

Neues über CMS bei Ackerbohnen

W. LINK

Einleitung

Ackerbohne, Erbse, Lupine und Linse sind die in Europa traditionell angebauten Körnerleguminosen. Die Ackerbohne ist seit dem späten Neolithikum bekannt, sie stammt aus dem Nahen Osten oder aus Westasien. Eine Wildart, von der diese Kulturpflanze abstammen könnte, ist nicht bekannt. Etwa 2000 v. Chr. waren Ackerbohnen auf der Iberischen Halbinsel vertreten, wenige Jahrhunderte später datieren Funde auf den Jersey Inseln vor der französischen Küste. Die frühesten Funde der großsamigen Varietät *Vicia faba* L. *major* datieren nach 1000 A.D., in Mitteleuropa wurden solche Samen erst aus dem Mittelalter nachgewiesen (HANELT 1973). Die großsamigen Typen (TKM > 1000 g) werden zumeist als Gemüse verwendet, während die kleinsamigen Typen (TKM > 250g) als Futter verwendet werden. Heute wird die Ackerbohne von Asien über Nordafrika, Europa bis Mittelamerika genutzt.

Der Anbau in Deutschland unterlag in der Vergangenheit starken Schwankungen auf relativ niedrigem Niveau (1977: 14000 ha; 1987: 61000 ha; 1997: 26000 ha). Um die Fruchtart hier zu erhalten, muß sie im Korntrag verbessert werden, vor allen Dingen muß die Stabilität des Ertrages erhöht werden. Zusätzlich zur Resistenz ist auch die Nutzung von Heterosis ein wirksamer Ansatzpunkt, um unvorhersagbare Ertragsschwankungen zu vermindern. STELLING et al. (1994) fanden in einer Versuchsserie über 7 Umwelten in Deutschland, daß die Ökovalenz des Korntrages (von den Autoren als Variationskoeffizient präsentiert) bei den geprüften Hybriden um ein Drittel kleiner ausfiel (diese somit ertragsstabiler waren) als bei den genetisch orthogonalen, mitgeprüften Inzuchtlinien. Es konnte auch gezeigt werden, daß Heterogenität in einer Sorte deren Ertragsstabilität verbessert. Diese und weitere Befunde motivierten bislang die

Züchtung von Populationssorten, insbesondere von synthetischen Sorten (z.B. LINK und RUCKENBAUER 1987). Allerdings bringt diese Züchtungskategorie u.a. durch die nur teilweise Fremdbefruchtung der Ackerbohne (ca. 50 %) besondere Schwierigkeiten mit sich (DIETRICH et al. 1976, von KITTLITZ 1985, LINK 1994).

Blühbiologische Gegebenheiten

Ackerbohnenblüten werden von Bienen und Hummeln besucht. *Vicia faba* ist in genotypabhängigem Grade auch für die Selbstbefruchtung auf Bestäuber (Bienen, Hummeln) angewiesen. Beim Pollensammeln stimulieren diese Insekten die Narbe, wodurch sie für die Befruchtung empfänglich wird. Überträgt das Insekt keinen Fremdpollen, stimuliert es dadurch die Selbstbefruchtung. Überträgt es Fremdpollen, dann liegt auf der Narbe ein Gemisch aus eigenen Pollen und Fremdpollen vor, das Resultat ist eine teilweise Fremdbefruchtung. Europäische Inzuchtlinien zeigen bei völliger Abwesenheit von Bestäubern (mangels Stimulation) einen sehr geringen Samenansatz (autosteril), europäische Hybriden sowie mediterrane und nordafrikanische Genotypen sind dagegen auf diesen Stimulus überwiegend nicht angewiesen (autofertil). Dieser Stimulus kann auch manuell nachgeahmt werden (sog. Tripping, DRAYNER 1959, LAWES 1974). Selbstinkompatibilität im eigentlichen Sinne wurde bei Ackerbohne bisher nicht beobachtet. Für die Fremdbefruchtung ist die Ackerbohne gänzlich auf Hummeln und Bienen angewiesen.

Bestäuberinsekten sammeln Nektar oder Pollen, allerdings nicht beides zugleich. Der Nektar befindet sich am Grunde der Blüte, er ist für kurzrüsslige Bestäuber (Honigbiene, Erdhummel) schwer zu erreichen. Gerade die Erdhummeln beißen regelmäßig ein Loch am Grunde des Kelches durch die Kelch- und Blüten-

blätter (siehe Abbildung 1), wodurch ein direkter Zugang zum Nektar entsteht. In unseren Feldversuchen ist praktisch jede Blüte ab ihrem Aufblühen mit diesem Loch versehen. Die meisten anderen nektarsuchenden Bestäuber benutzen diese Löcher, auch wenn sie sie (wie z.B. die Honigbiene) nicht selbst anbringen können. Dadurch sind solche nektar-orientierten Besuche im Sinne von Bestäubung und Befruchtung unwirksam. Die Übertragung von Pollen beschränkt sich somit im wesentlichen auf pollensuchende Bestäuber - ein wichtiger Unterschied zu z.B. Sonnenblume und Raps. Es stellt sich nämlich die Frage, ob und inwieweit pollensuchende Bestäuberinsekten bei einem Streifenanbau (Vermehrung von CMS-Linien oder Hybridsaatgut-Produktion) "lernen", welcher Streifen keinen Pollen bietet.

