firma PHARMAPLANT GmbH beabsichtigt eine wissenschaftliche Begleitung ihrer Teilprojekte im Gesamtvorhaben in Anspruch zu nehmen. Dafür werden etwa 5.000,- € p. a. veranschlagt (= sonst. Vorhabenskosten).

Gesamtkosten Phase I 663.850,- €

Phase II: Entwicklung der Elternkomponenten

Der Umfang der in Phase II anfallenden Arbeiten ist insgesamt dem in Phase I vergleichbar. Graduelle Unterschiede der auszuführenden Arbeiten ergeben sich nach dem Züchtungsablaufplan zwischen den einzelnen Teilnehmern.

Gesamtkosten Phase II : Geschätzt: 600.000,- €

Phase III: Testung der Kombinationseignung, die Prüfung von F1-Hybriden und die Entwicklung einer triploiden Sorte.

In Phase III sind neben den Kontrollen und dem Erhalt der Elternlinien umfangreiche Testkreuzungen mit anschließenden Leistungsprüfungen durchzuführen. Die Feldversuche sind schwerpunktmäßig vom Teilnehmer PHARMAPLANT GmbH zu planen und durchzuführen. Entsprechend erfolgt die Aufteilung der verfügbaren Mittel.

Gesamtkosten Phase III : Geschätzt: 500.000,- €

Zu III.3: Klärung arzneimittelrechtlicher Fragen zur Arzneibuchkonformität von hypothetischen triploiden Kamilleblüten

Diskutiert wurde die Frage nach der Arzneibuchkonformität in der Expertengruppe ‚Pharmazeutische Biologie‘ der Deutschen Arzneibuchkommission beim BfArM. Das Europäische Arzneibuch lässt di- und tetraploide Formen von *Matricaria recutita* L. zu und es dürften keine Hinderungsgründe für die Einbeziehung einer triploiden Form bestehen, sofern

- der Blütenaufbau, bestehend aus Kelch, gelben, fünfzipfligen Röhrenblüten und weißen Zungenblüten erhalten bleibt (keine Gefülltblütigkeit) und
- die DC-Identitätsprüfung nicht zu anderen als im Pharm. Eur. beschriebenen Ergebnissen führt.

Werden jedoch andere Arten als *Matricaria recutita* (L.) in den Zuchtablauf einer triploiden Kamille integriert, ist eine Überprüfung unabweisbar.

Zu III.4: Wirtschaftliche Bewertung der Auswirkungen der Einführung einer triploiden Kamillesorte auf die Wettbewerbsfähigkeit des deutschen Kamilleanbaus

Die wirtschaftlichen Vorteile der Einführung einer triploiden Kamillesorte auf die Wettbewerbsfähigkeit des deutschen Kamilleanbaus sind in der nachfolgenden Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: **Wirtschaftliche Vorteile**

Vorteilhafte Eigenschaften einer hypothetischen triploiden Kamillensorte	Voraussichtliche wirtschaftliche Auswirkungen	Mengen- effekt kg/ha x Jahr	Finanzieller Effekt ¹⁾ €/ha x Jahr (3,00 €/kg)
Längere Blühdauer der Bestände durch Blockung der Seneszenzprozesse	- Mindestens ein zusätzlicher Pflücktermin ist möglich, dadurch Ertragszuwachs	100	300
Längere Blühdauer der Einzelblüten	- Verlängerung des möglichen Erntefensters für jede Pflücke, Minderung der witterungsbedingten Ertragsausfälle im Mittel der Betriebe und letzten Jahre; Minderung des Ernterisikos	25	75
Kein Ausfall von Saatgut	- Eröffnung der Möglichkeit einer aufgelockerten Fruchtfolge; Fruchtwechsel nach mindestens 2 Jahren; Minderung der parasitär bedingten Ertragsausfälle um etwa 50 %	75	225
	- Einsparung von mindestens einer speziell gegen Kamilleverunkrautung durchgeführten Pflanzenschutzanwendung in der Folgekultur	-	40
Gesamt		200	640
Wirkung auf den Deckungsbeitrag ²⁾ (Leistung – vK Produktion – vK Trocknung/Aufbereitung)		-	384
Postulierte Anbaufläche in Deutschland mit triploider Sorte: 500 ha			320.000

1) Zugrundelegung der Preise nach KTBL-Datenblatt-Sammlung

2) Berechnung nach KTBL-Mustertechnologie Kamille, Heil- und Gewürzpflanzen, 2002

Neben wirtschaftlichen Vorteilen ergeben sich auch Nachteile:

Die Kosten für die Produktion von Kamillesaatgut liegen im Jahr 2011, je nach Aufwand für die Erhaltungszüchtung der jeweiligen Sorte, zwischen 72,- € und 110,- €/kg. Die kostenmäßige Auswirkung auf die Erzeugung des triploiden Saatgutes können in dieser frühen Phase noch nicht abgeschätzt werden. Als kalkulatorische Größe sollte eine Verdoppelung der Kosten bzw. eine zusätzliche Kostenbelastung des Anbaus von 275 €/ha angenommen werden. Eine Relativierung des Kostenfaktors sollte im Rahmen des Teilprojektes ‚Bestandesetablierung‘ erfolgen. Bei einer Exaktsaattechnologie würde 1,0 kg Saatgut/ha statt derzeit 2,5 bis 3,0 kg Saatgut/ha völlig ausreichen, um einen vollen, ausreichend dichten Bestand zu etablieren.

