

**Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz
(Direktor: Prof. Dr. habil. W. E. Weber)
der Landwirtschaftlichen Fakultät
(Dekan: Prof. Dr. habil. Peter Pickel)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Experimentelle Bearbeitung im Institut für Pflanzengenetik und
Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben**

Entwicklung neuartiger intergenerischer Hybriden bei Futtergräsern (Pooideae)

DISSERTATION

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)**

**vorgelegt von
Diplom-Biologe
Lars-Gernot Otto**

**geb. am 10.12.1970
in Stuttgart**

**Gutachter: Prof. Dr. habil. W. E. Weber
Prof. Dr. habil. A. Graner
Prof. Dr. habil. H. Becker**

Verteidigung am: 17.11.2003

Halle/Saale 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005874

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005874>]

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis	
II	Tabellenverzeichnis	
III	Abkürzungsverzeichnis	
1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeine Strategien zur Schaffung und Nutzung interspezifischer und intergenerischer Hybriden.....	1
1.2	Problemstellungen und Ziele bei der Erzeugung intergenerischer Hybriden im Rahmen dieser Arbeit.....	4
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Pflanzenmaterial.....	10
2.1.1	Verwendete Ausgangseltern.....	10
2.1.2	Pflanzenmaterial für die weiten Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologen Genomen.....	11
2.1.3	Pflanzenmaterial der Hybriden von Eltern mit homöologen Genomen.....	13
2.2	Pflanzenanzucht.....	14
2.3	Durchführung der Kreuzungen.....	15
2.3.1	Erzeugung von Hybriden aus weiten Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologen Genomen.....	15
2.3.1.1	Kastration, Bestäubung und Auxinbehandlung.....	15
2.3.1.2	Embryokultur.....	16
2.3.2	Rückkreuzungen mit Auxinbehandlung und Embryokultur ohne Kastration der Hybriden.....	18
2.3.3	Kreuzungen und Selbstungen ohne Kastration, Auxinbehandlung und Embryokultur.....	18
2.4	Ermittlung der Fertilität.....	18
2.4.1	Männliche Fertilität.....	18
2.4.2	Weibliche Fertilität.....	19
2.5	Erstellung von Präparaten für cytologische Untersuchungen.....	20
2.5.1	Behandlung von Wurzelspitzen zur Anreicherung von Metaphasestadien.....	20
2.5.2	Quetschpräparation von Wurzelspitzen und Antheren.....	21
2.6	Genomische <i>in situ</i> Hybridisierung (GISH) zur Analyse der Genomzusammensetzung.....	22
2.6.1	Herstellung der Proben- und Blocking- DNS.....	22
2.6.2	Vorbereitung der Präparate.....	23
2.6.3	Vorbereitung der DNS-Probe.....	24
2.6.4	<i>In situ</i> Hybridisierung und Signaldetektion.....	24
2.6.5	Dokumentation der Präparate.....	25

2.7	Antherenkultur.....	25
2.7.1	Durchführung.....	25
2.7.2	Bestimmung des Ploidiegrades der Regenerate	26
2.8	Statistische Berechnungen	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Kreuzungen von Arten mit inhomologen Genomen	28
3.1.1	Erfolg der Kreuzungskombinationen.....	28
3.1.2	Charakterisierung der F ₁ -Hybriden aus Kreuzungen von Arten mit inhomologen Genomen	32
3.1.2.1	Abstammung, Phänotyp und Genomzusammensetzung.....	32
3.1.2.2	Vitalität und Fertilität	38
3.1.3	Erzeugung von Nachkommen der F ₁ -Hybriden	43
3.1.3.1	Rückkreuzungsergebnisse.....	43
3.1.3.2	Kalli und Regenerate aus Antherenkultur von F ₁ -Hybriden der Kombination <i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x).....	44
3.1.4	Analyse mit GISH an Interphasekernen	46
3.1.5	Charakterisierung der BC ₁ -Hybriden zwischen <i>L. multiflorum</i> × <i>D. glomerata</i>	47
3.1.5.1	Vitalität, Phänotyp, Genomzusammensetzung und Fertilität.....	47
3.1.5.2	Nachkommen der BC ₁ -Hybriden.....	51
3.1.6	Charakterisierung der BC ₂ -Pflanzen zwischen <i>L. multiflorum</i> × <i>D. glomerata</i>	52
3.1.6.1	Vitalität, Phänotyp und Fertilität der BC ₂ -Pflanzen.....	52
3.1.6.2	Genomzusammensetzung der BC ₂ -Pflanzen.....	54
3.1.6.3	Nachkommen der BC ₂ -Hybriden.....	59
3.2	Antherenkultur von Hybriden zwischen <i>L. multiflorum</i> , <i>L. perenne</i> und <i>L. boucheanum</i> × <i>F. pratensis</i> (homöologe Genome).....	61
3.2.0	Einführung	61
3.2.1	Die verschiedenen Stufen der Regeneration und deren Genotypabhängigkeit.....	61
3.2.2	Wirkung der Dauer von Kältevorbehandlungen auf die Antherenkultur	75
3.2.3	Fertilität der grünen Regenerate aus Antherenkultur.....	77
3.2.4	Genom- und Chromosomenzusammensetzung von <i>Lolium-Festuca</i> -Hybriden	80
4	Diskussion	82
4.1	Kreuzbarkeit und Kreuzungsbarrieren zwischen Arten der Poaceae.....	82
4.2	Nachkommen der F ₁ -Hybriden zwischen <i>L. multiflorum</i> × <i>D. glomerata</i> – Barrieren bei der Schaffung disomer chromosomaler Additionslinien und Möglichkeiten zum Gentransfer mittels intergenerischer Translokationen.....	89

4.3 Antherenkultur als Mittel zur Erzeugung homozygoter <i>Lolium-Festuca</i> -Hybriden	99
4.4 Erzeugung stabiler und fertiler balancierter Hybriden zwischen <i>L. multiflorum</i> , <i>L. perenne</i> und <i>L. boucheanum</i> × <i>F. pratensis</i>	107
4.5 Kreuzbarkeit zweier Arten in Abhängigkeit von deren systematischer Stellung	109
4.6 GISH als Methode zur Analyse von Art- und Gattungshybriden.....	114
4.7 Weite Kreuzungen als Mittel die genetische Variabilität bei Gräsern zu erweitern.....	116
5 Zusammenfassungen	118
5.1 Zusammenfassung.....	118
5.2 Summary.....	120
6 Literaturverzeichnis	123
7 Anhang	
7.1 Daten anderer Autoren die untersuchten Hybridpflanzen und Kombinationen betreffend	
7.1.1 F ₁ -Hybriden	
7.1.2 Rückkreuzungsgeneration BC ₁ und BC ₂ von <i>L. multiflorum</i> - <i>D. glomerata</i> - Hybriden	
7.2 Pufferlösungen und Medien	
7.2.1 Kruse-Medium, modifiziert	
7.2.2 Induktionsmedium	
7.2.3 Regenerationsmedium	
7.2.4 DAPI - Puffer für die Durchflusscytometrie	
7.2.5 SSC-Stammlösung 20x (20fache Endkonzentration)	
7.3 Taxonomie relevanter Arten der Poaceae	
8 Förderhinweis	

I Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Allgemeine Strategien zur Schaffung und Nutzung intergenerischer Hybriden .	4
Abb. 2: Darstellung der Strategie zur Erzeugung balancierter <i>Lolium-Festuca</i> Hybriden	8
Abb. 3: Stammbaum für die Nachkommen der intergenerischen F ₁ -Hybriden der Kombination <i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	13
Abb. 4 (links) und Abb. 5 (rechts): Kastrieren eines Blütenstandes von <i>L. multiflorum</i>	15
Abb. 6: Bestäubung: Blütenstände des Pollenelters <i>D. glomerata</i> befinden sich oberhalb von kastrierten Ähren des Samenelters <i>L. multiflorum</i>	16
Abb. 7: Nach Auxinapplikation durch Parthenokarpie gebildete Karyopsen einer Kreuzung zwischen <i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	17
Abb. 8: Klassifikation der Embryodifferenzierung, nach MATZK (1991), verändert von OERTEL (1997)	17
Abb. 9: Fragmentgröße isolierter, unbehandelter genomischer DNS (Tasche 2+3) und mittels Ultraschall behandelter genomischer DNS (Tasche 5), jeweils in Vergleich zu einer Referenz-DNS (Tasche 1+4; 1 kbp Ladder, Gibco BRL)	23
Abb. 10a: Embryofrequenzen mit ihren Konfidenzintervallen ($\alpha = 0,05$) bei Kreuzungen von Arten mit inhomologen Genomen	30
Abb. 10b: Ausbeute an Hybriden mit den zugehörigen Konfidenzintervallen ($\alpha = 0,05$) bei Kreuzungen von Arten mit inhomologen Genomen, jeweils bezogen auf die Anzahl produzierter Embryonen	30
Abb. 11: Blütenstand der allotetraploiden F ₁ -Pflanze 3 zwischen den Eltern <i>L.</i> <i>multiflorum</i> (4x; links) und <i>D. glomerata</i> (4x; rechts)	34
Abb. 12: Blütenstand der allotetraploiden F ₁ -Pflanze 4 zwischen den Eltern <i>L.</i> <i>multiflorum</i> (4x; links) und <i>D. glomerata</i> (4x; rechts)	34
Abb. 13: Blütenstand der allotetraploiden F ₁ -Pflanze 8 (Mitte) im Vergleich zu den Eltern <i>F. pratensis</i> (4x; links) und <i>D. glomerata</i> (4x; rechts)	34
Abb. 14: Allotriploide F ₁ -Pflanze 2 (Blütenstand Mitte) im Vergleich zu Blütenständen der Eltern <i>L. multiflorum</i> (2x; links) und <i>D. glomerata</i> (4x; rechts)	34
Abb. 15a: Blütenstand der allotriploiden F ₁ -Pflanze 1 zwischen den Eltern <i>L. multiflorum</i> (2x; links) und <i>D. glomerata</i> (4x; rechts)	35
Abb. 15b: Blütchen der allotriploiden F ₁ -Pflanze 1 (Mitte) im Vergleich zu Blütchen der Eltern <i>L. multiflorum</i> (links) und <i>D. glomerata</i> (rechts)	35
Abb. 16: Blütenstand der allotriploiden F ₁ -Pflanze 7 zwischen den Eltern <i>F. pratensis</i> (2x; links) und <i>D. glomerata</i> (4x; rechts)	35
Abb. 17: Blütenstand der allopentaploiden F ₁ -Pflanze 14 (Mitte) zwischen <i>F.</i> <i>arundinacea</i> (6x; links) und <i>D. glomerata</i> (4x; rechts)	35

Abb. 18a+b: Allotriploide F ₁ -Pflanze 15 (a) der Kombination <i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>Cyn. cristatus</i> (2x) im Vergleich zum Pollenelter <i>Cyn. cristatus</i> (2x; b).....	36
Abb. 19a - Abb. 21: F ₁ -Hybriden zwischen <i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x): Die DNS von <i>D. glomerata</i> erscheint durch FITC-Markierung gelbgrün, während die DNS von <i>L. multiflorum</i> durch Gegenfärbung rot erscheint	
Abb. 19a: Interphasekerne in Wurzelspitzen der F ₁ -Pflanze 4: Die DNS der beiden Eltern ist nicht zufällig miteinander gemischt, sondern liegt jeweils in spezifischen Regionen des Kerns.....	36
Abb. 19b: Mitotische Metaphase der F ₁ -Pflanze 4 mit jeweils 14 Chromosomen beider Elternarten.....	37
Abb. 20: Mitotische Metaphase der F ₁ -Pflanze 6 mit jeweils 14 Chromosomen beider Elternarten.....	37
Abb. 21: Mitotische Metaphase der F ₁ -Pflanze 5 mit jeweils 14 Chromosomen beider Elternarten.....	37
Abb. 22: Mitotische Metaphase der allotriploiden F ₁ -Pflanze 1 der Kombination <i>L. multiflorum</i> (2x) × <i>D. glomerata</i> (4x): Die 14 Chromosomen von <i>D. glomerata</i> erscheinen durch FITC-Markierung gelbgrün, die 7 Chromosomen von <i>L. multiflorum</i> durch Gegenfärbung rot.....	37
Abb. 23: F ₁ -Hybride der Kombination <i>F. arundinacea</i> (6x=42) × <i>D. glomerata</i> (4x=28): Die 14 <i>D. glomerata</i> Chromosomen erscheinen durch FITC-Markierung gelbgrün, die vermutlich 21 <i>F. arundinacea</i> Chromosomen durch Gegenfärbung rot.....	38
Abb. 24: F ₁ -Pflanze 9 der Kombination <i>F. pratensis</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x): Es sind 14 Chromosomen von <i>F. pratensis</i> zu erkennen (s. weiße Zahlen, Chromosomen rotgefärbt). Die mit FITC markierten 14 Chromosomen von <i>D. glomerata</i> (gelbgrün-orange) sind aufgrund kontrastarmer Markierung und ungünstiger räumlicher Lage nicht vollständig zu erkennen.	38
Abb. 25: F ₁ -Hybride zwischen <i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>Cynosurus cristatus</i> (2x): Die erwartete Chromosomenzahl von 21 wurde bestätigt. Alle Chromosomen sind mit DAPI gefärbt. Die Markierung der <i>Cyn. cristatus</i> Chromosomen mit FITC-markierter genomischer DNS dieser Art verlief erfolglos.	38
Abb. 26: Sterile Pollenkörner (PK) der allotriploiden F ₁ -Pflanze 2 der Kombination <i>L. multiflorum</i> (2x) × <i>D. glomerata</i> (4x), (Vergr. 1600fach).....	41
Abb. 27: KES-gefärbte PK der allotetraploiden F ₁ -Pflanze 3 der Kombination <i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x), (Vergr. 640fach): Die meisten PK waren entweder ohne Cytoplasma oder wiesen nur Cytoplasmareste auf, die dann ca. 20-50 % der PK ausfüllten.....	41
Abb. 28: KES-gefärbte PK von tetraploidem <i>L. multiflorum</i> (links Vergr. 640fach, rechts Vergr. 160fach).....	42

Abb. 29: Interphasekern aus einer Wurzelspitze von Regenerat 2: Die DNS der Ausgangseltern liegt in getrennten Zellkernbereichen.....	45
Abb. 30a: Interphasekern aus einer Wurzelspitze von Regenerat 1: Die DNS der Ausgangseltern liegt in getrennten Zellkernbereichen.....	45
Abb. 30b: Mitotische Telophase in einer Wurzelspitze des Regenerats 1: Es konnten ca. 18 - 19 Chromosomen von <i>L. multiflorum</i> und ca. 14 - 17 von <i>D. glomerata</i> identifiziert werden. Das waren mehr als die jeweils 14 Chromosomen beider Eltern, die die Donorpflanze F ₁ -Pflanze 3 besaß.....	45
Abb. 31: Blütenstand der BC ₁ -Pflanze 1 zwischen Blütenständen der Elternarten <i>L. multiflorum</i> (links) und <i>D. glomerata</i> (rechts).....	47
Abb. 32: KES-gefärbte Pollenkörner (PK) der BC ₁ -Pflanze 1 (links Vergr. 640fach mit Phasenkontrast, rechts Vergr. 160fach)	48
Abb. 33a+b: Meiose der BC ₁ -Pflanze 1: Während der meiotischen Metaphase I sind deutlich die 7 Chromosomen von <i>D. glomerata</i> als Univalente zu erkennen.....	49
Abb. 34: Mitotische Metaphase der BC ₁ -Pflanze 3, die 7 Chromosomen von <i>D. glomerata</i> und 21 von <i>L. multiflorum</i> aufweist	49
Abb. 35a+b: Mitotische Metaphase der BC ₁ -Pflanze 6, die 7 Chromosomen von <i>D. glomerata</i> und vermutlich 20 Chromosomen von <i>L. multiflorum</i> zeigt	49
Abb. 36: Mitotische Metaphase der BC ₁ -Pflanze 2 mit 21 Chromosomen von <i>L. multiflorum</i> und 7 Chromosomen von <i>D. glomerata</i>	50
Abb. 37a+b: Mitotische Metaphase der BC ₁ -Pflanze 4 mit 21 Chromosomen von <i>L. multiflorum</i> und 7 Chromosomen von <i>D. glomerata</i>	50
Abb. 37c: 2 Kerne der BC ₁ -Pflanze 4 in der mitotischen Telophase: Die 7 Chromosomen von <i>D. glomerata</i> sind auch hier erkennbar.	50
Abb. 38a-c: Ein sehr hoher Anteil irregulär entwickelter Mikrosporen in der BC ₂ -Pflanze 1 belegt Differenzierungsstörungen in der Sporogenese: Anstelle regulärer Tetraden sind Triaden (a), Pentaden (b) und ungleichmäßige Tetraden (c) zu sehen	54
Abb. 39: KES-gefärbte Pollenkörner (PK) der BC ₂ -Pflanze 4 (Vergr. 1600fach)	54
Abb. 40a+b: Meiotische Metaphase I in PMZ der BC ₂ -Pflanze 2: Neben den <i>L. multiflorum</i> Chromosomen liegen 2 zueinander nicht-homologe <i>D. glomerata</i> Chromosomen als Univalente vor	57
Abb. 40c: Interphasekerne in Mikrosporen: Es sind deutlich die 2 <i>D. glomerata</i> Chromosomen zu erkennen.	57
Abb. 41a: Meiose in PMZ der BC ₂ -Pflanze 6: Ein Chromosom von <i>D. glomerata</i> ist im Genom der Pflanze vorhanden.....	57
Abb. 41b: Interphasekerne in Mikrosporen der BC ₂ -Pflanze 6: Das einzelne <i>D. glomerata</i> Chromosom ist auch in den Interphasekernen zu sehen.	57

Abb. 42a+b: Meiotische Metaphase I (a) und meiotische Anaphase I (b) der BC ₂ -Pflanze 4: 7 Chromosomen von <i>D. glomerata</i> sind als Univalente zu erkennen, in Abb. b bei Ausblendung der FITC-Markierung.	57
Abb. 42c+d: Interphasekerne von Mikrosporen der BC ₂ -Pflanze 4: Mehrere <i>D. glomerata</i> Chromosomen sind zu erkennen.	57
Abb. 43a-d: Mitotische Metaphase der BC ₂ -Pflanze 5: Eine <i>D. glomerata</i> -Translokation erscheint durch FITC-Markierung gelbgrün. Die Translokation ist am terminalen Ende lokalisiert (Abb. a). Sie ist ebenfalls in Interphasekernen zu erkennen, sowohl in Wurzelspitzenzellen (Abb. b+c) als auch in Mikrosporen (Abb. d).....	58
Abb. 43e: Beim Quetschen artifiziell deformierte mitotische Metaphasechromosomen der BC ₂ -Pflanze 5 im Jugendstadium: Es sind mehrere (wahrscheinlich 7) <i>D. glomerata</i> Chromosomen zu erkennen.	58
Abb. 44: Freilandanlage zur Selektion von Donorpflanzen für die Antherenkultur:.....	61
Abb. 45: Ausbeute an Kalli und Pflanzen mit den jeweiligen Konfidenzintervallen ($\alpha = 0,05$) bei ausgewählten <i>Lolium-Festuca</i> -Hybriden.....	65
Abb. 46: Kallusbildung und Pflanzenregeneration mit den jeweiligen Konfidenzintervallen ($\alpha = 0,05$) bei den Elternarten der intergenerischen Kreuzungen (s. Tab. 16) im Vergleich zu <i>Lolium-Festuca</i> -Hybriden des I. Zyklus 1999 und II. Zyklus 2000 (s. Tab. 14).....	66
Abb. 47: Beginn der Kallusbildung.....	68
Abb. 48: Anthere (links) und gebildeter Kallus (rechts).....	68
Abb. 49: 2-Blatt-Stadium einer Albinopflanze auf Regenerationsmedium (RM)	71
Abb. 50: Teilweise grüne Pflanze auf RM: Der Albinoteil des Regenerates verkümmerte später, während sich das grüne Segment weiterentwickelte.	71
Abb. 51: Pflanze auf RM mit nur einem geringen Anteil chlorophyllhaltigen Gewebes	71
Abb. 52: Histogramm eines diploiden Regenerates.....	74
Abb. 53: Histogramm eines tetraploiden Regenerates	74
Abb. 54: Histogramm einer triploiden F ₁ -Hybride (Kontrolle) der Kombination <i>L. multiflorum</i> (2x) × <i>F. pratensis</i> (4x).....	74
Abb. 55: 14 Chromosomen einer diploiden Regeneratpflanze (Vergrößerung 400fach)	75
Abb. 56: 28 Chromosomen einer tetraploiden Regeneratpflanze (Vergrößerung 1600fach)	75
Abb. 57: Regeneration an Kalli, Pflanzen insgesamt und grünen Pflanzen mit den jeweiligen Konfidenzintervallen ($\alpha = 0,05$) in Abhängigkeit von der Dauer der Kältebehandlung der Antheren.....	77
Abb. 58a-c: <i>Lolium-Festuca</i> -Hybriden mit dehiszenten Antheren (a), teilweise bzw. verzögert dehiszenten Antheren (b) und indehiszenten Antheren (c).....	79

- Abb. 59: Meiotische Metaphase I eines aus Antherenkultur erhaltenen diploiden fertilen Regenerates (Vergrößerung 1600fach): 7 Ring-Bivalente belegen die reguläre Paarung der Chromosomen, worauf sich die relativ hohe Fertilität begründet. 79
- Abb. 60: Pollenkörner (PK) eines aus Antherenkultur erhaltenen diploiden sterilen Regenerates mit indehiszenten Antheren (Vergr. 640fach): Die meisten PK waren tot, maximal 20 % KES-färbbarer PK (s. Pfeile) wurden gefunden..... 79
- Abb. 61: PK eines diploiden fertilen Regenerates (Vergrößerung 1600fach): Deutlich sind in den zwei PK die beiden generativen Kerne („G“) und der davon etwas abseits gelegene vegetative Kern („V“) sichtbar. Des Weiteren ist die Keimpore („KP“) erkennbar..... 79
- Abb. 62: Mitotische Metaphase eines diploiden Regenerates: DNS von *L. multiflorum* erscheint durch FITC-Markierung gelbgrün, während die von *F. pratensis* durch Gegenfärbung rot erscheint. Es sind vor allem Translokationen von *F. pratensis* an terminalen Regionen verschiedener *L. multiflorum* Chromosomen zu sehen (s. Pfeile). 80
- Abb. 63: Symmetrische Translokationen: Zu sehen ist ein Beispiel von 3 Chromosomen, die das gewünschte Muster an symmetrischen Translokationen aufweisen. Die Centromer-Regionen stammen von *L. multiflorum*. Sie erscheinen durch FITC-Markierung gelbgrün. 4 der 6 terminalen Regionen stammen von *F. pratensis* und erscheinen aufgrund der Gegenfärbung rot (s. Pfeile). 81
- Abb. 64: Reziproke Markierung: In dieser mitotischen Metaphase eines diploiden Regenerates sind Chromosomen oder Chromosomenabschnitte, die von *F. pratensis* stammen, durch FITC gelbgrün markiert (s. Pfeile), während DNS von *L. multiflorum* aufgrund der Gegenfärbung rot erscheint. 81

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Arten, Sorten und Ökotypen der Pooideae	10
Tabelle 2: Ermittlung der weiblichen Fertilität bei Hybriden verschiedener Kombinationen	20
Tabelle 3: Embryofrequenz und Anzahl der Hybriden bei Kreuzungen von Arten mit inhomologen Genomen	29
Tabelle 4: Abstammung, Phänotyp und Genomzusammensetzung der F ₁ -Hybriden aus intergenerischen Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologen Genomen.....	33
Tabelle 5: Vitalität und Fertilität der F ₁ -Hybriden aus intergenerischen Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologen Genomen	40
Tabelle 6: Rückkreuzungen der F ₁ -Hybriden mit Auxinbehandlung und Anwendung der Embryokultur	43
Tabelle 7: Kalli und Pflanzen aus Antherenkultur von F ₁ -Hybriden der Kombination <i>L.</i> <i>multiflorum</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x).....	44
Tabelle 8: Phänotyp, Vitalität und Genomzusammensetzung der 1. Rückkreuzungs- generation (BC ₁) von <i>L. multiflorum</i> × <i>D. glomerata</i> -Hybriden mit <i>L. multiflorum</i>	48
Tabelle 9: Embryonen und Pflanzen aus Rückkreuzungen der BC ₁ -Hybriden mit Auxinbehandlung und Embryokultur.....	51
Tabelle 10: Phänotyp, Vitalität und Fertilität von BC ₂ -Pflanzen der Kombination <i>L. multiflorum</i> × <i>D. glomerata</i>	53
Tabelle 11: Genomzusammensetzung in somatischen und generativen Organen von BC ₂ -Pflanzen der Kombination <i>L. multiflorum</i> × <i>D. glomerata</i>	56
Tabelle 12: Kalli und regenerierte Pflanzen aus Antherenkultur von BC ₂ -Hybriden.....	59
Tabelle 13: Embryonen und Pflanzen aus Rückkreuzungen der BC ₂ -Hybriden mit Auxinbehandlung und Embryokultur.....	60
Tabelle 14: Kallusbildung und Pflanzenregeneration in zwei Zyklen Antherenkultur (I und II) bei <i>Lolium-Festuca</i> -Hybriden in Relation zur Anzahl jeweils einbezogener Donorpflanzen	63
Tabelle 15: Kallusbildung und Pflanzenregeneration in Antherenkultur für einzelne tetraploide <i>Lolium-Festuca</i> -Hybriden.....	64
Tabelle 16: Kallusbildung und Pflanzenregeneration in Antherenkultur von Elternarten, die für intergenerische Kreuzungen eingesetzt wurden.....	66
Tabelle 17: Regeneration von Pflanzen in Abhängigkeit von der Wachstums- geschwindigkeit der Kalli	69
Tabelle 18: Abhängigkeit der Ploidiestufe der Regenerate von der Wachstums- geschwindigkeit der Kalli bei <i>Lolium-Festuca</i> -Hybriden (2n=4x)	72
Tabelle 19: Ploidiestufen der Regenerate bezogen auf die Donorpflanzen	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 20: Häufigkeit der Kallusbildung und Pflanzenregeneration in Abhängigkeit von der Dauer der Kältevorbehandlung der Antheren	76
Tabelle 21: Beziehung zwischen männlicher Fertilität und der Ploidiestufe bei Regeneraten aus Antherenkultur.....	78
Tabelle 22: Beziehung zwischen weiblicher Fertilität (Kornansatz) und der Ploidiestufe bei Regeneraten aus Antherenkultur	78
Tabelle 23: Embryofrequenz und erzeugte Hybriden bei Kreuzungen von Arten mit inhomologen Genomen	
Tabelle 24: Abstammung, Phänotyp und Genomzusammensetzung der Hybriden aus intergenerischen Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologem Genom	
Tabelle 25: Vitalität und Fertilität von Hybriden aus intergenerischen Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologem Genomen	

III Abkürzungsverzeichnis

≥	größer gleich
≤	kleiner gleich
µg	Mikrogramm
1 n	1-normal, d. h. Konzentration von 1 Grammäquivalent pro Liter
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
∞	unendlich
A. dest.	destilliertes Wasser (lat.: Aqua destillata)
ABA	Abszisinsäure (engl.: cis- abscisic acid)
Abb.	Abbildung
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
Agar	Gemisch aus Agarose und Agaropectin
Anz.	Anzahl
APM	Amiprophosmethyl
BAC	engl.: bacterial artificial chromosome
BC ₁	F ₁ BC ₁ (für erste Rückkreuzungsgeneration der ersten Filialgeneration)
BC ₂	F ₁ BC ₂ (für zweite Rückkreuzungsgeneration der ersten Filialgeneration)
BC ₃	F ₁ BC ₃ (für dritte Rückkreuzungsgeneration der ersten Filialgeneration)
Bot.	Botanisch(er)
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
Chrom.zahl	Chromosomenzahl
d	Tage (engl.: days)
DAPI	4',6- Diamidin-2-phenylindol
Dicamba	3,6-Dichlor-2-methoxybenzoesäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	ethylenediamino-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol-bis(β-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
F ₁	Filialgeneration 1
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gramm
GA ₃	Gibberellinsäure (engl.: gibberellic acid)
Genomzus.setzg.	Genomzusammensetzung
GISH	Genomische in situ Hybridisierung
h	Stunde (engl.: hour)
Hrsg.	Herausgeber
HU	Hydroxyharnstoff (engl.: hydroxy urethrale)
IES	Indolyl-Essigsäure , engl.: IAA
IM	Induktionsmedium

Abkürzungsverzeichnis

insges.	insgesamt
ITS	I nternal t ranscribed s pacer
k. A.	keine Angabe
Karyop.	Karyopse (n)
kbp	Kilobasenpaare
KES	Karminessigsäure
l	L iter
mg	M illigramm
min	M inute(n)
ml	M illiliter
NAA	Naphtylelessigsäure (engl.: n aphtyle a cetic a cid)
NaCl	N atrium c hlorid
NKN	N achkommen
Pfl.	P flanze(n)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration = $-\lg[\text{H}^+]$ (lat.: p otentia h ydrogenii)
PI	P ropidiumjodid
PK	P ollen k örner
PMZ	P ollen m utterzelle(n)
ppm	Millionstel (engl.: p art p er m illion)
RAPD	R andom a mplified p olymorphic D N A
RFLP	R estriction f ragment l ength p olymorphism
RM	R egenerations m edium
RNS	R ibonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: r evolutions p er m inute)
s	S ekunde(n)
s.	s iehe
s. o.	s iehe o ben
s. str.	im engeren Sinne (lat.: s ensu s trictu)
s. u.	s iehe u nten
spec.	Art (lat.: s pecies)
SSC	engl. S aline S odium C itrate
ssp.	Unterart (lat. S ub s pecies, taxonomische Kategorie)
Tab.	T abelle
T _m	Schmelztemperatur (engl.: t emperature of m elting)
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaureat
V	V olt
var.	V arietät (taxonomische Kategorie)
Vergr.	V ergrößerung
W	W att
z. T.	z um T eil

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Strategien zur Schaffung und Nutzung interspezifischer und intergenerischer Hybriden

Kreuzungen bieten die Möglichkeit, Eigenschaften der Eltern in den Nachkommen zu kombinieren. Die Erzeugung von F₁-Hybriden, die gleiche Anteile der Genome beider Ausgangsarten in sich vereinen, erlaubt die Kombination gewünschter Charakteristika in sehr großem Umfang. Durch weite Kreuzungen können – nach anschließender wiederholter Rückkreuzung – auch chromosomale Additions- oder Substitutionslinien erzeugt werden, die dann zum Kartieren dieser einzelnen Additions- oder Substitutionschromosomen genutzt werden können. Dies ist vor allem wichtig bei Arten, bei denen sich die einzelnen Chromosomen nicht hinreichend unterscheiden lassen.

Die Strategien zur Schaffung von Art- und Gattungshybriden sind abhängig von der Verwandtschaft der Ausgangseltern (s. Abb. 1). Ist die Verwandtschaft eng, so sind die Genome durch Homöologie (d. h. teilweise Homologie) gekennzeichnet. Es kommt zur meiotischen Paarung und Rekombination, wie z. B. bei Hybriden zwischen *Lolium multiflorum* L. und *Festuca pratensis* Huds. Die Erzeugung solcher Hybriden ist oft problemlos möglich. Ihre Fertilität ist aber meist aufgrund meiotischer Irregularitäten vermindert und ihre Stabilität über die Folgegenerationen aufgrund der fortgesetzten meiotischen Rekombination zwischen den homöologen Genomen begrenzt.

Die Introgression eines oder weniger Merkmale durch fortgesetzte Rückkreuzung der Hybriden mit einer Elternart sowie Selektion nach dem gewünschten Merkmal bietet hier einen Ausweg. Auf diese Weise kann die genetische Variabilität einer Art erweitert werden. Bei *Lolium-Festuca*-Hybriden wurde dies beispielsweise von HUMPHREYS (1989) oder OERTEL und MATZK (1999) durchgeführt. Man gelangt auf diese Weise wieder zu einer der Ausgangsarten, die durch hohe Stabilität gekennzeichnet ist, dabei aber eine kleine Introgression besitzt (HUMPHREYS und PAŠAKINSKIENĖ 1996 oder OTTO et al. 2001).

Ein anderer Ansatz ist charakterisiert durch die Erzeugung stabiler und gut fertiler *Lolium-Festuca*-Hybriden aufgrund balancierter Chromosomensätze mit gleichen Genomanteilen beider Eltern. Diesem Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit nachgegangen (s. 1.2).

Verwandtschaftlich stärker entfernte Ausgangseltern sind gekennzeichnet durch den Besitz weitgehend inhomologer Genome, bei denen im Normalfall keine interspezifische meiotische Rekombination auftritt.