Jedenfalls wurde im Streifenanbau von Ackerbohnen beobachtet, daß die Insekten sich länger im pollenfertilen Streifen als im CMS-Streifen aufhielten, und daß sie eher entlang der Reihen "arbeiten" als daß sie zufällig von Pflanze zu Pflanze fliegen. Es war im Streifenanbau der Ansatz der CMS-Linie je nach Umwelt deutlich geringer als der Ansatz vergleichbaren fertilen Materials, auch deutlich geringer als beim Anbau einer Mischung zwischen der CMS-Linie und dem fertilen Material innerhalb eines Streifens (durch diesen Mischanbau könnte es schwieriger für pollensammelnde Insekten sein, Besuche von Pol-

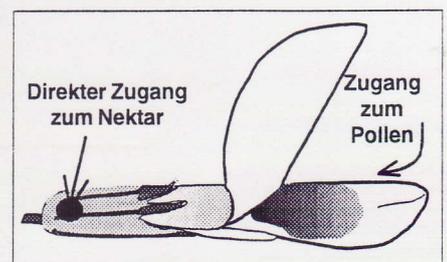


Abbildung 1: Bei Ackerbohnen werden von den Bestäubern verschiedene Zugänge für das Sammeln von Pollen bzw. Nektar genutzt

Autor: Wolfgang LINK, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Georg August-Universität Göttingen, von Sieboldstr. 8, D-37075 GÖTTINGEN



lensterilen systematisch zu vermeiden; BOND, 1989a).

Bislang bekannte CMS-Systeme

Zwei Arbeitsgruppen widmeten sich der Erforschung von CMS bei *Vicia faba*: BOND in Cambridge (PBI, ab 1957) und BERTHELEM in Rennes (INRA, ab 1967). Die französischen Arbeiten mit CMS wurden in den achtziger und neunziger Jahren von DUC an der INRA in Dijon fortgesetzt.

Im Jahr 1957 entdeckte BOND am King's College, Newcastle Upon Tyne, das CMS-System 447. Eine Einzelpflanze (Nr. 447) einer Winterbohnen-Population war ihm wegen ihres hohen Fremdbefruchtungsgrades aufgefallen und hatte überwiegend männlich sterile Nachkommen. Die Antheren waren geschrumpft und hatten nur sehr wenig Pollen, die Pollenkörner erschienen im Acetokarmin-Test kaum gefärbt und keimten in Zuckerlösung nicht. Die weibliche Fertilität erschien normal. Bei Testkreuzungsnachkommen trat wiederholt eine gute Ausprägung der männlichen Sterilität auf. Die Aufspaltung der Restorer-Eigenschaft zeigte eine klare monofaktoriell dominante Vererbung (BOND et al. 1966).

Die Fixierung der Pollensterilität des Systems CMS 447 auf homozygotem Niveau erwies sich als schwierig, es traten spontan teilweise oder vollständig Fertile auf. Diese Ergebnisse bewogen ab 1967 BERTHELEM, ein weiteres CMS-System zu suchen. Insgesamt 350 Sorten wurden auf männliche Sterilität hin untersucht. In einer englischen Population (Nr. 350) wurden Pflanzen gefunden, deren Pollenkörner stark verkümmert waren. Eine von dieser Population unabhängige Linie, G 58, erwies sich als guter Maintainer dieser männlichen Sterilität CMS 350 (BERTHELEM 1970, BERTHELEM 1987).

Bei beiden CMS-Systemen wurde ein merklicher Umwelteinfluß auf die Ausprägung der männlichen Sterilität gefunden. Beim System CMS 447 führte konstante Temperatur zu homogener Sterilität, starke Temperaturschwankungen während der männlichen Meiose hingegen induzierten die Produktion fertilen Pollens. Auf der anderen Seite scheint

das System CMS 350 auch auf die Lichtbedingungen zu reagieren. Der Wechsel von 9 Stunden Licht bei 8000 Lux zu 16 Stunden Licht mit 25000 Lux führte hier zu einer fast vollständigen Fertilität bei 66 % der Pflanzen (DUC 1980).

An der INRA in Dijon wurde im wesentlichen nur das CMS 447 bearbeitet, während die Arbeiten mit dem CMS 350 eingestellt wurden. Diese Entscheidung war (1) in der besseren Maintainerqualität der Linie Ad 23 (Maintainer des CMS 447), (2) deren höherem agronomischen Wert, beides im Vergleich zur Linie G58 (Maintainer des CMS 350) und (3) in der Möglichkeit begründet, beim CMS 447 (s.u.) mittels ELISA-Test die männliche Sterilität in größeren Serien zu evaluieren (Le GUEN, pers. Mitteilung).

Als herausragende Besonderheit des CMS 447 ist die Permanenz der Restoration zu nennen. In Pflanzen, die aus heterozygot restorierten Pflanzen herauspalten, tritt keine männliche Sterilität mehr auf. Eine kerngenetische Aufspaltung am Maintainer/Restorer-Locus liegt dennoch wie erwartet vor, es treten die erwarteten Häufigkeiten von Maintainerotypen auf. BOND et al. (1966) sowie BERTHELEM und LEGUEN (1967) folgerten, daß diese Permanenz das Resultat einer Resistenz gegen die Samenübertragung des sterilitätsinduzierenden Agens sein könnte. Durch die Permanenz der Restoration ist die Übertragung des Maintainer- oder Restorer-gens in einen anderen genetischen Hin-

tergrund aufwendig. Es müssen stets Testkreuzungen durchgeführt werden (Tabelle 1).

Die Permanenz der Restoration wird durch die molekulargenetischen Befunde verständlich. Auch bei *Phaseolus vulgaris* L. wurde, wenn auch mittels eines anderen Mechanismus, eine Permanenz der Restoration von CMS gefunden (JANSKA und MACKENZIE 1993).