Gegenüberstellung von zusätzlichen Anbaukosten und dem Nutzen, der durch den Anbau von triploidem F1-Hybridsaatgut entsteht:

Mögliche Erlössteigerung durch den Anbau einer triploiden F1-Kamillensorte:

640,-€/ha Anbaufläche

Höhere Saatgutkosten für triploides Saatgut: 275,-€/ha Anbaufläche
zukünftig bei optimierter Sätechnik betragen die Mehrkosten nur 110,-€/ha

Durch den Anbau einer triploiden Sorte ist eine Erlössteigerung von 365,- €/ha Anbaufläche gegeben, bei reduziertem Saatgutbedarf durch optimierte Sätechnik wäre eine Erlössteigerung bis 530,-€/ha im Vergleich zu dem Ertragspotential mit herkömmlichen Sorten möglich, d.h. bei jährlich 500 ha Anbaufläche mit einer triploiden Sorte ergeben sich Mehrerträge von 182.500,- bis 265.000,- €/Jahr.

Zu III.5: Redaktionelle Fertigstellung der Machbarkeitsstudie

Die Kommentierung und Begutachtung sowie die redaktionelle Fertigstellung der Machbarkeitsstudie erfolgen durch Mitwirkung von Herrn Prof. Dr. J. Grunewaldt, Universität Hannover.

Arbeitspaket IV (IPK Gatersleben und PHARMAPLANT GmbH Artern)

Aufgabenstellung: **Durchflusszytometrische Analyse von Kamillepflanzen**

Zu IV.1: Pflanzenauswahl, Pflanzenanzucht und Bereitstellung des Materials

Das benötigte Material wurde von der PHARMAPLANT Artern ausgewählt, angezogen und bereitgestellt. Insgesamt erhielt das IPK Gatersleben von 13 Populationen jeweils 30 Einzelpflanzen zur Ploidieanalyse.

Zu IV.2: Etablierung der Technik der Durchflusszytometrie zur Ploidiebestimmung bei ausgewählten Kamillepflanzen, Detektion von spontanem Auftreten triploider Kamillepflanzen

Die Durchflusszytometrie wurde für das Objekt Kamille adaptiert. Zur Messung wurde frisches Blattmaterial verwendet. Es wurden jeweils 30 Pflanzen von 13 Prüfgliedern (Sorten, Herkünfte und Populationen) durchflusszytometrisch untersucht. Diese waren Sorten oder Handelsherkünfte, die als tetraploid angesehen werden, oder solche, die bislang nicht untersucht sind.

Spontan treten Triploide in Kamille auf. Bei 12 von 13 Prüfgliedern konnte spontanes Auftreten von insgesamt 50 triploiden Pflanzen nachgewiesen werden (s. Tab.2). In einigen Prüfgliedern waren sowohl diploide, tetraploide, deutlich aneuploide als auch triploide Pflanzen enthalten; andere waren weitestgehend homogen (s. Abb.1).

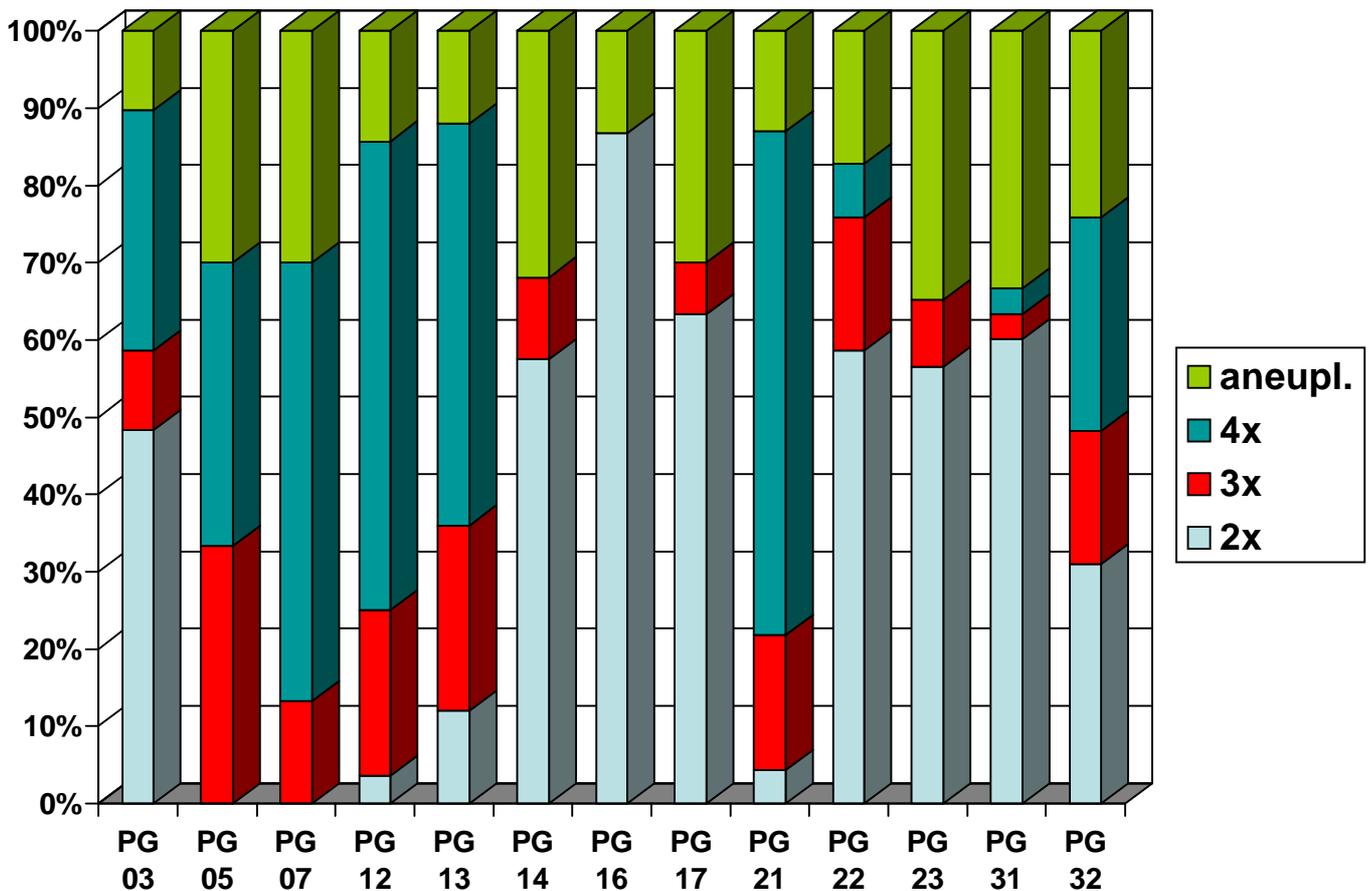
Zur sicheren Erzeugung triploider Kamillepflanzen ist es erforderlich, Elternpflanzen mit definierter Ploidie zu haben. Das Ergebnis zeigt, dass die Durchflusszytometrie eine Zuordnung von Kamillepflanzen zu Ploidieklassen ermöglicht (s. Tab. 2). Da ein großer Probendurchsatz technisch möglich ist, können umfangreiche Kontrollen von Einzelpflanzen vorgenommen werden.