Die Schaffung von amphiploiden Linien bietet unter diesen Bedingungen eine Möglichkeit der Hybriderzeugung. Amphidiploide Pflanzen, also Bastardpflanzen die

durch den Besitz je eines diploiden Chromosomensatzes beider Eltern gekennzeichnet sind, finden eine weite Verbreitung unter den heutigen Kulturpflanzen, wie z. B. Raps (*Brassica napus* L., $2n=38$), Tabak (*Nicotiana tabacum* L., $2n=48$) oder Hartweizen (*Triticum turgidum* ssp. *durum* L., $2n=28$). Durch die Hybridisierung von Vorläufern von Hartweizen und einer weiteren Art (*Aegilops tauschii* Coss., $2n=14$) entstand der amphiploide Saatweizen (*Triticum aestivum* L., $2n=42$), der die diploiden Genome dreier Ausgangseltern vereint (z. B. KERBY und KUSPIRA 1987, JAUHAR und CHIBBAR 1999, DEVOS und GALE 2000). Diese Pflanzen sind evolutionär entstanden, wahrscheinlich durch unreduzierte Gameten oder durch spontane Verdoppelung des Genomes nach der Befruchtung. Sie zeichneten sich gegenüber ihren Eltern durch verbesserte Eigenschaften wie höheren Ertrag, größere Vitalität, höhere Konkurrenzfähigkeit, Resistenzen u. a. aus.

Vor mehr als 30 Jahren wurde von Züchtern die intensive Arbeit an der Kreuzung von Weizen (oft der tetraploide *Triticum turgidum*) und Roggen (*Secale cereale* L., $2n=14$) begonnen, aus der die wirtschaftlich erfolgreich genutzte Pflanzenhybride Triticale (\times *Triticosecale* Wittmack) resultierte (s. LARTER 1976). Triticale wird meist in der allohexaploiden Form genutzt ($2n=42$), es existiert aber auch eine allooktoploide Form ($2n=56$; *Triticum aestivum* \times *Secale cereale*).

Artifiziiell erzeugte intergenerische Hybriden können auch zwischen sehr weit entfernten Ausgangseltern erhalten werden. In den letzten Jahren gelang sogar die Produktion intergenerischer Hybriden zwischen Arten der Unterfamilien Pooideae und Panicoideae (zusammengefasst von MATZK et al. 1997).

Betreffend der Kreuzungen zwischen Eltern mit weitgehend inhomologen Genomen liegt in dieser Arbeit der Schwerpunkt bei Hybriden zwischen *L. multiflorum* \times *D. glomerata* (s. 1.2). Untersucht werden allerdings auch die Kombination *F. pratensis* \times *D. glomerata* und einige weitere Kombinationen.

Bei Arten mit inhomologen Genomen bietet die Schaffung von chromosomalen Additionslinien eine weitere Option zur Erzeugung stabiler Hybriden. Disome Additionslinien, in denen die Pflanzen einer Art ein Chromosomenpaar einer anderen Art besitzen, sollten sich stabil verhalten. Als Beispiel mögen hier Weizenlinien mit einzelnen Chromosomenpaaren von Gerste dienen (ISLAM et al. 1981, ISLAM und SHEPHARD 2000).

Additionslinien lassen sich schaffen, indem zunächst aus F_1 -Hybriden durch wiederholte Rückkreuzungen Pflanzen erzeugt werden, die nur noch ein oder wenige zusätzliche Additionschromosomen aufweisen. Ausgehend von Additionslinien können disome Additionslinien dann durch Verdoppelung des gesamten Genoms erzielt werden, was durch entsprechende Chemikalien wie z. B. Colchicin erreicht werden

kann. Jedes Paar der Additionschromosomen sollte sich über Generationen hinweg meiotisch stabil verhalten.

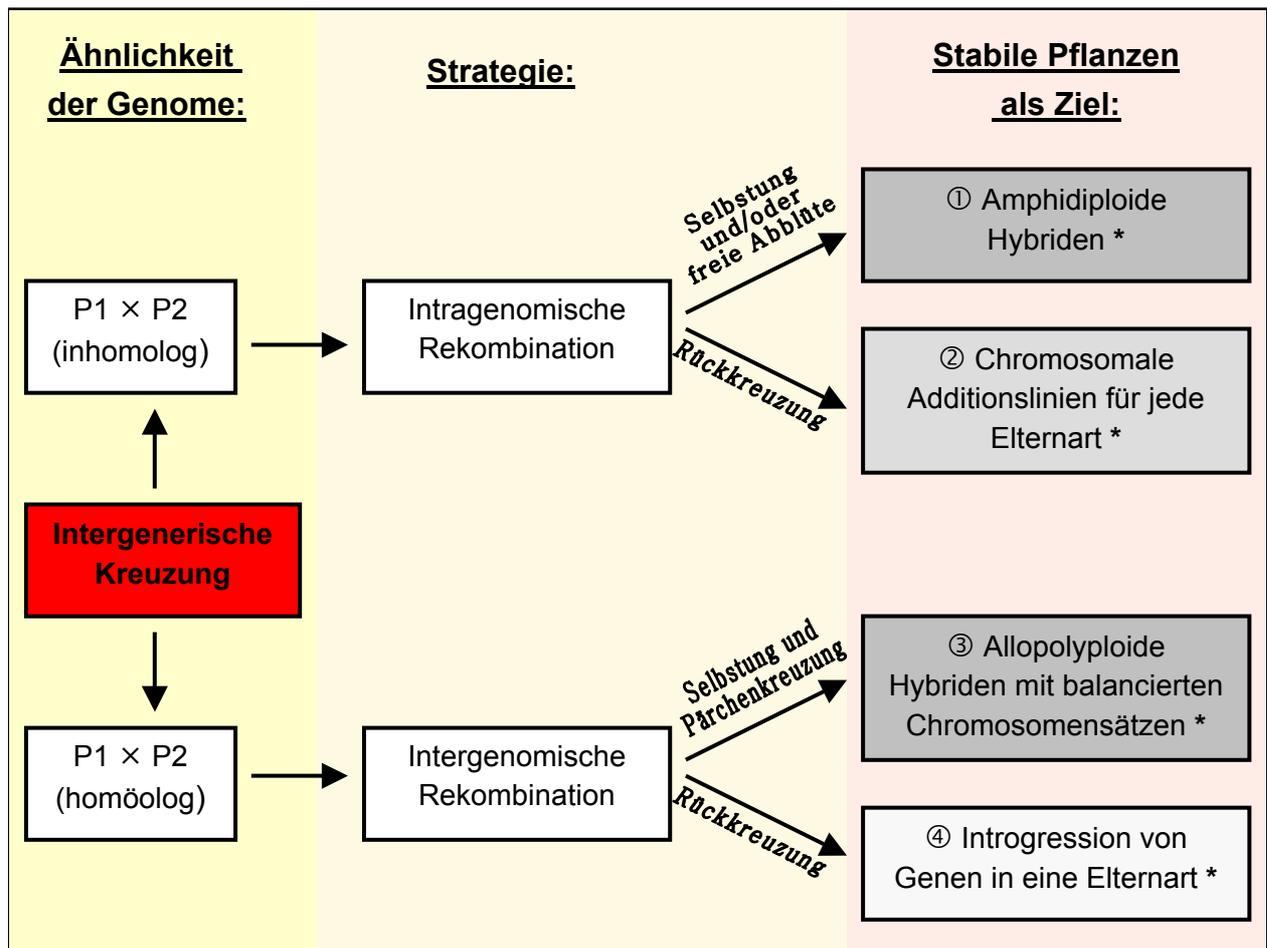
Dabei ist zu beachten, dass das Genom der Pflanze nicht eine Ploidiestufe erreicht, die der Fertilität abträglich ist. Aus diesem Grund sollte das Pflanzengenom vor der Verdoppelung gegebenenfalls zunächst halbiert werden, z. B. durch Antherenkultur. Univalente, in diesem Fall die Additionschromosomen, werden dabei entweder eliminiert oder erhalten. Diejenigen Pflanzen, die dann noch Additionschromosomen enthalten, werden in den weiteren Prozess einbezogen.

Falls autotetraploide Ausgangseltern vorliegen (die F_1 -Hybriden sind dann allotetraploid), kann die Reduzierung des Genoms – in diesem Fall vom tetraploiden auf das diploide Niveau – auch durch kontinuierliche Rückkreuzung mit diploiden Pflanzen eines Ausgangselters erreicht werden. Dabei sind immer Pflanzen zu selektieren, die noch ein oder wenige Chromosomen der anderen Elternart besitzen. Sobald Pflanzen hinsichtlich des Genoms der einen Elternart diploid sind – zuzüglich von Univalenten der anderen Elternart – erfolgt die Applikation polyploidisierender Chemikalien, um Chromosomenpaare der anderen Elternart anstelle der Univalente in den Pflanzen vorliegen zu haben.

Translokationen ermöglichen den Transfer von Genen. Die Introgression einzelner Gene in eine Art, Sorte oder Linie kann dabei aufgrund von Translokationen erreicht werden. In neuerer Zeit wurden auch zwischen verwandtschaftlich weiter entfernten Ausgangseltern Translokationen beobachtet, beispielsweise bei Gerste-Weizen Kreuzungen (*Hordeum vulgare* L. × *Triticum aestivum* und reziprok), beschrieben z. B. von ISLAM und SHEPHERD (1992), KOBAYASHI et al. 1997, SCHUBERT et al. (1998) oder MALYSHEVA et al. (2003). Das Vorkommen von Translokationen eröffnet zwischen diesen entfernt verwandten Ausgangseltern die Möglichkeit zur Introgression einzelner Gene durch Kreuzung.

Diese Translokationen zwischen entfernt verwandten Eltern treten selten auf, sie sollten sich aber artifiziell erhöhen lassen. Dies kann z. B. durch allgemein mutagene Behandlung wie dem Einwirken von Röntgenstrahlung oder von Chemikalien wie Ethylmethansulfonat und wie für Weizen-Gerste-Hybriden von MOLNÁR-LÁNG et al. (2000a) beschrieben durch Regeneration nach Durchlaufen eines Kallusstadiums geschehen.

Abb. 1: Allgemeine Strategien zur Schaffung und Nutzung intergenerischer Hybriden



* Verhältnis beider Elterngenome: unausgewogen ausgewogen

1.2 Problemstellungen und Ziele bei der Erzeugung intergenerischer Hybriden im Rahmen dieser Arbeit

Weite Kreuzungen bieten die Möglichkeit, Merkmale verschiedener Arten miteinander zu kombinieren. Für die wichtigsten einheimischen Futtergräsern, zu diesen zählen *Lolium multiflorum* Lam., *Lolium perenne* L., *Festuca pratensis* Huds., *Dactylis glomerata* L. und *Phleum pratense* ssp. *pratense* L. (alle Familie Poaceae, Subfamilie Pooideae), wäre dies erstrebenswert. So wäre es z. B. von hohem Nutzen, den Ertrag und den Futterwert von *L. multiflorum* mit der Winterhärte, Ausdauer und Trockenheitstoleranz von *D. glomerata* zu kombinieren. Der Transfer von Krankheitsresistenzen von einer Art in die andere, z. B. von *F. pratensis* in *L. multiflorum*, ist eine weitere Option. Hybriden zwischen diesen Arten sind aber oft nur schwer oder gar nicht zu erzeugen. Gelingt dies, sind die Hybriden in den meisten Fällen entweder nicht vital, hochgradig steril oder nicht stabil.

In der vorliegenden Arbeit wurden weite Kreuzungen zwischen Gräsern innerhalb der Subfamilie Pooideae untersucht, um die Kreuzbarkeit zwischen verschiedenen Arten und die Möglichkeiten zur Erzeugung vitaler, fertiler und stabiler Hybriden zu bewerten. Neben den wichtigsten einheimischen Futtergräsern wurden in geringem Umfang einige weitere Arten mit einbezogen (s. 2.1.2).

In der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) lag bereits eine vitale F₁-Hybride vor, die trotz regulärer Meiose steril war (OERTEL 1997). Die zugrunde liegende Strategie war, dass bei Kreuzungen zwischen Arten mit zueinander inhomologen Genomen bei Verwendung von autotetraploiden Eltern die Meiose regulär sein sollte (was zutraf) und folglich die Pflanze hohe Fertilität zeigen sollte (was nicht zutraf). Es sollte geklärt werden, ob die Sterilität genotypspezifisch ist oder generell für Hybriden dieser Kombination erwartet werden kann. Ebenso wurden für die Kombination *F. pratensis* (4x) × *D. glomerata* (4x) und einige weitere Kombinationen Kreuzungen autotetraploider Eltern untersucht (s. 2.1.2, 3.1.1 und 3.1.2), um die Möglichkeiten zur Schaffung fertiler amphidiploider Hybriden bewerten zu können.

Bereits vorliegende F₁-Hybriden der Kombinationen *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) (OERTEL et al. 1996a, OERTEL 1997), *F. pratensis* (2x, 4x) × *D. glomerata* (4x) (OERTEL 1997, OERTEL unveröffentlicht) und *F. arundinacea* (6x) × *D. glomerata* (4x) (MATZK 1981) wurden in die Untersuchungen ebenso einbezogen wie vorhandene BC₁- und BC₂-Hybriden (OERTEL 1997, OERTEL unveröffentlicht) zwischen *L. multiflorum* × *D. glomerata* (Überblick s. Abb. 3; 2.1.2).

Intergenerische Kreuzungen zwischen Eltern, die nicht beide autotetraploid waren, dienten zur Bewertung der generellen Kreuzbarkeit in diesen Kombinationen und damit der Nutzbarkeit als Genpool für die Pflanzenzüchtung. Generell können erzeugte Pflanzen zur Erzeugung von Nachkommen durch Rückkreuzungen oder durch Antherenkultur genutzt werden mit dem Ziel, chromosomale Additionslinien zu schaffen oder einzelne Gene in eine der Elternarten zu introgressieren. In der Kombination *L. multiflorum* × *D. glomerata* bestand ein Ziel der vorliegenden Arbeit darin, diese Möglichkeiten unter Zuhilfenahme der vorhandenen BC₁- und BC₂-Hybriden zu untersuchen. Vor allem sollte die Anzahl der zur Verfügung stehenden Rückkreuzungsnachkommen vergrößert werden.

Da bei weiten Kreuzungen innerhalb der Poaceae oft die Entwicklung des Endosperms, nicht allerdings die des Embryos gestört ist, ersetzt bei den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologen Genomen eine exogene Phytohormonapplikation die fehlende interne Stimulation seitens des Endosperms auf den Embryo. Eine anschließende Embryokultur ist erforderlich.

Die GISH (genomische *in situ* Hybridisierung) ist eine geeignete Technik zur Analyse von Hybriden, deren Elternarten ausreichend unterschiedliche DNS-Sequenzen aufweisen.

Als entscheidende Methoden kommen deshalb die Phytohormonbehandlung der befruchteten Ovarien mit anschließender Embryokultur (MATZK 1991, MATZK und MAHN 1994) und die GISH (DURNAM et al. 1985, PINKEL et al. 1986, LE et al. 1989, SCHWARZACHER et al. 1989, JIANG und GILL 1994, für Weizen: SCHWARZACHER et al. 1992, für *Lolium-Festuca*-Hybriden: PEREZ-VICENTE et al. 1992) zur Analyse der Genomzusammensetzung von produzierten Hybriden zum Einsatz.

Hybriden zwischen *Lolium* und *Festuca* sind schon seit langer Zeit bekannt (MCALPINE 1898, JENKIN 1924, JENKIN 1933) und werden seit ca. 50 Jahren intensiv bearbeitet (z. B. JENKIN 1959a+b, zusammengefasst in JAUHAR 1993). Obwohl beide traditionell als verschiedene Gattungen betrachtet werden, bastardieren Arten beider Gattungen gelegentlich auch unter natürlichen Bedingungen (z. B. *F. pratensis* × *L. perenne*: LEWIS 1975). Bei *Festuca* betrifft dies vor allem Arten der Sektion Bovinae (*F. arundinacea*, *F. pratensis* und *F. gigantea*; JAUHAR 1993). Im Laufe der Jahre betrachteten immer mehr Autoren die Gattung *Lolium* (8 Arten weltweit: z. B. JAUHAR 1993, GAUT et al. 2000), der Gattung *Festuca* (6 Sektionen mit ca. 450 Arten weltweit; nach HAECKEL 1882, JAUHAR 1993) sehr nahe stehend oder mit ihr zu einer Gattung gehörend (STEBBINS 1956, BULIŃSKA-RADOMSKA und LESTER 1988, JAUHAR 1993, PAŠAKINSKIENĖ et al. 1998, GAUT et al. 2000 u. a.).

Neben möglichen Krankheitsresistenzen, z. B. gegenüber Kronenrost (*Puccinia coronata* Corda var. *coronata*), Bakterienwelke (*Xanthomonas campestris* pv. *graminis* [Egli et al.] Dye) oder Schneeschimmel (*Microdochium nivale* [Fr.] Samuels & Hallet), weisen Arten von *Festuca* und *Lolium* auch jeweils andere wichtige Eigenschaften (s. u.) auf, deren Transfer von einer Art in die andere erstrebenswert ist oder deren Kombination in einer einzigen Hybridsorte mit hoher Fertilität große Bedeutung für die Gräserzüchtung hätte. Bei *Festuca* (vor allem *F. pratensis*, *F. arundinacea* und *F. arundinacea* var. *glaucescens*) sind das besonders die Trocken- und Kältetoleranz (Winterhärte) sowie die Ausdauer, bei *Lolium* (vor allem *L. multiflorum* und *L. perenne*) können der Ertrag, der Futterwert und die Wachstumsgeschwindigkeit genannt werden. Resistenz gegenüber Kronenrost wurde erfolgreich sowohl von *Festuca arundinacea* als auch von *F. pratensis* in *L. multiflorum* transferiert (OERTEL und MATZK 1999). Des Weiteren wurde von einer erhöhten Kältetoleranz in *L. multiflorum* × *F. arundinacea* Hybriden nach Antherenkultur berichtet, die teilweise die Kältetoleranz in beiden Eltern sogar deutlich überschreite (ZARE et al. 1999). Ebenso liegen Untersuchungen über den gelungenen Transfer von Trockenheitsresistenz aus *F. arundinacea* in *L. multiflorum* (HUMPHREYS und PAŠAKINSKIENĖ 1996) und über die erfolgreiche Intro-gression einer

länger andauernden Grünfärbung der Blätter („stay-green character“) aus *F. pratensis* in *Lolium temulentum* Ceres (THOMAS et al. 1999) vor.

Allopolyploide Hybriden zwischen *Lolium* und *Festuca* lassen sich zwar relativ leicht entwickeln, doch führen Irregularitäten in der meiotischen Chromosomenpaarung zwischen den homöologen Genomen (z. B. Univalent- und Multivalentbildungen) zu einer verminderten Fertilität (JAUHAR 1975a, MORGAN und THOMAS 1981, SPRINGER und BUCKNER 1982, KLEIJER 1984, THOMAS 1993, z. T. zusammengefasst in JAUHAR 1993). Auch einzelne selektierte, hoch fertile *Lolium-Festuca*-Hybriden mit regulärer Meiose boten keinen Ausweg (KLEIJER 1987, KAISER 1988, ZIMMERMANN 1988). Aufgrund der Selbstinkompatibilität bei den hybridisierten Arten war Fremdbefruchtung erforderlich. Vorliegende balancierte Genome, möglicherweise gekennzeichnet durch ein symmetrisches Translokationsmuster (s. u.), wurden durch die fortgesetzte meiotische Rekombination in den Folgegenerationen wieder debalanciert. Einzelne Sorten sind zugelassen (*Festulolium braunii* [K. Richt.] A. Camus; z. B. 'Paulita': Bundessortenamt 1997, Bundessortenamt 1999 und 'Paulena': Bundessortenamt 1997), aber für einen wirtschaftlichen Erfolg bislang nicht fertil und stabil genug.

Bei der normalen meiotischen Chromosomenpaarung innerhalb einer Art lagern sich die physikalisch entsprechenden Regionen der homologen Chromosomen (homologe Sequenzen) aneinander an (SCHWARZACHER 1997, SCHWARZACHER 1999). Bei *Lolium-Festuca*-Hybriden geschieht dies auch zwischen den entsprechenden homöologen Chromosomen (JAUHAR 1975a + 1993, THOMAS et al. 1994, PAŠAKINSKIENĖ et al. 1997, HUMPHREYS et al. 1998, ZWIERZYKOWSKI et al. 1999a, u. a.), woraus oft intergenerische Translokationen resultieren. Werden Hybriden selektiert, bei denen die Chromosomenmitte jeweils von *Lolium* und die terminalen Chromosomenbereiche jeweils von *Festuca* stammen (oder umgekehrt !), so sollten in der Meiose jeweils fast ausschließlich Chromosomenbereiche von *Festuca* an welchen von *Festuca* liegen und die von *Lolium* an denen von *Lolium*. Dies resultiert dann in Hybridpflanzen, die ungefähr gleiche Genomanteile beider Elternarten sowie eine regelmäßige Meiose besitzen und aus dieser folgend hohe Fertilität aufweisen.

Werden Hybriden mit diesen symmetrischen Translokationen (einige Chromosomen als Beispiel s. Abb. 63, s. Abb. 2) ausschließlich untereinander befruchtet, so sollten nahezu keine neuen intergenerischen Translokationen auftreten, da *Festuca*- und *Lolium*-Bereiche der Chromosomen dann untereinander paaren. Das symmetrische Translokationsmuster im Genom der Pflanzen sollte im Folgenden also nicht gestört werden und die Hybriden sind in ihrer hohen Fertilität auch über mehrere Generationen stabil. Die geeignete Methode zur Identifikation der entsprechenden Genotypen stellt die genomische *in situ* Hybridisierung (GISH) dar (z. B. PEREZ-VICENTE et al. 1992).

Abb. 2: Darstellung der Strategie zur Erzeugung balancierter *Lolium-Festuca* Hybriden, bezogen auf eines der 7 verschiedenen Chromosomen dieser Arten: Chromosomensegmente des einen Elter sind rot, des anderen Elter gelb dargestellt

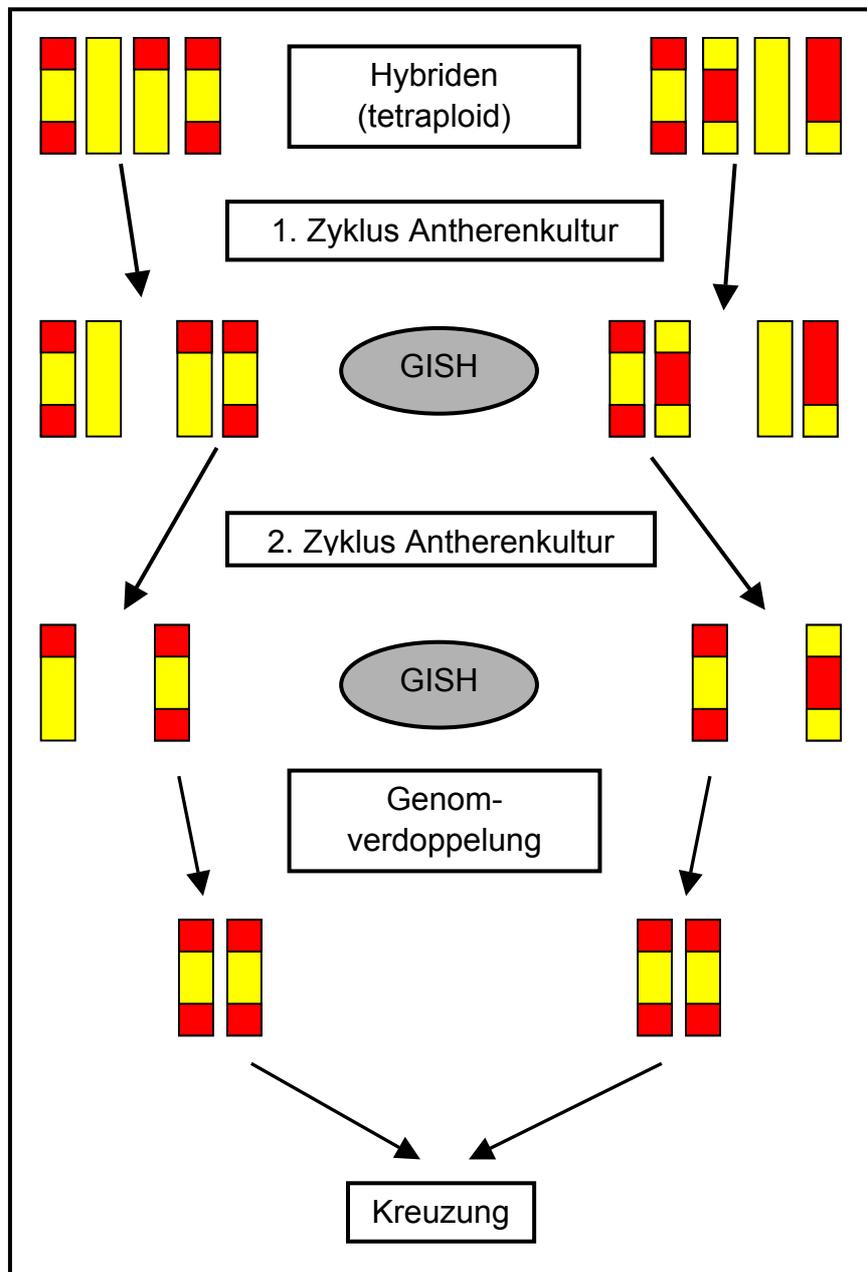


Abb. 2 veranschaulicht die Strategie zur Selektion von *Lolium-Festuca*-Hybriden mit symmetrischen Translokationsmustern, zur Vereinfachung ist nur eines der 7 Chromosomenpaare (Pflanzen diploid) bzw. Chromosomenquartetts (Pflanzen tetraploid) der *Lolium-Festuca* Ausgangseltern dargestellt.

Um Pflanzen mit diesen Translokationsmustern selektieren zu können, stellen die Auswahl fertiler, phänotypisch intermediärer Hybriden – wobei der intermediäre Phänotyp in etwa gleiche Genomanteile beider Eltern vermuten lässt – und die anschließende Reduktion des Genoms entscheidende Schritte dar (s. Abb. 2). Als Ausgangspflanzen für diese Arbeit dienen *Lolium-F. pratensis*-Hybriden der 3. bis 7. Generation (s. 2.1.3). Die Antherenkultur ist dabei eine geeignete Methode, das Genom von tetraploiden Ausgangsbastardpflanzen zuerst auf das diploide und dann auf das haploide Niveau abzusenken. Bei haploiden Pflanzen ist die

Möglichkeit, solche mit dem gewünschten Muster symmetrischer Translokationen zu selektieren, weitaus größer als bei diploiden Pflanzen mit 14 verschiedenen oder als bei tetraploiden Pflanzen mit 28 verschiedenen Chromosomen. Vom haploiden Genom erfolgt die Verdoppelung des Genoms, entweder durch spontane Verdoppelung oder artifiziell durch Polyploidisierung mit z. B. Colchicin, so dass man verdoppelt haploide Pflanzen erhält. Diese haben dann 7 Paare mit jeweils zwei identischen Chromosomen. Eine große Anzahl aus zwei Zyklen Antherenkultur regenerierter grüner Pflanzen werden benötigt, um Hybriden mit den gewünschten Translokationen finden zu können. Der Chromosomensatz der Pflanzen muss dabei jeweils reduziert werden. Daher stellt die Anwendung und Optimierung der Antherenkulturtechnik für die verwendeten *Lolium-Festuca*-Hybriden ein unumgängliches Ziel dar.

Aus dem Vergleich der Ergebnisse für die *Lolium-Festuca*-Hybriden mit den Ergebnissen für die anderen intergenerischen Kreuzungskombinationen innerhalb der Pooideae können sich Anhaltspunkte für die Bewertung der systematischen Stellung der Gattungen zueinander ergeben.

Es lassen sich im Wesentlichen folgende Zielstellungen nennen:

- Untersuchung der Möglichkeit, stabile amphidiploide Hybridlinien zwischen *Lolium multiflorum* × *Dactylis glomerata* sowie zwischen *Festuca pratensis* und *D. glomerata* zu erzeugen
- Rückkreuzung der F₁-Hybriden von *L. multiflorum* × *D. glomerata* mit den Elternarten und Evaluierung der Möglichkeit zur Schaffung disomer Additionslinien
- Evaluierung der Möglichkeit für intergenerische Translokationen bei *Lolium-Dactylis*-Hybriden und deren Nutzung zur Introgression einzelner oder weniger Gene
- Generelle Bewertung der Chancen für erfolgreiche intergenerische Kreuzungen innerhalb der Pooideae für Arten mit zueinander weitgehend inhomologen Genomen
- Anwendung der Antherenkultur bei *Lolium-F. pratensis*- Bastardgräsern zur Erzeugung reduzierter und fertiler Regenerate
- Untersuchung der Möglichkeit, balancierte *Lolium-F. pratensis*- Hybriden mit einem symmetrischen Translokationsmuster (s. o., s. Abb. 2) zu erhalten

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Verwendete Ausgangseltern

Tab. 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Arten, Sorten und Ökotypen. Verwendung fanden Arten der Triben Aveneae und Poeae.

Tabelle 1: Verwendete Arten, Sorten und Ökotypen der Pooideae

Art ¹	Valenz	Sorte/Ökotyp	Bezugsquelle
Tribus Aveneae²			
<i>Arrhenatherum elatius</i> (L.) P. BEAUV. ex. J. & C. PRESL	2n=4x=28	‘Roznovsky’	Genbank Gatersleben (GR 112/88)
		‘Steinacher Glatthafer’	Genbank Gatersleben (GR 307/90)
<i>Arrhenatherum elatius</i> ssp. <i>bulbosum</i> (WILLD.) T. KOYAMA	2n=4x=28	‘Variegatum’	Bot. Garten Bydgoszcz, Polen
<i>Holcus lanatus</i> L.	2n=2x=14	Ökotyp	Genbank Gatersleben (GR 3616/93)
		Ökotyp	Genbank Gatersleben (GR 4224/94)
<i>Phleum pratense</i> L.	2n=6x=42	‘Barliza’	Genbank Gatersleben (GR 3784/92)
		‘Levocska’	Genbank Gatersleben (GR 3914/74)
<i>Phleum pratense</i> ssp. <i>bertolonii</i> (DC.) SERBANESCU & E. L. NYARADY	2n=2x=14	Ökotyp	Genbank Gatersleben (GR 5525/85)
Tribus Poeae²			
<i>Cynosurus cristatus</i> L.	2n=2x=14	Ökotyp	Genbank Gatersleben (GR 653/95)
<i>Dactylis glomerata</i> L.	2n=4x=28	‘Baraula’	Genbank Gatersleben (GR 696/90)
		‘Currie’	Genbank Gatersleben (GR 717/76)
		‘Lidacta’	Deutsche Saatveredelung
		‘Lidaglo’	Deutsche Saatveredelung
		‘Motterwitzer’	Genbank Gatersleben (GR 913/74)
		‘Motycka’	Genbank Gatersleben (GR 924/82)
		‘Reda’	Deutsche Saatveredelung

		'Weidac'	Saatzucht Steinach
		3 Ökotypen	Gatersleben
		3 Ökotypen	Friedrichsbrunn, Harz
<i>Festuca arundinacea</i> SCHREB.	2n=6x=42	'Kentucky-31'	Genbank Gatersleben (GR 1378/77)
<i>Festuca pratensis</i> HUDS.	2n=2x=14	'Cosmos 11'	Genbank Gatersleben (GR1697/86)
	2n=4x=28	Zuchtstamm	Saatzucht Steinach
<i>Festulolium braunii</i> [K. Richt.] A. Camus <i>Festulolium braunii</i> , Antherenkulturregenerate	2n=4x=28	'Paulita'	DLF-Trifolium
	–	'Paulita'	Universität Hohenheim, Landessaatzuchtanstalt
<i>Lolium</i> × <i>boucheanum</i> KUNTH.	2n=4x=28	'Gazella'	Deutsche Saatveredelung
<i>Lolium multiflorum</i> LAM.	2n=2x=14	'Axis'	Genbank Gatersleben
		'Lema'	Norddeutsche Pflanzenzucht
		'Turilo'	Deutsche Saatveredelung
	2n=4x=28	'Liberta'	Deutsche Saatveredelung
		'Lipo'	Deutsche Saatveredelung
		'Malmi'	Norddeutsche Pflanzenzucht
		'Manito'	Norddeutsche Pflanzenzucht
<i>L. m.</i> LAM. var. <i>westerwoldicum</i>	2n=2x=14	'Lirasand'	Deutsche Saatveredelung
<i>L. perenne</i> L.	2n=2x=14	'Limes'	Deutsche Saatveredelung
	2n=4x=28	'Alex'	Genbank Gatersleben (GR 2646/87)
		'Bastion'	Genbank Gatersleben (GR 2695/88)
		'Mandat'	Norddeutsche Pflanzenzucht

¹ Nomenklatur nach Index Kewensis (1996)

² Tribus Nomenklatur nach CLAYTON und RENVOIZE (1986) / WATSON und DALLWITZ (1999), s. auch 7.3

Phleum pratense ssp. *bertolonii* (2x) wird der Einfachheit halber als *Ph. pratense* (2x) geführt.