EDWARDSON et al. (1976) entdeckten im Cytoplasma des CMS 447 die sogenannten „cytoplasmic spherical bodies“, kurz CSB genannt. Diese Vesikel kommen nur in männlich sterilen Pflanzen des CMS 447 vor, nicht in restorierten Pflanzen, nicht in Maintainern und nicht im CMS 350. Sie sind auch in den spontan zur Fertilität revertierten Individuen nicht vorhanden. Sie haben einen Durchmesser von ca. 70 nm und sind von einer Membran umschlossen. Sie beherbergen eine doppelsträngige RNA (GRILL und GARGER 1981), die 16,7 kB umfaßt und mit einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase assoziiert ist (LEFEBVRE et al. 1990). PFEIFFER et al. (1993) analysierten den Reproduktionsmodus dieser doppelsträngigen RNA mittels ihrer RNA-Polymerase. Diese dsRNA wurde inzwischen kloniert und sequenziert. Sie enthält zwei "open reading frames": ORF(A) codiert für ein 80 kDa-Protein, ORF(B) codiert für ein 550 kDa-Protein mit Polymerase- und Helicase-Signatur; PFEIFFER (mündl. Mitt.) schlägt als möglichen Ursprung der CSB

Tabelle 1: Die Permanenz der Restoration beim CMS 447 erschwert die Übertragung der Maintainer- bzw. Restorereigenschaft auf Elitematerial

(1) Aufspaltung geschieht vor dem CMS-Hintergrund (züchterisch günstiger Fall)			
Eltern	♀ CMS / rf rf	x	♂ Elitegenotyp / Rf Rf
F1			CMS / Rf rf
F2	CMS / Rf Rf	1	fertil
	CMS / Rf rf	2	fertil
	CMS / rf rf	1	steril
(2) Restoration ist permanent, Aufspaltung nur durch Testkreuzungen zu verifizieren (züchterisch ungünstiger Fall)			
Eltern	♀ CMS / rf rf	x	♂ Elitegenotyp/ Rf Rf
F1			CMS / Rf rf (verliert CMS-Charakter, revertiert zu N-Plasma)
F2	♂ N / Rf Rf	1	fertil x ♀ CMS / rf rf BC1 (CMS / Rf rf) fertil
	♀ N / Rf rf	2	fertil x ♀ CMS / rf rf BC1 (CMS / Rf rf) fertil BC1 (CMS / rf rf) steril
	♀ N / rf rf	1	fertil x ♀ CMS / rf rf BC1 (CMS / rf rf) steril

einen defekten Virus vor. Sie verhalten sich jedenfalls wie ein kryptisches Virus. Es ist unklar, ob diese Körperchen ein Resultat oder die direkte genetische Ursache der männlichen Sterilität sind. Der Grund liegt darin, daß bislang keine horizontale Übertragung des Partikels gelungen ist.

DULIEU et al. (1988) entwickelten einen ELISA-Test für die CSB und fanden eine perfekte Korrelation zur Ausprägung der männlichen Sterilität. Dieser ELISA-Test wurde an der INRA in Dijon routinemäßig eingesetzt, um in der Züchtungsarbeit mit dem CMS 447 die Ausprägung der männlichen Sterilität indirekt zu erfassen. Dadurch wurde es möglich, spontan gegebene Maintainer aus einer großen Anzahl von Genotypen heraus zu identifizieren.

Die mtDNA-Muster der beiden CMS-Systeme sind verschieden. Im CMS 447 kommt ein DNA-Molekül mit geringer elektrophoretischer Mobilität vor, welches im CMS 350 fehlt. Das CMS 350 zeigt dagegen eine zusätzliche Bande mit hoher Mobilität (BOUTRY und BRIQUET 1982). Das CMS 350 enthält in Abhängigkeit vom Kerngenotyp zusätzliche mitochondriale Plasmide, die in anderen Cytoplasmen nicht gefunden werden. Diese zusätzlichen Plasmide entstehen wahrscheinlich durch eine Rekombination zwischen den stets vorkommenden Plasmiden mtp1 und mtp2. Es konnte kein Zusammenhang mit der männlichen Sterilität aufgezeigt werden (FLAMAND et al. 1993).

Für die Maintainer- und Restorerloci bzw. deren Allele liegen für beide bekannten CMS-Systeme keine Marker vor. Es gibt für *Vicia faba* noch keine vollständige genetische Kopplungskarte, allerdings ist wohl bald mit einer solchen zu rechnen (TORRES et al. 1995, RAMSAY et al. 1995, SATTVIC et al. 1996).

Hybridzüchtung bei Ackerbohnen mittels CMS

Es ist absehbar, daß auch in den nächsten Jahren keine Ackerbohnen-Hybrid-sorten auf dem Markt verfügbar sein werden. In Cambridge wurde keine Hybridsorte zugelassen (Tabelle 2): die Produktion von Hybridsaatgut im notwendigen Umfang konnte nicht sichergestellt werden. Bei der Vermehrung der CMS-

Tabelle 2: Experimentelle Hybridzüchtung bei Ackerbohne mittels CMS

Zeit /CMS-System	Versuchsansteller	Konzept*
1956 bis 1972 CMS 447	D.A. Bond PBI Cambridge	Winterbohnen Einfachhybriden Streifenanbau
1964 bis 1988 CMS 447 (CMS 350)	P. Berthelem INRA Rennes	Winter- und Sommerbohnen Dreiwegehybriden Streifenanbau Major-Restorer**
1978 bis 1996 CMS 447	G. Duc INRA Dijon	Sommerbohnen Dreiwegehybriden Streifenanbau Major-Restorer
seit 1997*** CMS 199	W. Link & J. Vaupel Universität Göttingen	Sommerbohnen Dreiwegehybriden Mischenbau Major-Restorer

* Streifenanbau und Mischenbau: Anbauform von Hybrid-Mutter und Hybrid-Vater bei der Produktion des Hybridssaatgutes

** großsamiger, *Vicia faba major*-Typ als Restorer

*** siehe unten

Linie traten spontan Fertile auf (sog. Revertanten), deren Häufigkeit sehr stark zunahm (Abbildung 2). Diese Arbeiten wurden 1973 eingestellt (PBI Cambridge, 1960/ 61; 1964/ 65; 1966/ 67; 1972; 1973). Auch die INRA brachte keine Hybriden zur Zulassung (Tabelle 2). Die Hybriden waren den Konkurrenzsorten (synthetischen Sorten) nicht klar genug überlegen, hier wurden die Arbeiten mit Hybridbohnen 1996 beendet (DUC, schrift. Mitt.).