Tabelle 2: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Ploidieanalyse

Prüfglied (PG)	Angabe zur Ploidie	Anzahl Pflanzen in Ploidiestufe:				deutlich aneuploid (%)
		gesamt	2x (%)	3x (%)	4x (%)	
03 'Bodegold'	4x	29	14 (48,3)	3 (10,3)	9 (31,0)	3 (10,3)
05 'Lutea'	4x	30	0	10 (33,3)	11 (36,7)	9 (30,0)
07 'Goral'	4x	30	0	4 (13,3)	17 (56,7)	9 (30,0)
12	4x	28	1 (3,6)	6 (21,4)	17 (60,7)	4 (14,3)
13	4x	25	3 (12,0)	6 (24,0)	13 (52,0)	3 (12,0)
14	4x	30	18 (60,0)	2 (11,1)	0	10 (33,3)
16	4x	30	26 (86,7)	0	0	4 (13,3)
17	4x	30	19 (63,3)	2 (6,7)	0	9 (30,0)
21	4x	24	1 (4,2)	4 (16,7)	15 (62,5)	3 (12,5)
22 'Margaritar'	ungeprüft	29	17 (58,6)	5 (17,2)	2 (6,9)	5 (17,2)
23	ungeprüft	23	13 (56,5)	2 (8,7)	0	8 (34,8)
31	ungeprüft	30	18 (60,0)	1 (3,3)	1 (3,3)	10 (33,3)
32	ungeprüft	29	9 (31,0)	5 (17,2)	8 (27,6)	7 (24,1)

Legende Prüfglieder (PG): PG 03 Sorte 'Bodegold', 4x - PG 07 Sorte 'Goral', 4x - PG 12 Handelsherkunft Italien, Sorte unbekannt, 4x - PG 13 Handelsherkunft Frankreich, Sorte unbekannt, 4x - PG 14 Handelsherkunft Polen, Sorte unbekannt, 4x - PG 16 Saatguthandel Fa. Kiepenkerl, 4x - PG 17 Saatguthandel Italien, 4x - PG 21 Saatguthandel Ungarn, Sorte unbekannt, 4x - PG 22 Sorte 'Margaritar' Rumänien; ungeprüft - PG 23 Handelsherkunft Russland, genaue Sortenbezeichnung ist nicht bekannt; ungeprüft - PG 31 Handelsherkunft Italien, ungeprüft - PG 32 Handelsherkunft Italien, ungeprüft.

Abb. 1: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Ploidieanalyse



Legende Prüfglieder (PG): PG 03 Sorte 'Bodegold', 4x - PG 07 Sorte 'Goral', 4x - PG 12 Handelsherkunft Italien, Sorte unbekannt, 4x - PG 13 Handelsherkunft Frankreich, Sorte unbekannt, 4x - PG 14 Handelsherkunft Polen, Sorte unbekannt, 4x - PG 16 Saatguthandel Fa. Kiepenkerl, 4x - PG 17 Saatguthandel Italien, 4x - PG 21 Saatguthandel Ungarn, Sorte unbekannt, 4x - PG 22 Sorte 'Margaritar' Rumänien; ungeprüft - PG 23 Handelsherkunft Russland, genaue Sortenbezeichnung ist nicht bekannt; ungeprüft - PG 31 Handelsherkunft Italien, ungeprüft - PG 32 Handelsherkunft Italien, ungeprüft.