2.1.2 Pflanzenmaterial für die weiten Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologen Genomen

Als Eltern für Kreuzungen zwischen Arten mit inhomologen Genomen dienten *Arrhenatherum elatius*, *Cynosurus cristatus*, *Dactylis glomerata*, *Festuca pratensis*, *Holcus lanatus*, *Lolium multiflorum*, *L. perenne* und *Phleum pratense*. Es wurden verschiedene Sorten und Ökotypen in die Kreuzungen einbezogen. Einzelheiten sind

der Tab. 1 in 2.1.1 zu entnehmen. Des Weiteren dienten *Lolium-Festuca*-Hybriden als Samenertern (s. 2.1.3; Generationen F₃ - F₇ der Kombinationen 1 - 4). Die intergenerischen Kreuzungen wurden in den nachfolgend aufgeführten Kombinationen durchgeführt; die 15 insgesamt vorhandenen F₁-Hybriden sind bei den jeweiligen Kombinationen genannt:

Lolium multiflorum (2x) × *Phleum pratense* (2x), *L. multiflorum* (4x) × *Ph. pratense* (6x), *L. perenne* (4x) × *Ph. pratense* (6x), *Festuca pratensis* (4x) × *Ph. pratense* (2x/6x), *Lolium-Festuca*-Hybriden (4x; Kombinationen 1-4) × *Ph. pratense* (2x/6x), *L. multiflorum* (4x) × *Arrhenatherum elatius* (4x), *F. pratensis* (4x) × *Arrh. elatius* (4x), *L. multiflorum* (4x) × *Holcus lanatus* (2x) und *L. perenne* (2x/4x) × *D. glomerata* (4x):

keine Hybriden

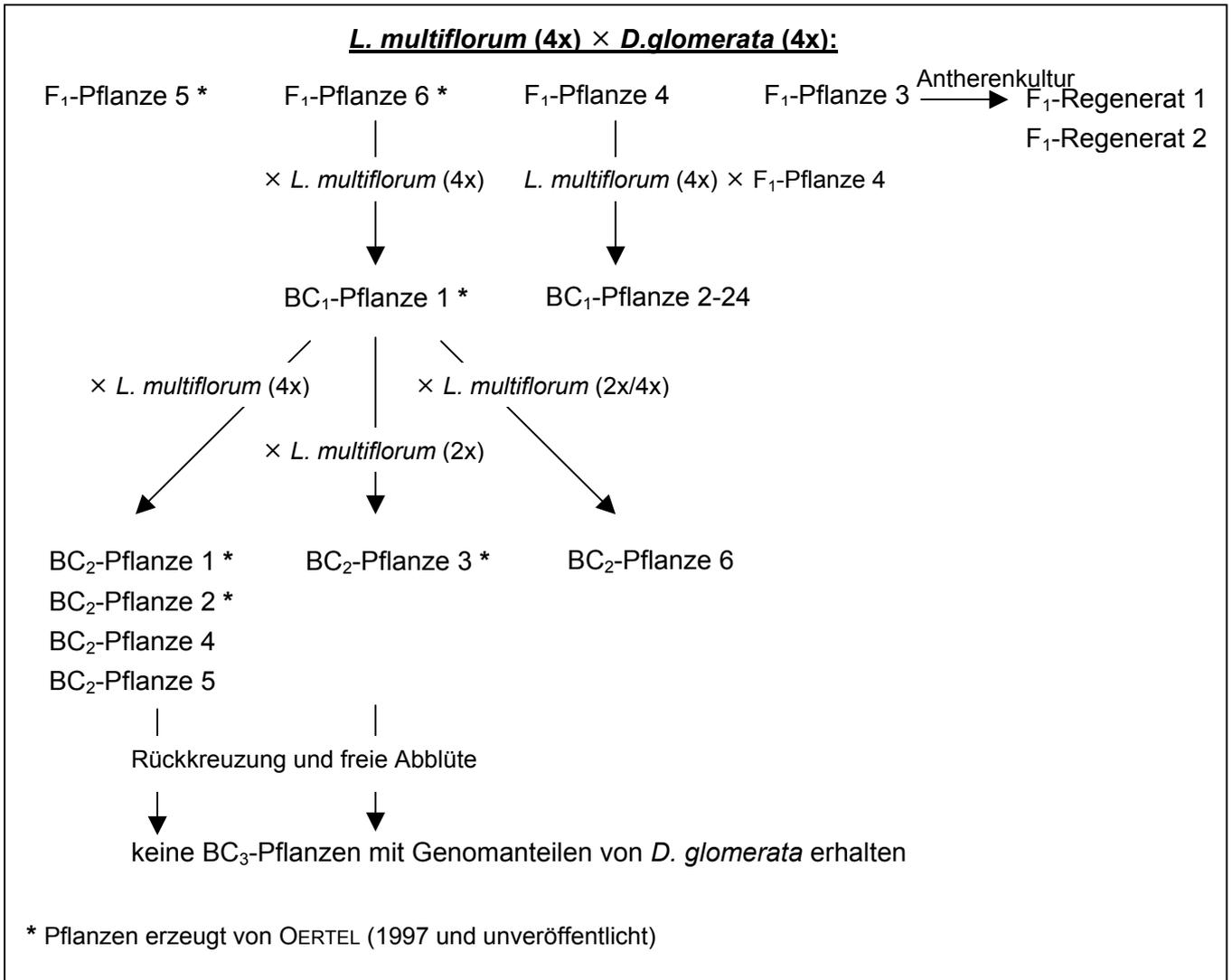
L. multiflorum (4x) × *Cyn. cristatus* (2x): F₁-Pflanze 15
F. pratensis (4x) × *D. glomerata* (4x): F₁-Pflanze 8, F₁-Pflanze 9 *, F₁-Pflanze 10 *
L. multiflorum (2x) × *D. glomerata* (4x): F₁-Pflanze 1, F₁-Pflanze 2
L. multiflorum (4x) × *D. glomerata* (4x): F₁-Pflanze 3, F₁-Pflanze 4, F₁-Pflanze 5 *,
F₁-Pflanze 6 *
Lolium-Festuca-Hybriden (4x; Kombinationen 1 und 3: s. 2.1.3) × *D. glomerata* (4x):
F₁-Pflanze 11, F₁-Pflanze 12, F₁-Pflanze 13

Bei den nicht im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Hybriden sind von OERTEL (1997 und unveröffentlicht) erzeugte Pflanzen mit einem Stern (*) und von MATZK (1981) erzeugte Pflanzen mit einem Kreis (°) gekennzeichnet. Folgende Kreuzungen wurden nur von OERTEL (unveröffentlicht) bzw. MATZK (1981) durchgeführt:

F. pratensis (2x) × *D. glomerata* (4x): F₁-Pflanze 7 *
F. arundinacea (6x) × *D. glomerata* (4x): F₁-Pflanze 14 °

Rückkreuzungen erzeugter Hybriden wurden mit *L. multiflorum*, *D. glomerata* und *L. multiflorum* var. *westerwoldicum* durchgeführt. Abb. 3 zeigt den Stammbaum für die Nachkommen der F₁-Hybriden zwischen *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x). Blühende Pflanzen der strikt einjährigen Varietät *Westerwoldicum* sind leichter verfügbar, da keine Vernalisation erforderlich ist.

Abb. 3: Stammbaum für die Nachkommen der intergenerischen F₁-Hybriden der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x)



2.1.3 Pflanzenmaterial der Hybriden von Eltern mit homöologen Genomen

Zur Erzeugung von *Lolium-Festuca*-Hybriden mit balancierten Genomen fanden Pflanzen Verwendung, die nach mehreren Generationen freier Abblüte (Generationen F₃ - F₇) aus F₁-Hybriden folgender Kombinationen hervorgegangen waren:

- Kombination 1: *Lolium multiflorum* (2x) × *Festuca pratensis* (4x)
- Kombination 2: *Festuca pratensis* (4x) × *Lolium perenne* (4x)
- Kombination 3: *Festuca pratensis* (4x) × *Lolium multiflorum* (4x)
- Kombination 4: *Festuca pratensis* (4x) × *Lolium boucheanum* (4x)

16 Antherenkulturregenerate, die alle von einer einzigen *Lolium-Festuca*-Donorpflanze der tetraploiden Sorte 'Paulita' abstammten, wurden im Rahmen der Antherenkultur bei

der Bestimmung der Ploidie mit einbezogen. Diese Regenerate wurden von U. K. Posselt (Landessaatzuchtanstalt Universität Hohenheim) zur Verfügung gestellt.

2.2 Pflanzenanzucht

Adulte Pflanzen wuchsen in Pflanztöpfen mit 14 cm oder 16 cm Durchmesser im Gewächshaus und im Freilanderdbeet. Kurz vor und während der Blüte befanden sich die Pflanzen im Gewächshaus in einem Regime mit 15-16 h Licht (≥ 20.000 Lux) und Tag-/Nachttemperatur von ca. 21/16°C. Zwei Klonteile (s. u.) der F₁-Pflanze 6 (s. Abb. 3) der Kombination *L. multiflorum* (4x) \times *D. glomerata* (4x) wurden kurz vor und während der Blüte bei konstanter Umgebungstemperatur von 35°C (16 h Licht; 5000 Lux) geführt. Adulte *Lolium-Festuca*-Hybriden und einige Nachkommen von *Lolium-Dactylis*-Hybriden befanden sich z. T. in Feldkultur.

Während des Winters wurden Topfpflanzen im Freilanderdbeet oder in kalt gehaltenen Gewächshäusern vernalisiert. Die Vernalisation der Jungpflanzen, die im Frühjahr für eine Feldpflanzung vorgesehen waren, erfolgte in der Regel aus Platzgründen in Multitopfpaletten.

Für die Vernalisation (Dauer ≥ 3 Monate) im Frühling, Sommer und Herbst stand eine Kühlzelle mit 4°C bei Kurztagbedingungen (8 h Licht, 2000 Lux) zur Verfügung. Pflanzen von *D. glomerata* und F₁-Hybriden zwischen *L. multiflorum* \times *D. glomerata* wurden vor der Vernalisation in der Kühlzelle 3 Wochen Kurztagbedingungen (8 h Licht, 5000 Lux) mit Tag-/Nachttemperatur von ca. 14/10°C ausgesetzt. Diese Bedingungen wurden gewählt, um eine bestmögliche Vernalisation sicherzustellen. *D. glomerata* benötigt zum Blühen deutlicher als z. B. *L. multiflorum* eine Vernalisationsperiode mit Kurztag und niedrigen Temperaturen. Von GARDNER und LOOMIS (1952) wurde gezeigt, dass bei *D. glomerata* die Kurztagphase, die die Vernalisation initiiert, dabei der Phase mit niedrigen Temperaturen vorausgehen kann, die die Vernalisation fixiert.

Alle in der Kühlzelle vernalisierten Pflanzen wurden jeweils mindestens 20 d bei einer Tageslänge von 11 h (ca. 14/11°C tags/nachts bei ≥ 16.000 Lux) und anschließend 14 h (ca. 18/13°C bei ≥ 20.000 Lux) geführt, bevor sie zur Blüte gebracht wurden (15-16 h Licht ≥ 20.000 Lux mit ca. 21/16°C tags/nachts).

Viele Pflanzen wurden verklont. Ein Klonteil diente meist zur vegetativen Erhaltung. Die anderen Klonteile standen nach Vernalisation für Kreuzungen, Selbstungen und Antherenkultur zur Verfügung.

Folgende Pflanzen wurden in mehrere Klone geteilt:

- a. F₁-Hybriden aus Kreuzungen zwischen Eltern mit **inhomologen Genomen**, deren Regenerate aus Antherenkultur und deren Rückkreuzungsnachkommen

- b. Selektierte *Lolium-Festuca*-Hybriden (**homöologe Genome**), die als Ausgangspflanzen für die Antherenkultur und weitere Kreuzungen dienen
- c. Regenerate aus Antherenkultur von *Lolium-Festuca*-Hybriden (**homöologe Genome**)

2.3 Durchführung der Kreuzungen

2.3.1 Erzeugung von Hybriden aus weiten Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologen Genomen

2.3.1.1 Kastration, Bestäubung und Auxinbehandlung

Bei Kreuzungen zwischen entfernter verwandten Arten (s. 2.1.2), gekennzeichnet durch zueinander **inhomologe Genome**, wurden Blütenstände vom Samenelter ca. zwei Tage vor Anthesis per Hand kastriert (s. Abb. 4 und Abb. 5). Dies geschah bei allen Kreuzungen zur Erzeugung von F₁-Hybriden sowie in der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) bei Rückkreuzungen der BC₂-Pflanze 3 und z. T. der BC₂-Pflanze 1.



Abb. 4 (links) und Abb. 5 (rechts): Kastrieren eines Blütenstandes von *L. multiflorum* : Die Antheren der Blütchen, die in ein bis vier Tagen blühen werden, werden mittels einer Pinzette entfernt. Jüngere Blütchen und nicht kastrierte Blütenstände der Pflanze werden komplett entfernt.

Kastrierte Blütenstände wurden bis zur Durchführung der Kreuzung mit Zellglasbeuteln isoliert, um eine Bestäubung durch unerwünschten Pollen zu vermeiden. Mehrere Pflanzen des Samenelters mit meist je 2 bis 3 kastrierten Blütenständen wurden in Gruppen in Gewächshauskabinen, die frei von anderen Bestäubern als dem gewünschten waren, aufgestellt. Um ein Überangebot an Pollen zu gewährleisten, wurden abgeschnittene Blütenstände des Pollenelters in großer Anzahl oberhalb des Samenelters in Behälter mit Wasser gestellt. Die Blütenstände des Pollenelters wurden mehrmals täglich geschüttelt (s. Abb. 6) und nach Abblühen ersetzt.



Abb. 6: Bestäubung: Blütenstände des Pollenelters *D. glomerata* befinden sich oberhalb von kastrierten Ähren des Samenelters *L. multiflorum*, die mit Stäben stabilisiert wurden.

In den meisten Fällen ist bei weiten Kreuzungen innerhalb der Poaceae zuerst die Entwicklung des Endosperms gestört. Eine vom Endosperm ausgehende Stimulation ist für die Entwicklung des Embryos jedoch notwendig. Diese wird durch exogene Phytohormonapplikation nach einer Methode von MATZK (1991) sowie MATZK und MAHN (1994) ersetzt, bei deren Anwendung die Embryodifferenzierung stimuliert wird. Die Blütenstände des Samenelters wurden 2 bis 3 Tage nach Beginn der Bestäubung durch einminütiges Tauchen in eine wässrige Lösung (100 ppm) des synthetischen

Auxins 3,6-Dichlor-2-methoxybenzoesäure (Dicamba, mit Zusatz eines Tropfens Tween 20) behandelt.

Um den Einfluss der Kastration und Auxinbehandlung auf die Embryofrequenz zu erfassen, wurde tetraploides *L. multiflorum* kastriert, mit Pollen von *L. multiflorum* bestäubt und, wie bei den weiten Kreuzungen, nach ca. zwei Tagen mit Dicamba behandelt. Als weiterer Vergleich wurden entsprechende Kreuzungen zwischen *L. multiflorum* (4x) × *F. pratensis* (4x) durchgeführt, deren Genome homöolog sind.

2.3.1.2 Embryokultur

Die mit Dicamba behandelten Blütenstände verblieben an der Pflanze und wurden 16 bis 18 Tage nach der Behandlung geerntet. Dicamba induziert die Bildung von Karyopsen, die statt Endosperm eine klare Flüssigkeit enthalten (Parthenokarpie). Diese Karyopsen (s. Abb. 7) wurden manuell aus den Blütenständen präpariert und ihre Oberfläche durch 10- bis 20minütiges Tauchen in eine Lösung von ca. 1 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in 50 % Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde einmal mit sterilem Wasser gespült. Die Karyopsen wurden in einer Laminarbox bei Betrachtung durch ein Stereomikroskop (Zeiss Jena, 16fache Vergrößerung) mit einer spitzen Präpariernadel aufgeschnitten und Embryonen wurden entnommen. Die Embryonen wurden nach ihrem Entwicklungsstand in Klassen eingestuft (s. Abb. 8).



Abb. 7: Nach Auxinapplikation durch Parthenokarpie gebildete Karyopsen einer Kreuzung zwischen *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x)

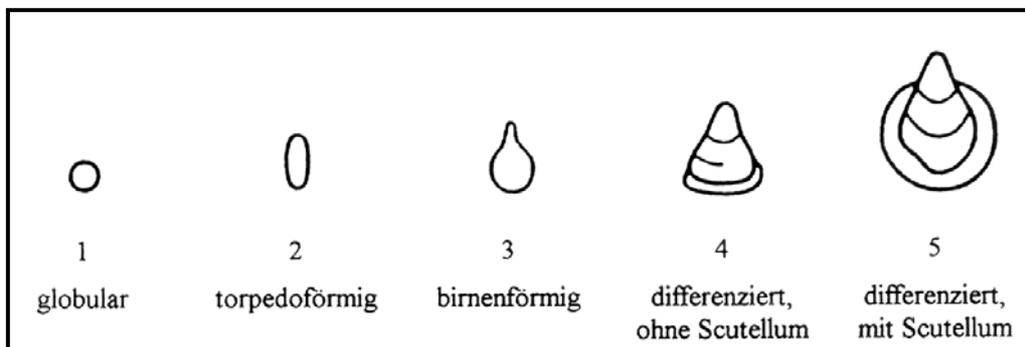


Abb. 8: Klassifikation der Embryodifferenzierung, nach MATZK (1991), verändert von OERTEL (1997)

Embryonen der Klassen 4 und 5 (differenziert) wurden in Glasröhrchen (8 cm Länge, ca. 34 ml Rauminhalt) auf ca. 10 ml Kruse-Medium (modifiziert nach KRUSE 1974, s. 7.2.1) überführt. Die Röhrchen befanden sich anschließend in einer Klimakammer bei konstanten Bedingungen von 24°C im Dunkeln. Da die Röhrchen verschlossen waren, kann im Inneren von einer hohen relativen Luftfeuchtigkeit ausgegangen werden. Embryonen mit Wurzel- und Sprossbildung oder nur Wurzelbildung wurden mit ihren Röhrchen in eine Klimakammer mit 16 h Licht (3.000 Lux) bei 24°C überführt.

Nach Erreichen des 3-Blatt-Stadiums wurden die Pflanzen in feingesiebtetes Substrat aus je einem Volumen Torf, Sand und gedämpfter Komposterde (Wasserdampf 90°C) pikiert. Die Pflanzen befanden sich bis zur Bildung von mindestens 7 Blättern und bis zur Durchwurzelung des 6-cm-Pflanztopfes in einer Gewächshauskabine mit einem Regime von 16 h Licht (14.000 Lux Lichtstärke) und Tag-/Nachttemperatur von ca. 24/20°C. In den ersten Tagen nach dem Pikieren wurde die Luftfeuchtigkeit durch Abdeckung der Töpfe mit Glas sehr hoch gehalten und nach und nach durch schrittweises Öffnen der Abdeckung verringert. Zum Bestocken wurden kühlere Bedingungen von ca. 20/14°C Tag-/Nachttemperatur bei 15 bis 16 h Licht (≥ 20.000 Lux) gewählt.

2.3.2 Rückkreuzungen mit Auxinbehandlung und Embryokultur ohne Kastration der Hybriden

Bei Hybriden von Eltern mit **inhomologen Genomen** wurden Rückkreuzungen der F₁-Hybriden und z. T. der BC₁- und BC₂-Hybriden wie die Kreuzungen zur Erzeugung von F₁-Hybriden mit Auxinbehandlung und Embryokultur durchgeführt (s. 2.3.1). Weitgehend männlich sterile Pflanzen, d. h. alle F₁-, die BC₁-Pflanze 1, die BC₂-Pflanze 2 und meistens die BC₂-Pflanze 1 wurden dabei nicht kastriert. Blütenstände der Hybriden wurden mit solchen vom Rückkreuzungselter in Zellglasbeuteln (Fa. Baumann Saatzuchtbedarf) isoliert oder Klonteile der Hybriden wurden mit den Bestäuberpflanzen in separaten Kabinen zur Blüte gebracht.

Bei der Auswertung von unkastrierten Pflanzen wurden nur diejenigen Blütchen erfasst, die während der Bestäubung aufgrund ihres Entwicklungsstandes die Anthesis erreichen konnten und somit potenziell befruchtungsfähig waren. Bei der Verwendung der Hybriden als Pollenelter wurde der Samenelter (*L. multiflorum*) kastriert.

Rückkreuzungen der BC₁- und BC₂-Hybriden ohne Auxinbehandlung und Embryokultur erfolgten wie unter 2.3.3 beschrieben.

2.3.3 Kreuzungen und Selbstungen ohne Kastration, Auxinbehandlung und Embryokultur

Bei den *Lolium-Festuca*-Hybriden, gekennzeichnet durch zueinander **homöologe Genome**, wurden Kreuzungen (Pärchenkreuzungen und freie Abblüte) sowie Selbstungen jeweils ohne Kastration, Auxinbehandlung und Embryokultur durchgeführt.

Bei Hybriden von Eltern mit **inhomologen Genomen** geschah dies in gleicher Weise teilweise bei Pärchenkreuzungen (Rückkreuzungen) und freier Abblüte bei der BC₁-Pflanze 1 und den BC₂-Pflanzen 1; 3 und 4.

Die Isolierung der Blütenstände erfolgte bei Pärchenkreuzungen und Selbstungen nach dem Schieben der Blütenstände und vor Anthesisbeginn, bei freier Abblüte hingegen nach Anthesis aber vor der Reife der Karyopsen aufgrund möglichen Kornausfalls. Für Pärchenkreuzungen wurden Blütenstände der gewünschten Eltern, die zur gleichen Zeit blühten, zusammen in einem Beutel isoliert. Im Gewächshaus geschah dies mit Zellglastüten, bei Pflanzen im Freiland aufgrund der Witterungsbeständigkeit mit Pergaminbeuteln (beide Fa. Baumann Saatzuchtbedarf).

2.4 Ermittlung der Fertilität

2.4.1 Männliche Fertilität

Die männliche Fertilität wurde vorrangig bei Hybriden zwischen Eltern mit **inhomologen Genomen** und bei Regeneraten aus Antherenkultur von *Lolium-Festuca*-Hybriden (**homöologe Genome**) erfasst. Als Kriterium für die männliche Fertilität galten die

Dehiscenz der Antheren, die Menge und die KES-Färbbarkeit der Pollenkörner, letztere auch als Kriterium für die Vitalität der Pollenkörner.

Pollenkörner aus reifen, aber ungeöffneten Antheren wurden mit Karminessigsäure (KES) nach der Standard-Färbemethode (DARLINGTON und LA COUR 1962, GERLACH 1969) gefärbt. Die Anzahl deutlich und lückenlos gefärbter Pollenkörner wurde als die maximale Zahl lebensfähiger Pollenkörner angesehen. Der aufwändigere Fluoresceindiaceetat (FDA)-Test nach HESLOP-HARRISON und HESLOP-HARRISON (1970) wurde von OERTEL (1997) mit der KES-Standard-Färbemethode verglichen. Da sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden zeigte, wurde in der vorliegenden Arbeit die KES-Färbung verwendet.

Der Stichprobenumfang betrug ca. 1000 Pollenkörner aus 2 bis 3 Antheren. Bei den Hybriden zwischen Eltern mit **inhomologen Genomen** (s. 3.1) wurden, sofern vorhanden, 6 bis 20 Antheren (ca. 2000 bis 5000 Pollenkörner) verschiedener Klonteile in die Bonitur einbezogen. Bei einigen dieser Hybriden mit sehr stark reduzierter Pollenmenge war es nur möglich, 300 bis 500 Pollenkörner zu erfassen.

2.4.2 Weibliche Fertilität

Zur Ermittlung der weiblichen Fertilität wurden abhängig von Standort und Charakter der Pflanze folgende Methoden angewandt (Übersicht s. Tab. 2):

Methode 1:

Es wurde erfasst, wieviel Karyopsen pro Blütenstand keimfähig waren. Hierzu wurden die Blütenstände frei abgeblühter Pflanzen zerkleinert, in mit Erde gefüllte Töpfe gelegt und 2 cm hoch mit feingesiebter, gedämpfter Komposterde (Wasserdampf 90°C) bedeckt. Die Töpfe befanden sich unter Bedingungen von ca. 24°C und 16 h Licht. Die Auszählung der Sämlinge erfolgte etwa 3 Wochen nach der Aussaat.

Methode 2:

Die Blütchen und Karyopsen pro Blütenstand wurden ausgezählt und der Prozentsatz Blütchen mit Kornansatz errechnet. Ein anschließendes Auskeimen der Karyopsen gab Aufschluss über den Anteil nicht keimfähiger Karyopsen.

Methode 3:

Das Gewicht der Karyopsen von 10 frei abgeblühten und gelegentlich auch von 10 geselbsteten Blütenständen wurde bestimmt. Durch 2 Wiederholungen pro Pflanze sollte die Zufallsstreuung berücksichtigt werden. Um unkontrollierten Ausfall von Karyopsen zu vermeiden, wurden die Blütenstände nach Anthesis in Pergamintüten isoliert (s. 2.3.3). Die Blütenstände wurden nach der Reife geerntet und gedroschen, das Saatgut schließlich gereinigt und gewogen.

Bei den Methoden 1 und 2 wurde sichergestellt, dass ein ausreichendes Angebot an befruchtungsfähigem Pollen vorlag. Methode 3 wurde nur bei Feldpflanzen angewandt, bei denen aufgrund der großen Menge an Pflanzen ein hohes Angebot an kompatiblen, fertilem Pollen gegeben war.

Tabelle 2: Ermittlung der weiblichen Fertilität bei Hybriden verschiedener Kombinationen

Methode zur Fertilitätsermittlung	Pflanzen	Bezug zu
<u>Methode 1:</u> keimfähiger Kornansatz pro Blütenstand	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lolium-Festuca</i>-Hybriden in Töpfen (homöologe Genome) • Regenerate aus Antherenkultur von <i>Lolium-Festuca</i>-Hybriden (homöologe Genome) • Hybriden zwischen Arten mit inhomologen Genomen¹ 	Blütenstand
<u>Methode 2:</u> manuelle Auszählung der Karyopsen pro Blütenstand und Ermittlung der Keimfähigkeit	<ul style="list-style-type: none"> • Hybriden zwischen Arten mit inhomologen Genomen¹ 	Blütchen
<u>Methode 3:</u> Gewicht der Karyopsen von 20 Blütenständen	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lolium-Festuca</i>-Hybriden in Feldkultur (homöologe Genome) 	20 Blütenstände

¹ Die Kreuzung bzw. Abblüte wurde ohne Embryokultur und Phytohormonapplikation durchgeführt.

2.5 Erstellung von Präparaten für cytologische Untersuchungen

Die cytologischen Untersuchungen dienen zur Bestimmung der Chromosomenzahl, der Analyse des meiotischen Paarungsverhaltens und der Analyse der Genomzusammensetzung mittels Genomischer *in situ* Hybridisierung (s. 2.6).

2.5.1 Behandlung von Wurzelspitzen zur Anreicherung von Metaphasestadien

Wurzelspitzen der zu untersuchenden Pflanzen wurden für Mitoseuntersuchungen abgenommen. Eine möglichst hohe Metaphaserate in den Wurzelspitzen ist besonders für eine Untersuchung mittels GISH nötig, da im Laufe der hierzu nötigen Prozedur Verluste an Zellen auftreten können.

Töpfe mit **jungen Pflanzen** (≤ 3 Monate) wurden in einem Kühlraum 48-72 Stunden bei 4°C und Kurztag (8 Stunden Licht, 2.000 Lux) gehalten und anschließend in den

Langtag (16 Stunden Licht, 14.000 Lux) mit Temperaturen von ca. 24°C gebracht. Nach 26 Stunden unter diesen Bedingungen wurden die Wurzelspitzen abgetrennt und sofort in Eiswasser (Wasser bei ca. 0°C) gelegt. Zur Erhöhung der Metaphaserate lagerten in einigen Fällen die Wurzelspitzen noch 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer 4 µM APM-Lösung, bevor sie in Eiswasser gebracht wurden. Das Eiswasser diente zur stärkeren Kondensation der Chromosomen und reduzierte ihr Zusammenkleben (HOUBEN 1993).

Um von **alten Pflanzen** (> 3 Monate) Wurzelspitzen mit hohem Metaphaseindex zu erhalten, wurden einzelne Triebe separiert. Sie wurden insgesamt auf ca. 10 cm Sprosslänge, 2 cm Blattlänge und 1 cm Wurzellänge gekürzt. Die Triebe wurden belüftet in Behältern mit Wasser kultiviert, bis sich neue Wurzeln von 1 bis 3 cm Länge gebildet hatten. Dann erfolgte der Transfer der Behälter in den Kühlraum und es wurde im Folgenden wie oben für junge Pflanzen beschrieben verfahren.

Zur Abnahme von **Keimwurzeln** wurden Karyopsen in Schalen mit feuchtem Filterpapier ausgelegt. Nach einer Kältebehandlung (wie bei Töpfen mit jungen Pflanzen, s. o.) wurden die Schalen bei 24°C in Dunkelheit inkubiert. Ansonsten wurden die Schalen mit Keimwurzeln wie die Töpfe mit jungen Pflanzen und die Wasserbehälter mit separierten Trieben alter Pflanzen behandelt.

Die Weiterbehandlung der Wurzelspitzen erfolgte wie unter 2.5.2 beschrieben.

2.5.2 Quetschpräparation von Wurzelspitzen und Antheren

Nach 24 Stunden in Eiswasser erfolgte die Fixierung von Wurzelspitzen in einem Ethanol-Essigsäure Gemisch (Verhältnis 3:1; v/v) für mindestens 24 Stunden. Nach dem Fixieren wurde das Wurzelspitzen Gewebe meistens durch eine Behandlung mit Zellulase (2 %; „Onozuka R-10“ aus *Trichoderma viride*; Serva Feinbiochemica) und Pektinase (1 %; Polygalacturonase aus *Rhizopus spec.*; Sigma) mazeriert (nach LEITCH et al. 1994). Die Enzyme wurden hierzu unter 30minütigem Rühren in Citratpuffer (4 mM Citronensäure und 6 mM Natriumcitrat; pH von 4,7) gelöst, die Lösung anschließend filtriert und aliquotiert. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -20°C, die für kurze Zeit bei 4°C. Zur Mazeration wurden die Wurzelspitzen zweimal in Citratpuffer gespült, dann leicht abgetrocknet und anschließend in der Enzymlösung bei 26°C 40-60 min inkubiert, bis sie sehr weich waren, die Zellen sich aber noch nicht aus dem Zellverband lösten. Bei Raumtemperatur wurde die Enzymlösung abgesaugt und zur Auslösung eines osmotischen Schocks A. dest. zugegeben. Diese Behandlung führte in den meisten Fällen bereits zur Trennung der eigentlichen Wurzelspitze mit dem Meristem vom Rest der Wurzel. Nach einem kurzen Spülen in 45%iger Essigsäure wurde die Wurzelspitze zwischen Deckglas und Objektträger gequetscht.

Alternativ wurde in einigen Fällen auf eine Behandlung mit Enzymen verzichtet. In diesem Fall wurde das Ethanol-Essigsäure Gemisch vor dem Quetschen abgegossen

und die Wurzelspitzen mindestens 5 min in 45%iger Essigsäure belassen. Die Wurzelspitzen erhitzte man kurz über der Flamme eines Methanolbrenners, um sie leichter quetschbar zu machen und quetschte sie unmittelbar danach.

Zur Beobachtung von Meiosen und Erstellung von Meiosepräparaten wurden Antheren gequetscht und lichtmikroskopisch (s. u.) untersucht. Befand sich eine der drei Antheren eines Blütchens im Stadium der Meiose, wurden die beiden anderen mindestens 24 h im Ethanol-Essigsäure Gemisch (3:1; v/v) fixiert. Anschließend wurden die Antheren in 45%iger Essigsäure über einer Flamme kurz erhitzt und dann gequetscht.

Die Präparate wurden am Lichtmikroskop (Zeiss Axioskop) im Phasenkontrast betrachtet. Die Aufnahme von Fotos erfolgte – sofern erforderlich – mit einer Mikroskopkamera MC80 mit Hilfe einer Steuereinheit für automatische Belichtung auf einem Schwarzweiss-Film (AGFA APX 25).

Nach 2 Monaten wurden Wurzeln oder Antheren aus dem Ethanol-Essigsäure Gemisch in 70%igen Alkohol überführt oder verworfen.

2.6 Genomische *in situ* Hybridisierung (GISH) zur Analyse der Genomzusammensetzung

2.6.1 Herstellung der Proben- und Blocking- DNS

Die Isolierung genomischer DNS der Ausgangseltern erfolgte mit dem DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) aus jungen, gesunden Blättern und jungen Blütenständen, die sich noch innerhalb der Blattscheide befanden.

