

Entwicklung eines Verfahrens für die Zitronenmelisse (*Melissa officinalis*) zur Erzeugung von Doppelhaploiden und Suche nach Elementen für die Schaffung eines Systems zur Befruchtungsregulierung auf der Grundlage männlicher Sterilität

Laufzeit	01.04.2010 - 15.01.2014
Forschungsstelle	Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI) Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen (ZG) Erwin-Baur-Straße 27 06484 Quedlinburg
Projektleitung	Dr. Frank Marthe Dr. Ute Kästner
Förderung	Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft unter dem Förderkennzeichen 22020008 aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestags.

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



Problemstellung/Zielsetzung

Nur ein geringer Anteil der in Deutschland verarbeiteten Zitronenmelisse (*Melissa officinalis* L.) stammt aus heimischem Anbau. Das für den deutschen Anbau genutzte Sortenmaterial befindet sich auf dem Niveau von inhomogenen Landsorten geringer Leistung und Zuchtsorten mit geringem Anbauumfang. Begrenzende Faktoren für eine Anbauausdehnung in Deutschland sind der gegenwärtig erzielbare Gesamtertrag mit den Problempunkten: Nutzung im ersten Standjahr, Winterhärte und Gesamtnutzungsdauer. Eine verbesserte Linien- oder Synthetiksorte wird zu einer Ertragssteigerung, der Erhöhung der Qualität sowie der Verbesserung der Wirtschaftlichkeit beitragen und damit auch zur Vergrößerung des deutschen Anbaus als einem Hauptziel des Demonstrationsprojektes „Verbesserung der internationalen Wettbewerbsposition des deutschen Arznei- und Gewürzpflanzenanbaus am Beispiel der züchterischen und anbautechnologischen Optimierung von Kamille, Baldrian und Zitronenmelisse“.

Für die Beschleunigung der Schaffung homozygoter Linien von Melisse wird eine Technik zur Erzeugung doppelhaploider Pflanzen benötigt. Die Methodik zur Haploidenerzeugung und zur anschließenden Diploidisierung als Voraussetzung für die Erzeugung doppelhaploider Pflanzen war im Rahmen des Projektes zu entwickeln. Da Erfahrungen für die Haploidenerzeugung bei Melisse international nicht vorliegen, wurden alle einschlägigen Verfahren auf ihre Adaptierbarkeit untersucht. Die Suche nach männlicher Sterilität war ebenfalls Bestandteil des Projektes.

Ergebnisse

International liegen keine Erfahrungen zur Haploidenerzeugung von Melisse vor. Deshalb wurden Erfahrungen bei anderen Kulturarten genutzt. Die recherchierten Ergebnisse bei Lippenblütengewächsen (*Lamiaceae* Lindl.) und anderen Kulturarten wurden in die Arbeiten einbezogen.

Etablierung der *In-vitro*-Kultivierung von Melisse

Zu Beginn des Projektes wurde die Eignung verschiedener Nährmedien und Kulturbedingungen für eventuell entstehende Regeneratpflanzen und deren Bewurzelung durch Etablierung von Melissepflanzen *in vitro* getestet. Aus der Sammlung von Melisseherkünften der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) wurden 10 Pflanzen nach der im Vorfeld beobachteten Überwinterungsfähigkeit und den analysierten Ätherisch-Öl-Werten ausgesucht. Sprossspitzen und Stängelstücke wurden von Gewächshauspflanzen entnommen, mit Natriumhypochlorit oberflächensterilisiert und auf agarverfestigte Nährmedien gesetzt. Die Inkulturnahme erwies sich als erfolgreich und unkompliziert. Unterschiede zeigten sich bei der Bewurzelung und Bestockung der Pflanzen in Abhängigkeit von den getesteten Nährmedien. Von jedem Genotyp konnten problemlos Pflanzen im Gewächshaus in Erde überführt werden. Diese Pflanzen aus *In-vitro*-Kultur wurden nach Blühinduktion als Ausgangspflanzen für die Gewinnung von Gameten genutzt.

Pflanzenanzucht in der Klimakammer für die Entnahme von Antheren

In den Versuchen zur Haploidenkultur wurden Pflanzen aus der Klimakammer, dem Gewächshaus und vom Versuchsfeld als Ausgangsmaterial für die Haploidenkultur genutzt. Die Anzucht von Pflanzen an allen drei Standorten sollte die Verfügbarkeit von Knospen über das Jahr gestaffelt ermöglichen. Aus diesem Grund wurde Pflanzenmaterial in Gewächshaus und Klimakammer überführt. Die anfänglich fehlende Blühbereitschaft konnte durch eine zwölfwöchige Vernalisation der Pflanzen überwunden werden. Blühinduktion durch Gibberellinsäurebehandlung konnte nicht erreicht werden.