Mehrere mögliche Gründe wurden für die Zunahme der Pollenfertilität von CMS-Linien im Laufe der Vermehrung genannt, u.a. die Tatsache, daß (1) die Revertanten eher als partielle Restorer denn als gute Maintainer anzusehen waren und sie (2) eine ideal synchrone Blühzeit mit der CMS-Linie hatten, und daß (3) je nach Umwelt während der Blüte die Bestäuberinsekten unzureichend aktiv sind und daher pollenfertile "CMS"-Pflanzen deutlich mehr Samen-

ansatz hatten als sterile CMS-Pflanzen (BOND 1989a, 1989b, PBI CAMBRIDGE 1973).

Die Häufigkeit solcher spontanen Revertanten war bei verschiedenen Maintainer unterschiedlich (Abbildung 2). Es wurde von den Versuchsanstellern zunehmend Engagement in die Identifizierung besserer Maintainer gesteckt. Die Permanenz der Restoration, die Aufwendigkeit des züchterischen Umganges mit diesem Merkmal, führte dazu, daß bessere Maintainer nicht gezüchtet wurden, sondern daß spontan vorhandene Maintainer durch Screening identifiziert wurden. Brauchbare Maintainer (wie auch gute Restorer) traten zwar wiederholt auf. Im Verlaufe der Rückkreuzungen in CMS-tragendes Material traten aber selbst bei bewährten Maintainerlinien Reversionen zur partiellen männlichen Fertilität auf (BERTHELEM 1970, BERTHELEM und LEGUEN 1967, 1974, BOND 1989a, 1989b).

Die agronomische Verbesserung der Experimental-Hybriden, die auf dem CMS 447 basieren, ist wohl durch diese Umstände behindert worden. Bei einem CMS-System ohne permanente Restoration könnte sicherlich mehr Aufwand in die agronomische Verbesserung des Materials gesteckt werden.

Experimental-Hybriden wurden nur mit dem CMS 447 erzeugt. In Cambridge wurden in den Jahren 1966 bis 1972 Experimental-Hybriden für offizielle Prüfungen hergestellt. Das System CMS

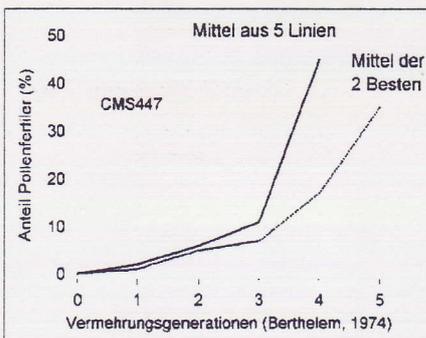


Abbildung 2: Zunahme der spontanen Pollenfertilität bei der Vermehrung der CMS-Linie im System CMS 447

447 war in Winterbohnen aufgetreten; so wurden zunächst nur Winterbohnen-Hybriden hergestellt (Tabelle 2). Die Vermehrung der CMS-Linie sowie die Produktion des Hybridsaatgutes wurde in Streifenanbau durchgeführt. Es standen in dieser Zeit die Maintainer-Linie L349, L73 und L6 sowie die Restorer-Linie S 45 zur Verfügung, die zu drei Einfach-Hybriden kombiniert wurden. Die Hybride (L73 x S45) lag im Mittel der Jahre bei 127 % des Ertrages der Vergleichssorte Throws M.S. (PBI Cambridge 1972, 1973).

Auch das an der INRA verfügbare Material war sehr begrenzt. Ein wesentlicher Grund dafür lag darin, daß man etwa 1990 dazu überging, nur noch tanninfreies Material für die Hybridzüchtung zu benutzen. Tanninfreie Bohnen zeigen eine verbesserte Verdaulichkeit (JANS-MAN et al. 1993). Wenn auch dieses Qualitätsmerkmal einfach vererbt wird (PICARD 1976), so verfügte DUC 1996 nur über zehn Maintainer-Linien und sechs Restorer-Linien zur Produktion von Experimentalhybriden. Es handelte sich dabei um Dreibege-Hybriden des Minor x Major-Typs (kleinkörnige Mutter *Vicia faba minor* und großkörniger Vater *Vicia faba major*). Die Saatgutproduktion wurde weiterhin im Streifenanbau durchgeführt, obwohl die Idee des Mischanbaues der Hybrideltern schon existierte. Nach dieser Idee wird das eigentliche (kleinkörnige) Hybridsaatgut vom (großkörnigen) Ertrag des Hybridvaters durch Siebsortieren getrennt, dies geschieht mithin erst nach der Mähdrüscherte (BOND 1989a). Die Ertragsüberlegenheit solcher französischer Hybriden über die Vergleichssorten betrug zwar über viele Versuchsjahre 20 bis 30 %. Insbesondere die starke Abnahme des Ackerbohnenanbaus in Frankreich (<10 000 ha) trug jedoch dazu bei, daß die Arbeiten eingestellt wurden (Le GUEN, mündl. Mitt., DUC, mündl. Mitt.).

Neue CMS-Systeme

In Stuttgart-Hohenheim wurden 1993 zwei neue CMS-Systeme bei *Vicia faba* entwickelt. Sie werden seit 1995 in Göttingen weiterbearbeitet, seit 1996 in enger Zusammenarbeit mit der Landessaat-zuchtanstalt Stuttgart-Hohenheim (VAUPEL et al. 1997).