Als Proben-DNS wurde meist die DNS des väterlichen Elters bzw. bei Rückkreuzungsnachkommen des Elters mit erwartungsgemäß weniger Anteil am Hybridgenom verwendet (*D. glomerata*, *Cyn. cristatus*). Bei *Lolium-Festuca*-Hybriden wurde GISH mit Proben-DNS sowohl von *Lolium* als auch von *Festuca* durchgeführt. Genomische DNS der Ausgangseltern zur Verwendung als Proben-DNS wurde mittels Nick-Translation (Nick-Translation-Kit, Boehringer Mannheim) mit Biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim) markiert (LANGER et al. 1981).

Zur Vorbereitung der Blocking-DNS wurde die in Elutionspuffer gelöste isolierte genomische DNS 2x 10 s im Dauerbetrieb bei 60 W Leistung unter Eiskühlung mit Ultraschall (Sonopuls HD60, mit Titanspitze, Bandelin) fragmentiert, um eine für die Hybridisierung optimale Länge von 400-1000 bp zu erhalten. Zwischen den beiden 10sekündigen Behandlungen wurde eine Pause von ebenfalls 10 s eingehalten. Zur Überprüfung wurde ein Teil der DNS auf ein 1,3%iges Agarosegel (Ultra Pure LMP Agarose; Gibco BRL) aufgetragen und bei einer Spannung von 90 V elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 9).

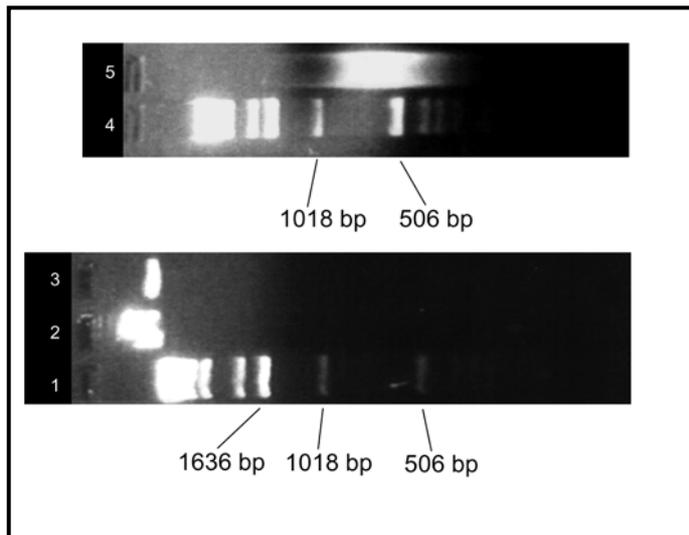


Abb. 9: Fragmentgröße isolierter, unbehandelter genomischer DNS (Tasche 2+3) und mittels Ultraschall behandelter genomischer DNS (Tasche 5), jeweils in Vergleich zu einer Referenz-DNS (Tasche 1+4; 1 kbp Ladder, Gibco BRL)

2.6.2 Vorbereitung der Präparate

Die Vorbereitung der Präparate (2.6.2), Vorbereitung der DNS-Probe (2.6.3) sowie *in situ* Hybridisierung und Signaldetektion (2.6.4) wurden in Anlehnung an FUCHS und SCHUBERT (1995), SCHUBERT et al. (1998) sowie SCHWARZACHER und HESLOP-HARRISON (2000) durchgeführt.

Quetschpräparate sowohl von Wurzelspitzen (Mitosen) als auch Antheren (Meiosen) fanden Verwendung. Nach einer kurzen mikroskopischen Analyse wurden die Präparate mit der Deckglassseite auf Trockeneis ($T_m\text{CO}_2 = -78,5^\circ\text{C}$) gelegt. Nach 5-10 min wurde das Deckglas mit Hilfe einer Rasierklinge abgesprengt. Die Objektträger wurden für 7 min in 99,8%igen Ethanol getaucht und dann ca. 1 h an der Luft getrocknet. Die Präparate wurden in 99,5%igem Glycerin bei 4°C aufbewahrt.

Alle Waschschritte der Präparate erfolgten in Glasfärbekästen und bei Raumtemperatur sofern nichts Anderes vermerkt ist. Die Objektträger wurden nach Entnahme aus dem Glycerin fünfmal für 5 min in 2x SSC (s. 7.2.5) gewaschen. Danach erfolgte eine 5minütige Behandlung in 45%iger Essigsäure bei 45°C . Nach zweimaligem erneutem Waschen für je 5 min in 2x SSC wurden die Präparate durch eine aufsteigende Ethanolreihe (zweimal 70 %, je einmal 90 % und 96 %) dehydriert und 1-2 h luftgetrocknet. Jedes Präparat wurde dann mit 20 μl RNase (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Boehringer Mannheim) 20 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubiert und danach dreimal 5 min und einmal 20 min mit 2x SSC gespült. Es folgte die Fixierung der Präparate durch 10minütiges Tauchen in eine 4%ige Paraformaldehydlösung (in 2x SSC). Nach dreimaligem Spülen für 5 min in 2x SSC wurden die Präparate durch 2minütiges Tauchen bei 68°C in 70%igem Formamid (in 2x SSC) denaturiert. Anschließend wurden die Präparate durch eine aufsteigende Ethanolreihe (s. o.) bei -20°C dehydriert und 1-2 h luftgetrocknet.

2.6.3 Vorbereitung der DNS-Probe

50 ng der mittels Nick Translation markierten DNS einer Elternart wurden als Probe pro Objektträger aufgetragen. Zu der Proben-DNS wurden 10 µg tRNA isoliert aus *Escherichia coli* (Boehringer Mannheim) sowie Blocking-DNS des anderen Elter zur Reduzierung unspezifischer Markierung und von Hintergrundsignalen aufgetragen. Die Menge an Blocking DNS betrug bei Hybriden zwischen *L. multiflorum* × *D. glomerata*, *F. pratensis* × *D. glomerata* und *F. arundinacea* × *D. glomerata* (**inhomologe Genome**) 1,25 µg (Verhältnis Proben zu Blocking DNS 1:25) und bei *Lolium-Festuca*-Hybriden 3 µg (Verhältnis Proben zu Blocking DNS 1:60). Bei den Hybriden zwischen *L. boucheanum*, *L. multiflorum* und *L. perenne* × *F. pratensis*, bei denen die Eltern durch den Besitz **homöologer Genome** gekennzeichnet sind, war ein höherer Anteil an Blocking-DNS nötig. Dadurch wurde gewährleistet, dass DNS-Sequenzen, die beiden Eltern gemein sind, weitgehend mit unmarkierter DNS abgedeckt wurden.

Bei der Hybride zwischen *L. multiflorum* × *Cyn. cristatus* (**inhomologe Genome**) wurde GISH mit beiden Mengenverhältnissen an DNS durchgeführt (1:25 und 1:60).

Durch die Zugabe von 1/20 Volumen 3M Natriumacetatlösung ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH=6,0) und dem 2,5fachen Volumen 99,8%igem Ethanol (T=-20°C) wurde die Proben- und Blocking-DNS sowie die tRNA zusammen in einem Reaktionsgefäß 30 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gefällt. Nach 20minütigem Zentrifugieren bei 22.000 rpm und 4°C (Biofuge 28 RS, Rotor 3740, Heraeus) erfolgte das Waschen des Pellets mit 70%igem Ethanol (200 µl; T=-20°C). Nach erneutem Zentrifugieren unter gleichen Bedingungen und Trocknen des Pellets für 15 min in einer Vakuumzentrifuge bei mittlerer Heizleistung (SpeedVac, Savant) wurde die DNS-Probe zuerst in 6 µl deionisiertem Formamid gelöst und dann mit 6 µl 4x SSC mit 20 % Dextransulfat gemischt. Anschließend wurde die DNS 10 min bei 95°C denaturiert und zur Vermeidung einer Rehybridisierung wurden die Proben sofort für 10 min in Eis gestellt. Danach wurde die DNS-Probe auf die vorbereiteten Objektträger gegeben (s. 2.6.4).

2.6.4 *In situ* Hybridisierung und Signaldetektion

Nach dem Trocknen der Präparate wurde die entsprechende Proben-DNS (s. 2.6.2 und 2.6.3) auf jedes Präparat gegeben, mit Hilfe eines Deckglases abgedichtet und Präparat und Proben-DNS zusammen 3 min auf einer Heizplatte bei 80°C denaturiert. Anschließend erfolgte über Nacht (mindestens 6 h) die Hybridisierung in einer Feuchtekammer bei 37°C. Danach wurde dreimal 5 min bei 42°C in einer Lösung aus 50 % Formamid in 2x SSC gewaschen und dabei wurden die Deckgläser entfernt. Anschließend wurde unter hoher Stringenz je 5 min bei 60°C in 1x SSC, 0,2x SSC und zuletzt 0,1x SSC gewaschen.

Zur Vermeidung unspezifischer Hybridisierung des der Detektion dienenden FITC - Streptavidin wurde eine Blockierung durch Zugabe von je 20 µl Blockinglösung (3 % Rinderserumalbumin und 0,1 % Tween 20 in 4x SSC) pro Objektträger durchgeführt. Das 30minütige Blockieren geschah wie die darauf folgende Detektion und Verstärkung in der Feuchtekammer bei 37°C. FITC-Streptavidin (Vector Laboratories) zur Detektion und biotinyliertes Anti-Streptavidin (Vector Laboratories) zur Signalverstärkung wurden mit Detektionspuffer (1 % Rinderserumalbumin; 0,1 % Tween 20 in 4x SSC) auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Nach der Inkubation (50 min) mit 20 µl FITC-Streptavidin und Inkubation (30 min) mit 20 µl biotinyliertem Anti-Streptavidin zur einmaligen Verstärkung erfolgte zur Fluoreszenzmarkierung des biotinyliertem Anti-Streptavidin eine erneute Detektion (30 min) mit 20 µl FITC-Streptavidin. Angefangen mit der ersten Inkubation mit FITC-Streptavidin lagen nach den einzelnen Inkubationen Waschschrte, die jeweils dreimaliges Spülen für 5 min unter leichtem Schütteln bei 42°C im Schüttelwasserbad umfassten.

Zur Mikroskopie wurde DNS unspezifisch gegengefärbt. Hierzu diente eine Anti-Bleichlösung (Vectashield, Vector Laboratories) mit je 1 µg/ml Propidiumjodid (PI) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Gegenfärbung.

2.6.5 Dokumentation der Präparate

Die Betrachtung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Axioplan 2). Teilweise wurden Fotos auf Kodak Elite Chrome 400 Film aufgenommen, meist aber Bilder mit einer gekühlten CCD-Kamera (Photometrics oder Visitron Systems) digital dokumentiert. Die Aufnahme der Bilder wurde mit Hilfe der Programme „IPLab Spektrum 2.5.5“ (am Power Macintosh) und „SPOT 3.0“ (am IBM PC) durchgeführt. Die Bearbeitung und Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe der Software „Adobe Photoshop 5.0“. Es wurden nur Funktionen verwendet, die alle Bildpunkte der Aufnahme in gleichem Maße betrafen.

2.7 Antherenkultur

2.7.1 Durchführung

Die Antherenkultur, vor allem die Zusammensetzung der Medien betreffend, wurde in Anlehnung an POSSELT und RAPP (1997) und POSSELT (persönliche Mitteilung) durchgeführt. Von den ausgewählten Pflanzen wurden Blütenstände mit Antheren selektiert, deren Pollenkörner sich etwa im späten Einzell-Stadium befanden. Die Blütenstände wurden zum Schutz vor Austrocknung in Aluminiumfolie eingeschlagen und bei 4°C einer Kältevorbehandlung von 0 bis zu 58 Tagen, meistens aber von 0 bis 31 Tagen unterzogen (s. Tab. 20). Unter sterilen Bedingungen an der Laminarbox wurden sie zur Desinfektion mit einer Lösung von 250 ppm Tween 20 in 70%igem vergälltem Ethanol besprüht. Nach ca. 10 bis 20 min war der Ethanol weitgehend

verdunstet, aber die Blütenstände noch nicht ausgetrocknet. Meist 12, manchmal bis zu 20 Antheren wurden dann auf 2,75 ml Induktionsmedium in Kunststoffpetrischalen mit 3,5 cm Durchmesser und 1 cm Höhe aufgesetzt. Die Antheren wurden auf die Oberfläche des Mediums aufgebracht und dabei leicht ins Medium gedrückt, um einen engen Kontakt zwischen Anthere und Medium sicherzustellen. Das Induktionsmedium enthielt 90 g/l Maltose und 10 g/l Kartoffelpüree (Pfanni) als Nährstoff sowie als Wachstumsregler 0,15 µg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und 0,05 µg/l Kinetin (s. 7.2.2). Zur Induktion der Kallusbildung wurden die Antheren im Dunkeln bei 26°C inkubiert.

Kalli mit mindestens 2 mm Durchmesser wurden in der Laminarbox in Glasröhrchen (8 cm Länge, ca. 34 ml Rauminhalt) mit ca. 10 ml Regenerationsmedium überführt. Die Regeneration erfolgte im Klimaschrank mit Dauerlicht (5.000 Lux) bei 26°C. Das Regenerationsmedium enthielt als Wachstumsregler 0,05 µg/l Indolyl-Essigsäure (IAA) und 0,02 µg/l Naphtylessigsäure (NAA) sowie 20 g/l Saccharose und 1 g/l Aktivkohle (Details s. 7.2.3). Grüne Regenerate wurden nach Erreichen des 3- bis 5- Blatt-Stadiums pikiert und wie aus Embryokultur erhaltene Pflanzen behandelt (s. 2.3.1.2). Die Bilddokumentation erfolgte mit Hilfe eines Stereomikroskops mit der Kamera MC80 (Zeiss Jena) auf Kunstlichtfilm Kodak Ektachrome 64T.

Bei Betrachtung einzelner *Lolium-Festuca*-Donorpflanzen (s. 3.2) werden diese Pflanzen in Zusammenhang mit der Antherenkultur in der vorliegenden Arbeit mit fortlaufenden Nummern als Pflanze 1 bis Pflanze 18 bezeichnet. Die Ausgangspflanze der 16 verwendeten Antherenkulturregenerate der Sorte 'Paulita' wird als 'Paulita'-Pflanze 1 bezeichnet.

2.7.2 Bestimmung des Ploidiegrades der Regenerate

Die Ploidiestufe der Regenerate von *Lolium-Festuca*-Hybriden (**homöologe Genome**) wurde mittels Durchfluscytometrie an Blattproben und teilweise auch lichtmikroskopisch an Wurzelspitzenzellen bestimmt (s. 2.5). Zur Messung diente ein FAC-Star Plus Durchfluscytometer der Firma Becton-Dickinson. Zur Präparation für die Durchfluscytometrie wurde ein Blatt jeder Pflanze mit einer Messingbürste in 2 ml Puffer leicht gebürstet. Der Puffer (s. 7.2.4) stabilisierte die aufgeschlossenen Zellkerne und enthielt DAPI (1 µg/ml) zum Färben der DNS. Die Proben wurden bis zur Messung in Eis aufbewahrt. Die Messung endete nach 3.000 -10.000 erfassten Zellkernen, abhängig davon wie hoch die Qualität des Histogramms war. Proben mit diploidem und tetraploidem *L. multiflorum* sowie einer triploiden F₁-Hybride zwischen *L. multiflorum* (2x) × *F. pratensis* (4x) dienten als externe Kontrolle.

2.8 Statistische Berechnungen

Die Berechnung der Konfidenzintervalle in Zusammenhang mit der Embryokultur (s. 3.1: Abb. 10a und 10b) erfolgte nach FAGAN (1996) mittels eines Quickbasic-Computerprogramms, das die exakten Konfidenzintervalle für binomial verteilte Werte berechnet. Die Vertrauenswahrscheinlichkeit beträgt dabei 95 %, wobei das Konfidenzintervall zweiseitig berechnet wurde (mit $\alpha = 2,5 \%$ nach jeder Seite, d. h. zur oberen und unteren Vertrauensgrenze jeweils 2,5 %). Für die Werte 0 % und 100 % wurde das Konfidenzintervall einseitig berechnet ($\alpha = 5 \%$ nur zur oberen bzw. nur zur unteren Vertrauensgrenze).

Bei der Berechnung der Konfidenzintervalle im Rahmen der Antherenkultur von *Lolium-Festuca*-Hybriden (s. 3.2: Abb. 45, 46 und 57) wurde für Zählergrößen bis 10 (Anzahl Kalli bzw. Anzahl regenerierter Pflanzen) ebenfalls so verfahren. Hier kann von einer Binomialverteilung ausgegangen werden.

Bei höheren Zählerwerten (> 10), die oft als ein Resultat einer hohen Antherenkultureignung der Donorpflanzen angesehen werden können, wurde das Konfidenzintervall nach POLLARD (1977) für Werte, die der Poisson-Verteilung folgen, mit Hilfe eines Quickbasic-Computerprogramms berechnet. Die Vertrauenswahrscheinlichkeit beträgt hierbei wie bei der Berechnung für binomial-verteilte Werte 95 % und das Konfidenzintervall wurde zweiseitig berechnet. Die Berechnung für Poisson-verteilte Werte war hier erforderlich, weil einzelne Antheren bei einigen für die Antherenkultur geeigneten Genotypen z. T. mehrere Kalli bildeten und auch die Möglichkeit gegeben war, dass mehr als eine Pflanze von einem Kallus regeneriert wurde. Der verwendete Algorithmus erreicht außerdem nur bei Zählerwerten über 10 eine zufriedenstellende Genauigkeit.

3 Ergebnisse

3.1 Kreuzungen von Arten mit inhomologen Genomen

3.1.1 Erfolg der Kreuzungskombinationen

In nahezu allen Kreuzungskombinationen wurden Embryonen erhalten (s. Tab. 3). Als Embryofrequenz wird die Ausbeute an Embryonen (%) im Verhältnis zu den kastrierten und bestäubten Blütchen bezeichnet. Ausschließlich Embryonen, die mindestens das globulare Stadium erreicht hatten (s. Abb. 8), besaßen die erforderliche Größe, um als Embryonen erkannt und gezählt zu werden.

Lebensfähige Hybriden konnten nur in einigen Kombinationen erzeugt werden (s. Tab. 3). Oft starben erzeugte Pflanzen, noch bevor sie in Erde pikiert werden konnten (s. Tab. 3: Differenz zwischen den beiden Zahlen in der letzten Spalte).

Die Embryofrequenzen der Kombinationen mit und ohne erzeugte Hybriden (Hybridcharakter durch Analyse bestätigt) zeigten keine deutlichen Abweichungen (s. Tab. 3 und Abb. 10a), d. h. die präzygotischen Kreuzungsbarrieren waren insgesamt betrachtet etwa gleich stark. Die Embryofrequenzen mit ihren Konfidenzintervallen bei einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95 % für die Kreuzungen zwischen Arten mit inhomologen Genomen zeigt Abb. 10a. Die geringe Embryofrequenz von < 1% bis 2,5 % ist auf präzygotische Kreuzungsbarrieren zurückzuführen. Deutliche Unterschiede in der Ausbeute an Hybriden zwischen den Kreuzungskombinationen (s. Abb. 10b), sind auf verschieden starke postzygotische Kreuzungsbarrieren (Abortion der erhaltenen Embryonen und der jungen Pflanzen) zurückzuführen.

Als Kontrolle wurden 617 Blütchen von 7 *L. multiflorum*-Pflanzen kastriert, mit Auxin behandelt und mit Pollen von *L. multiflorum* bestäubt. Der Kornansatz betrug 45,4 % ($\pm 4,0$ % bei 95 % Vertrauenswahrscheinlichkeit). Stichproben bestätigten, dass nahezu jede Karyopse einen Embryo enthielt (hochgerechnete Embryofrequenz ca. 43 %; s. Tab. 3). Bei der Kontrolle mit arteigenem Pollen entwickelte also ungefähr etwas weniger als die Hälfte der Blütchen Embryonen. (s. Tab. 3).

Als Vergleich für die Kreuzung zweier Eltern mit zueinander homöologen Genomen wurden 257 Blütchen von zwei *L. multiflorum*-Pflanzen (4x) kastriert, mit Pollen von *F. pratensis* (4x) bestäubt und mit Auxin behandelt (s. Tab. 3). Die Embryofrequenz betrug 10,1 % (bei 95 % Vertrauenswahrscheinlichkeit das Konfidenzintervall von 6,7 % bis 14,5 %).

Tabelle 3: Embryofrequenz und Anzahl der Hybriden bei Kreuzungen von Arten mit inhomologen Genomen

Samenelter (Ploidie) × Pollenelter (Ploidie)	Anzahl Samen- eltern	Anzahl Blütchen	Embryo- frequenz		Anzahl Hybriden ¹
			n	[%]	
<i>F. pratensis</i> (4x) × <i>Arrhenatherum elatius</i> (4x)	1	335	0	0	(-) -
<i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>Arrhenatherum elatius</i> (4x)	12	1825	27	1,48	(0) 0
<i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>Cynosurus cristatus</i> (2x)	8	1587	4	0,25	(2) 1
<i>F. pratensis</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	28	3877	63	1,62	(3) 1
<i>L. multiflorum</i> (2x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	13	1777	18	1,01	(2) 2
<i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	118	21960	222	1,01	(11) 2
<i>L. perenne</i> (2x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	1	70	0	0	(-) -
<i>L. perenne</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	7	779	17	2,18	(0) 0
[<i>L. m./p.</i> × <i>F. prat.</i>] ² (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	12	1693	5	0,30	(3) 3
<i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>Holcus lanatus</i> (2x)	1	258	6	2,33	(0) 0
<i>F. pratensis</i> (4x) × <i>Phleum pratense</i> (2x/6x)	2	290	6	2,07	(0) 0
<i>L. multiflorum</i> (2x) × <i>Phleum pratense</i> (2x)	3	454	6	1,32	(0) 0
<i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>Phleum pratense</i> (6x)	16	3309	50	1,51	(1) 0
<i>L. perenne</i> (4x) × <i>Phleum pratense</i> (6x)	3	351	7	1,99	(0) 0
[<i>L. m./p.</i> × <i>F. prat.</i>] ² (4x) × <i>Phleum pratense</i> (2x/6x)	19	3438	16	0,47	(0) 0
Kontrolle	7	617	ca.	ca.	(-) -
<i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>L. multiflorum</i> (4x)			265	43	
<i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>F. pratensis</i> (4x)	2	257	26	10,1	nicht erfasst

¹ Die Zahl in Klammern gibt alle erzeugten Pflanzen an (ab 1-Blatt-Stadium), die möglicherweise Hybriden waren. Die Zahl hinter der Klammer bezieht sich auf Pflanzen, die das Pikieren in Erde überlebten und deren Hybridcharakter eindeutig festgestellt wurde. Lebensfähige Pflanzen, die keinen Hybridcharakter aufwiesen (z. B. durch Kontamination mit arteigenem Pollen entstanden), sind in keine der beiden Angaben mit einbezogen.

² Verwendung als Sameneltern fanden Hybriden der *Lolium-Festuca*-Kombinationen 1 bis 4 (s. 2.1.3; *F. pratensis* × *L. perenne* / *L. multiflorum*)

Abb. 10a: Embryofrequenzen mit ihren Konfidenzintervallen ($\alpha = 0,05$) bei Kreuzungen von Arten mit inhomologen Genomen

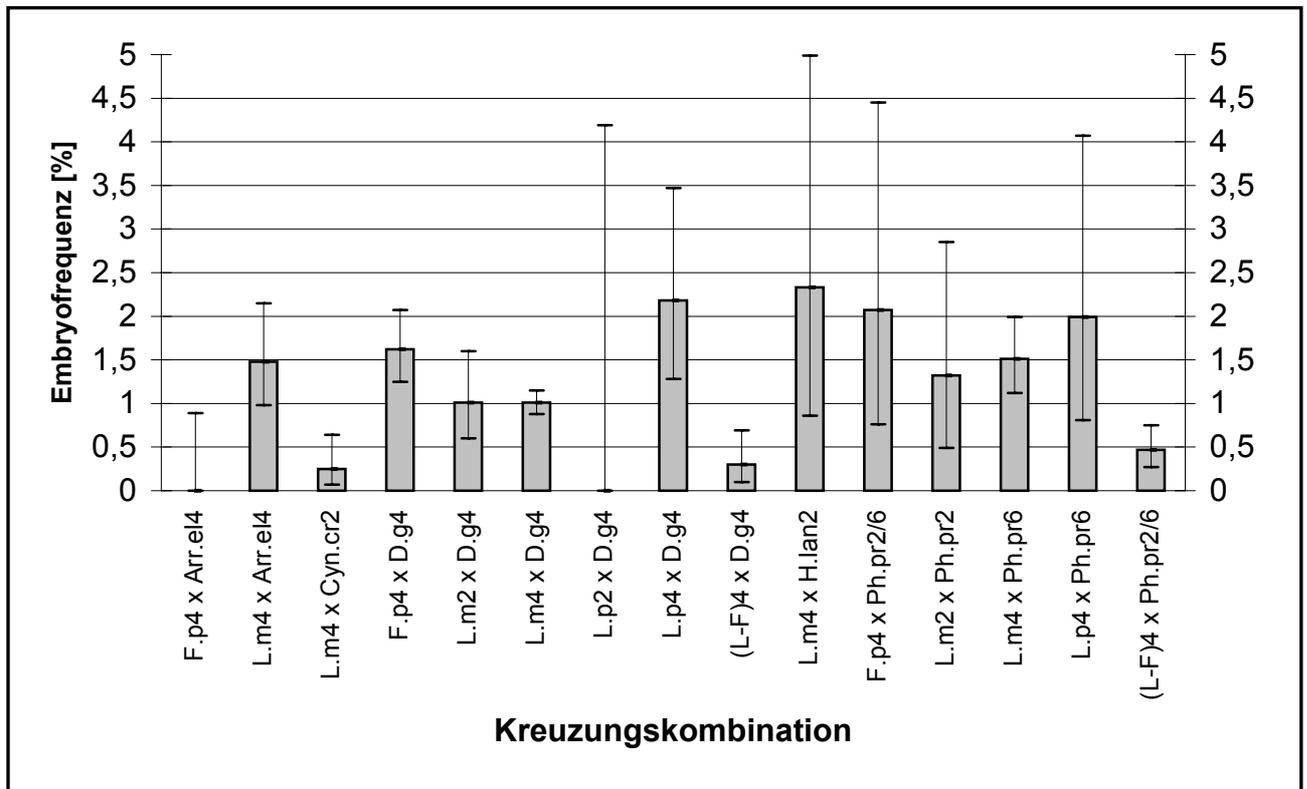
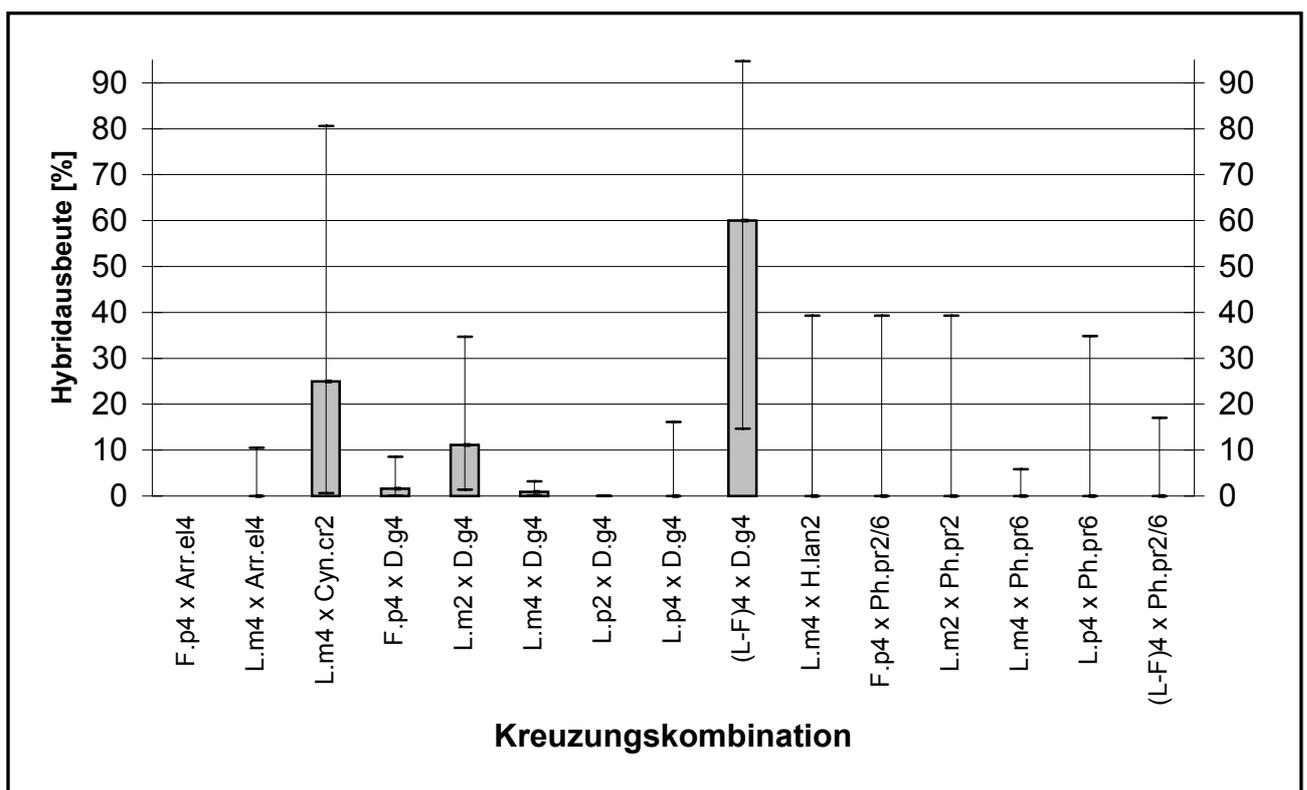


Abb. 10b: Ausbeute an Hybriden mit den zugehörigen Konfidenzintervallen ($\alpha = 0,05$) bei Kreuzungen von Arten mit inhomologen Genomen, jeweils bezogen auf die Anzahl produzierter Embryonen



Zwei der drei produzierten 3-Weg-Hybriden stammten von Sameneltern der *Lolium-Festuca*-Kombination 3 [s. 2.1.3: Nachkommen von *F. pratensis* (4x) × *L. multiflorum* (4x)] und eine von einem Samenelter der Kombination 1 [s. 2.1.3: Nachkommen von *L. multiflorum* (2x) × *F. pratensis* (4x)], jeweils bestäubt mit *D. glomerata* (Übersicht s. Tab. 4). Die Embryofrequenz (s. Tab. 3 und s. Abb. 10a) war mit 0,30 % gering (starke präzygotische Barrieren), doch ist die Ausbeute mit 3 Hybriden aus 5 Embryonen (60 %) im Vergleich zu anderen Kombinationen, wie z. B. *F. pratensis* (4x) × *D. glomerata* (4x), *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) oder *L. multiflorum* (4x) × *Ph. pratense* (6x), bei 95 % Vertrauenswahrscheinlichkeit signifikant höher (s. Abb. 10b) und lässt auf schwächere postzygotische Barrieren schließen. Aus Kreuzungen von Sameneltern der Kombinationen 2 und 4 (s. 2.1.3: *F. pratensis* × *L. perenne* und *F. pratensis* × *L. boucheanum*) mit *D. glomerata* gingen keine Hybriden hervor.

Die Ploidiestufe der Elternarten hatte keine erkennbare Auswirkung auf die Embryofrequenz (s. Tab. 3 und Abb. 10a). In Kreuzungen zwischen diploidem *L. multiflorum* mit *D. glomerata* (immer tetraploid) wie auch in Kreuzungen zwischen tetraploidem *L. multiflorum* mit *D. glomerata* betrug die Embryofrequenz ca. 1 %; in beiden Kombinationen wurden zwei Hybriden erhalten. Vergleicht man die Kreuzungen zwischen *L. multiflorum* (2x) × *Ph. pratense* (2x) und *L. multiflorum* (4x) × *Ph. pratense* (6x), so war die Embryofrequenz bei beiden trotz der unterschiedlichen Ploidiestufen in etwa gleich. In letzterer Kreuzung wurde eine Albinopflanze erhalten, die möglicherweise Hybridcharakter besaß. Sie abortierte aber bereits im 3-Blatt-Stadium, bevor sie näher untersucht werden konnte.

Ansonsten wurden in Kreuzungen von *L. multiflorum*, *L. perenne*, *F. pratensis* und den *Lolium-Festuca*-Hybriden als Samenelter mit *Phleum pratense* (2x/6x) als Pollenelter wie auch bei den Kreuzungskombinationen *L. multiflorum* (4x) × *Arrh. elatius* (4x), *L. multiflorum* (4x) × *Holcus lanatus* (2x) und *L. perenne* (2x/4x) × *D. glomerata* keine Hybriden erhalten. Die Embryofrequenz war ähnlich hoch wie bei den Kreuzungskombinationen, in denen Hybriden erhalten wurden (s. Tab. 3 und Abb. 10a), doch abortierte die Entwicklung der Embryonen aufgrund postzygotischer Kreuzungsbarrieren, abgesehen von der einen Albinopflanze (s. o.), immer zwischen dem globularen und reifen Stadium der Embryoentwicklung.