Zu IV.3: *In vitro*-Erhaltung von identifizierten Referenzpflanzen zur späteren Nutzung

Von einer di- sowie einer tetraploiden Sorte wurden je drei Referenzpflanzen ausgewählt und bei PHARMAPLANT zur *in vitro*-Erhaltung etabliert. Sie sollen als bleibender Standard für weitere Analysen zur Verfügung stehen.

Im Rahmen der Ploidieanalyse wurden von 390 Pflanzen aus 13 genetisch verschiedenen Populationen insgesamt 50 Pflanzen als spontane Triploide identifiziert. Davon wurden 19 Individuen *in vitro* überführt, um für spätere Untersuchungen des Wuchsverhaltens sowie der Samenbildung zur Verfügung zu stehen.

Arbeitspaket V (PHARMAPLANT GmbH Artern)

Aufgabenstellung: **Verteilung des Inhaltsstoffgehaltes in samenreifen Blütenköpfen**

Zu V.1, 2 und 3: Trennung von samenreifen Blütenköpfen in ihre Bestandteile und Bereitstellung von jeweils 10g Trockenmasse zur Inhaltsstoffanalytik, Analytik von drei Blütenfraktionen nach Gehalt an ätherischem Öl, Apigenin, Alpha-Bisabolol, Chamazulen sowie Auswertung der Ergebnisse

Triploide Pflanzen bilden im Allgemeinen keine Samen aus. Im Ernteverfahren von Kamille ist es üblich, dass immer ein Teil Blüten mit bereits reifen Samen mit dem Erntegut erfasst wird. Zur Klärung der Frage, ob im Fall einer triploiden Kamillensorte aufgrund der ausbleibenden Samenbildung mit inhaltsstofflichen Veränderungen in der Blütendroge zu rechnen ist, wurden am Beispiel von zwei Kamillensaatgut-Herkünften aus dem Erntejahr 2010 die ätherischen Ölgehalte parallel im Kamillensamen sowie in dem dabei anfallenden Blütengrus bestimmt.

Resultat:

Herkunft 1 – Gehalt an äth. Öl	im Kamillengrus:	0,27 ml/100g TS
	im Kamillensamen:	0,02 ml/100g TS

Das entspricht 7,4 % des äth. Ölgehaltes, der in den Blütenbestandteilen gebildet wird.

Herkunft 2 - Gehalt an äth. Öl	im Kamillengrus:	0,61 ml/100g TS
	im Kamillensamen:	0,02 ml/100g TS

Das entspricht 3,2 % des äth. Ölgehaltes, der in den Blütenbestandteilen gebildet wird.

Das Ergebnis der Analysen zeigt, dass Kamillensamen geringe Gehalte an ätherischem Öl aufweisen, die jedoch für den Gesamtölgehalt der Blütendroge unbedeutend sind. Womit sich die weitere Analyse des Inhaltsstoffspektrums erübrigte. Auf Grund des geringen Anteiles an Inhaltsstoffen im Samen ist bei triploiden, samenlosen Sorten nicht mit einer nennenswerten Verminderung des Inhaltsstoffgehaltes zu rechnen.

Arbeitspaket VI (PHARMAPLANT GmbH Artern)

Aufgabenstellung: **Zusammenstellung der Machbarkeitsstudie**

Zu VI.1: Sichtung, Auswertung und Verdichtung der Fremdleistungen und Einarbeitung in die eigenen Rechercheergebnisse

Das Ergebnis der Arbeitspakete wurde anlässlich dreier Treffen am 22.2.2011, 11.5.2011 und 28.06.2011 eingehend analysiert und in Hinblick auf die Realisierbarkeit des Vorhabens „Triploide Kamille“ mit allen Projektteilnehmern erörtert. Auf der Grundlage dieser Erörterung wurde der vorgelegte Bericht erstellt; er ist mit allen Teilnehmern abgestimmt.

Die Teilnehmer der Machbarkeitsstudie haben aus dem Ergebnis der Literaturrecherchen, eigener Erfahrung und den während der Laufzeit der Studie durchgeführten Experimenten einen Züchtungsablaufplan für eine triploide Kamillesorte entwickelt.

Dieser Züchtungsablaufplan ist im Teil 2 des Ergebnisberichtes ausgeführt.

Zu VI.2: Wissenschaftliche Bewertung der zusammengetragenen Fakten und Bewertung der Machbarkeit einschließlich Entscheidungsvorschlägen für den Projektträger durch Herrn Professor Dr. J. Grunewaldt, Universität Hannover

In der wissenschaftlichen Bewertung der Ergebnisse der Machbarkeitsstudie ist festzustellen, dass aufgrund der zusammengetragenen Informationen die Züchtung einer triploiden Kamillesorte möglich, aber mit Risiken behaftet ist. So fehlen Informationen über

die genetische Stabilität triploider Kamillegenotypen, die Konsistenz der Ploidiestufe und die Sterilität. Da es sich dabei um genetisch determinierte Merkmale handelt, ist durch entsprechende Selektion die benötigte Stabilität mit großer Wahrscheinlichkeit zu etablieren.

Die Abschätzung der genannten Risiken ist eine Voraussetzung für das Gelingen eines Züchtungsvorhabens „Triploide Kamille“. Untersuchungen dazu sind daher dem Gesamtvorhaben entsprechend zu gewichten.

Ich empfehle dem wissenschaftlichen Beirat zum Demonstrationsvorhaben Kamille, Baldrian und Melisse auf Grund der Ergebnisse dieser Machbarkeitsstudie das Vorhaben „Züchtung einer triploiden Sorte von *Matricaria recutita* (L.)“ weiter zu verfolgen. Weiterhin empfehle ich, dem Projektträger entsprechend zu berichten, und ihn um die Ausschreibung für das Vorhaben „Entwicklung einer triploiden Kamillesorte“ zu ersuchen.