Antheren-, Mikrosporen- und Ovarienkultur

Insgesamt wurden 53 verschiedene Akzessionen in die Versuche zur Haploidenkultur einbezogen: 24 Akzessionen der Melisse-Sammlung der LfL, 20 Akzessionen der Bundeszentralen *Ex-situ*-Genbank des Leibniz-Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben, 7 Akzessionen der russischen Genbank des N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry (VIR) in St. Petersburg und zwei Sorten.

Es wurden verschiedene Temperatur- und Medienvarianten in allen Haploidenkulturen getestet, beginnend mit der Antherenkultur. Dafür wurde die Pollenentwicklung im Verhältnis zu Blütenentwicklung und Kelchlänge bzw. Knospenlänge untersucht. Knospen mit Pollen im für die Antheren- bzw. Mikrosporenkultur günstigen späten Einkernstadium wurden ab Blühbeginn von den Pflanzen entnommen, mit Natriumhypochlorit oberflächensterilisiert und unter dem Mikroskop in der sterilen Werkbank präpariert. Die Antheren wurden auf künstliches Nährmedium übertragen. Zur Kontrolle erfolgte die Entnahme von Antheren jeder Versuchsvariante, die fixiert, mit Karminessigsäure gefärbt und unter dem Mikroskop auf Teilungsstadien untersucht wurden. Die Versuche wurden unter dem Stereomikroskop und dem Umkehrmikroskop ausgewertet. Die sporophytischen Teilungen konnten bis zu Mikrokalli verfolgt werden. Kallus oder Embryoide wurden nicht beobachtet. Insgesamt wurden 69.760 Antheren aufgelegt.

In den einzelnen Versuchsserien wurde versucht, die Bedingungen zu optimieren. Das gestaltete sich schwierig, da nur wenige Veränderungen an den Antheren zu beobachten waren. Auf flüssigen und agarverfestigten Nährmedien sahen die Antheren anfangs gleich aus, aber auf

festen Medien verbräunten die Antheren dann schneller. Deshalb wurden in weiteren Versuchen flüssige Nährmedien verwendet.

Für die Mikrosporenkultur wurden verschiedene Varianten getestet. Entweder wurden die Antheren präpariert und vorkultiviert oder direkt die Mikrosporen aus den Antheren isoliert und in flüssigem Medium kultiviert. Für die Mikrosporenkultur wurden insgesamt 24.020 Antheren präpariert und vorkultiviert bzw. isolierte Mikrosporen in flüssigem Medium mit Kälte vorbehandelt. Zu Beginn wurde die Größe der Mikrosporen ermittelt. Sie lag zwischen 30 und 35 µm Durchmesser. Die Isolation der Mikrosporen erfolgte durch Zerschlagen der Antheren mittels Magnetrührer, Abgießen durch einen Filter (40 µm) und zweimaliges Waschen und Zentrifugieren in mannitolhaltigem Nährmedium. Kultiviert wurde in maltosehaltigem Nährmedium mit einer Dichte von 100.000 - 150.000 Mikrosporen/ml. Eine Medienkonditionierung erfolgte bei späteren Versuchsvarianten mit Weizenfruchtknoten. Nach 14 Tagen Kultur bei 27 °C in Dunkelheit wurden die Kulturen einem 16stündigen Lichtrhythmus ausgesetzt. In den meisten Mikrosporen war eine Stärkeanreicherung zu beobachten. In der Mikrosporenkultur wurde einzeln eine von der Mikrosporogenese abweichende sporophytische Entwicklung des Pollens beobachtet. Verschiedene Strukturen, von zweikernigen über mehrzellige bis hin zu Mikrokalli, konnten gefunden werden. Bislang ist es nicht gelungen, aus diesen Mikrokalli makroskopisch sichtbare Kalli, Embryoide oder Pflanzen zu regenerieren.

Fruchtknoten und Samenanlagen wurden auf agarverfestigten Medien kultiviert. Unbefruchtete Samenanlagen, insgesamt 7.100, wurden auf Nährmedium übertragen und in Kultur genommen. Das Präparieren der Samenanlagen erwies sich als zeitaufwendig. Außer kallusartigen Schwellungen an der Schnittstelle einiger Samenanlagen erfolgten keine Entwicklungen. Mit dem Auflegen ganzer Fruchtknoten im Gegensatz zu Samenanlagen wird der Anteil somatischen Gewebes weiter erhöht. Bei der Kultur zeigte sich bei einem Teil der Fruchtknoten eine Schwellung der darauf sitzenden Samenanlagen, aber diese verbräunten nach ca. 14 Tagen und starben wie die isolierten Samenanlagen ab. Sowohl bei den kultivierten Samenanlagen als auch den aufgelegten Fruchtknoten (3.685) gab es keine Entwicklung haploider Strukturen.