Tabelle 3: Entwicklung des CMS 199 aus der Kreuzung der Akzession [Fab 199 (♀)] aus Russland mit der Akzession [Fab 187 (♂)] aus Afghanistan

Saison bzw. Operation	Genotypen	Ergebnis
1 Kreuzung der Eltern	Fab199 Fab187	
2 Selbstung der F1	F1	F1 pollenfertil
3 Rückkreuzung pollensteriler F2-Individuen (Nr. 1 und 3) mit dem Vater (Indiv. 2) Selbstung des Vaters	F2-1* F2-2 F2-3* Fab187(2)*	3 von 8 F2-Individuen pollensteril
4 Rückkreuzung der pollensterilen BC1-Individuen mit dem Vater Selbstung des Vaters	BC1\ 1(2)-1 BC1\ 1(2)-2* BC1\ 1(2)-3 BC1\ 1(2)-4 BC1\ 1(2)-5 BC1\ 3(2)-1 BC1\ 3(2)-2 BC1\ 3(2)-3* Fab187(2)-(1)*	5 von 5 BC1- Individuen pollensteril 3 von 5 BC1-Individuen pollensteril

* auf diese Pedigrees geht das inzwischen verwendete Material zurück

Material und Methoden

Die Vorüberlegung war, daß als Indiz für das Vorhandensein von CMS bei weiten Kreuzungen das Auftreten von männlich Sterilen in nur einer der beiden reziproken Kreuzungsrichtungen, nicht aber in der anderen Kreuzungsrichtung, gelten könnte. Da die Ackerbohne nicht mit anderen Arten kreuzbar ist (LAZARIDOU und ROUPAKIAS 1992, 1995, ROUPAKIAS 1986), wurden weite intraspezifische Kreuzungen durchgeführt. Als Material dienten 24 genetisch divergente Akzessionen der Genbank Gatersleben. Die Akzessionen stammten aus Süd-

ost-Asien, Zentralasien, Kleinasien, Nordafrika, Nordeuropa und Südamerika. Es wurden im Sommer 1992 330 Kreuzungen in beiden Kreuzungsrichtungen zwischen diesen Akzessionen durchgeführt. Beide reziproke Richtungen dieser Kreuzungen wurden in der F2-Generation mit insgesamt 5100 Individuen daraufhin evaluiert, ob männlich Sterile auftraten. Pollensterilität wurde mittels dreier Methoden evaluiert:

(1) mittels des Selbstungsansatzes, wobei der Anbau in Freilandisolerhäusern oder im Gewächshaus erfolgte und die Blüten getrippt wurden, (2) mittels vi-

Tabelle 4: Ausprägung und Entwicklung der Pollensterilität über die Rückkreuzungs-Generationen bei den beiden neuen Systemen CMS 199 und CMS 297

Generation	Saison ^o	CMS199		CMS297	
		n	Anteil Steriler (%)	n	Anteil Steriler (%)
F2	1993S	8	38	16	38
BC1	1993W	10	80	23	26
BC1	1994S	-	-	75	100
BC2	1994S	47	96	25	96
BC3	1994W	107	88	112	6
BC2	1995S	-	-	666	61
BC3	1995S	327	95	-	-
BC4	1995S	296	97	239	67
BC5	1995W	40	100	44	9
BC6	1996S	343	98	413	61
BC7	1996W	59	98	22	23
BC8	1997S	243	95	149	94

S = Evaluierung während der Sommersaison in Freiland-Isolierhäusern

W = Evaluierung während der Wintersaison im Gewächshaus

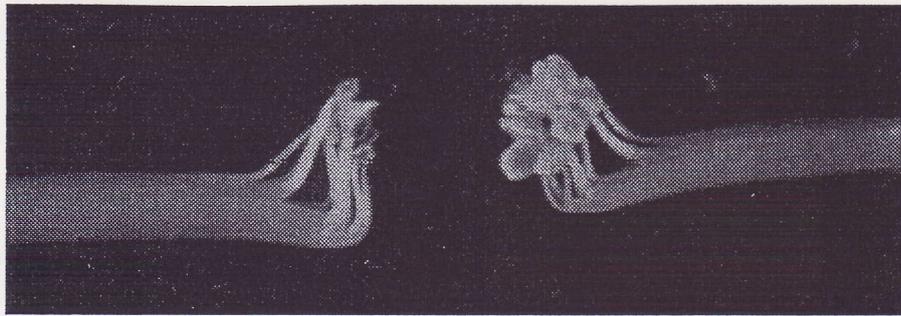


Abbildung 3: Gegenüberstellung des pollensterilen Phänotyps des Systems CMS 199 (links) und des normalen, pollenfertilen Phänotyps kurz vor dem Platzen der Antheren (rechts)

sueller Bonitur der Antherengröße und der Pollenmenge während der Blüte und mittels des Alexander-Tests auf Pollenlebensfähigkeit (ALEXANDER 1969). Pflanzen wurden dann als nicht pollensteril eingestuft, wenn sie mindestens einen Samen bildeten. Pollensterile F₂-Individuen wurden mit dem jeweiligen Vater (dem mutmaßlichen Maintainer) rückgekreuzt, in weiteren Rückkreuzungs-Schritten mit Selbstungsnachkommen des Vaters.

Ergebnisse und Diskussion

Von anfänglich sechs vielversprechenden Kreuzungen blieben während der weiteren Rückkreuzungen zwei übrig, die konsistent Pollensterilität zeigten. Diese gehen auf die Akzession Fab 199 (aus Russland) und auf die Akzession Fab 297 (aus Ägypten) als Mutter zurück, die CMS-Systeme werden daher als CMS 199 und CMS 297 bezeichnet. Der Ausgangs-Maintainer des Systems CMS 199 war die Akzession Fab 187, der Ausgangs-Maintainer des Systems CMS 297 war die Akzession Fab 370, beide mit Herkunft aus Afghanistan (VAUPEL et al. 1997). In *Tabelle 3* werden am Beispiel des CMS 199 die ersten Schritte der Entwicklung dargestellt.

Der Antheren-Phänotyp des CMS 199 (mit Kerngenotyp Fab 187) ist in *Abbildung 3* kurz vor dem Antherenplatzen einem normalen Antheren-Phänotyp gegenübergestellt. Die Antheren der CMS-Linie sind gelb, haben etwa ein Drittel der Normalgröße, und zumeist sind die zwei im Schiffchen "kielseits" befindlichen Antheren schwarz verfärbt. Fertile Antheren sind in diesem Stadium grau und rundlich-prall, öffnet man die Blüte nach dem Antherenplatzen, so tritt bei Fertilen aus der Spitze des Schiffchens

der durch die Innenseite der Schiffchen- spitze vorgeformte Pollenpfropf mit der Narbe heraus. Bei Pollensterilen treten die pollenfreie ("saubere") Narbe und die verkümmerten Antheren heraus. Die Bonitur der Pollenfertilität ist, da die Leguminosenblüte eine geschlossene und nicht durchsichtige Blüte ist, un-

gleich aufwendiger als z.B. bei Sonnenblumen oder Raps.