Ergebnisbericht Teil 2:

Umsetzung der Ergebnisse der Machbarkeitsstudie für die Züchtung einer triploiden Kamillesorte

Aus den Informationen der Literaturrecherche, den Ergebnissen der Versuchsanstellung im Rahmen der Machbarkeitsstudie und langjähriger, wissenschaftlicher und praktischer Erfahrung der an der Machbarkeitsstudie beteiligten Partner wurde ein Plan zum Züchtungsablauf entwickelt. Dieser umfasst drei Phasen:

In der ersten Phase die Erarbeitung des Ausgangsmaterials, in der zweiten die Entwicklung der Elternkomponenten und in der dritten die Testung der Kombinationseignung, die Prüfung von F1-Hybriden und die Entwicklung einer triploiden Sorte.

Nachfolgend werden die Aufgaben in den einzelnen Phasen aufgelistet. Die Verteilung der Teilaufgaben auf die Teilnehmer ist aus dem beigefügten Züchtungsablaufplan zu ersehen (siehe Anlage 1).

Phase I: Erarbeitung der Voraussetzungen

Teilaufgaben sind:

- Selektion und Identifikation von Triploiden in Sorten, Populationen und Zuchtmaterial sowie Erfassung von Blühverhalten, Samenansatz (Fertilität) und Ploidiestabilität
- Selektion von männlich sterilen (MS) und weiblich fertilen Kamillepflanzen,
- Selektion von selbstinkompatiblen (SI) Kamillepflanzen,
- Entwicklung von cytoplasmatisch männlich sterilen (CMS) Kamillepflanzen,
- Induktion von männlich sterilen (MS) und cytoplasmatisch männlich sterilen (CMS) Kamillepflanzen,
- Entwicklung von potentiellen Mutterpflanzen-Linien A aus den männlich sterilen, weiblich fertilen Selektionen.

Das benötigte Pflanzen-Ausgangsmaterial ist bei den Teilnehmern vorhanden. Bei Bedarf kann es durch weiteres Material internationaler Genbanken sowie aus Wildsammlung ergänzt werden.

Die Aufteilung der in Phase I durchzuführenden Aufgaben auf die Teilnehmer und deren Kompetenz ist aus dem Züchtungsablaufplan ersichtlich (siehe Anlage 1).

Zu treffende Entscheidungen nach Meilenstein I:

- Entsprechen die selektierten Triploiden im Blühverhalten, Samenansatz (Fertilität) und der Ploidiestabilität den geforderten Voraussetzungen?
- Konnten stabile, weiblich fertile und männlich sterile Genotypen entwickelt werden?
- Welche genetische Basis für männliche Sterilität haben diese Linien?

Phase II: Entwicklung der Elter-Komponenten

Auf Grund der Ergebnislage in Phase I (siehe Meilenstein I) erfolgt eine Entscheidung über die im weiteren Züchtungsablauf zu verwendende männliche Sterilität. Bevorzugt wird zunächst die Verwendung einer kerngenetisch kontrollierten männlichen Sterilität.

Teilaufgaben sind:

- Entwicklung männlich fertiler Bestäuberlinien für $A = A'$,
- Entwicklung männlich und weiblich fertiler Vaterlinien B.

Die Aufteilung der in Phase II durchzuführenden Teilaufgaben und die dazu benötigte Kompetenz sind aus dem Züchtungsablaufplan ersichtlich (siehe Anlage 1).

Zu treffende Entscheidungen nach **Meilenstein II:**

- Konnten die männlich sterilen, weiblich fertilen Mutterlinien A sowie die Bestäuberlinien A' zur generativen Erhaltung von A entwickelt werden? Wenn ja, Eintritt in Phase III; wenn nein ist über das weitere Vorgehen zu beraten.

Phase III: Testung der Kombinationseignung und Sortenentwicklung

Teilaufgaben sind:

- Selbstung selektierter A- und B-Linien,
- Feststellung der Kombinationseignung selektierter A- und B-Linien.

Die Aufteilung der in Phase III durchzuführenden Teilaufgaben und die dazu benötigte Kompetenz sind aus dem Züchtungsablaufplan ersichtlich siehe Anlage 1).

Zu treffende Entscheidungen nach **Meilenstein III:**

- Stehen leistungsfähige Kreuzungskombinationen zur Prüfung unter Versuchs- und Anbaubedingungen zur Verfügung? Wenn ja, Fortsetzung des Züchtungsablaufplanes, wenn nein ist über das weitere Vorgehen zu beraten.

Weitere Teilaufgaben sind:

- Prüfung der besten F1-Hybriden unter Versuchs- und Praxisbedingungen,
- Vermehrung der A-, A' - und B-Linien und Produktion von F1-Saatgut,
- Anmeldung der besten F1-Hybriden zum Sortenschutz.