In der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *Cyn. cristatus* (2x) war die Embryofrequenz gering (0,25 %, d. h. 4 Embryonen), was auf starke präzygotische Barrieren hindeutet (s. Abb. 10a). Es wurde eine Hybride erhalten, über die Stärke der postzygotischen Barrieren läßt sich aber aufgrund eines sehr großen Konfidenzintervalls (s. Abb. 10b) keine Aussage treffen.

3.1.2 Charakterisierung der F₁-Hybriden aus Kreuzungen von Arten mit inhomologen Genomen

3.1.2.1 Abstammung, Phänotyp und Genomzusammensetzung

Verschiedene Sorten oder Ökotypen wurden für die Kreuzungen verwendet. Hinsichtlich der Kreuzbarkeit (Embryofrequenz sowie Anzahl, Vitalität und Fertilität der F₁-Hybriden) ließen sich bei den Elternarten keine Sorten oder Ökotypen mit besonderer Eignung feststellen (s. Tab. 4 und Tab. 5). Aus den Kreuzungen *L. multiflorum* (2x, 4x) × *D. glomerata* (4x) gingen 6 F₁-Hybriden hervor, die meist von Elternpflanzen unterschiedlicher Herkunft abstammen (s. Tab. 4 und 7.1.1 Tab. 24).

Die F₁-Hybriden zeigten die zu erwartende Chromosomenzahl bzw. Genomzusammensetzung (s. Tab. 4). Eine Ausnahme bildete die 3-Weg-Hybride F₁-Pflanze 11, die der Analyse zu Folge wahrscheinlich 17 Chromosomen (± 1 Chromosom) besitzt. 28 Chromosomen wären hier zu erwarten gewesen. Die Markierung der *Cyn. cristatus* Chromosomen mit FITC-markierter genomischer DNS dieser Art (GISH) verlief bei der F₁-Hybride zwischen *L. multiflorum* (4x) × *Cynosurus cristatus* (2x) wiederholt erfolglos (s. Abb. 25).

Der Phänotyp der Hybriden entspricht den Genomanteilen der Elternarten (s. Tab. 4 und Abb. 11 bis Abb. 18). Die Hybriden einer Kombination unterschieden sich trotzdem aber meist sehr deutlich im Habitus (Vergleiche Abb. 11 mit Abb. 12 und Abb. 14 mit Abb. 15).

Darstellungen der Genomzusammensetzung (nach GISH) sind als Abb. 19 bis Abb. 25 zu finden.

Tabelle 4: Abstammung, Phänotyp und Genomzusammensetzung der F₁-Hybriden aus intergenerischen Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologen Genomen

Kombination und Pflanze	Sameneltern	Bestäuber	Phänotyp	Chrom.zahl bzw. Genomzus.setzg. ¹
<u>L. multiflorum (2x) × D. glomerata (4x)</u>				
F ₁ -Pflanze 1	‘Axis’	mehrere Sorten und Ökotypen	intermediär; ähnlicher <i>D. g.</i>	7 Lm + 14 Dg
F ₁ -Pflanze 2	‘Turilo’	‘Currie’ und ‘Baraula’	intermediär; ähnlicher <i>D. g.</i>	nicht erfasst
<u>L. multiflorum (4x) × D. glomerata (4x)</u>				
F ₁ -Pflanze 3	‘Lipo’	mehrere Sorten und Ökotypen	intermediär	14 Lm + ca. 14 Dg
F ₁ -Pflanze 4	‘Manito’	mehrere Sorten und Ökotypen	intermediär	14 Lm + 14 Dg
F ₁ -Pflanze 5 *	————	s. 7.1.1, Tab. 24	————	14 Lm + 14 Dg
F ₁ -Pflanze 6 *	————	s. 7.1.1, Tab. 24	————	14 Lm + 14 Dg
<u>F. pratensis (2x) × D. glomerata (4x)</u>				
F ₁ -Pflanze 7 *	—— s. 7.1.1, Tab. 24 ——		intermediär; ähnlicher <i>D. g.</i>	s. 7.1.1, Tab. 24
<u>F. pratensis (4x) × D. glomerata (4x)</u>				
F ₁ -Pflanze 8	Zuchtstamm Steinach	mehrere Sorten und Ökotypen	intermediär	nicht erfasst
F ₁ -Pflanze 9 *	—— s. 7.1.1, Tab. 24 ——		intermediär	14 Fp + 14 Dg
F ₁ -Pflanze 10 *	—— s. 7.1.1, Tab. 24 ——		intermediär	14 Fp + 14 Dg
<u>3-Weg-Hybriden [L. m. × F. p.], [F. p. × L. m.] (4x) × D. glomerata (4x)</u>				
F ₁ -Pflanze 11	F ₃ -Hybride ² <i>F.p. × L. m.</i>	‘Reda’	intermediär	wahrscheinlich 17 Chromosomen
F ₁ -Pflanze 12	F ₃ -Hybride ² <i>F.p. × L. m.</i>	‘Lidaglo’ und ‘Motycka’	intermediär	nicht erfasst
F ₁ -Pflanze 13	F _{>5} -Hybride ² <i>L.m. × F. p.</i>	‘Reda’	intermediär	nicht erfasst
<u>F. arundinacea (6x) × D. glomerata (4x)</u>				
F ₁ -Pflanze 14 °	————	s. 7.1.1, Tab. 24	————	ca. 21 Fa + 14 Dg
<u>L. multiflorum (4x) × Cynosurus cristatus (2x)</u>				
F ₁ -Pflanze 15	‘Lipo’	Akzession Genbank	intermediär	21 Chromosomen

¹ Chromosomenzahl bzw. Genomzusammensetzung: 2n-Chromosomenzahl bzw. Anzahl der Chromosomen von den jeweiligen Elternarten: Lm = *L. multiflorum*, Dg = *D. glomerata*, Fp = *F. pratensis*, Fa = *F. arundinacea*

² Verwendung von Pflanzen, die aus 2 Generationen (F₃-) bzw. mehr als 4 Generationen (F_{>5}-) freier Abblüte aus F₁-Hybriden der *Lolium-Festuca* Kombinationen 3 (F₃-) und 1 (F_{>5}-) hervorgegangen waren

* Pflanzen erzeugt von OERTEL (1997 und unveröffentlicht) ° Pflanze erzeugt von MATZK (1981)

Abb. 11 bis Abb. 18: Phänotyp und Blütenstände von F₁-Hybriden

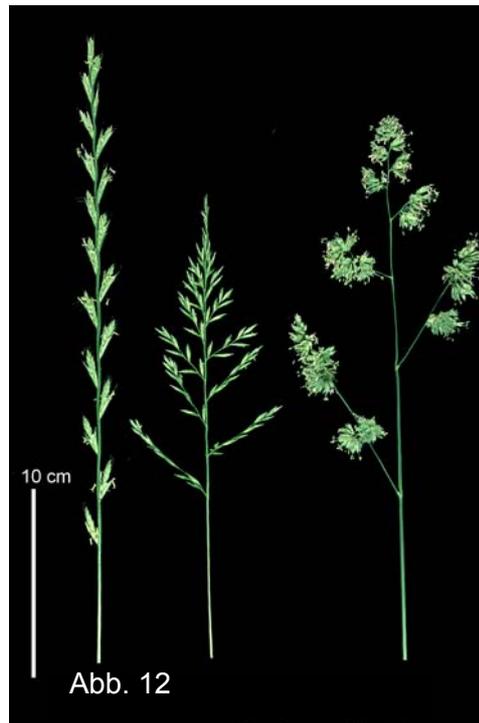
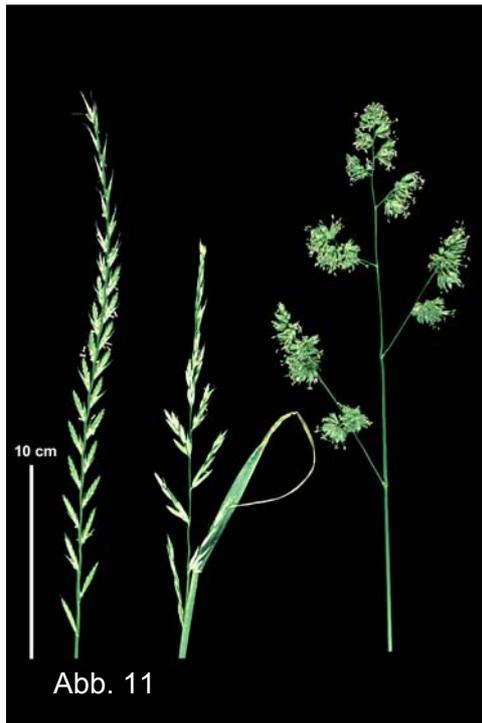


Abb. 11: Blütenstand der allotetraploiden F₁-Pflanze 3 zwischen den Eltern *L. multiflorum* (4x; links) und *D. glomerata* (4x; rechts)

Abb. 12: Blütenstand der allotetraploiden F₁-Pflanze 4 zwischen den Eltern *L. multiflorum* (4x; links) und *D. glomerata* (4x; rechts)

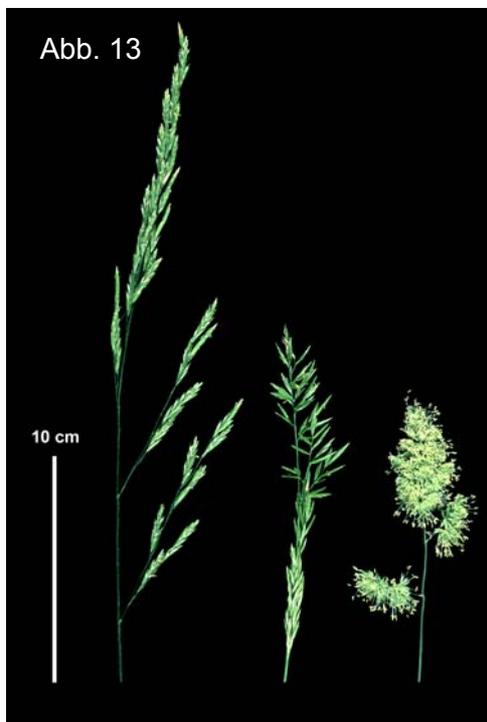


Abb. 13: Blütenstand der allotetraploiden F₁-Pflanze 8 (Mitte) im Vergleich zu den Eltern *F. pratensis* (4x; links) und *D. glomerata* (4x; rechts)

Abb. 14: Allotriploide F₁-Pflanze 2 (Blütenstand Mitte) im Vergleich zu Blütenständen der Eltern *L. multiflorum* (2x; links) und *D. glomerata* (4x; rechts)



Abb. 15a: Blütenstand der allotriploiden F_1 -Pflanze 1 zwischen den Eltern *L. multiflorum* (2x; links) und *D. glomerata* (4x; rechts)

Abb. 15b: Blütchen der allotriploiden F_1 -Pflanze 1 (Mitte) im Vergleich zu Blütchen der Eltern *L. multiflorum* (links) und *D. glomerata* (rechts)

Abb. 16: Blütenstand der allotriploiden F_1 -Pflanze 7 zwischen den Eltern *F. pratensis* (2x; links) und *D. glomerata* (4x; rechts)

Abb. 17: Blütenstand der allopentaploiden F_1 -Pflanze 14 (Mitte) zwischen *F. arundinacea* (6x; links) und *D. glomerata* (4x; rechts)

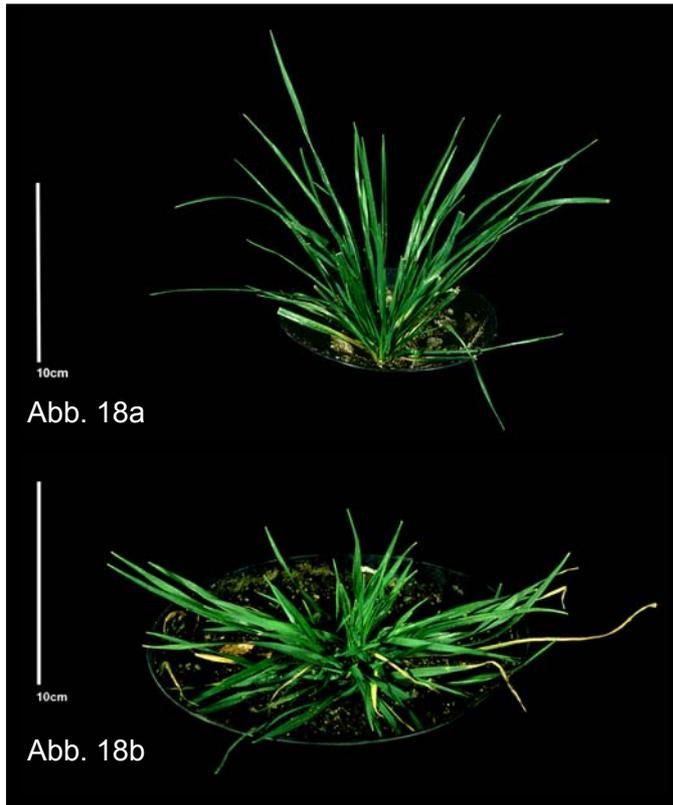


Abb. 18a+b: Allotriploide F₁-Pflanze 15 (a) der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *Cyn. cristatus* (2x) im Vergleich zum Pollenelter *Cyn. cristatus* (2x; b)

Abb. 19a bis Abb. 25: Genomzusammensetzung von F₁-Hybriden

Abb. 19a - Abb. 21:

F₁-Hybriden zwischen *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x): Die DNS von *D. glomerata* erscheint durch FITC-Markierung gelbgrün, während die DNS von *L. multiflorum* durch Gegenfärbung rot erscheint.

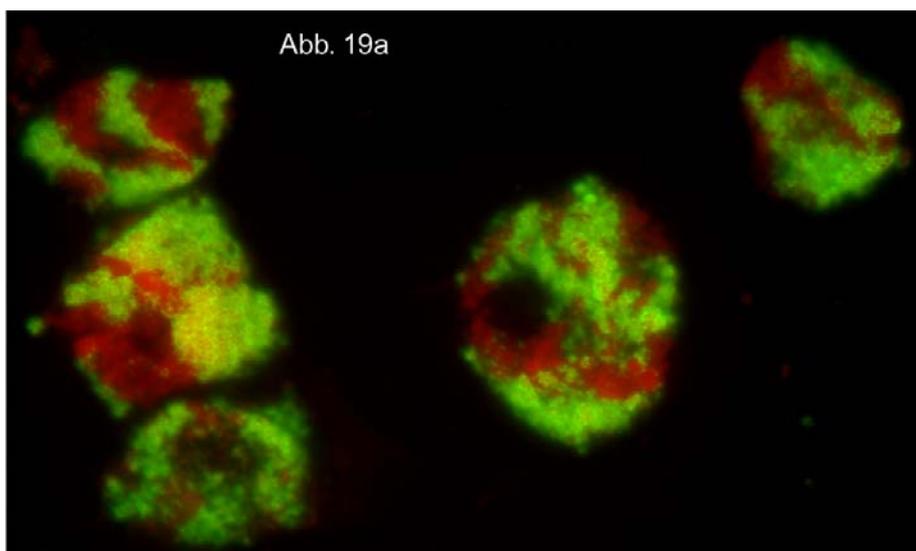


Abb. 19a: Interphasekerne in Wurzelspitzen der F₁-Pflanze 4: Die DNS der beiden Eltern ist nicht zufällig miteinander gemischt, sondern liegt jeweils in spezifischen Regionen des Kerns

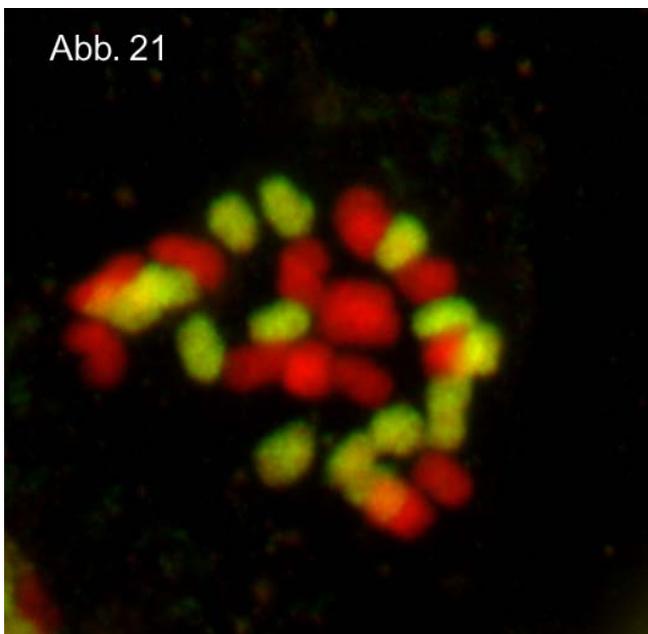
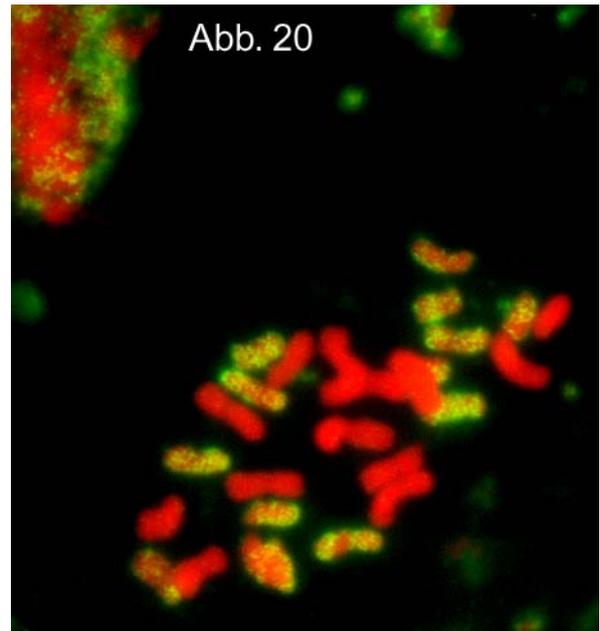
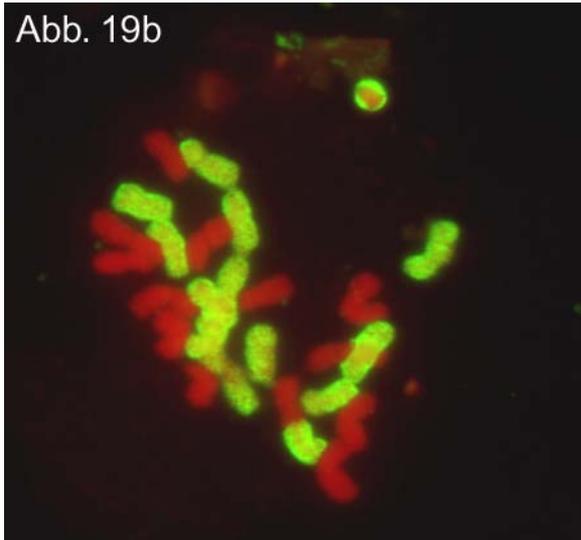
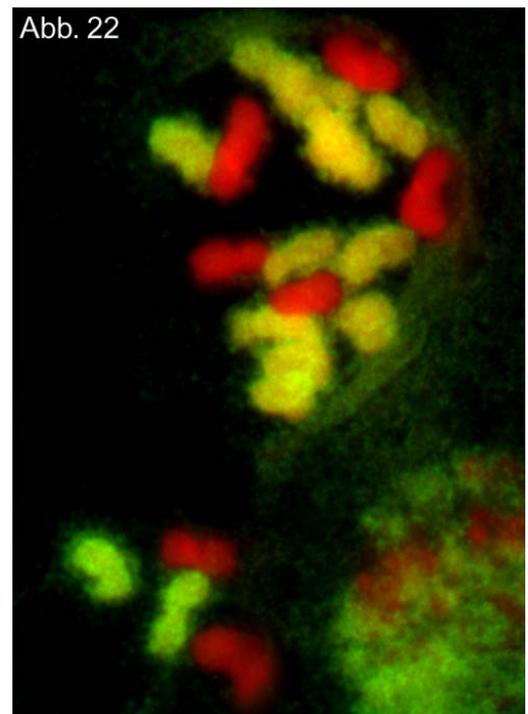


Abb. 19b: Mitotische Metaphase der F₁-Pflanze 4 mit jeweils 14 Chromosomen beider Elternarten

Abb. 20: Mitotische Metaphase der F₁-Pflanze 6 mit jeweils 14 Chromosomen beider Elternarten

Abb. 21: Mitotische Metaphase der F₁-Pflanze 5 mit jeweils 14 Chromosomen beider Elternarten

Abb. 22: Mitotische Metaphase der allotriploiden F₁-Pflanze 1 der Kombination *L. multiflorum* (2x) × *D. glomerata* (4x): Die 14 Chromosomen von *D. glomerata* erscheinen durch FITC-Markierung gelbgrün, die 7 Chromosomen von *L. multiflorum* durch Gegenfärbung rot.



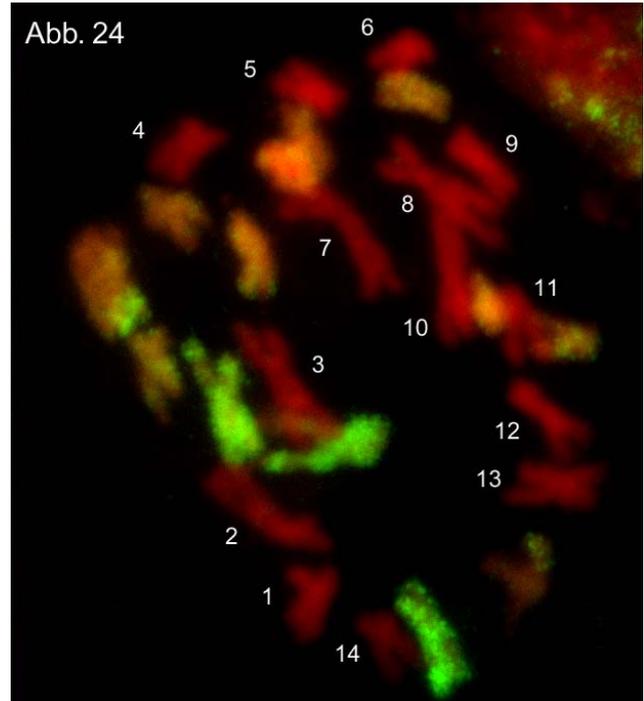
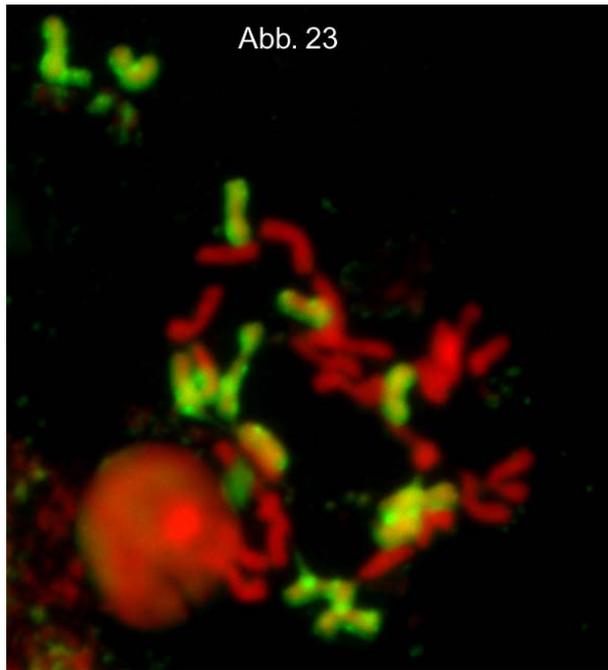
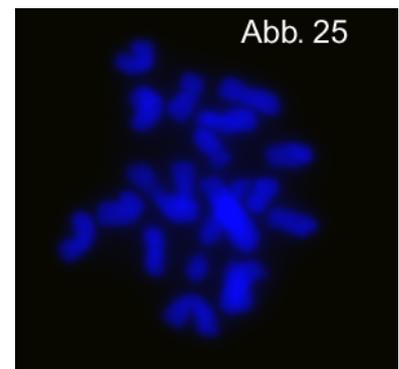


Abb. 23: F₁-Hybride der Kombination *F. arundinacea* (6x=42) × *D. glomerata* (4x=28): Die 14 *D. glomerata* Chromosomen erscheinen durch FITC-Markierung gelbgrün, die vermutlich 21 *F. arundinacea* Chromosomen durch Gegenfärbung rot. Die theoretisch zu erwartende Zahl von Chromosomen jedes Elters wird ebenso bestätigt wie die bereits von MATZK (1981) für diese Hybride ermittelte Gesamtzahl von 35 Chromosomen.

Abb. 24: F₁-Pflanze 9 der Kombination *F. pratensis* (4x) × *D. glomerata* (4x): Es sind 14 Chromosomen von *F. pratensis* zu erkennen (s. weiße Zahlen, Chromosomen rotgefärbt). Die mit FITC markierten 14 Chromosomen von *D. glomerata* (gelbgrün-orange) sind aufgrund kontrastarmer Markierung und ungünstiger räumlicher Lage nicht vollständig zu erkennen.

Abb. 25: F₁-Hybride zwischen *L. multiflorum* (4x) × *Cynosurus cristatus* (2x): Die erwartete Chromosomenzahl von 21 wurde bestätigt. Alle Chromosomen sind mit DAPI gefärbt. Die Markierung der *Cyn. cristatus* Chromosomen mit FITC-markierter genomischer DNS dieser Art verlief erfolglos.



3.1.2.2 Vitalität und Fertilität

Von den 15 vorhandenen F₁-Hybriden (s. Tab. 4) waren, incl. der F₁-Pflanze 14 der Kombination *F. arundinacea* (6x) × *D. glomerata* (4x), 8 sehr vital (s. Tab. 5 bzw. Tab. 25). Abgesehen von den 3-Weg-Hybriden zwischen *L. multiflorum*, *F. pratensis* und *D. glomerata*, die eine sehr geringe Vitalität hatten, konnten alle Hybriden bereits über einen Zeitraum von 2 bis zu 7 Jahren erhalten werden.

Die 15 F₁-Hybriden waren alle weitgehend steril (s. Tab. 5, Tab. 6 und Tab. 24). Nur in der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) gelang die Erzeugung einiger Nachkommen.

Die Fruchtknoten und Antheren der allotriploiden F₁-Hybride zwischen *F. pratensis* und *D. glomerata* abortierten sehr früh. Beim Schieben der Blütenstände aus der Blattscheide waren keine generativen Organe mehr zu finden (s. Tab. 5). Von den insgesamt 4 produzierten allotetraploiden Hybriden der Kombination *F. pratensis* (4x) × *D. glomerata* (4x) (s. 7.1.1, Tab. 25) bildete nur F₁-Pflanze 8 Blütenstände (s. Tab. 5). Es wurden nie PMZ oder Pollenkörner (PK) in den Antheren nachgewiesen. Dies legt nahe, dass die Entwicklung der Antheren deutlich vor der Meiose abbrach. Aus Rückkreuzungen mit dieser Pflanze als Samenelter gingen keine Embryonen hervor (s. Tab. 6).

Die Entwicklung der allotriploiden Hybriden zwischen *L. multiflorum* (2x) × *D. glomerata* (4x) abortierte später, als die der Hybriden zwischen *F. pratensis* (2x und 4x) × *D. glomerata* (4x). Bei ihnen wurden Antheren gebildet, in denen PMZ oder PK zu finden waren. Im Gegensatz zu den allotetraploiden Hybriden der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x), die in ihrer Entwicklung noch weiter voranschritten, waren aber nie vitale (KES-färbbare) PK zu finden (s. u., Tab. 5 und Abb. 26 - Abb. 28).

Die allotetraploiden F₁-Hybriden zwischen *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) bildeten alle PK. Die Antheren waren teilweise dehiszent. Pollenkornfärbungen ergaben meist einen eher geringen Anteil vitaler PK (s. Tab. 5, Abb. 27 und Abb. 28).

Vitalität und besonders Fertilität der Hybriden variierten innerhalb einer und zwischen verschiedenen Kombinationen. Bei den einzelnen Hybriden traten zwischen verschiedenen Jahreszeiten und Jahren Schwankungen auf. F₁-Pflanze 5 und F₁-Pflanze 6 beispielsweise bildeten zeitweise trotz Vernalisation keine Blütenstände, z. T. wurden aber auch zahlreiche Blütenstände entwickelt, deren Antheren bei F₁-Pflanze 5 ausschließlich tote Pollenkörner (PK) und bei F₁-Pflanze 6 bis zu 1 % KES-färbbarer PK aufwiesen (s. Tab. 5 und 7.1.1, Tab. 25). F₁-Pflanze 3 und F₁-Pflanze 4 hingegen entwickelten immer Antheren mit KES-färbbaren PK, deren Anteil dabei bis zu 30 % bzw. 50 % betrug (s. Tab. 5). In den Antheren dieser beiden Hybriden wurde oft eine asynchrone Mikrosporenentwicklung gefunden.

Bei Verwendung als Pollengeber wurden von den F₁-Hybriden einige Nachkommen mit Hybridcharakter (s. 3.1.3; Tab. 6 und Tab. 7) erhalten, in einem Fall auch bei Verwendung als Samenelter (F₁-Pflanze 6, s. Tab. 5 und Tab. 25). Eine Stimulierung durch externe Phytohormone war dazu immer nötig, entweder im Rahmen der Kreuzung und Embryokultur oder im Rahmen der Erzeugung von Regeneraten durch Antherenkultur.

Ergebnisse

Die 3-Weg-Hybride F₁-Pflanze 11 in der Kombination [*F. pratensis* × *L. multiflorum*] (4x) × *D. glomerata* (4x) hatte einen Blütenstand gebildet, bevor sie abstarb. Die Antheren enthielten eine geringe Anzahl Pollenkörner (s. Tab. 5). Die anderen beiden 3-Weg-Hybriden bildeten keine Blütenstände.