Die beiden neuen CMS-Systeme unterscheiden sich stark in der Stabilität der Pollensterilität (*Tabelle 4*). Das System CMS 199 zeigte ab der Generation BC4 Werte zwischen 95 und 100 % Sterilität. Das System CSM 297 dagegen schwankte in diesen Generationen zwischen 9 und 94 %, es zeigte insbesondere in der Wintersaison eine geringe Ausprägung der Sterilität. Aufgrund dieser Befunde konzentrieren sich die weiteren Arbeiten auf das System CMS 199. Es stellt sich die Frage, ob die partiell fertilen Individuen, die hier auftreten (0 - 5 %) Maintainer- oder Restorereigenschaften haben. Solche Individuen (Revertanten) treten als Nachkommen von phänotypisch vollständig pollensterilen CMS-Individuen auf; wenn Revertanten bei

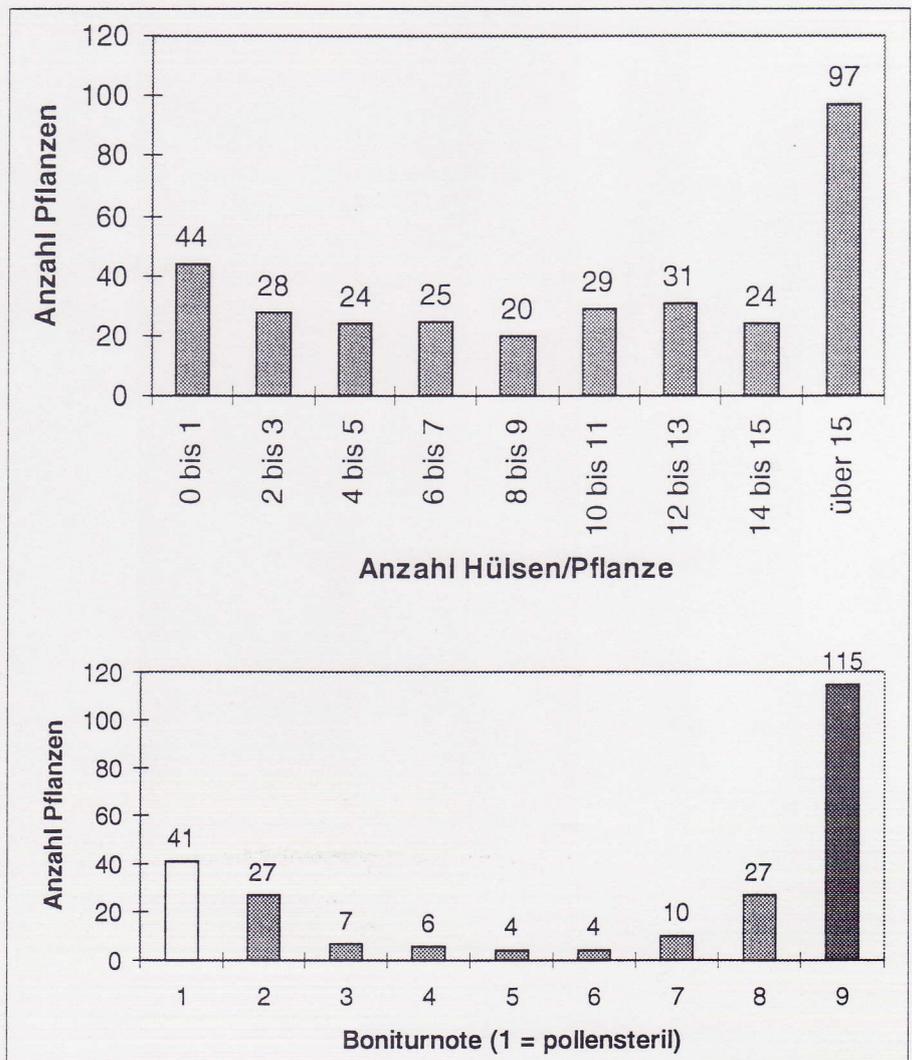


Abbildung 4: Häufigkeit des Auftretens pollensteriler, intermediärer und pollenfertiler Individuen in einer F₂-Generation der Kreuzung der Linie CMS199 mit der Linie Peloponnes, bonitiert anhand der Pollenbonitur während der Blüte und anhand des späteren Hülsenansatzes

Tabelle 5: Skizze zur Produktion von *minor* (♀) x *major* (♂) - Dreibege-Hybridsaatgut [(A x B) x C] mittels CMS bei Ackerbohnen

(A) Annahmen (in Klammer: rechnerische Werte ohne Reinigungsverluste)							
Genotyp	Samen/Pfl.	TKG (g)	Ertrag (dt/ha)	Genotyp	Samen/Pfl.	TKG (g)	Ertrag (dt/ha)
CMS-Linie A	30	300	30	Hybride A x B	44	300	45
Maintainer A	30	300	30	Restorer C	6	1500	30
Maintainer B	30	300	30				

(B) Umfang und Form des Anbaues				
Vermehrungsschritt / Kommentar	CMS-Linie A	Maintainer A	Maintainer B	Restorer C
1 Gemeinsamer Anbau von CMS-Linie A und Maintainer A in Isolierhäusern, dabei Einsatz von Hummeln	350 m ² in Isolierhäusern	700 m ² in Isolierhäusern	350 m ² Isolierlage	1,5 ha Isolierlage
2 Produktion von Vorstufensaatgut der CMS-Linie A	1 ha gemeinsamer Streifenanbau	2 ha Isolierlage	1 ha Isolierlage	9 ha
3 Produktion von Basissaatgut der pollensterilen Einfachhybride A x B	30 ha Streifenanbau CMS-Linie A mit Maintainer B	-	30 ha	50 ha Isolierlage
4 Produktion von Hybrid-Saatgut durch gemeinsamen Misch-Anbau der sterilen Einfachhybride A x B mit Restorer C; Trennung des Erntegutes durch Absieben; Resultat: Z-Saatgut einer Dreibege-Hybride für ca. 40 000 ha Anbaufläche	900 ha: F1(A x B)	-	-	300 ha

spielsweise durch eine Rekombination von mt-Plasmiden entstehen, sollten sie immerhin weiter Maintainereigenschaften zeigen.