Anlage 1: Züchtungsablaufplan

Literaturverzeichnis

- Baydar H., Gökmen O., 2003: "Hybrid seed production in safflower (*Carthamus tinctorius*) following the induction of male sterility by gibberellic acid." *Plant Breeding* **122**: 459-461.
- Carlsson J., Glimelius, K., 2010: „ Cytoplasmic Male-Sterility and Nuclear Encoded Fertility Restoration". in F. Kempken (ed.), *Plant Mitochondria*: 469-491.
- Chakraborty K., Devakumar C., 2006: "Ethyloxanilates as specific male gametocide for wheat (*Triticum aestivum* L.)." *Plant Breeding* **125 (5)**: 441-447.
- Franz Ch., 1992: "Genetica biochemical e coltivazione della camomilla (*Chamomilla recutita* (L.) Rausch.)." *Agricoltura Ricerca* **131**, 87-96.
- Franz Ch., Hölzl J., Vömel A., Wickel I., 1981: Arbeitsbericht 1979/1980 (Kap.6 des Forschungsantrages Sept. 1981) zu Kamille, *Matricaria chamomilla* L. und Baldrian, *Valeriana* L. species, Freising, Marburg, Gießen.
- Franz Ch., Massoud H., 1989: "Genotype-Environment Interactions and Breeding of *Chamomilla recutita*." *Planta med.* **55**, 220.
- Jan C. C., Rutger J.N., 1988: "Mitomycin C- and streptomycin-induced male sterility in cultivated sunflower." *Crop-Science Madison: Crop Science Society of America* **28 (5)**: 792-795.
- Khan M. S., 2005: "Plant biology: Engineered male sterility." *Nature* **436**: 783-785.
- Leino M., Thyselius S., Landgren M., Glimelius K., 2004: "*Arabidopsis thaliana* chromosome III restores fertility in a cytoplasmic male-sterile *Brassica napus* line with *A. thaliana* mitochondrial DNA." *Theor. Appl. Genet.* **109**: 272-279
- Mader E., 1998: „Experimentelle Überprüfung des Hardy-Weinberg Gleichgewichts von Bisabolol-Chemotypen bei tetraploiden Kamillen.“ Diplomarbeit, Institut für Angewandte Botanik der Veterinärmedizinischen Universität Wien.
- Mader E., Bein-Lobmaier B., Novak J., Franz Ch., 2007: "The Effect of Contaminating an α -Bisabolol with an α -Bisabololoxide (A,B) Chemotype of Tetraploid Chamomile." *Proceedings of the 1st International Symposium on Chamomile Research, Development and Production, Prešov, Slovak Republic, June 7-10, 2006, Acta Horticulturae* **749**, 97-102.
- Massoud H., Franz Ch., 1990a: „Quantitative Genetical Aspects of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert.“ *J. Ess. Oil Res.* **2**, 15-20.
- Massoud H., Franz Ch., 1990b: „Quantitative Genetical Aspects of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. II. Genotype-Environment Interactions and Proposed Breeding Methods.“ *J. Ess. Oil Res.* **2**, 299-305.
- Meirmans P. G., Den Nijs J. C., Van Tienderen P. H., 2006. „Male sterility in triploid dandelions: asexual females vs. asexual hermaphrodites.“ *Heredity*. **96 (1)**: 45-52.
- Miller J., Fick G., 1978: "Adaptation of reciprocal full sib selection in sunflower breeding using gibberellic acid induced male sterility." *Crop Science* **18 (1)**, 161-162.
- Murai K., Tsunewaki K., 1993: "Photoperiod-sensitive cytoplasmic male-sterility in wheat with *Aegilops crassa* cytoplasm." *Euphytica* **67**: 41-48.
- Noyes R. D., 2007: "Apomixis in the Asteraceae: Diamonds in the rough." *Functional Plant Science and Biotechnology* **1(2)**: 207-222.
- Owen F. V., 1945: "Cytoplasmically inherited male-sterility in sugar beets." *J. Agric. Res.* **71**: 423-440.
- PATENT-DE: „Verwendung von Sulfonylharnstoffen als Gametozide.“ <http://www.patent-de.com/19890302/DE3727629A1.html>, 2008

- Peckert, T., Chrtek, J., 2006: "Mating interactions between coexisting diploid, triploid and tetraploid cytotypes of *Hieracium echinoides* (Asteraceae)." *Folia Geobotanica* Vol. **41 (3)**: 323-334.
- Pirkhezri M., Hassani M. E., Hadian J., 2010: "Genetic diversity in different populations of *Matricaria chamomilla* L. growing in Southwest of Iran, based on morphological and RAPD markers." *Res. J. Med. Plant.* **4**: 1-13.
- Schuster W., Liu S., 1983: „Über die gametozide Wirkung von Gibberellinsäure auf unterschiedliche Genotypen der Sonnenblume.“ *Angewandte Botanik* **57 (1-2)**, 85 – 98.
- Spirova M., 1975: "New data on the male sterility in sunflowers induced by gibberellic acid." *Plant Science*, **12 (9)**, 10 – 17.
- Taviana P., 2001: "Variation for agronomic and essential oil traits among wild populations of *Chamomilla recutita* (L.) Rausch from Central Italy." *J. Herb. Species Med. Plants*, **9**: 1049-6475.
- van der Hulst R. G., Meirmans P., van Tienderen P. H., van Damme J. M., 2004: „Nuclear-cytoplasmic male-sterility in diploid dandelions." *Heredity*. **93 (1)**: 43-50.
- Wagner C., Friedt W., Marquard R.A., Ordon F., 2005: "Molecular analyses on the genetic diversity and inheritance of (-)-alpha-bisabolol and chamazulene content in tetraploid chamomile (*Chamomilla recutita* (L.) Rausch.)" *Plant Science* **169**: 917-927.