Tabelle 5: Vitalität und Fertilität der F₁-Hybriden aus intergenerischen Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologen Genomen

Kombination und Pflanze	Vitalität ¹	Blütenstände ²	weibliche Fertilität ³	männliche Fertilität	
				Antheren	Pollen ⁴
<u>L. multiflorum (2x) × D. glomerata (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 1	++	+++	keine Karyop.	indehiszent	nur PMZ
F ₁ -Pflanze 2	+	+	keine NKN	indehiszent	+; 0 % KES
<u>L. multiflorum (4x) × D. glomerata (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 3	++	+++	keine NKN	z.T. dehiszent	+; <0,5 - 30 % KES; NKN erhalten
F ₁ -Pflanze 4	++	+++	keine NKN	z.T. dehiszent	++; 20 - 50 % KES; NKN erhalten
F ₁ -Pflanze 5 *	++	++	keine NKN	indehiszent	+; 0 % KES
F ₁ -Pflanze 6 *	++	++	NKN erhalten	indehiszent	++; 0 - 1 % KES
<u>F. pratensis (2x) × D. glomerata (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 7 *	++	+++	Fruchtknoten früh abortiert	früh abortiert	–
<u>F. pratensis (4x) × D. glomerata (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 8	++	+	keine Karyop.	indehiszent	0
<u>3-Weg-Hybriden [<i>L. m.</i> × <i>F. p.</i>], [<i>F. p.</i> × <i>L. m.</i>] (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 11	0	+	keine Karyop.	indehiszent	+; 0 % KES
F ₁ -Pflanze 12	+	0	–	–	–
F ₁ -Pflanze 13	0	0	–	–	–
<u>L. multiflorum (4x) × <i>Cynosurus cristatus</i> (2x)</u>					
F ₁ -Pflanze 15	+	0	–	–	–
<u>L. multiflorum (4x)</u>					
Pflanzen	++	+++	NKN erhalten	dehiszent	+++; 90 % KES; NKN erhalten

* Pflanzen erzeugt von OERTEL (1997 und unveröffentlicht)

¹ Vitalität: 0 = tot + = schwach ++ = hoch

² Häufigkeit der Bildung von Blütenständen:

0 = nie + = selten ++ = manchmal +++ = häufig

³ weibliche Fertilität:

Ergebnisse

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1. Fruchtknoten früh abortiert | Fruchtknoten vor dem Schieben des Blütenstandes abortiert |
| 2. keine Karyop. | keine stimulierten Karyopsen trotz Auxinapplikation |
| 3. keine NKN | keine Nachkommen trotz Auxinapplikation und Embryokultur |
| 4. NKN erhalten | Nachkommen erhalten |

4 Pollen

- | | |
|--|--|
| 1. O | keine Pollenkörner |
| 2. nur PMZ | Pollenmutterzellen abortieren |
| Mengenangaben von Pollenkörnern: + = wenig ++ = mittel +++ = normal | |
| 3. 0 % KES | KES-Färbung völlig negativ, d. h. nur tote Pollenkörner |
| 4. in % KES | Anteil der KES-färbaren Pollenkörner |
| 5. NKN erhalten | Nachkommen erhalten, d. h. Pollenkörner erfolgreich als Bestäuber oder in Antherenkultur |

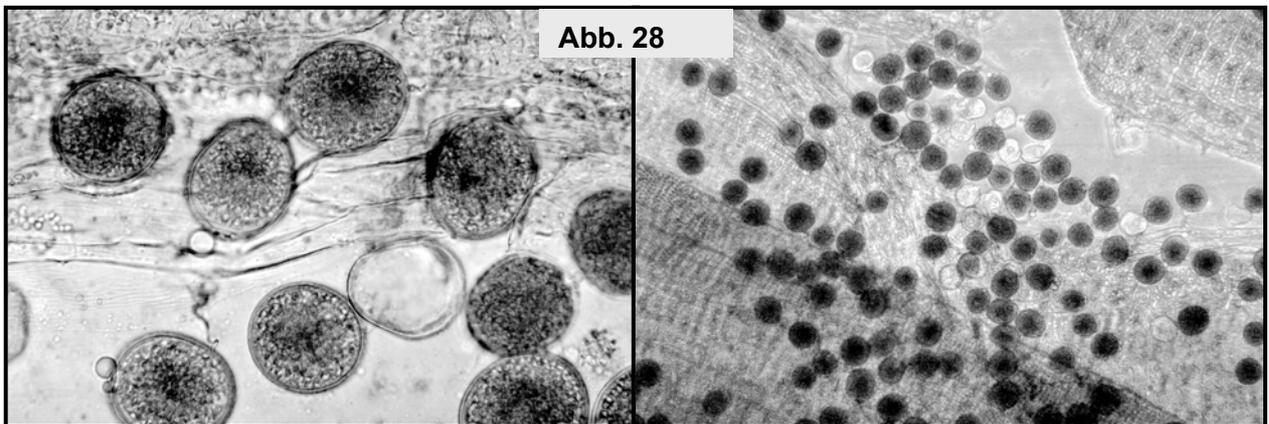
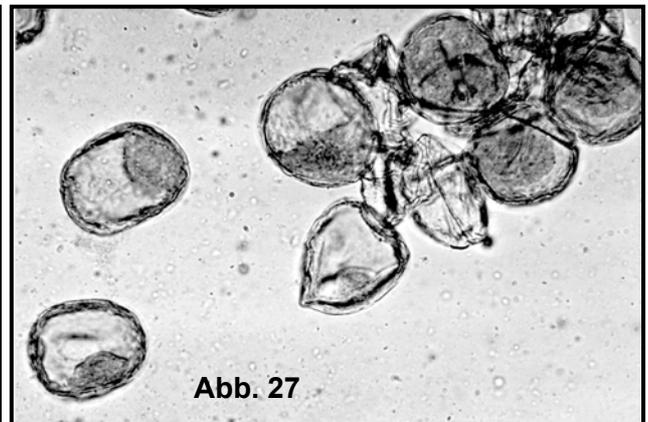


Abb. 26: Sterile Pollenkörner (PK) der allotriploiden F₁-Pflanze 2 der Kombination *L. multiflorum* (2x) × *D. glomerata* (4x), (Vergr. 1600fach): Im Inneren der PK waren nur Cytoplasmareste vorhanden, die ca. 20 % des jeweiligen PK ausfüllten.

Abb. 27: KES-gefärbte PK der allotetraploiden F₁-Pflanze 3 der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x), (Vergr. 640fach): Die meisten PK waren entweder ohne Cytoplasma oder wiesen nur Cytoplasmareste auf, die dann ca. 20-50 % der PK ausfüllten.

Abb. 28: KES-gefärbte PK von tetraploidem *L. multiflorum* (links Vergr. 640fach, rechts Vergr. 160fach): Der Anteil KES-färbbarer PK lag bei ca. 90 %. Im Hintergrund ist das Gewebe der Anthere zu sehen.

Die Hybriden waren meist schwächer bewurzelt als die Eltern. Besonders deutlich trat dies bei F₁-Pflanze 6 der Kombination *L. multiflorum* × *D. glomerata* und bei F₁-Pflanze 12 der 3-Weg-Hybriden hervor.

Von F₁-Pflanze 1 der Kombination *L. multiflorum* (2x) × *D. glomerata* (4x) wurden von Teilen unreifer Blütenstände, die sich auf Induktionsmedium befanden, nach einer Kallusphase 9 grüne Regenerate erhalten. Phänotypisch glichen diese der Spenderpflanze. Ein mittels GISH analysiertes Regenerat zeigte dann auch die gleiche Genomzusammensetzung (7 Lm + 14 Dg, s. Tab. 4) wie die Spenderpflanze. Es waren keine Aneuploidie (Veränderung der Zahl einzelner Chromosomen) oder intergenerische Translokationen zu beobachten.

3.1.3 Erzeugung von Nachkommen der F₁-Hybriden

3.1.3.1 Rückkreuzungsergebnisse

Rückkreuzungen hatten – selbst unter Anwendung von Auxinbehandlung und Embryokultur – aufgrund der hohen Sterilität der F₁-Hybriden und postzygotischer Kreuzungsbarrieren gleich denen bei der Erzeugung der F₁-Hybriden eine geringe Erfolgsquote (s. Tab. 6). Ausschließlich Rückkreuzungen mit der F₁-Pflanze 4 als Pollenelter zeigten Erfolg (s. Tab. 6). Aus diesen Kreuzungen gingen 23 Nachkommen hervor, deren Hybridcharakter größtenteils bestätigt wurde (s. Tab. 8). Sie belegen, wie auch die Erzeugung von Regeneraten durch Antherenkultur (s. 3.1.3.2 Tab. 7), die partielle Fertilität des Pollen der Hybriden dieser Kombination.

Tabelle 6: Rückkreuzungen der F₁-Hybriden mit Auxinbehandlung und Anwendung der Embryokultur

Samenelter	Bestäuber	Anzahl Blütenstände	Anzahl Blütchen	Embryonenzahl, (Embryofrequenz [%])	Anzahl BC ₁ -Pflanzen
<u>L. multiflorum (2x) × D. glomerata (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 1	<i>D. glomerata</i>	1	107	0	–
	<i>L. multiflorum</i>	2	112	0	–
F ₁ -Pflanze 2	<i>D. glomerata</i>	3	350	0	–
	<i>L. multiflorum</i>	5	700	0	–
<u>L. multiflorum (4x) × D. glomerata (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 3	<i>D. glomerata</i>	1	140	0	–
	<i>L. multiflorum</i>	6	1515	0	–
F ₁ -Pflanze 4	<i>D. glomerata</i>	8	1111	2 (0,2 %)	0
	<i>L. multiflorum</i>	8	1602	1 (0,1 %)	0
<i>L. multiflorum</i>	F ₁ -Pflanze 4	5	256	29 (11,3 %)	23
F ₁ -Pflanze 5	<i>D. glomerata</i>	8	1265	0	–
	<i>L. multiflorum</i>	35	2219	0	–
F ₁ -Pflanze 6	<i>D. glomerata</i>	6	972	0	–
	<i>L. multiflorum</i>	46	3299	0	–
<u>F. pratensis (4x) × D. glomerata (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 8	<i>D. glomerata</i>	1	335	0	–
<u>3-Weg-Hybride [<i>L. m.</i> × <i>F. p.</i>] (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 11	<i>L. multiflorum</i>	1	50	0	–
<u>F. arundinacea (6x) × D. glomerata (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 14	<i>D. glomerata</i>	14	690	1 (0,1 %)	0

Bei F₁-Pflanze 6 der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) wurden 5 der 46 Blütenstände aus Tab. 6 mit insgesamt 369 Blütchen bei konstanter Umgebungstemperatur von 35°C statt der üblichen Tag-/Nachttemperatur von ca. 21/16°C mit *L. multiflorum* zurückgekreuzt, um Auswirkungen der hohen Temperatur auf die Fertilität der Hybride zu testen. Es waren keine Embryonen zu verzeichnen.

3.1.3.2 Kalli und Regenerate aus Antherenkultur von F₁-Hybriden der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x)

Zwei grüne Pflanzen wurden regeneriert (s. Tab. 7). Sie waren vital und glichen phänotypisch der Donorpflanze F₁-Pflanze 3. Im Versuchszeitraum von 1,5 Jahren haben die Regenerate trotz Vernalisation nicht geblüht.

Die Ergebnisse aus der Antherenkultur der Elternarten sind unter 3.2.1 in Tab. 16 aufgeführt.

Tabelle 7: Kalli und Pflanzen aus Antherenkultur von F₁-Hybriden der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x)

Donor-pflanze	Anzahl Antheren	Anzahl Kalli (% v. Antheren)	Anzahl Regenerate insgesamt ¹	Anzahl an grünen Regeneraten
F ₁ -Pfl. 3	156	4 (2,6 %)	3	2
F ₁ -Pfl. 4	48	0	–	–
F ₁ -Pfl. 5	275	2 (0,7 %)	0	–
F ₁ -Pfl. 6	152	0	–	–

¹ Hier sind alle regenerierten Pflanzen aufgeführt, d. h. sowohl Albinopflanzen als auch grüne Pflanzen.

Die Donorpflanze F₁-Pflanze 3 hatte 14 Chromosomen von *L. multiflorum* und wahrscheinlich 14 von *D. glomerata* (s. Tab. 4).

F₁-Regenerat 1 hatte keinen reduzierten Chromosomensatz. Es wurden mitotische Metaphasen mit sowohl 14 als auch ca. 18 - 19 Chromosomen von *L. multiflorum* und sowohl 14 als auch ca. 14 - 17 Chromosomen von *D. glomerata* detektiert (für die jeweils zweite Angabe s. Abb. 30b). Die Pflanze wurde entweder aus somatischem Antherengewebe oder aus einer unreduzierten Mikrospore gebildet oder aber es kam zu spontaner Verdoppelung bei der Regeneration. Darüberhinaus scheint es zu partieller weiterer Vermehrung der Chromosomenzahl pro Zelle gekommen zu sein, da einige – aber nicht alle – Pflanzensektoren mehr Chromosomen als die Donorpflanze besitzen. Erklärbar ist dies durch mitotische Störungen.

F₁-Regenerat 2 wies wohl den reduzierten (haploiden) Chromosomensatz des Genoms der Donorpflanze auf. Nur an einer Metaphaseplatte war aber hierbei eine Abschätzung der Chromosomenzahl möglich. Es wurden je ca. 7 Chromosomen von *D. glomerata*

und *L. multiflorum* ermittelt. Über mögliche somatische Variabilität kann keine Aussage getroffen werden.

Intergenerische Translokationen, möglicherweise bedingt durch somaklonale Variation, ließen sich bei den zwei Regeneraten nicht nachweisen. Jeweils beide Elterngenome liegen bei den Regeneraten wie auch bei den F₁-Hybriden in spezifischen Bereichen des Interphasezellkerns und sind nicht zufällig miteinander vermischt (s. Abb. 29 und Abb. 30a, s. 3.1.4).

Abb. 29 und Abb. 30a+b: GISH bei den Regeneraten 2 und 1 aus Antherenkultur der F₁-Pflanze 3 der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x)

DNS von *D. glomerata* erscheint durch FITC-Markierung gelbgrün, während DNS von *L. multiflorum* durch Gegenfärbung rot erscheint.

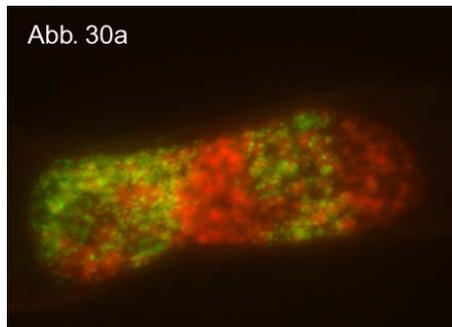
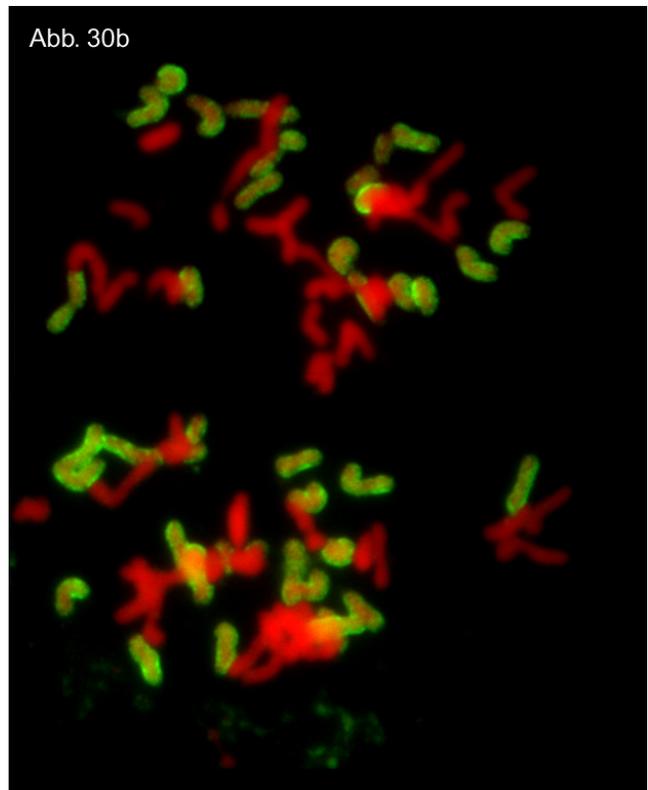
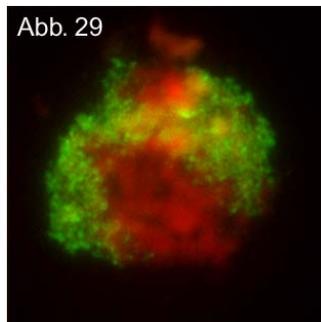


Abb. 29: Interphasekern aus einer Wurzelspitze von Regenerat 2: Die DNS der Ausgangseltern liegt in getrennten Zellkernbereichen.

Abb. 30a: Interphasekern aus einer Wurzelspitze von Regenerat 1: Die DNS der Ausgangseltern liegt in getrennten Zellkernbereichen.

Abb. 30b: Mitotische Telophase in einer Wurzelspitze des Regenerats 1: Es konnten ca. 18 - 19 Chromosomen von *L. multiflorum* und ca. 14 - 17 von *D. glomerata* identifiziert werden. Das waren mehr als die jeweils 14 Chromosomen beider Eltern, die die Donorpflanze F₁-Pflanze 3 besaß.

3.1.4 Analyse mit GISH an Interphasekernen

Der Hybridcharakter von Pflanzen ist mittels GISH auch an Interphasekernen detektierbar. Die DNS der Ausgangseltern befindet sich bei den Hybriden in separaten Regionen des Interphasekernes und ist nicht zufällig miteinander vermischt. Dies ließ sich bei *L. multiflorum* - *D. glomerata* - Hybriden bei Pflanzen mit gleichem Genomanteil beider Eltern wie auch mit geringem *D. glomerata*-Anteil finden (F₁-, BC₁- und BC₂-Hybriden; s. 3.1.2.1: z. B. Abb. 19a und Abb. 20, s. 3.1.3.2: Abb. 29 und Abb. 30, s. 3.1.5.1: z. B. Abb. 33a, s. 3.1.6.2: z. B. Abb. 41b, Abb. 42c+d und Abb. 43b-d). Auch für F₁-Hybriden zwischen *F. pratensis* × *D. glomerata* sowie *F. arundinacea* × *D. glomerata* ließ sich dies bestätigen.

Bei der Zahl von mindestens 100 Zellkernen, die in jedem Präparat von Wurzelspitzen zu finden waren, ließ sich auch anhand der Interphasekerne eindeutig sagen, ob eine Pflanze Hybridcharakter hatte oder nicht. Einzelne Kerne erschienen aufgrund ungünstiger räumlicher Verteilung der zu detektierenden DNS zwar auch bei Hybriden unmarkiert, aber wenn 100 oder mehr Kerne unmarkiert sind – und die Markierung bei der Kontrolle erfolgreich ist – kann ausgeschlossen werden, dass die untersuchte Pflanze eine Hybride ist. Wird hingegen bei den meisten Kernen eine eindeutige Markierung einiger Zellkernbereiche festgestellt und anderer Bereiche nicht, so ist der Hybridcharakter einer Pflanze diagnostiziert.

Sind nur wenige Chromosomen des einen Elterngenoms, im vorliegenden Fall *D. glomerata*, vorhanden, so lässt sich deren Zahl in den Interphasekernen abschätzen (s. Abb. 40c, Abb. 41b und Abb. 42c+d). Im Interphasekern können große Translokationen nicht sicher von ganzen Chromosomen unterschieden werden. So könnten 2 translozierte Chromosomenarme eines Chromosoms für 2 Chromosomen gehalten werden. Bei Elternarten mit Genomen, die als inhomolog zueinander betrachtet werden können, wie z. B. zwischen *L. multiflorum* und *D. glomerata*, tritt dies aber nur selten auf.

3.1.5 Charakterisierung der BC₁-Hybriden zwischen *L. multiflorum* × *D. glomerata*

3.1.5.1 Vitalität, Phänotyp, Genomzusammensetzung und Fertilität

Aus Rückkreuzungen allotetraploider F₁-Hybriden mit autotetraploidem *L. multiflorum* (4x) wurden zusätzlich zu der bereits vorhandenen und beschriebenen BC₁-Pflanze 1 (OERTEL 1997, s. 7.1.2) im Jahr 2000 insgesamt 23 weitere BC₁-Pflanzen erhalten (s. Tab. 6, Tab. 8 und Abb. 3).

Phänotypisch ähnelten sie *L. multiflorum*, besaßen aber auch Merkmale von *D. glomerata* wie die gefalteten Blattanlagen (mäßig), gekielten Blattspreiten (mäßig) und bei BC₁-Pflanze 1 (s. auch OERTEL 1997) die verzweigten Blütenstände (mäßig; s. Abb. 31) und die zweite Hüllspelze (teilweise vorhanden). Die meisten Pflanzen waren vital (s. Tab. 8). Auch bei überdurchschnittlicher Ausprägung von Hybridmerkmalen, wie sie bei einigen Pflanzen auftrat, war die Vitalität vergleichbar hoch.

Fünf BC₁-Hybriden wurden mittels GISH analysiert und als Hybriden bestätigt. Sie hatten 7 *D. glomerata* und ca. 21 *L. multiflorum* Chromosomen. Dies entspricht der theoretischen Erwartung. Bei zwei der Hybriden kann die Zahl der *L. multiflorum* Chromosomen aufgrund qualitativ hierfür unzureichender Präparate nur mit 20 oder 21 angegeben werden (s. Tab. 8). Die bereits charakterisierte BC₁-Pflanze 1 (OERTEL 1997) wurde erneut analysiert, um mögliche somatische Instabilität, vor allem somatische Eliminierung der *D. glomerata* Chromosomen, zu untersuchen. Sowohl mitotische als auch meiotische Metaphasen wurden in die GISH-Analyse einbezogen. Eine Änderung der Genomzusammensetzung wurde nicht festgestellt. Im Genom der BC₁-Pflanze 1 waren immer noch 7 *D. glomerata* Chromosomen vorhanden.

BC₁-Pflanze 1 war gering fertil (s. Abb. 32, s. Tab. 10), es wurden einige Nachkommen erhalten (s. 3.1.5.2 und Abb. 3). Die Antheren waren indehiszent. Zwischen 5 % und 40 % der PK waren mit KES-färbbar. Die anderen BC₁-Hybriden wurden erst kürzlich erzeugt und konnten im Versuchszeitraum aufgrund fehlender Vernalisation noch nicht zur Blüte gelangen.



Abb. 31: Blütenstand der BC₁-Pflanze 1 zwischen Blütenständen der Elternarten *L. multiflorum* (links) und *D. glomerata* (rechts)

Tabelle 8: Phänotyp, Vitalität und Genomzusammensetzung der 1. Rückkreuzungsgeneration (BC₁) von *L. multiflorum* × *D. glomerata*-Hybriden mit *L. multiflorum*

Pflanze	Hybridmerkmale ¹	Vitalität ²	Genomzus.setzg. ³
BC ₁ -Pflanze 1 *	+++	++	21 Lm + 7 Dg
BC ₁ -Pflanze 2	+++	++	21 Lm + 7 Dg
BC ₁ -Pflanze 3-4	++	++	21 Lm + 7 Dg
BC ₁ -Pflanze 5-6	+++	++	20 oder 21 Lm (unsicher) + 7 Dg
BC ₁ -Pflanze 7-9	+++	++	nicht analysiert
BC ₁ -Pflanze 10	+++	+	nicht analysiert
BC ₁ -Pflanze 11-19	++	++	nicht analysiert
BC ₁ -Pflanze 20-23	++	+	nicht analysiert
BC ₁ -Pflanze 24	+	+	nicht analysiert
<u>zum Vergleich:</u>			
F ₁ -Pflanze 3 <i>L. m.</i> (4x) × <i>D. g.</i> (4x)	++++	++	14 Lm + 14 Dg
<i>L. multiflorum</i> (4x)	O	++	28 Lm + 0 Dg

* Pflanze erzeugt und bereits charakterisiert von OERTEL (1997, s. auch 7.1.2).

¹ Hybridmerkmale:

O = keine + = wenig ++ = mittel +++ = viele ++++ = genau intermediär

² Vitalität: + = schwach ++ = hoch

³ Genomzusammensetzung:

Anzahl der Chromosomen von den Elternarten: Lm = *L. multiflorum*, Dg = *D. glomerata*

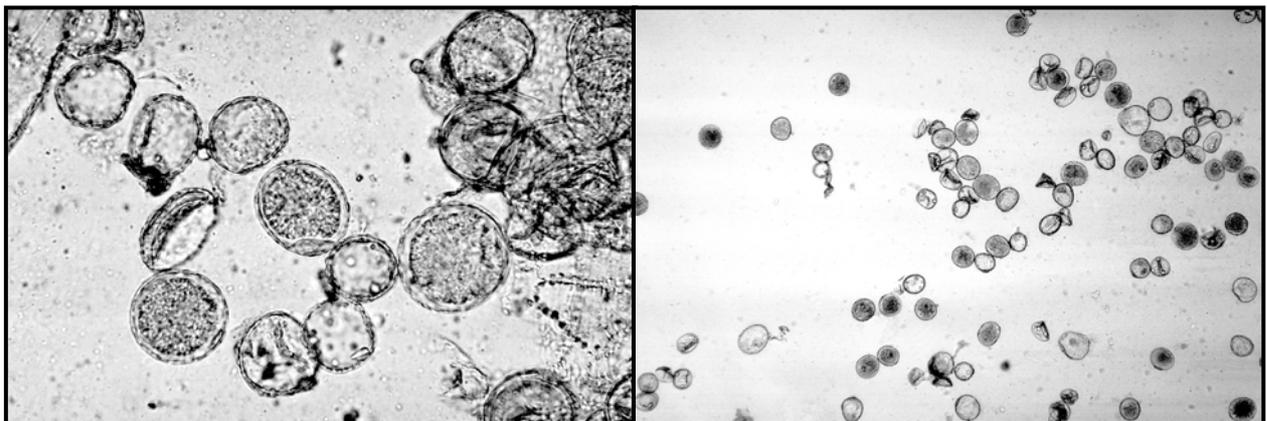


Abb. 32: KES-gefärbte Pollenkörner (PK) der BC₁-Pflanze 1 (links Vergr. 640fach mit Phasenkontrast, rechts Vergr. 160fach): Teilweise waren bis zu 40 % der PK einer Anthere KES-färbbar.

Abb. 33a - Abb. 37c: Genomzusammensetzung von BC₁-Pflanzen der Kombination *L. multiflorum* × *D. glomerata*

Chromosomen von *D. glomerata* erscheinen durch FITC-Markierung gelbgrün, während Chromosomen von *L. multiflorum* durch Gegenfärbung rot erscheinen.

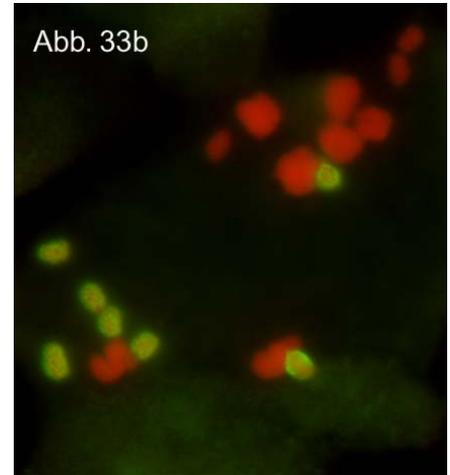
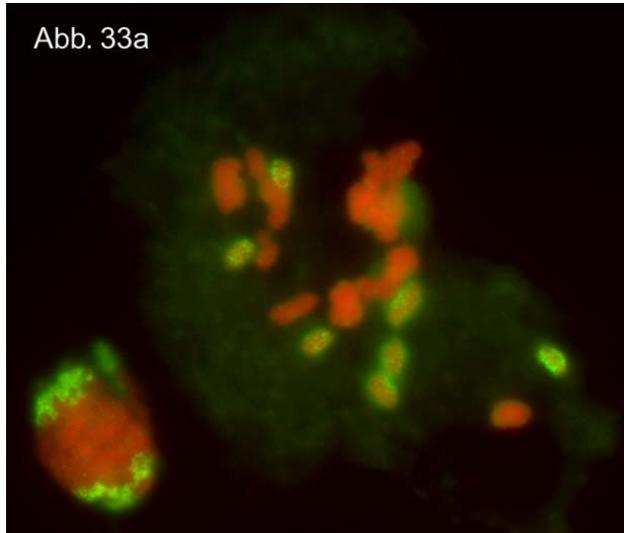


Abb. 33a+b: Meiose der BC₁-Pflanze 1: Während der meiotischen Metaphase I

sind deutlich die 7 Chromosomen von *D. glomerata* als Univalente zu erkennen.

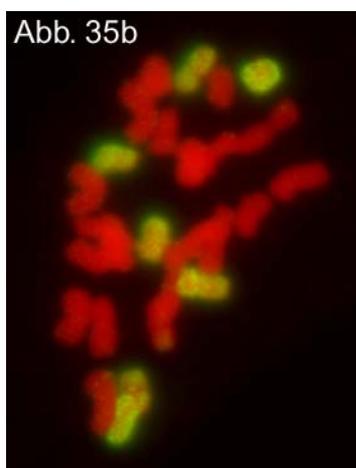
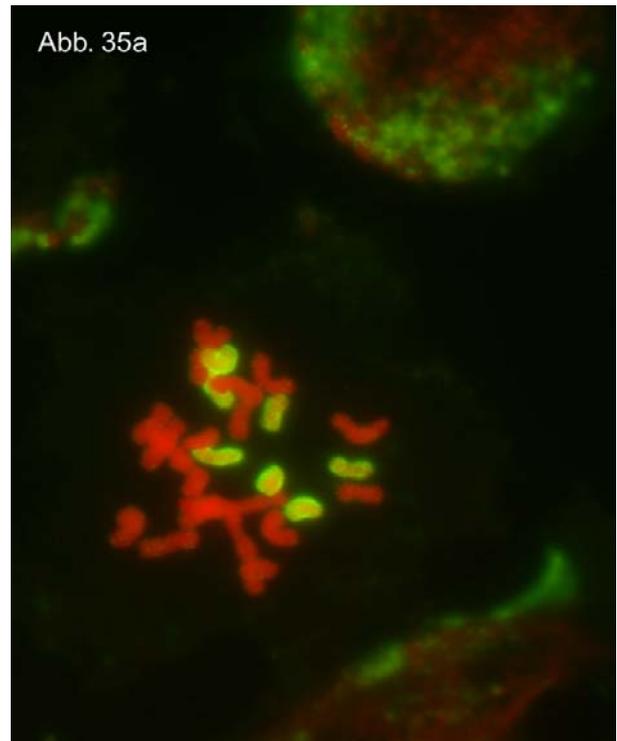
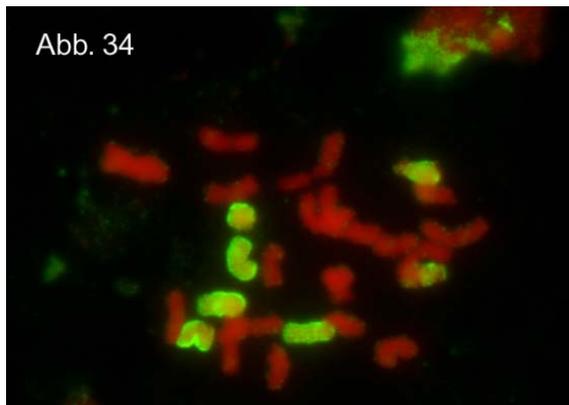


Abb. 34: Mitotische Metaphase der BC₁-Pflanze 3, die 7 Chromosomen von *D. glomerata* und 21 von *L. multiflorum* aufweist

Abb. 35a+b: Mitotische Metaphase der BC₁-Pflanze 6, die 7 Chromosomen von *D. glomerata* und vermutlich 20 Chromosomen von *L. multiflorum* zeigt

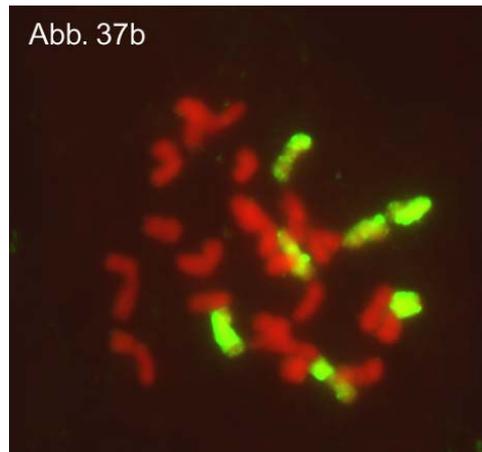
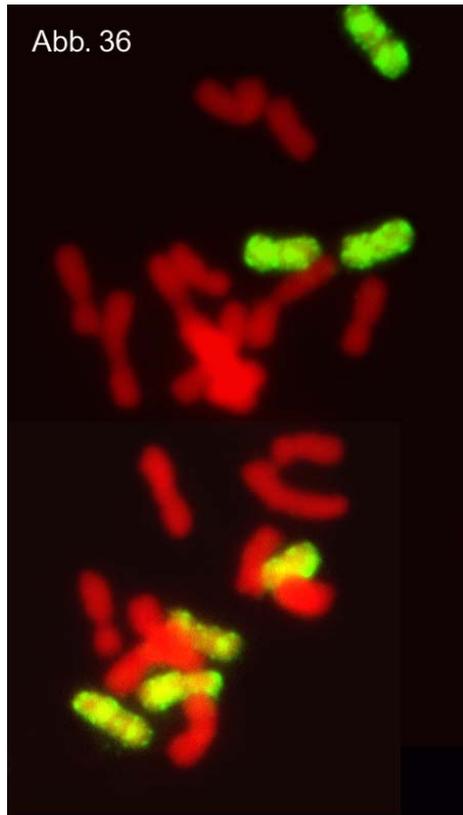


Abb. 36: Mitotische Metaphase der BC₁-Pflanze 2 mit 21 Chromosomen von *L. multiflorum* und 7 Chromosomen von *D. glomerata*
(Die Abbildung wurde aus 2 sich überlappenden Einzelaufnahmen zusammengestellt.)

Abb. 37a+b: Mitotische Metaphase der BC₁-Pflanze 4 mit 21 Chromosomen von *L. multiflorum* und 7 Chromosomen von *D. glomerata*

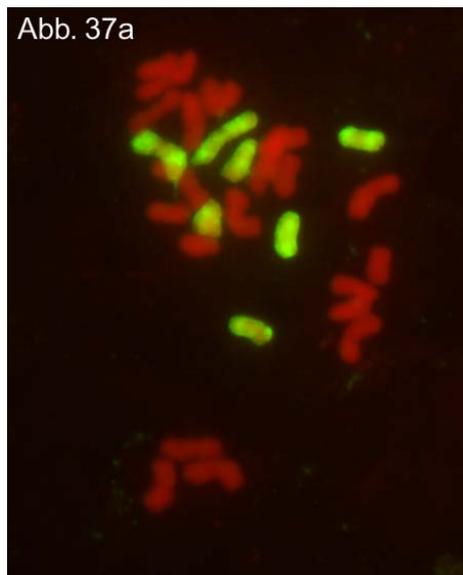
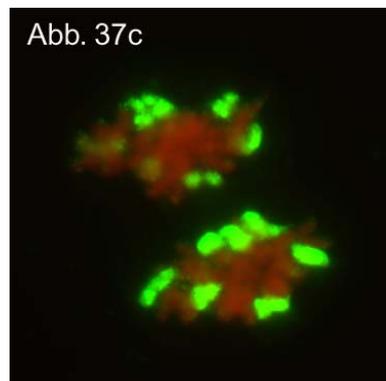


Abb. 37c: 2 Kerne der BC₁-Pflanze 4 in der mitotischen Telophase: Die 7 Chromosomen von *D. glomerata* sind auch hier erkennbar.