Diploidisierung von Melissepflanzen

Um bei erfolgreicher Erzeugung haploider Pflanzen einen Vorlauf zu haben und um tetraploide citralhaltige Pflanzen zu charakterisieren, wurde im Vorfeld eine Polyploidisierung diploider Pflanzen vorgenommen. Ein Teil der *in vitro* etablierten Pflanzen wurde dafür vermehrt. Die Polyploidisierung wurde nicht nur mit Kolchizin in verschiedenen Konzentrationen getestet, sondern auch mit Oryzalin und Trifluralin, die eine gleiche Wirkung erzielen. Aufgrund der abzusehenden chimärischen Struktur der Pflanzen mussten alle frisch ausgetriebenen Sprosse als Einzelpflanzen behandelt werden. Insgesamt überlebten 34% der Pflanzen die Behandlung. Erste durchflusszytometrischer Untersuchungen zeigen Veränderungen in der Genomgröße. Um Chimären auszuschließen, müssen Selbstungsnachkommen hergestellt und untersucht werden.

Screening auf männliche Sterilität

Das Screening auf männliche Sterilität wurde in den Feldversuchen durchgeführt. Es konnten in den 120 getesteten Akzessionen keine männlich sterilen Pflanzen gefunden werden. Das betrifft 68 Akzessionen der bayerischen Sammlung des LFL, 28 Akzessionen der Genbank des IPK Gatersleben und 24 Akzessionen des VIR St. Petersburg.

Erzeugung haploider Pflanzen nach Scheinbefruchtung

Da aus Antheren, Mikrosporen, Samenanlagen und Fruchtknoten keine haploiden Pflanzen hervorgegangen sind, sollte eine siebenmonatige Projektverlängerung dafür genutzt werden, durch Scheinbefruchtung von Melissepflanzen mit Pollen anderer Arten der Lamiaceae oder bestrahltem Pollen von Melisse und anschließender Embryokultur Haploide zu generieren.

Die Scheinbefruchtung von Melissepflanzen erfolgte im Versuchsfeld. Bestäubt wurde mit Pollen von Agastache (*Agastache rugosa x foeniculum*), Bergbohnenkraut (*Satureja montana*), Dost (*Origanum vulgare*) oder Ysop (*Hyssopus officinalis*). Außerdem wurde mit röntgenbestrahltem Pollen von Melisse bestäubt. Prozentual entwickelten sich die meisten Embryonen nach einer Scheinbefruchtung mit Bohnenkraut oder Dost.

Die bestäubten Blüten wurden durch Tüten isoliert. Nach drei Wochen wurden die Knospen entnommen, sterilisiert und unter dem Stereomikroskop präpariert. Der größte Teil der Samenanlagen und Embryonen war abgestorben. Die lebenden Embryonen wurden auf künstlichem Nährmedium im Klimaschrank kultiviert.

Zu Beginn der Versuche zur Scheinbefruchtung mit bestrahltem Melissepollen wurde der Einfluss verschiedener Röntgenbestrahlungsdosen auf die Lebensfähigkeit des Pollens durch die Variierung der Bestrahlungszeit getestet. Bestrahlt wurde mit 20, 35 bzw. 50 Gray. Nach Bestrahlung mit 20 Gray waren noch ca. 20% der Pollen, bei 35 Gray noch einzelne Pollen lebensfähig. Bei Bestrahlung mit 50 Gray waren alle Pollenkörner abgestorben. Nur aus Bestäubungen mit Pollen nach Bestrahlung mit 20 Gray gingen Pflanzen hervor. Embryoide aus Bestäubungen mit Pollen nach Bestrahlung mit 35 und 50 Gray entwickelten sich nicht zu Pflanzen.

Insgesamt entwickelten sich 39 Pflanzen aus der Embryokultur nach Scheinbefruchtung. Diese wurden in Kulturgläser überführt und *in vitro* vermehrt. Die Pflanzen wurden in das Versuchsfeld gepflanzt. In ersten durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten sich Peaks unterschiedlicher Größe für diploides bzw. triploides Ploidieniveau oder mehrere Peaks für chimerische Verhältnisse.