Züchtungsablaufplan für die Entwicklung einer triploiden Kamille-Sorte (*Matricaria recutita* L.)

Teil 1: Prüfung des Blühverhaltens, der Fertilität und Stabilität von spontanen triploiden Kamillepflanzen

Methoden

Material

Aufgabenverteilung/
Kompetenzen

Durchflusscytometrisches Einzelpflanzenscreening zur Selektion von spontanen triploiden Pflanzen

und

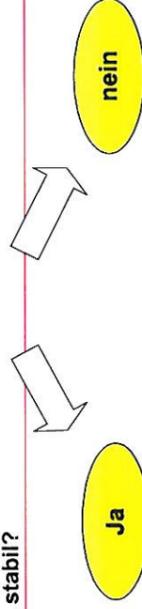
Feldprüfung von triploiden Pflanzen im Vergleich zu di- und tetraploiden Pflanzen zur Erfassung des Blühverhaltens, der Fertilität und Stabilität des Ploidiegrades

* tetraploide Sorten Handelsaatgut bei der PHARMAPLANT aus dem laufenden 'KA-BA-MEL' - Kamille-Züchtungsprojekt sowie weitere Sorten anderer Herkunftsgelände bei dem IAB Wien

* triploide Pflanzen aus In-vitro-Vermehrung der PHARMAPLANT, die aus den Versuchen der Machbarkeitsstudie hervorgegangen und In-vitro überführt wurden;

IPK	IAB	PHARMAPLANT
Einzelpflanzenscreening mittels Durchflusscytometrie;	- Pflanzenanzucht für das Einzelpflanzenscreening - Durchführung Einzelpflanzenscreening mittels Flowcytometrie; - Feldprüfung triploider Pflanzen - Bonituren zum Blühverhalten, Sterilität und Stabilität der Triploide	- Pflanzenanzucht für das Einzelpflanzenscreening; - Feldprüfung triploider Pflanzen unterschiedlicher Sorten - Bonituren zum Blühverhalten, Sterilität und Stabilität der Triploide - In-vitro-Vermehrung von triploiden Pflanzen

Meilenstein I: 1. Sind spontan entstandene Triploide im Blühverhalten di- und tetraploiden Pflanzen überlegen?
 2. Sind Triploide verlässlich steril?
 3. Sind Triploide cyto-genetisch stabil?



Fortsetzung der Sortenentwicklung mit Teil 2

Beratung der Projektpartner über das weitere Vorgehen

Teil 2: Entwicklung von Genotypen, die eine Bestäubungslenkung ermöglichen

1. 1 Selektion von männlich sterilen (ms) und weiblich fertilen Kamillepflanzen

und

1. 2 Selektion von selbstinkompatiblen Kamillepflanzen

und

1. 3 Entwicklung von cytoplasmatisch männlich sterilen, weiblich fertilen Kamillepflanzen

und

1. 4 Induktion von männlich sterilen Mutanten von Kamillepflanzen

* vorhandenes, bereits analysiertes Sorten- und Handelsaatgut bei der PHARMAPLANT aus dem laufenden 'KA-BA-MEL' - Kamille-Züchtungsprojekt (25 Sorten/Handelspopulationen); * bei der vet.med. Univ. Wien vorhandenes Kamille-Zuchtmaterial aus früherer Sortenzüchtung * vorhandenes Züchtungsmaterial der PHARMAPLANT sowie Wildmaterial aus Genbankbeständen (insges. mind. 20 Akzessionen) * Wildsammlung sowie Bezug von weiterem Genbankmaterial mit großer genetischer Breite * induzierte männlich sterile Mutanten	- durchflusscytometrische Analyse von Einzelpflanzen; - mikroskopische Untersuchung zur Selbstinkompatibilität (SI); - Etablierung des Genomvergleiches von Kamille-Genotypen - Entwicklung molekularer Marker für männliche Sterilität; - Übernahme von Einzelpflanzen-isolierungen in Abstimmung mit PHARMAPLANT	- umfangreiches Screening von Zucht- und anderem Material zum Auffinden männlich steriler Pflanzen - Versuche zur Induktion männlich steriler Pflanzen der Echten Kamille auf Basis von Gefülltblütigkeit - Versuche zur chemischen Kastration - Kreuzungen mit Wildformen zur Gewinnung von cms-Pflanzen	- Bereitstellung von eigenem Sorten- und Züchtungsmaterial, bedarfsweise Beschaffung von weiterem Genbank- und Wildmaterial; - Bereitstellung vorhandener bonitur- und Analysendaten der Prüfglieder - Anzucht (Pflanzkultur) und Prüfung des ausgewählten Materials bei isolierter Abblüte auf Blühmerkmale und Samenansatz bei Handbestäubung; - In-vitro-Überführung, Erhaltung und Vermehrung männlich steriler Individuen; - Kreuzungsexperimente
--	--	--	--

Fortsetzung siehe Blatt 2

Züchtungsablaufplan für die Entwicklung einer triploiden Kamille-Sorte (*Matricaria recutita* L.)

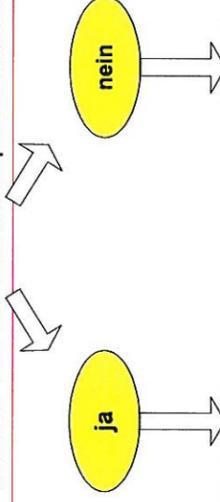
Methoden

Material

Aufgabenverteilung/
Kompetenzen

IPK	IAB	PHARMAPLANT
-----	-----	-------------

Meilenstein II: Ist die Entwicklung von männlich sterilen, weiblich fertilen Genotypen gelungen, die auf einer kerngenetischen (ms) oder cytoplasmatischen (cms) Kontrolle oder auf Selbstinkompatibilität beruht?