3.1.5.2 Nachkommen der BC₁-Hybriden

Kalli und Regenerate aus Antherenkultur

Bei der Antherenkultur der BC₁-Pflanze 1 wurden aus 908 Antheren keine Kalli und folglich auch keine Pflanzen regeneriert.

Rückkreuzungsergebnisse der BC₁-Hybriden

Nur mittels Auxinbehandlung und Embryokultur gelang es, BC₂-Hybriden zu schaffen, wobei ausschließlich Kreuzungen mit *L. multiflorum* zu Embryonen führten (s. Tab. 9).

Von der BC₁-Pflanze 1 wurden aus Rückkreuzungen mit *L. multiflorum* als Pollenelter unter Anwendung der Auxinbehandlung und Embryokultur 9 Pflanzen erhalten (s. Tab. 9). Davon waren drei phänotypisch auffällig und erwiesen sich als Hybriden (s. Tab. 11). Fünf entsprachen reinem *L. multiflorum* und eine Pflanze starb unmittelbar nach der Überführung in Erdkultur. Die Embryofrequenz war sehr gering (s. Tab. 9).

Aus Kreuzungen zwischen *L. multiflorum* als Samenelter und der BC₁-Pflanze 1 als Pollenelter gingen 5 Pflanzen hervor, die alle reinem *L. multiflorum* entsprachen.

Tabelle 9: Embryonen und Pflanzen aus Rückkreuzungen der BC₁-Hybriden mit Auxinbehandlung und Embryokultur

Samenelter	Bestäuber	Anzahl Blütenstände	Anzahl Blütchen	Embryonenzahl, (Embryofrequenz [%])	Anzahl Pflanzen ¹
BC ₁ -Pflanze 1	<i>L. multiflorum</i>	69	10188	35 (0,3 %)	(9) 3
BC ₁ -Pflanze 1	<i>D. glomerata</i>	17	2737	0	–
BC ₁ -Pflanze 1	[<i>L. m.l.p.</i> × <i>F. prat.</i>]	4	436	0	–
<i>L. multiflorum</i>	BC ₁ -Pflanze 1	6	397	11 (2,8 %)	(5) 0

¹ Die Zahl in Klammern gibt alle erzeugten Nachkommen an (ab 1-Blatt-Stadium). Hinter der Klammer sind alle Pflanzen aufgeführt, die das Pikieren in Erde überlebten und deren Hybridcharakter nach dem Pikieren eindeutig festgestellt wurde.

Aus Kreuzungen ohne Auxinbehandlung (Rückkreuzungen mit *L. multiflorum* und freie Abblüte) wurden von BC₁-Pflanze 1 bei Verwendung als Pollenelter 15 und bei Verwendung als Samenelter 27 Nachkommen erhalten. Unter diesen konnten allerdings keine Hybriden identifiziert werden, weder durch Analyse des Phänotyps noch durch Ermittlung der Genomzusammensetzung, wie es bei 6 phänotypisch etwas von *L. multiflorum* abweichenden Nachkommen (s. Tab. 11, BC₂-Pflanze 7-12) mittels GISH geschah. Ohne Auxinbehandlung und Embryokultur sind wahrscheinlich die postzygotischen Kreuzungsbarrieren zu stark (s. auch 3.1.6.3).

3.1.6 Charakterisierung der BC₂-Pflanzen zwischen *L. multiflorum* × *D. glomerata*

12 BC₂-Pflanzen wurden eingehender charakterisiert. Davon waren 3 durch Rückkreuzung der BC₁-Pflanze 1 als Samenerter mit *L. multiflorum* als Pollenerter unter Anwendung von Auxinbehandlung und Embryokultur erzeugt worden (s. Tab. 9, s. Abb. 3). 3 BC₂-Pflanzen lagen bereits vor Beginn dieser Arbeit vor und waren auf gleichem Wege erzeugt worden (OERTEL unveröffentlicht, s. Abb. 3). Die weiteren 6 BC₂-Pflanzen (BC₂-Pflanzen 7-12) stammten aus Rückkreuzungen der BC₁-Pflanze 1 (sowohl als Samen- wie auch als Pollenerter) mit *L. multiflorum* ohne Auxinbehandlung und Embryokultur (s. 3.1.5.2). Der Phänotyp dieser 6 Pflanzen wich von *L. multiflorum* etwas ab, ohne dabei aber deutliche Merkmale von *D. glomerata* zu zeigen (s. Tab.10).

3.1.6.1 Vitalität, Phänotyp und Fertilität der BC₂-Pflanzen

Die BC₂-Hybriden waren fast alle hoch vital (s. Tab. 10). Phänotypisch ähnelten sie weitgehend *L. multiflorum*, doch waren wie auch bei den BC₁-Hybriden Merkmale von *D. glomerata* zu erkennen (s. 3.1.5.1). Dies waren vor allem eine zweite Hüllspelze (teilweise vorhanden), die gefalteten Blattanlagen (wenig), die gekielten Blattspreiten (mäßig) und bei BC₂-Pflanze 1 verzweigte Blütenstände (wenig).

Alle BC₂-Hybriden, bis auf BC₂-Pflanze 6, die nicht vernalisiert war, haben zahlreiche Blütenstände gebildet. Alle mit Auxin behandelten Pflanzen wurden zur Bildung von Karyopsen stimuliert.

Insgesamt ließ sich bei den *L. multiflorum* - *D. glomerata* - Hybriden die Tendenz erkennen, dass die Fertilität umso höher war, je weniger *D. glomerata* Chromosomen neben dem *L. multiflorum* - Genom vorlagen und je weiter fortgeschritten die Generation war. Die Fertilität der BC₂-Hybriden war höher als die der F₁-Hybriden (s. Tab. 10), obwohl auch bei den BC₂-Hybriden Störungen in der Mikrosporogenese auftraten (s. Abb. 38), die im Vergleich zur Kontrolle *L. multiflorum* (s. Abb. 28) in einem großen Anteil steriler PK resultierten (s. Abb. 39). Es kamen dabei auch Ausnahmen vor. So wies die schwach vitale BC₂-Pflanze 2 eine geringe Fertilität auf (s. Tab. 10), die in dieser Höhe von den allotetraploiden F₁-Hybriden (vor allem von F₁-Pflanze 3, 4 und 6, s. Tab. 5) zumindest auch erreicht wurde und von der BC₁-Pflanze 1 (s. 3.1.5.1) überschritten wurde.

Die Fertilität der einzelnen BC₂-Hybriden schwankte wie auch die der F₁-Hybriden (s. 3.1.2.2, Tab. 5) oft stark. Bei BC₂-Pflanze 4 waren 30 - 80 % der PK KES-färbbar, bei BC₂-Pflanze 2 waren es 0 - 40 %.

Angaben zur Anzahl und Häufigkeit von Nachkommen bei Verwendung als Samen- und Pollenerter in Rückkreuzungen finden sich unter 3.1.6.3, ebenso Angaben zur Regeneration in Antherenkultur als Indiz für die Vitalität der Mikrosporen.

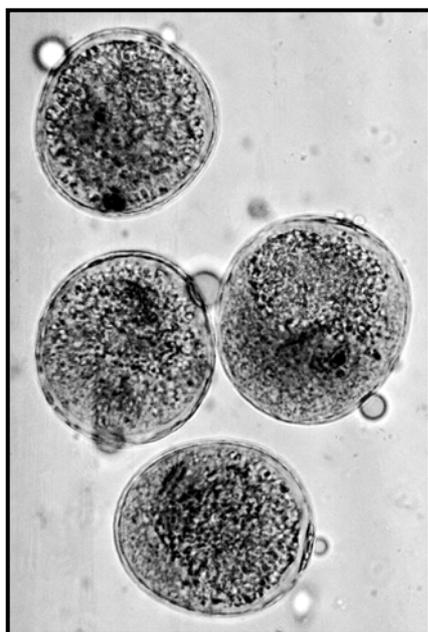
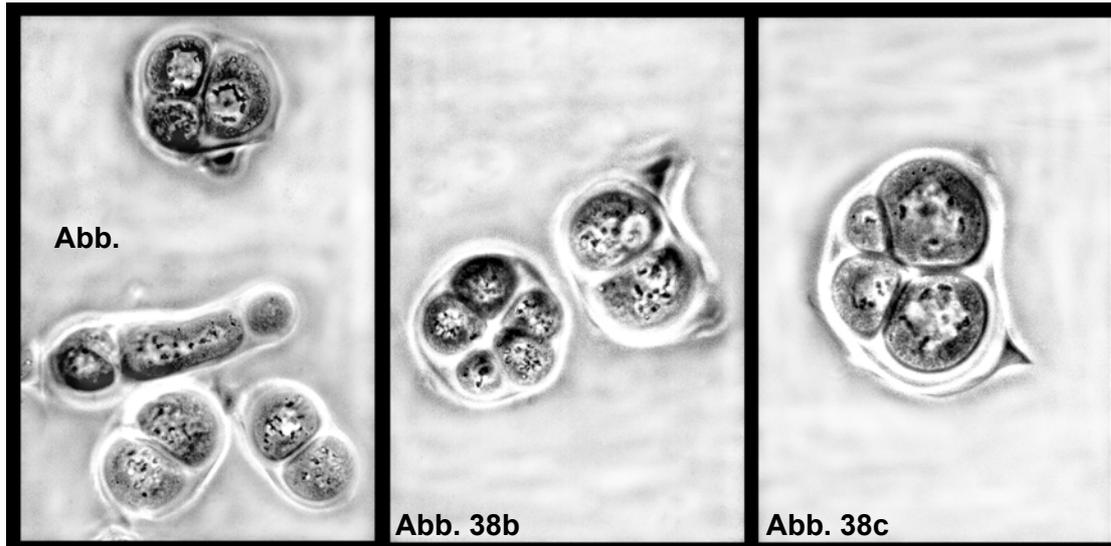


Abb. 38a-c: Ein sehr hoher Anteil irregulär entwickelter Mikrosporen in der BC₂-Pflanze 1 belegt Differenzierungsstörungen in der Sporogenese: Anstelle regulärer Tetraden sind Triaden (a), Pentaden (b) und ungleichmäßige Tetraden (c) zu sehen. Des Weiteren wurden Dyaden und Tetraden in hoher Zahl nebeneinander vorkommend beobachtet.

Abb. 39: KES-gefärbte Pollenkörner (PK) der BC₂-Pflanze 4 (Vergr. 1600fach)

3.1.6.2 Genomzusammensetzung der BC₂-Pflanzen

Von den 12 mittels GISH analysierten BC₂-Pflanzen waren 6 Hybriden (s. Tab. 11). Neben den hauptsächlich vorliegenden *L. multiflorum* Chromosomen lagen noch einige, meist wenige *D. glomerata* Chromosomen vor. Im Gegensatz zu den F₁- und BC₁-Hybriden aller Kreuzungskombinationen, deren Genomzusammensetzung auch über mehrere Jahre stabil war, kam es bei BC₂-Hybriden zu somatischer Variabilität und Eliminierung der *D. glomerata* Chromosomen, die neben einer Vielzahl von *L. multiflorum* Chromosomen vorlagen.

Zwei Pflanzen wiesen eine stabile Anzahl *D. glomerata* Chromosomen auf. BC₂-Pflanze 1 ist seit 3 Jahren bzgl. dieser Additionschromosomen stabil, BC₂-Pflanze 4 seit 1,5 Jahren. Die BC₂-Pflanze 6 wurde erst vor einem halben Jahr produziert.

Die anderen 3 BC₂-Hybriden zeigten hingegen somatische Eliminierung der *D. glomerata* Chromosomen. Bei BC₂-Pflanze 2 wurden von ursprünglich 7 *D. glomerata* Chromosomen zu einem späteren Zeitpunkt nur noch 2 nachgewiesen. Bei den BC₂-Pflanzen 3 und 5 wurden sämtliche *D. glomerata* Chromosomen auf somatischem Wege eliminiert. In beiden Pflanzen ließen sie sich bis zu einem Pflanzenalter von 4 Monaten nachweisen, später nicht mehr.

Hervorzuheben ist, dass im Alter von bis zu 4 Monaten eine Sektion der BC₂-Pflanze 5 bis zu 7 *D. glomerata* Chromosomen aufwies (s. Tab. 11), eine andere Sektion hingegen gar keine. In dieser hatte ein *L. multiflorum* Chromosom eine terminale von *D. glomerata* stammende Translokation (s. Abb. 43a-d). Bei späteren Untersuchungen (Pflanzenalter > 5 Monate) und während der Meiose wurde ausschließlich die von *D. glomerata* stammende terminale Translokation detektiert. Es lagen keine *D. glomerata* Chromosomen mehr vor.

Deutliche Anhaltspunkte für eine somatische Variabilität der *L. multiflorum* Chromosomen gab es nicht. Nur bei BC₂-Pflanze 3 könnte dies der Fall sein. Dort wurden nach 5 Monaten in Wurzelspitzenzellen 21 und auch 22 Chromosomen von *L. multiflorum* gefunden, diese aber nie zusammen in einem Klonteil, sondern immer in verschiedenen Klonteilen.

Bei BC₂-Pflanze 5 kamen stabil 22 *L. multiflorum* Chromosomen vor, nach 4 Monaten wies eines dieser 22 Chromosomen dabei immer eine von *D. glomerata* stammende Translokation auf. Trotz leichter Unsicherheiten in der Bestimmung der exakten Zahl, wies diese Pflanze doch bei sämtlichen Analysen jeweils wahrscheinlich 22 *L. multiflorum* Chromosomen auf.

Abb. 40 - Abb. 43e: Genomzusammensetzung von BC₂-Hybriden der Kombination *L. multiflorum* × *D. glomerata*

Chromosomen von *D. glomerata* oder ihre Teile erscheinen durch FITC-Markierung gelbgrün, während Chromosomen von *L. multiflorum* durch Gegenfärbung rot erscheinen.

Tabelle 11: Genomzusammensetzung in somatischen und generativen Organen von BC₂-Pflanzen der Kombination *L. multiflorum* × *D. glomerata*

Pflanze Alter, Organ und Stadium	Genomzusammensetzung ¹
BC₂-Pflanze 1 ≤ 4 Monate, Wurzelspitze, Mitose ≥ 9 Monate, Anthere (PMZ), Meiose	33 Lm + 7 Dg * XX Lm + 7 Dg
BC₂-Pflanze 2 ≤ 4 Monate, Wurzelspitze, Mitose ≥ 9 Monate, Anthere (PMZ), Meiose	28 Lm + 7 Dg * ca. 28 (±1) Lm + 2 Dg
BC₂-Pflanze 3 ≤ 4 Monate, Wurzelspitze, Mitose ≥ 5 Monate, Wurzelspitze, Mitose ≥ 9 Monate, Anthere (PMZ), Meiose	21 Lm + 1 bis 2 Dg * 21 und z. T. 22 Lm + 0 Dg 21 oder 22 Lm (unsicher) + 0 Dg
BC₂-Pflanze 4 ≤ 4 Monate, Wurzelspitze, Mitose ≥ 9 Monate, Anthere (PMZ), Meiose	38 Chromosomen ca. 31 (±1) Lm + 7 Dg
BC₂-Pflanze 5 ≤ 4 Monate, Wurzelspitze, Mitose ≥ 5 Monate, Wurzelspitze, Mitose ≥ 9 Monate, Anthere (PMZ), Meiose	ca. 22 (±1) Lm + 3 bis 7 Dg wie auch ca. 21 (±1) Lm + 1 Lm mit Dg-Translokation ca. 21 (±1) Lm + 1 Lm mit Dg-Translokation ca. 21 (±1) Lm + 1 Lm mit Dg-Translokation
BC₂-Pflanze 6 ≤ 4 Monate, Wurzelspitze, Mitose ≥ 9 Monate, Anthere (PMZ), Meiose	XX Lm + 1 (evtl. 2) Dg noch zu jung für Blüte
BC₂-Pflanzen 7-12 ≤ 4 Monate, Wurzelspitze, Mitose	im Bereich von 14 bis 28 Lm + 0 Dg

* Pflanzen und Angaben zur Genomzusammensetzung von OERTEL (unveröffentlicht)

¹ Anzahl der Chromosomen von den Elternarten: Lm = *L. multiflorum*, Dg = *D. glomerata*, XX = keine Angabe möglich

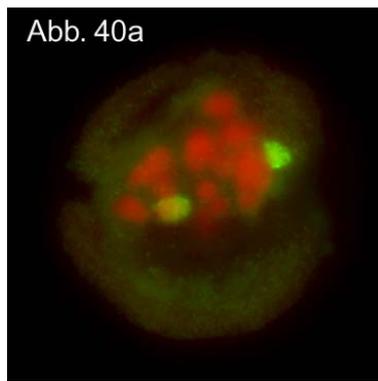


Abb. 40a

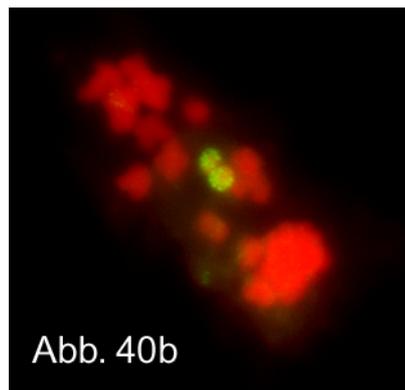


Abb. 40b

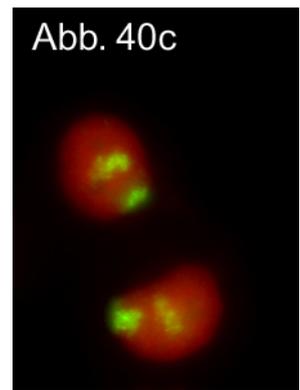


Abb. 40c

Abb. 40a+b: Meiotische Metaphase I in PMZ der BC₂-Pflanze 2: Neben den *L. multiflorum* Chromosomen liegen 2 zueinander nicht-homologe *D. glomerata* Chromosomen als Univalente vor, was vor allem in Abb. a deutlich wird.

Abb. 40c: Interphasekerne in Mikrosporen: Es sind deutlich die 2 *D. glomerata* Chromosomen zu erkennen.

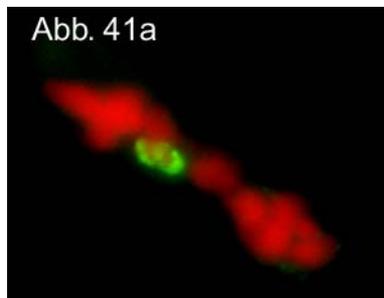


Abb. 41a

Abb. 41a: Meiose in PMZ der BC₂-Pflanze 6: Ein Chromosom von *D. glomerata* ist im Genom der Pflanze vorhanden.

Abb. 41b: Interphasekerne in Mikrosporen der BC₂-Pflanze 6: Das einzelne *D. glomerata* Chromosom ist auch in den Interphasekernen zu sehen.

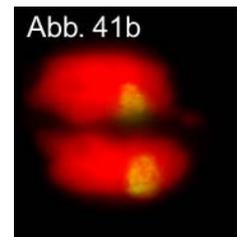


Abb. 41b

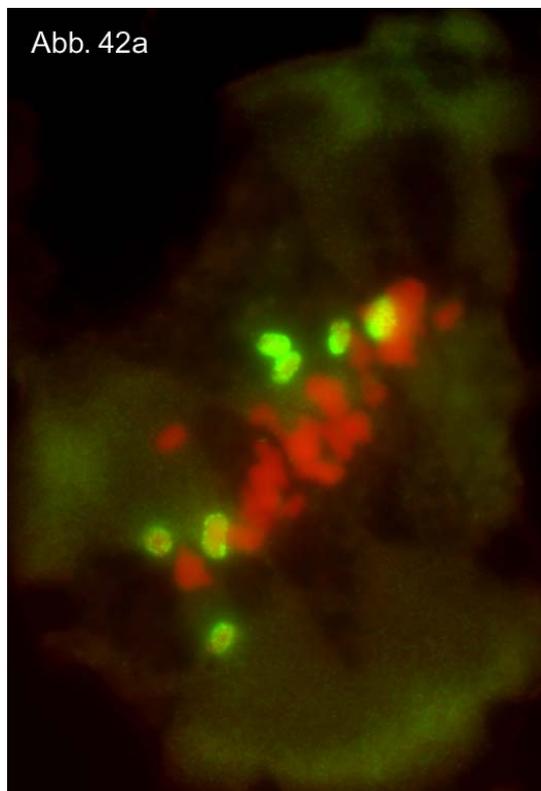


Abb. 42a

Abb. 42a+b: Meiotische Metaphase I (a) und meiotische Anaphase I (b) der BC₂-Pflanze 4: 7 Chromosomen von *D. glomerata* sind als Univalente zu erkennen, in Abb. b bei Ausblendung der FITC-Markierung.

Abb. 42c+d: Interphasekerne von Mikrosporen der BC₂-Pflanze 4: Mehrere *D. glomerata* Chromosomen sind zu erkennen.

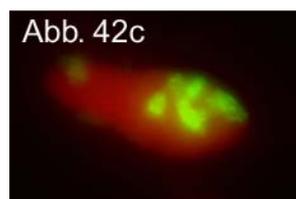


Abb. 42c

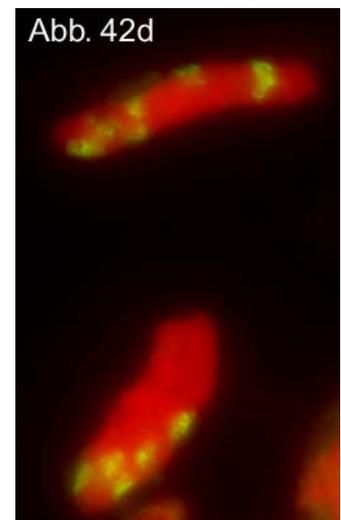


Abb. 42d

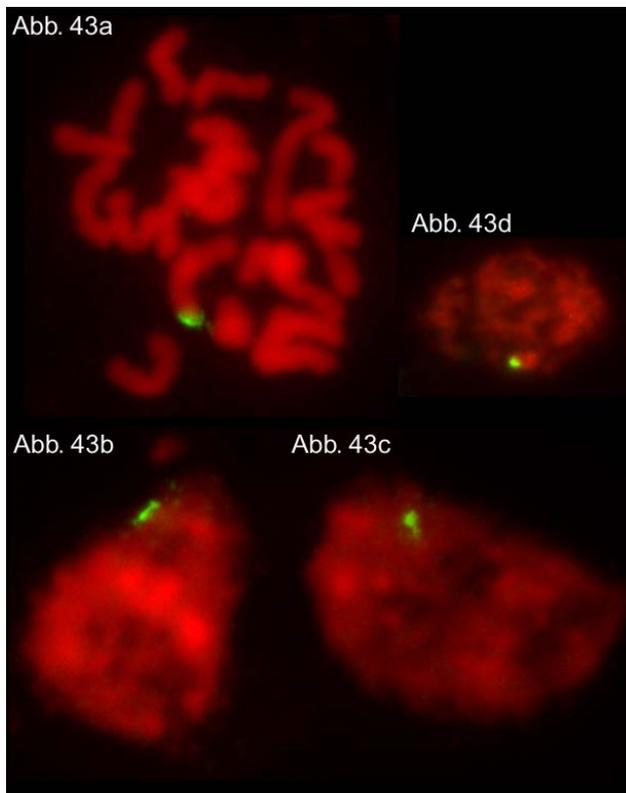
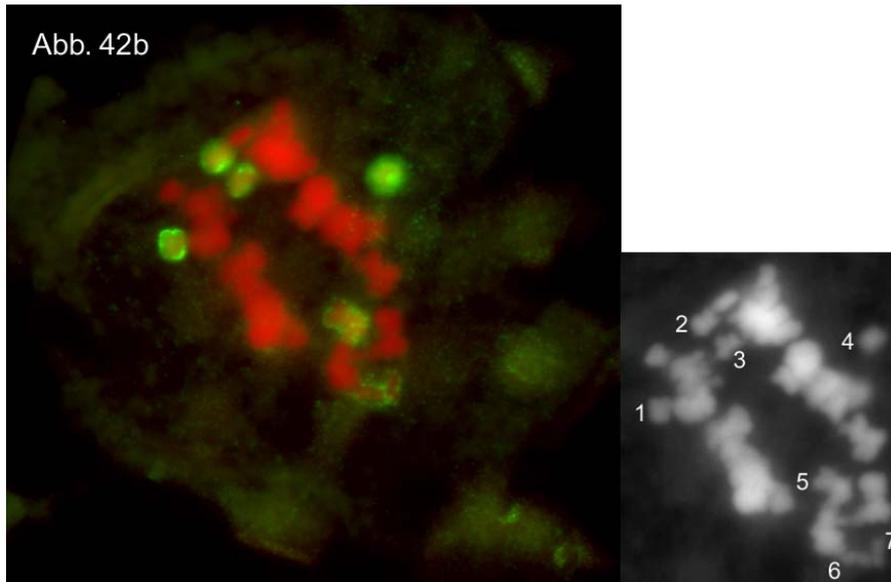
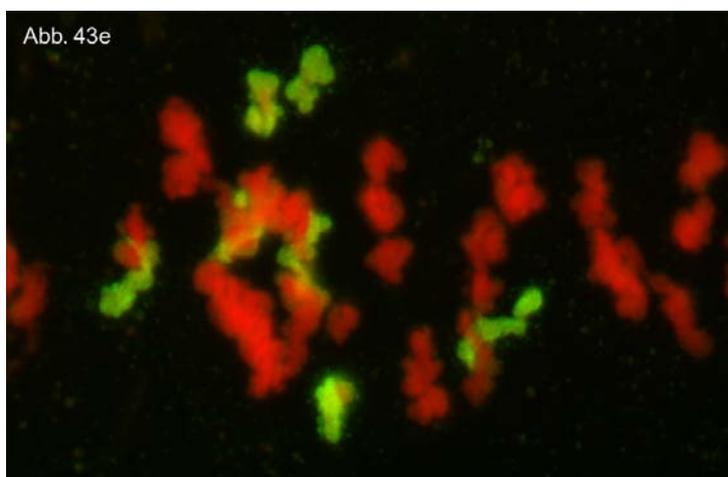


Abb. 43a-d: Mitotische Metaphase der BC₂-Pflanze 5: Eine *D. glomerata*-Translokation erscheint durch FITC-Markierung gelbgrün. Die Translokation ist am terminalen Ende lokalisiert (Abb. a). Sie ist ebenfalls in Interphasekernen zu erkennen, sowohl in Wurzelspitzenzellen (Abb. b+c) als auch in Mikrosporen (Abb. d).

Abb. 43e: Beim Quetschen artifiziiell deformierte mitotische Metaphasechromosomen der BC₂-Pflanze 5 im Jugendstadium: Es sind mehrere (wahrscheinlich 7) *D. glomerata* Chromosomen zu erkennen.



3.1.6.3 Nachkommen der BC₂-Hybriden

Kalli und Regenerate aus Antherenkultur

Die Antherenkultur von BC₂-Pflanzen verlief insgesamt erfolglos. Zwar gelang, anders als bei der Antherenkultur der BC₁-Pflanze 1, die Erzeugung von Kalli und Albinopflanzen, doch grüne Pflanzen wurden nicht regeneriert (s. Tab. 12). Von den 114 Kalli, die erhalten wurden, entfielen 108 Kalli auf BC₂-Pflanze 3, die zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich keinen Hybridcharakter mehr aufwies (s. 3.1.6.2, Tab. 11). BC₂-Pflanze 4, die Hybridcharakter aufwies (s. Tab. 11), zeigte mit der Regeneration von 2 Albinopflanzen aus 5 Kalli relativ hohe Regenerationsfähigkeit (s. Tab. 12).

Tabelle 12: Kalli und regenerierte Pflanzen aus Antherenkultur von BC₂-Hybriden

Donor-pflanze	Anzahl Antheren	Anzahl und Ausbeute ¹ an Kalli (% v. Antheren)	Anzahl und Ausbeute ¹ an Regeneraten insgesamt (% v. Kalli) ²	Anzahl an grünen Regeneraten
BC ₂ -Pfl. 1	175	1 (0,6 %)	0	–
BC ₂ -Pfl. 3	1182	108 (9,1 %)	3 (2,8 %)	0
BC ₂ -Pfl. 4	72	5 (6,9 %)	2 (40,0 %)	0

¹ Anzahl und Ausbeute (%) von den Antheren gebildeter Kalli bzw. Anzahl und Ausbeute (%) von den Kalli regenerierter Pflanzen insgesamt

² Hier sind alle regenerierten Pflanzen aufgeführt, d. h. sowohl Albinopflanzen als auch grüne Pflanzen.

Rückkreuzungsergebnisse der BC₂-Hybriden

Es gelang nicht, BC₃-Hybriden zu schaffen.

Bei den Kreuzungen mit Auxinbehandlung und Embryokultur wurden Embryonen – wie bei den Rückkreuzungen der BC₁-Pflanze 1 (s. 3.1.5.2) – nur bei den Kreuzungen mit *L. multiflorum* nicht aber bei den mit *D. glomerata* erhalten (s. Tab. 13). Eine Kreuzung von BC₂-Pflanze 1 als Pollenelter mit *L. multiflorum* als Samenelter resultierte in 35 Embryonen (ca. 56 % Embryofrequenz) und daraus hervorgehend 30 Pflanzen, die aber alle keine Hybridmerkmale mehr aufwiesen. Wahrscheinlich lag hier – aufgrund der außergewöhnlich hohen Embryofrequenz – Kontamination mit arteigenem, kompatiblen Pollen vor. Auch die 3 Pflanzen, die aus der Kreuzung der BC₂-Pflanze 3 als Samenelter mit *L. multiflorum* als Pollenelter hervorgingen (s. Tab. 13), zeigten keine Hybridmerkmale mehr. Es erwies sich, dass die BC₂-Pflanze 3 bei der Kreuzung nur noch *L. multiflorum* Chromosomen hatte (s. u. / s. 3.1.6.2), so dass die Nachkommen keinen Hybridcharakter aufweisen konnten.

Tabelle 13: Embryonen und Pflanzen aus Rückkreuzungen der BC₂-Hybriden mit Auxinbehandlung und Embryokultur

Samenelter	Bestäuber	Anzahl Blütenstände	Anzahl Blütchen	Embryonenzahl, (Embryofrequenz [%])	Anzahl Pflanzen ¹
<i>L. multiflorum</i>	BC ₂ -Pflanze 1	1	63	35 (55,6 %)	(30) 0
BC ₂ -Pflanze 1	<i>L. multiflorum</i>	3	282	2 (0,7 %)	(0) –
BC ₂ -Pflanze 1	<i>D. glomerata</i>	1	194	0	–
BC ₂ -Pflanze 2	<i>D. glomerata</i>	1	46	0	–
BC ₂ -Pflanze 3	<i>L. multiflorum</i>	1	78	5 (6,4 %)	(3) 0
BC ₂ -Pflanze 3	<i>D. glomerata</i>	1	33	0	–

¹ Die Zahl in Klammern gibt alle erzeugten Nachkommen an (ab 1-Blatt-Stadium). Hinter der Klammer sind alle Pflanzen aufgeführt, die das Pikieren in Erde überlebten und deren Hybridcharakter nach dem Pikieren eindeutig festgestellt wurde.

Aus Kreuzungen ohne Auxinbehandlung (Rückkreuzungen mit *L. multiflorum* und freie Abblüte) wurden zahlreiche Nachkommen erhalten, unter denen allerdings keine Hybriden identifiziert werden konnten, weder durch Analyse des Phänotyps noch durch Ermittlung der Genomzusammensetzung mittels GISH. Bei ausschließlicher Verwendung als Samenelter wurden bei Kreuzungen ohne Auxinapplikation von BC₂-Pflanze 1 insgesamt 65 und von BC₂-Pflanze 3 insgesamt 929 Nachkommen erzielt. 11 Nachkommen gingen hierbei aus der Verwendung der BC₂-Pflanze 4 sowohl als Samen- wie auch als Pollenelter hervor.