Von überragender Bedeutung für den Einsatz eines CMS-Systems in der Hybridzüchtung ist die Vererbung der Maintainer- bzw. Restorer-Eigenschaft. Als erster Schritt dahin wurden mehrere Kreuzungen in F2 auf ihre Aufspaltung hin untersucht. *Abbildung 4* zeigt als Beispiel die Aufspaltung bei Kreuzung mit der agronomisch breit adaptierten Linie Peloponnes (SCHILL et al. 1997), die sich hier als Restorer für das CMS 199 gezeigt hat. Bisher stehen die Ergebnisse nicht im Widerspruch zur Annahme eines Locus mit Allelen für Maintainer- und Allelen für Restorer-Eigenschaft.

Ausblick

Bei einer zukünftigen Hybridsaatgutproduktion wären aus unserer Sicht folgende Punkte zu beachten (*Tabelle 5*):

- Selektionsvorteile zugunsten von Revertanten in der CMS-Linie vermeiden durch:
 - Blühzeitsynchronisation zwischen Mutter- und Vatergenotyp,
 - hoher Anteil des Bestäubers (mind. in den ersten Vermehrungsgenerationen),
 - möglichst schmale Mutter- und Vaterstreifen,
 - Auswahl von Umwelten mit hoher Bestäuberaktivität,
 - zusätzlicher Einsatz von langrüsseligen Hummel-Völkern;

- Einsatz einer kleinkörnigen CMS-Linie A und Maintainerlinie B mit entsprechend hohem Vermehrungskoeffizient;
- Produktion einer Dreibegehybride, dadurch im Vergleich zur Einfachhybride erhöhter Vermehrungskoeffizient im letzten Schritt;
- Bei der Produktion der Dreibegehybride: Mischanbau der kleinkörnigen, pollensterilen Einfachhybride mit dem großkörnigen Restorer; dadurch bessere Bestäubung der pollensterilen Mutter; Trennung des Erntegutes der Mutter von dem des Vaters durch Absieben.

In der *Tabelle 5* ist dargestellt, wie Hybridsaatgut für eine Anbaufläche von 40 000 ha produziert werden könnte. Es sind dabei nur drei Generationen vorgesehen, die wegen des Umfangs kein Merzen von Revertanten mehr erlauben. Selbst die hohe Revertantenrate des Systems CMS 447 (*Abbildung 2*) würde eine solche Strategie zulassen: 15 % effektive Selbstung der Hybridmutter bei der Hybridsaatgutproduktion wurden als Toleranzgrenze gefunden (PBI Cambridge 1972, 1973). Ist darüber hinaus beim neuen System CMS 199 eine einfache mendelische Vererbung der Maintainer- bzw. Restorereigenschaft gegeben, und liegen mittelfristig molekulare Marker für die entsprechenden Allele vor, dann sollte die Hybridzüchtung bei *Vicia faba* L. züchterisch wieder interessant werden.

Literatur

- ALEXANDER, M. P., 1969: Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Technol.* 44, 117 - 122.
- BERTHELEM, P. und J. LE GUEN, 1967: Rapport d'activité 1967. INRA Rennes, France, pp. 39 - 44.
- BERTHELEM, P., 1970: Rapport d'activité 1968 - 1970. INRA Rennes, France, pp. 52 - 63.
- BERTHELEM, P. und J. LE GUEN, 1974: Rapport d'activité 1971 - 1974. INRA Rennes, France, pp. 119 - 163.
- BERTHELEM, P., 1987: Stabilité et production des lignées male-steriles cytoplasmiques de féverole. Unveröffentlichtes Manuskript, INRA Rennes, Frankreich.
- BOND, D. A., J. L. FYFE, und G. TOYNBEE-CLARKE, 1966: Male sterility in field beans (*Vicia faba* L.). 3. Male sterility with a cytoplasmic type of inheritance. *J. Agric. Sci.* 66, 369 - 377.
- BOND, D. A., 1989a: Prospects for commercialisation of F1 hybrid field beans *Vicia faba* L. *Euphytica* 41, 81 - 86.
- BOND, D. A., 1989b: A short review of research on male sterility and prospects for F1 hybrid varieties in field beans (*Vicia faba* L.). *Euphytica* 41, 87 - 90.
- BOUTRY, M. and M. BRIQUET, 1982: Mitochondrial modifications associated with the cytoplasmic male sterility in faba bean. *Eur. J. Biochem.* 127, 129 - 135.
- DIETRICH, M., F. KÄSTNER und R. STEUK-KARDT, 1976: Inzucht bei Ackerbohnen (*Vicia faba* L.), Gefahren und Nutzungsmöglichkeiten im Zuchtprozeß. Tag.-Ber., Akad. Landwirtsch.-Wiss. DDR, 143, 157 - 172.
- DRAYNER, J. M., 1959: Self- and cross-fertility in field beans. (*Vicia faba* L.). *J. Agric. Sci.* 53, 387 - 404. Duc, G., 1980: Effect of environment on the instability of two sources of cytoplasmic male sterility in faba beans. *Fabis Newsletter* 2, 29-30.