Projektbezogene Veröffentlichungen

Krüger, H.; Schütze, W.; Lohwasser, U.; Marthe, F.
Qualität bei Melisse – gestern und heute: Hydroxymitsäurederivate versus Rosmarinsäure, vergleichende Untersuchungen an einer Melissenkollektion (*Melissa officinalis* L.)
Zeitschrift für Arznei- und Gewürzpflanzen (2010), 15(1), 31-32

Kittler, J.; Kästner, U.; Junghanns, W.; Marthe, F.; Blüthner, W.D.
Entwicklung von Hochleistungslinien in Melisse (*Melissa officinalis*). Poster.
Poster auf der Tagung Arzneipflanzenanbau in Deutschland – mit koordinierter Forschung zum Erfolg, 25.-26.10.2010, Neustadt an der Weinstraße, Deutschland
Abstract in: Arzneipflanzenanbau in Deutschland – mit koordinierter Forschung zum Erfolg, 199

Kästner, U.; Kittler, J.; Marthe, F.
Gelingt die Erzeugung doppelt-haploider Pflanzen in Melisse (*Melissa officinalis* L.)?
Poster auf der 6. Fachtagung Arznei- und Gewürzpflanzen, 19.-22.9.2011, Berlin, Deutschland
Abstract in: Innovation, Vielfalt und Nutzen, Kurzfassung der Vorträge und Poster, 105-107

Kästner, U.; Kittler, J.; Marthe, F.
Experiments on *in vitro* production of haploids via anther, microspore and ovule culture in lemon balm (*Melissa officinalis* L.).
Poster auf dem 5th International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, 18.-20.6.2012, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria
Abstract in: 5th International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, 18.-20.6.2012, Veterinärmedizinische Universität Wien, P 37, 81

Kittler, J.; Krüger, H.; Schütze, W.; Kästner, U.; Junghanns, W.; Blüthner, W.D.; Lohwasser, U.; Marthe, F.

Charakterisierung unterschiedlicher Genpools der Melisse (*Melissa officinalis*) als Basis für die Entwicklung von züchterisch wertvollem Ausgangsmaterial.

Vortrag (Kittler, J.) auf der 6. Fachtagung Arznei- und Gewürzpflanzen, 19.-22.9.2011, Berlin, Deutschland

Abstract in: Innovation, Vielfalt und Nutzen, Kurzfassung der Vorträge und Poster, 93-96

Kittler, J.; Kästner, U.; Budahn, H.; Krüger, H.; Schütze, W.; Fiedler, A.; Lohwasser, U.; Junghanns, W.; Blüthner, W.D.; Marthe, F.

Variability in lemon balm (*Melissa officinalis* L.) characterized by phylogenetic distances and phenotypic data as a basis for new breeding gene pools

Vortrag (Kittler, J.) auf dem 5th International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, 18.-20.6.2012, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

Abstract in 5th International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, 18. - 20.6.2012, Veterinärmedizinische Universität Wien, 30

Kästner, U.

Sporophytische Entwicklung bei Melisse (*Melissa officinalis* L.)

Vortrag auf dem Gemeinsamen Workshop 2012 der AG Arznei- und Gewürzpflanzen (AG 17) der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung (GPZ) und der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), 09.10.2012, Quedlinburg, Deutschland

Abstract in: Gemeinsamer Workshop 2012, Saatgutqualität, Trocknung und züchterische Verbesserung von Zitronenmelisse (*Melissa officinalis*), 12-13

Kittler, J.; Kästner, U.; Krüger, H.; Paladay E.; Marthe, F.; Junghanns, W.; Blüthner, W.D.

Entwicklung von züchterisch wertvollen Linien bei Melisse (*Melissa officinalis*)

Vortrag (Kittler, J.) zum 23. Bernburger Winterseminar, 19.-20.02.2013, Bernburg, Deutschland

Tagungsbroschüre 26-27

Argyropoulos, D.; Barfuss, I.; Biertümpfel, A.; Blüthner, W.D.; Blum, H.; Böhner, M.; Budde, M.; Damerow, L.; Dehe, M.; Graf, T.; Junghanns, W.; Kästner, U.; Kittler, J.; Mahlberg, B.; Marthe, F.; Meinhold, T.; Mellmann, J.; Müller, J.; Paladey, E.; Pietzsch, K.; Plescher, A.; Pude, R.; Reichardt, I.; Schockert, K.; Wahl, S.; Ziegler, T.

Melisse – eine alte Arzneipflanze fit für die Zukunft

Vortrag (Marthe, F.) auf der 2. Tagung Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe, Arzneipflanzenanbau in Deutschland - mit koordinierter Forschung zum Erfolg, 16.-17.10.2013, Bad Blankenburg, Deutschland

Short Paper in: Arzneipflanzenanbau in Deutschland - mit koordinierter Forschung zum Erfolg, 19-23

Kästner, U., Kittler, J., Marthe, F.

Comparison of in vitro haploid induction in balm (*Melissa officinalis*)

Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2016, DOI: 10.1007/s11240-016-1007-4