Aus versuchstechnischen Gründen soll die Weiterentwicklung des Züchtungsablaufes auf der Basis der kerngenetisch kontrollierten männlichen Sterilität erfolgen.

Beratung der Projektpartner über die weitere Vorgehensweise - Entscheidung über andere Möglichkeiten zur Entwicklung männlicher Sterilität, wie Gametozidanwendung, Protoplastenfusion, Gentransfer - oder Abbruch -

Phase II = Entwicklung der Komponenten

2015 - 2017
drei Bearbeitungsjahre

2.: Entwicklung einer männlich fertilen Bestäuberlinie für A = A'

2.1 Entwicklung männlich fertiler Bestäuberlinien (A') zur generativen Erhaltung von A durch Rückkreuzungen mit A'

* Das Material für die Rückkreuzungen bildet jeweils die Population, aus der die männlich sterilen Pflanzen selektiert wurden.

- durchflußcytometrische Analyse aller selektierten, männlich fertilen Bestäuberlinien
- Erfassung des Rückkreuzungsfortschrittes (Angleichung der Genome von A und A') durch vergleichende DNA-Analyse der verwendeten A und A' Genotypen
- umfangreiche Isolierung von Kreuzungen von A x A' und Analyse des Samenansatzes aus Selbstung und Kreuzung

- Durchführung von Rückkreuzungen und isolierte Abblüte unter Gewächshausbedingungen
- Prüfung der Kreuzungsprodukte

- Durchführung von Rückkreuzungen und isolierte Abblüte im Freiland
- Prüfung der Kreuzungsprodukte

3.: Entwicklung von männlich und weiblich fertilen Vaterlinien (B) für A

3.1 Selektion der männlich und weiblich fertilen Vaterlinien

* Das Material für die Selektion bilden leistungsstarke Sorten, die im Rahmen des Projektes 'klassische Kamillenzüchtung' bereits getestet und charakterisiert sind.

- durchflußcytometrische Analyse aller selektierten, männlich fertilen Vaterlinien
- umfangreiche Isolierung von Kreuzungen von A x B und Analyse des Samenansatzes aus Selbstung und Kreuzung

- Selektion von leistungsfähigen Vaterpflanzen aus eigenem, leistungsfähigen Sorten- und Zuchtmaterial
- vegetative Erhaltung

- Selektion von leistungsfähigen Vaterpflanzen aus bereits getesteten und inhaltlich definierten Sorten
- In-vitro-Erhaltung

Meilenstein III: Die männlich sterilen, weiblich fertilen Mutterlinien (A) sowie die Bestäuberlinien (A') zur generativen Erhaltung von (A) sind entwickelt. Aus leistungsstarken Sorten wurden als potentielle Vaterlinien (B) Einzelpflanzen ausgelesen und vermehrt. Diese stehen für Testkreuzungsprogramme zur Verfügung.

Phase III = Testung der Kombinationsleistung und Sortenentwicklung

2018 - 2020
drei Bearbeitungsjahre

4.: Testung von Kreuzungskombinationen zur Erzeugung einer leistungsfähigen, triploiden F1-Hybridsorte

4.1 Homogenisierung der besten Linien durch Selbstung (Inzuchtgenerationen)

* Mutter- und Vaterlinien, die für das Testkreuzungsprogramm ausgewählt werden, werden ingezüchtet.

- durchflußcytometrische Kontrolle der Ploidie-Stabilität aller verwendeten (A)- und (B)-Elterlinien
- Unterstützung bei der Produktion der Testkreuzungspartner

- Prüfung der Kombinationsleistung erster Prüfort
- Selbstung der besten A-Linien (mit A')

- Selbstung der besten B-Linien
- Durchführung umfangreicher Testkreuzungen zwischen potentiellen Hybridparenten
- Prüfung der Kombinationsleistung (zweiter Prüfort)
- Erhalt und Produktion von Elternlinien

4.2 Feststellung der Kombinationsleistung mittels Polycross- bzw. Topcross-Verfahren

* weitgehend homogene männlich sterile Mutterlinien A sowie männlich und weiblich fertile Vaterlinien B (aus 4.1)

Meilenstein IV: Leistungsfähige Kreuzungskombinationen stehen zur Prüfung unter Versuchs- und Anbaubedingungen zur Verfügung.

5.: Prüfung der F1-Hybriden und Sortenschutzanmeldung der leistungsfähigsten triploiden F1-Hybride

5.1: Prüfung der besten F1-Hybriden unter Versuchsbedingungen sowie als Großparzellen unter Anbaubedingungen

- Prüfung der besten F1-Hybriden unter Versuchsbedingungen
- zweiter Prüfort, Organisation und Betreuung der Großparzellenprüfung unter Anbaubedingungen

5.2: Fremdungsfreie generative Vermehrung der Linien A u. B, Produktion von F1-Saatgut

- durchflußcytometrische Kontrolle der A- und B-Linien
- Prüfung der besten F1-Hybriden unter Versuchsbedingungen

5.3: Anmeldung der besten triploiden F1-Hybridsorte zur Sortenschutzprüfung bei dem BSA