- DULIEU, P., P. PENIN, H. DULIEU and D. C. GAUTHERON, 1988: Purification of virus-like particles from *Vicia faba* and detection by ELISA in crude leaf extracts. *Plant Science* 56, 9 - 14.
- EDWARDSON, J. R., D. A. BOND and R. G. CHRISTIE, 1976: Cytoplasmic sterility factors in *Vicia faba* L. *Genetics* 82, 443 - 449.
- FLAMAND, M.-C., G. DUC, J.-P. GOBLET, L. HONG, O. LOUIS, M. BRIQUET and M. BOUTRY, 1993: Variant mitochondrial plasmids of broad bean arose by recombination and are controlled by the nuclear genome. *Nucleic Acids Research* 21, 5468 - 5473.
- GRILL, L. K., and S. J., GARGER, 1981: Identification and characterization of double stranded RNA associated with cytoplasmic male sterility in *Vicia faba*. *Proceedings of the Ntl. Academy of Sci., U.S.A.* 78, 7043 - 7046.
- HANELT, P., 1973: Die infraspezifische Variabilität von *Vicia faba* L. und ihre Gliederung. *Die Kulturpflanze* 20, 75 - 128.
- JANSKA, H., and S. A. MACKENZIE, 1993: Unusual mitochondrial genome organization in cytoplasmic male sterile common bean and the nature of cytoplasmic reversion to fertility. *Genetics* 135: 869 - 879.
- JANSMAN, A. J. M., J. HUISMAN, and A. F. B. VAN DER POE., 1993: Ileal and faecal digestibility in piglets of field beans (*Vicia faba* L.) varying in tannin content. *Animal Feed Science and Technology* 42, 83 - 96.
- KITTLITZ, E. von, 1985: Fababohne. In: FISCHBECK, G., W. PLARRE and W. SCHUSTER (Herausgeber): *Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen*, Band 2. Paul Parey, Berlin. S. 196 - 204.
- LAWES, D. A., 1974: Field beans: Improving yield and reliability. *Span*, 17, 21 - 31.
- LAZARIDOU, T., and D. ROUPAKIAS, 1992: Interspecific hybrids between *V. faba* and *V. narbonensis*, a future prospect. *First European Conference on Grain Legumes*, Angers. Editor AEP, Paris. p. 73 - 74.
- LAZARIDOU, T., and D. G. ROUPAKIAS, 1995: Intraspecific hybrids and embryo rescue in *Vicia narbonensis* L. *2nd European Conference on Grain Legumes*, Copenhagen. Editor AEP., 226.
- LEFEBVRE, A., R. SCALLA, and P. PFEIFFER., 1990: The double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility in *Vicia faba* is packaged together with its replicase in cytoplasmic membranous vesicles. *Plant Molecular Biology* 14, 477 - 490.
- LINK, W., und P. RUCKENBAUER, 1987: Aspekte der Nutzung von Heterosis bei der Pferdebohne (*Vicia faba* L.). *Bericht über die Arbeitstagung 1987 der Arbeitsgemeinschaft der Saat-zuchtleiter in Gumpenstein vom 24. bis 26. Nov. 1987*, 147 - 162.
- LINK, W., 1994: GFP-Forschung bei Körnerleguminosen. *Zuchtmethodische Entwicklungen: Nutzung von Heterosis bei Fababohnen*. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 30, 201 - 230.
- PFEIFFER, P., J.-L. JUNG, H. HEITZLER and G. KEITH, 1993: Unusual structure of the double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility in *Vicia faba*. *J. of General Virology* 74, 1167 - 1173.
- PICARD, J., 1976: Aperçu sur l'hérédité du caractère absence de tanins dans les graines de féve-rolle (*Vicia faba* L.). *Ann. Amélior. Plantes* 26: 101 - 106.
- Plant Breeding Institute Cambridet. *Annual Report*, 1960 - 61. Plant Breeding Institute, Cambridge, England.
- Plant Breeding Institute Cambridge. *Annual Report*, 1964 - 65. Plant Breeding Institute, Cambridge, England.
- Plant Breeding Institute Cambridge. *Annual Report*, 1966 - 67. Plant Breeding Institute, Cambridge, England.
- Plant Breeding Institute Cambridge. *Annual Report*, 1972. Plant Breeding Institute, Cambridge, England.
- Plant Breeding Institute Cambridge. *Annual Report*, 1973. Plant Breeding Institute, Cambridge, England.
- RAMSAY, G., W. VAN DE VEN, R. WOUGH, D. W., GRIFFITHS and W. POWELL, 1995: Mapping quantitative trait loci in faba beans. *2nd Europ. Conference on grain Legumes*, Copenhagen, p. 444 - 445.
- ROUPAKIAS, D. G., 1986: Interspecific hybridization between *Vicia faba* (L.) and *Vicia narbonensis* (L.): early pod growth and embryo-sac development. *Euphytica* 35, 175 - 183.
- SATIVIC, Z., A. M. TORRES, and J. I. CUBERO, 1996: Genetic mapping of new morphological, isozyme and RAPD markers in *Vicia faba* L. using trisomics. *Theor. Appl. Genet.* 93, 1130 - 1138.
- SCHILL, B., A. E. MELCHINGER, E. v. KITTLITZ und W. LINK, 1997: Züchterische Brauchbarkeit von Intrapool- und Interpool-Kreuzungen des mitteleuropäischen und mediterranen Genpools bei der Fababohne (*Vicia faba* L.). *Vortr. Pflanzenzüchtg* 38, 127 - 145.
- STELLING, D., E. EBMEYER and W. LINK, 1994: Yield stability in faba bean, *Vicia faba* L. 2. Effects of heterozygosity and heterogeneity. *Plant Breeding* 112, 30 - 39.
- TORRES, A. M., Z. SATIVIC, J. CANOVAS, and J. I. CUBERO, 1995: Present status of the genetic map of faba bean (*Vicia faba* L.). *2nd Europ. Conference on Grain Legumes*, Copenhagen, p. 442 - 443.
- VAUPEL, J. C., W. EDERER, E. v. KITTLITZ und W. LINK, 1997: *Vicia faba*: Genbank-Akzessionen als Quelle neuer CMS-Systeme. *Schriften zu Genetischen Ressourcen*, ZADI, (im Druck).