5 Nachkommen von BC₂-Pflanze 1 aus Kreuzungen ohne Auxinbehandlung, die im Phänotyp von *L. multiflorum* abwichen, wurden mittels GISH untersucht. Es waren keine *D. glomerata* Chromosomen oder nachweisbare Translokationen, die von *D. glomerata* stammen, vorhanden. Wie auch schon für die Nachkommen der BC₁-Pflanze 1 festgestellt (s. 3.1.5.2), sind wahrscheinlich die postzygotischen Barrieren bei Kreuzungen ohne Auxinbehandlung und Embryokultur zu stark. Da allerdings auch Kreuzungen mit Auxinbehandlung und Embryokultur nicht zu BC₃-Hybriden führten, könnten auch starke präzygotische Barrieren einen hohen Einfluss haben (s. 4.2). Die bei BC₂-Pflanze 3 im Bestockungsstadium nachgewiesenen ein bis zwei *D. glomerata* Chromosomen waren während der Blüte bereits eliminiert, es lagen also nur noch *L. multiflorum* Chromosomen vor, und folglich hatten die zahlreichen Nachkommen keine Merkmale von *D. glomerata*. 15 Nachkommen, die phänotypisch leicht von *L. multiflorum* abwichen, wurden dabei mittels GISH als reines *L. multiflorum* identifiziert. Über die mögliche Existenz sehr kleiner Introgressionen läßt sich keine Aussage treffen, da diese mit der GISH nicht erfasst werden (s. 4.6).

3.2 Antherenkultur von Hybriden zwischen *L. multiflorum*, *L. perenne* und *L. boucheanum* × *F. pratensis* (homöologe Genome)

3.2.0 Einführung

Für die tetraploiden Ausgangshybriden ist als Teil der Strategie zur Erzeugung von hoch fertilen und stabilen *Lolium-Festuca*-Hybriden mit balancierten Genomen (s. 1.2) das Durchlaufen von 2 Zyklen Antherenkultur ein essentieller Schritt für die Selektion von Pflanzen mit symmetrischen Translokationsmustern (s. Abb. 2, s. Abb. 63). Daher war es notwendig, die Technik der Antherenkultur für die *Lolium-Festuca*-Hybriden so zu optimieren, dass eine größtmögliche Ausbeute an reduzierten regenerierten grünen Pflanzen erhalten wird, um die Möglichkeit für die Selektion geeigneter Genotypen zu erhöhen.

3.2.1 Die verschiedenen Stufen der Regeneration und deren Genotypabhängigkeit

Pflanzen fortgeschrittener Generationen von 4 Ausgangskombinationen (s. 2.1.3) mit hoher Vitalität und guter Fertilität, Kronenrostresistenz sowie intermediärem Phänotyp zwischen *Lolium* und *Festuca pratensis* wurden als Donorpflanzen für den 1. Zyklus der Antherenkultur selektiert (s. Abb. 44). Besonderes Augenmerk galt hierbei der männlichen Fertilität, d. h. dehiszenten Antheren und vitalen Pollenkörnern (s. auch Abb. 58a-c sowie Abb. 60 und Abb. 61). Pflanzen der Ausgangskombination 2 [*Festuca pratensis* (4x) × *Lolium perenne* (4x); s. 2.1.3] erwiesen sich oft als weniger vital und fertil als die der anderen Kombinationen und wurden in dem 1. Zyklus der Antherenkultur in geringerem Umfang berücksichtigt (Daten nicht aufgeführt). Nachkommen der selektierten Pflanzen aus freier Abblüte, Selbstung und Pärchenkreuzung durchliefen nach Bonitur ebenfalls den 1. Zyklus Antherenkultur.



Abb. 44: Freilandanlage zur Selektion von Donorpflanzen für die Antherenkultur:

Familien (Nachkommen der gleichen Mutterpflanze) von jeweils 15 Pflanzen sind zu sehen, wobei sich die einzelnen Familien meist deutlich voneinander unterscheiden.

Es wurden im Rahmen des 1. Zyklus im Jahr 1999 zwischen 36 und 288 Antheren pro Donorpflanze aufgesetzt und im Jahr 2000 zwischen 72 und 352 Antheren. Im Rahmen des 2. Zyklus waren es 1999 zwischen 36 und 198 Antheren und 2000 zwischen 96 und 283 Antheren pro Donorpflanze.

In Tab. 14 ist die Häufigkeit der Kallusbildung und Pflanzenregeneration in zwei Zyklen Antherenkultur (I und II) bei *Lolium-Festuca*-Hybriden in Relation zur Anzahl jeweils einbezogener Donorpflanzen angegeben. Die Ergebnisse aus der Antherenkultur der Elternarten sind in Tab. 16 aufgeführt; den Vergleich mit den *Lolium-Festuca*-Hybriden zeigt Abb. 46.

Im 1. Zyklus (I) war in den Jahren 1999 und 2000 eine relativ hohe Regeneration bei allen Stufen in der Antherenkultur (Kalli, Albinos und grüne Pflanzen) zu verzeichnen. Im Vergleich dazu war die Ausbeute im Jahr 1998 deutlich geringer (s. Tab. 14).

Im 2. Zyklus (II) sowohl im Jahr 1999 als auch 2000 wurden nur wenige Kalli, fast keine Albinopflanzen und überhaupt keine grünen Pflanzen gebildet (s. Tab. 14). Die geringe Regenerationsfähigkeit im 2. Zyklus ist zum großen Teil begründet in der weitgehenden Sterilität der regenerierten Pflanzen aus dem 1. Zyklus (s. 3.2.3).

Die Regenerate der Ausgangskombinationen 1, 3 und 4 waren meistens vital; von ihnen starben weniger als 10 % im ersten Jahr ab. In der Ausgangskombination 2 hingegen gingen nur wenige, meistens schwach vitale Regenerate aus dem 1. Zyklus hervor, so dass sich diese Kombination im weiteren Verlauf als bedeutungslos erwies (Daten nicht aufgeführt).

Es ließ sich bei den *Lolium-Festuca*-Hybriden eine starke Genotypabhängigkeit bezüglich der Regeneration in Antherenkultur feststellen. Pflanzen mit einer hohen Eignung für die Antherenkultur (Regeneration von grünen Pflanzen) wurden identifiziert (s. Tab. 14). 14 der insgesamt 39 Genotypen des 1. Zyklus im Jahr 1999 regenerierten grüne Pflanzen und auch die bei weitem meisten Kalli und fast alle Albinopflanzen (s. Tab. 14). Diese Pflanzen wurden im Folgenden aufgrund ihrer hohen Regenerationsfähigkeit als gut geeignet für die Antherenkultur betrachtet (s. Tab. 14: AI). 11 dieser 14 Genotypen aus dem Jahr 1999 waren im Jahr 2000 vital genug, um sie nochmals für den 1. Zyklus als Donorpflanzen zu verwenden (s. Tab. 14: WAI). Alle bildeten bei der Wiederholung im Jahr 2000 Kalli, 10 der 11 Genotypen regenerierten erneut grüne Pflanzen.

Die Ausbeuten an Kalli, Pflanzen insgesamt und grünen Pflanzen waren dabei in etwa auf dem gleichen Niveau wie bei den 14 gut geeigneten Genotypen im Jahr 1999 (s. Tab. 14). Die größten Unterschiede fanden sich in der Ausbeute an Kalli (AI 1999: 45,3 %; WAI 2000: 38,0 %), weniger in der Ausbeute an Regeneraten. Bestätigt wird dieses auch durch die Betrachtung einzelner Donorpflanzen. Bei diesen traten teilweise größere Unterschiede in der Regeneration zwischen den beiden Jahren 1999 und 2000

auf, dies aber vor allem die Ausbeute an Kalli betreffend (s. Pflanzen 8+9: Tab. 15 und Abb. 45).

Tabelle 14: Kallusbildung und Pflanzenregeneration in zwei Zyklen Antherenkultur (I und II) bei *Lolium-Festuca*-Hybriden in Relation zur Anzahl jeweils einbezogener Donorpflanzen

Donor- pflanzen Jahr, Zyklus, (Ploidie) ¹	Anzahl der Antheren (und Donor- pfl. ²)	Kalli		Regenerierte Pflanzen insgesamt ³		Grüne Regenerate	
		Anzahl (v. Anz. Donorpfl.) ²	Ausbeute in % von Antheren	Anzahl (v. Anz. Donorpfl.) ²	Ausbeute in % von Kalli	Anzahl (v. Anz. Donorpfl.) ²	Ausbeute in % von Kalli
1998 I (4x)	1449 (27)	121 (9)	8,4 %	19 (6)	15,7 %	3 (2)	2,5 %
1999 I (4x)	3379 (39)	784 (24)	23,2 %	288 (16)	36,7 %	122 (14)	15,6 %
1999 AI (4x)	1566 (14)	710 (14)	45,3 %	278 (14)	39,2 %	122 (14)	17,2 %
1999 RI (4x)	1813 (25)	74 (10)	4,1 %	10 (2)	13,5 %	0 (-)	0 %
2000 WAI (4x)	1672 (11)	636 (11)	38,0 %	272 (10)	42,8 %	100 (10)	15,7 %
1999 II (2x/4x)	496 (3)	37 (2)	7,5 %	4 (2)	10,8 %	0 (-)	0 %
2000 II (meist 2x)	3710 (51)	104 (11)	2,8 %	12 (1)	11,5 %	0 (-)	0 %

¹ I = 1. Zyklus; II = 2. Zyklus; I 1999 = AI 1999 + RI 1999; AI = ausgewählte Pflanzen vom 1. Zyklus; RI = restliche Pflanzen des 1. Zyklus nach Ausgliederung der AI; WAI = Wiederholung des 1. Zyklus im 2. Jahr mit AI-Pflanzen

² Anzahl der Donorpflanzen, von denen Antheren aufgesetzt wurden bzw. die dann jeweils Kalli, Pflanzen (Albino- und grüne) und grüne Pflanzen regenerierten

³ Hier sind alle regenerierten Pflanzen aufgeführt, d. h. sowohl Albinopflanzen als auch grüne Pflanzen.

Die unterschiedliche Regenerationsfähigkeit einzelner Pflanzen in den verschiedenen Stufen der Antherenkultur (Kalli, Pflanzen insgesamt und grüne Pflanzen; s. Abb. 47 - Abb. 51) verdeutlichen Tab. 15 und Abb. 45. Es traten zwischen den Donorpflanzen sehr große Unterschiede in der Regeneration auf.

Tabelle 15: Kallusbildung und Pflanzenregeneration in Antherenkultur für einzelne tetraploide *Lolium-Festuca*-Hybriden

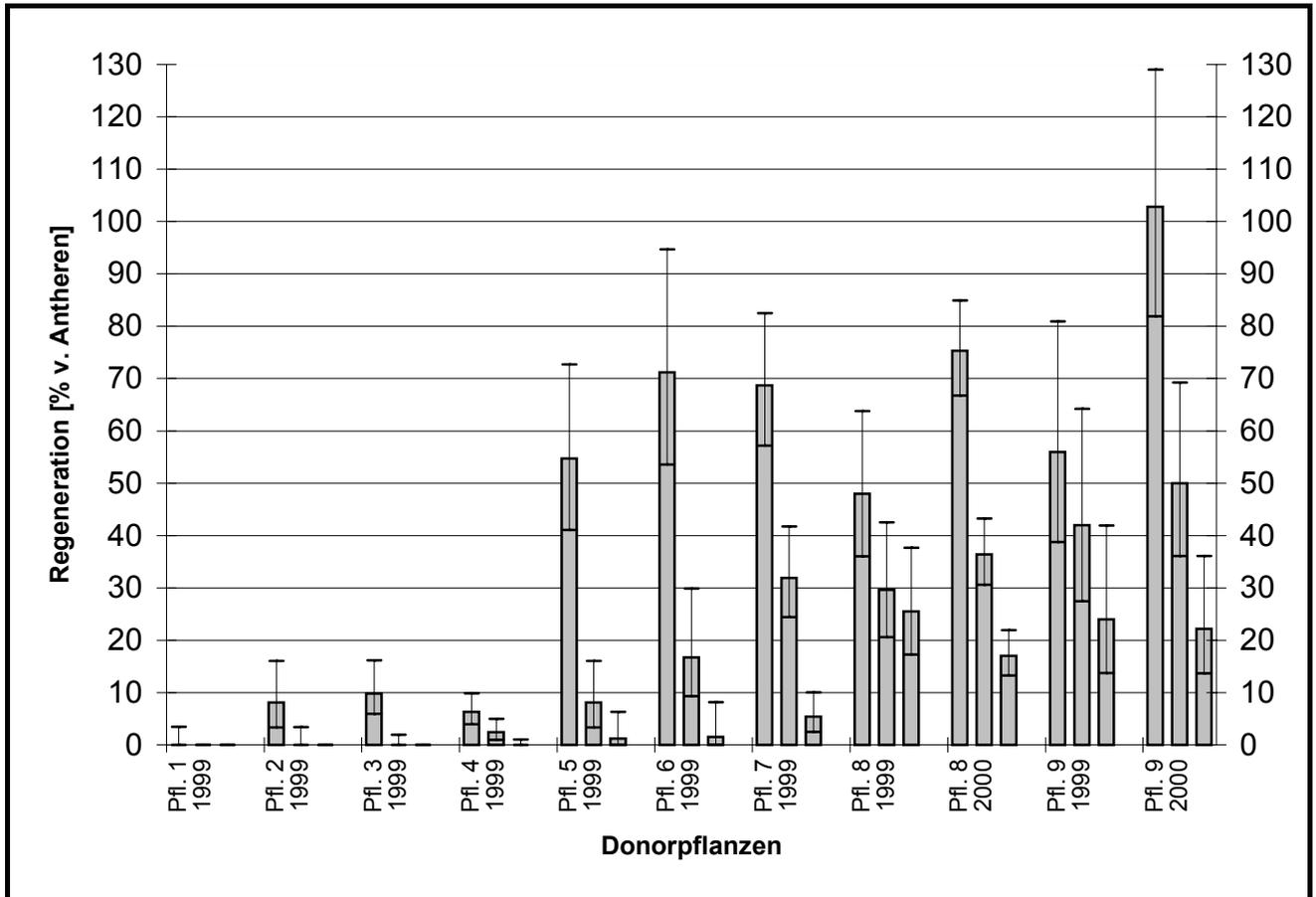
Pflanze und Jahr	Anzahl Antheren	Kalli		Regenerierte Pflanzen insges. ¹		Grüne Pflanzen	
		Anzahl	<u>Ausbeute</u> in % von Antheren	Anzahl	<u>Ausbeute</u> % v. Kalli (% von Antheren)	Anzahl	<u>Ausbeute</u> % v. Kalli (% von Antheren)
Pflanze 1 1999	85	0	0 %	–	–	–	–
Pflanze 2 1999	86	7	8,1 %	0	0 %	–	–
Pflanze 3 1999	153	15	9,8 %	0	0 %	–	–
Pflanze 4 1999	288	18	6,3 %	7	38,9 % (2,4 %)	0	0 %
Pflanze 5 1999	86	47	54,7 %	7	14,9 % (8,1 %)	1	2,1 % (1,2 %)
Pflanze 6 1999	66	47	71,2 %	11	23,4 % (16,7 %)	1	2,1 % (1,5 %)
Pflanze 7 1999	166	114	68,7 %	53	46,5 % (31,9 %)	9	7,9 % (5,4 %)
Pflanze 8 1999	98	47	48,0 %	29	61,7 % (29,6 %)	25	53,2 % (25,5 %)
Pflanze 8 2000	352	265	75,3 %	128	48,3 % (36,4 %)	60	22,6 % (17,0 %)
Pflanze 9 1999	50	28	56,0 %	21	75,0 % (42,0 %)	12	42,9 % (24,0 %)
Pflanze 9 2000	72	74	102,8 %	36	48,6 % (50,0 %)	16	21,6 % (22,2 %)

¹ Hier sind alle regenerierten Pflanzen aufgeführt, d. h. sowohl Albinopflanzen als auch grüne Pflanzen.

Pflanze 8 und Pflanze 9 (s. Tab. 15) regenerierten im Jahr 2000 signifikant mehr Kalli als 1999 (s. Abb. 45). Die Pflanzenregeneration aus diesen Kalli war aber deutlich niedriger als 1999 (s. Tab. 15), so dass die Ausbeute an Pflanzen in beiden Jahren bei diesen beiden Donorpflanzen als gleich angesehen werden kann (s. Tab. 15 und Abb. 45). Abb. 45 zeigt für die Donorpflanzen aus Tab. 15 jeweils mit den Konfidenzintervallen die Ausbeute an Kalli, regenerierten Pflanzen insgesamt und grünen Regeneraten bezogen auf die Anzahl aufgesetzter Antheren.

Aus einzelnen Antheren ging teilweise auch mehr als nur ein Kallus hervor. (s. Tab. 15: Pflanze 9 im Jahr 2000).

Abb. 45: Ausbeute an Kalli und Pflanzen mit den jeweiligen Konfidenzintervallen ($\alpha = 0,05$) bei ausgewählten *Lolium-Festuca*-Hybriden: Bei den einzelnen Donorpflanzen gibt die erste Säule (von links) den Anteil regenerierter Kalli, die zweite den Anteil regenerierter Pflanzen insgesamt und die dritte den Anteil regenerierter grüner Pflanzen an, alle Säulen jeweils bezogen auf die Anzahl aufgesetzter Antheren.



Mit einigen Futtergrasarten, den Ausgangsarten der intergenerischen Hybriden und Kreuzungen, wurde Antherenkultur durchgeführt (s. Tab. 16). Hauptsächlich geschah dies in den Jahren 1999 und 2000, die bei der Antherenkultur der *Lolium-Festuca*-Hybriden durch eine relativ hohe Regeneration gekennzeichnet waren. Die Regenerationsfähigkeit der Ausgangsarten (incl. Konfidenzintervall) im Vergleich zu den *Lolium-Festuca*-Hybriden veranschaulicht Abb. 46.

Tabelle 16: Kallusbildung und Pflanzenregeneration in Antherenkultur von Elternarten, die für intergenerische Kreuzungen eingesetzt wurden

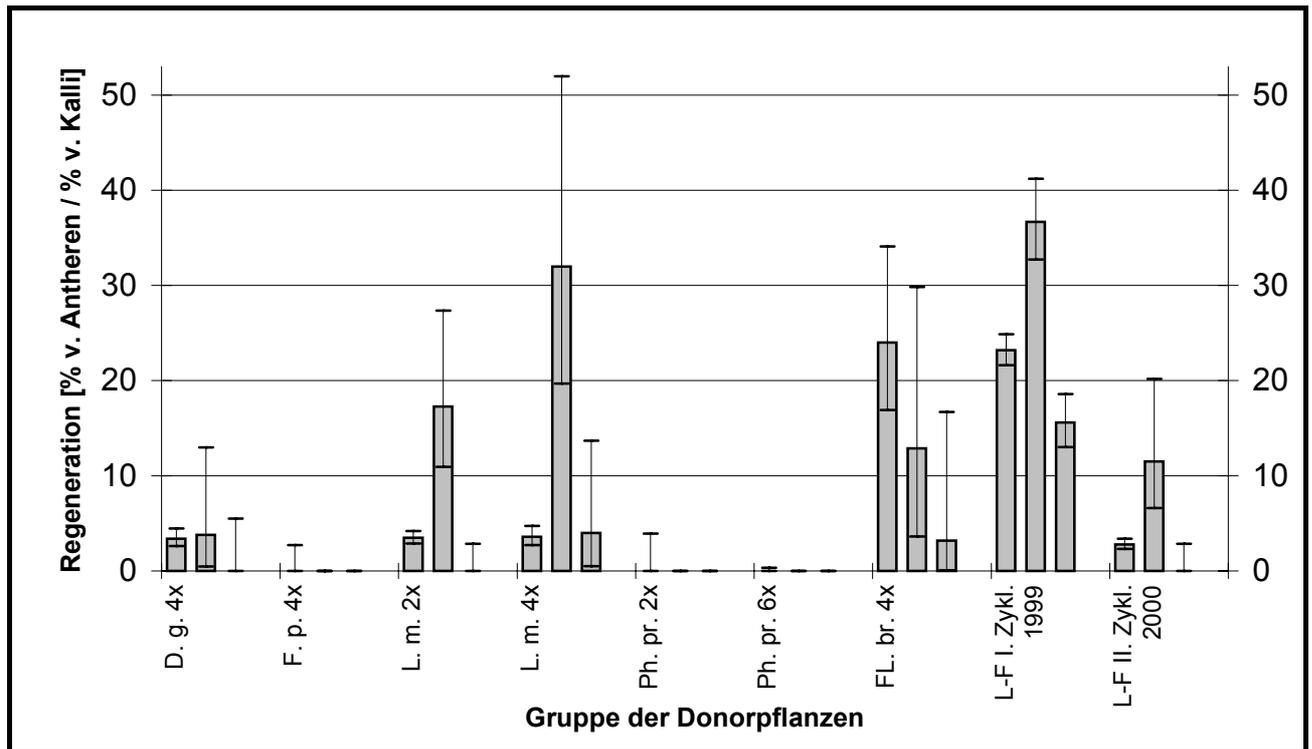
Art (Ploidie)	Anzahl ² der Antheren (und Donor- pfl. ¹)	Kalli		Regenerierte Pflanzen ³		Grüne Pflanzen	
		Anzahl (v. Anz. Donorpfl.) ¹	Ausbeute in % von Antheren	Anzahl (v. Anz. Donorpfl.) ¹	Ausbeute in % von Kalli	Anzahl (v. Anz. Donorpfl.) ¹	Ausbeute in % von Kalli
<i>D. glomerata</i> (4x)	1550 (23)	53 (5)	3,4 %	2 (1)	3,8 %	0 (-)	0 %
<i>F. pratensis</i> (4x)	109 (3)	0 (-)	0 %	-	-	-	-
<i>L. multiflorum</i> (2x)	2995 (37)	104 (15)	3,5 %	18 (5)	17,3 %	0 (-)	0 %
<i>L. multiflorum</i> (4x)	1395 (23)	50 (11)	3,6 %	16 (4)	32,0 %	2 (1)	4,0 %
<i>Ph. pratense</i> (2x)	75 (1)	0 (-)	0 %	-	-	-	-
<i>Ph. pratense</i> (6x)	912 (14)	0 (-)	0 %	-	-	-	-
<i>Festulolium braunii</i> (4x)	129 (2)	31 (1)	24,0 %	4 (1)	12,9 %	1 (1)	3,2 %

¹ Anzahl der Donorpflanzen, von denen Antheren aufgesetzt wurden bzw. die dann jeweils Kalli, Pflanzen (Albino- und grüne) und grüne Pflanzen regenerierten

² Es wurden zwischen 36 und 171 Antheren pro Donorpflanze aufgesetzt.

³ Hier sind alle regenerierten Pflanzen aufgeführt, d. h. sowohl Albinopflanzen als auch grüne Pflanzen.

Abb. 46: Kallusbildung und Pflanzenregeneration mit den jeweiligen Konfidenzintervallen ($\alpha = 0,05$) bei den Elternarten der intergenerischen Kreuzungen (s. Tab. 16) im Vergleich zu *Lolium-Festuca*-Hybriden des I. Zyklus 1999 und II. Zyklus 2000 (s. Tab. 14): Bei den einzelnen Donorpflanzengruppen gibt die erste Säule (von links) den Anteil regenerierter Kalli bezogen auf die Anzahl aufgesetzter Antheren, die zweite den Anteil regenerierter Pflanzen insgesamt bezogen auf die Anzahl aufgesetzter Kalli und die dritte den Anteil regenerierter grüner Pflanzen bezogen auf die Anzahl aufgesetzter Kalli an.



Die Kallusregeneration und sehr wahrscheinlich auch die Bildung von grünen Pflanzen war bei tetraploidem *L. multiflorum* signifikant schlechter als bei den tetraploiden *Lolium-Festuca*-Hybriden (s. Abb. 46 und Vgl. Tab. 14 mit Tab. 16). Die Regeneration von Pflanzen aus den Kalli hingegen scheint bei beiden Gruppen etwa gleich hoch zu sein. Bei *D. glomerata* ist dieser Wert deutlich niedriger (s. Abb. 46).

Bei diploidem und tetraploidem *L. multiflorum* war die Ausbeute an Kalli gleich (s. Abb. 46). Tetraploides *L. multiflorum* zeigte wohl eine höhere Regeneration an Pflanzen aus den Kalli als diploides. Die Konfidenzintervalle überlappen sich hierbei, wobei die Mittelwerte allerdings nicht im Bereich des Intervalls der jeweils anderen Ploidiestufe liegen. Eine höhere Pflanzenregeneration lässt sich bei tetraploidem *L. multiflorum* damit erklären, dass genetische Defekte eher als bei diploidem *L. multiflorum* kompensiert werden können, da selbst nach Halbierung des Pflanzengenoms noch zwei *L. multiflorum* Genome vorliegen.

Die Kallus- und Pflanzenregeneration von diploidem *L. multiflorum* (s. Tab. 16 und Abb. 46) erscheinen etwas höher als bei den meist diploiden *Lolium-Festuca* Pflanzen des 2. Zyklus (s. in Tab. 14 und Abb. 46: 1999 II, 2000 II und L-F II. Zykl. 2000), die ja selbst im 1. Zyklus Antherenkultur regeneriert worden waren.

Die Regeneration an Pflanzen insgesamt und grünen Pflanzen der zugelassenen *Festulolium*-Sorte 'Paulita' (\times *Festulolium braunii* [Richt.] A. Lamus) lag unter der bei den im 1. Zyklus verwendeten *Lolium-Festuca*-Hybriden, bzgl. der regenerierten Pflanzen insgesamt war dies signifikant (s. Abb. 46). Neben der geringen Anzahl aufgesetzter Antheren von der Sorte 'Paulita' lassen auch die Schwankungen in der

Ergebnisse

Antherenkultureignung zwischen verschiedenen Genotypen keine sichere Aussage zu, zumal nur 2 Genotypen von 'Paulita' verwendet wurden (s. Tab. 16).

Von *F. pratensis* wurden in Antherenkultur keine Kalli regeneriert, der geringe Umfang der Versuche lässt aber auch hier keine endgültigen Aussagen über die Antherenkultureignung zu. Bei *Ph. pratense* kann hingegen von einer schlechten Eignung für die Antherenkultur aufgrund mangelnder Kallusregeneration ausgegangen werden. Da insgesamt 15 Genotypen (s. Tab. 16) dreier Sorten/Ökotypen (s. Tab. 1) verwendet wurden, war das Ergebnis wahrscheinlich nicht vom verwendeten Genotyp abhängig.

Die tetraploiden *Lolium-Festuca*-Hybriden zeigten insgesamt eine höhere Regeneration in Antherenkultur als die autopolyploiden Pflanzen ohne Hybridcharakter (*D. glomerata*, *F. pratensis*, *L. multiflorum* und *Ph. pratense*), vor allem die Bildung von Kalli und grünen Pflanzen betreffend (s. Abb. 46). Die im Verhältnis dazu sehr geringe Regeneration in Antherenkultur von den im 1. Zyklus gebildeten Pflanzen lässt sich mit der hohen Sterilität dieser Pflanzen erklären.



Abb. 47: Beginn der Kallusbildung

Abb. 48: Anthere (links) und gebildeter Kallus (rechts)

Kalli der *Lolium-Festuca*-Hybriden erreichten eine Größe, die eine Überführung von Induktionsmedium (IM) auf Regenerationsmedium (RM) zuließ (≥ 2 mm Durchmesser), frühestens 26 d nach Aufsetzen der Antheren auf IM (s. Tab. 17). In Tab. 17, die die Pflanzenregeneration in Antherenkultur in Beziehung zur Wachstumsgeschwindigkeit der Kalli setzt, wurden nur Pflanzen mit einer hohen Regenerationsfähigkeit einbezogen (s. Tab. 14 und Tab. 15).

Tabelle 17: Regeneration von Pflanzen in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit der Kalli

Donorpflanze	Zeit bis zum Transfer des Kallus [d] ¹	Anzahl Kalli	Regenerierte Pflanzen insgesamt ²		Grüne Pflanzen	
			Anzahl	Ausbeute in % von Kalli	Anzahl	Ausbeute in % von Kalli
Pflanze 8 2000	26 – 29	7	5	71,4 %	4	57,1 %
	31 – 38	37	29	78,4 %	17	45,9 %
	40 – 49	73	47	64,4 %	22	30,1 %
	51 – 62	57	38	66,7 %	15	26,3 %
	66 – 87	21	9	42,9 %	3	14,3 %
	90 – 119	13	0	0 %	–	–
	120 – ∞	1	0	0 %	–	–
Pflanze 9 2000	26 – 29	9	9	100 %	6	66,7 %
	31 – 38	26	18	69,2 %	8	30,8 %
	40 – 49	20	5	25,0 %	2	10,0 %
	51 – 62	6	2	33,3 %	0	0 %
	66 – 87	1	0	0 %	–	–
	90 – 119	1	1	100 %	0	0 %
	120 – ∞	0	–	–	–	–
Pflanze 10 2000	26 – 29	10	14	140 %	12	120 %
	31 – 38	9	8	88,9 %	7	77,8 %
	40 – 49	16	12	75,0 %	4	25,0 %
	51 – 62	15	8	53,3 %	2	13,3 %
	66 – 87	6	0	0 %	–	–
	90 – 119	0	–	–	–	–
	120 – ∞	2	0	0 %	–	–
Pflanze 11 2000	26 – 29	1	0	0 %	–	–
	31 – 38	21	15	71,4 %	5	23,8 %
	40 – 49	12	8	66,7 %	2	16,7 %
	51 – 62	9	5	55,6 %	1	11,1 %
	66 – 87	7	1	14,3 %	0	0 %
	90 – 119	4	0	0 %	–	–
	120 – ∞	3	1	33,3 %	0	0 %
Pflanze 7 1999	26 – 29	10	10	100 %	3	30,0 %
	31 – 38	44	32	72,7 %	4	9,1 %
	40 – 49	30	12	40,0 %	2	6,7 %
	51 – 62	19	2	10,5 %	0	0 %
	66 – 87	5	1	20,0 %	0	0 %
	90 – 119	3	0	0 %	–	–
	120 – ∞	10	1	10,0 %	0	0 %
Pflanze 8 1999	26 – 29	3	3	100 %	2	66,7 %
	31 – 38	25	21	84,0 %	19	76,0 %
	40 – 49	10	5	50,0 %	3	30,0 %

Ergebnisse

	51 – 62	5	1	20,0 %	1	20,0 %
	66 – 87	3	0	0 %	–	–
	90 – 119	0	–	–	–	–
	120 – ∞	1	0	0 %	–	–
Pflanze 11 1999	26 – 29	2	2	100 %	2	100 %
	31 – 38	14	9	64,3 %	5	35,7 %
	40 – 49	21	11	52,4 %	6	28,6 %
	51 – 62	11	5	45,5 %	4	36,4 %
	66 – 87	16	2	12,5 %	1	6,3 %
	90 – 119	2	0	0 %	–	–
	120 – ∞	6	0	0 %	–	–
Pflanze 12 1999	26 – 29	9	8	88,9 %	4	44,4 %
	31 – 38	40	31	77,5 %	20	50,0 %
	40 – 49	3	2	66,7 %	0	0 %
	51 – 62	21	4	19,0 %	1	4,8 %
	66 – 87	4	1	25,0 %	0	0 %
	90 – 119	3	0	0 %	–	–
	120 – ∞	1	0	0 %	–	–
Summe Pflanzen	26 – 29	51	51	100 %	33	64,7 %
	31 – 38	216	164	75,9 %	85	39,4 %
	40 – 49	185	102	55,1 %	41	22,2 %
	51 – 62	143	65	45,5 %	24	16,8 %
	66 – 87	63	14	22,2 %	4	6,3 %
	90 – 119	26	1	3,8 %	0	0 %
	120 – ∞	24	2	8,3%	0	0 %

¹ Zeitdauer bis zum Transfer eines Kallus von Induktionsmedium auf Regenerationsmedium als Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit des Kallus; hierzu ist ein Durchmesser von mind. 2 mm zu erreichen

² Hier sind alle regenerierten Pflanzen aufgeführt, d. h. sowohl Albinopflanzen als auch grüne Pflanzen.

Teilweise gingen aus einer Anthere mehrere Kalli (s. Tab. 15: Pflanze 9 im Jahr 2000) und selten aus einem Kallus mehrere Pflanzen hervor, z. B. bei Pflanze 10 im Jahr 2000 (Prozentzahl > 100; s. Tab. 17). Hieraus erklärt sich auch in der Zusammenfassung am Ende der Tab. 17 die Angabe „100 %“ bei den „regenerierten Pflanzen insgesamt“ für den Transferzeitraum 26 - 29 d. 100 % dort bedeuten nicht, dass alle Kalli genau eine Pflanze regeneriert haben. Vielmehr haben die meisten Kalli dies zwar getan, aus einigen gingen aber auch 2 oder sehr selten 3 Pflanzen hervor und aus anderen dafür keine.

Die meisten Kalli (401/708 = 56,6 %) erreichten 31-49 d nach Aufsetzen der Antheren auf IM, das entspricht den beiden Zeitintervallen 31-38 d und 40-49 d in der Tab. 17, eine Größe, die eine Pflanzenregeneration nach Transfer auf RM chancenreich erschienen ließ (s. Tab. 17). Anschließend sank die Zahl an Kalli, die diese Größe erreichten. 51-62 d nach Start der Antherenkultur erreichten mit 143 von insgesamt 708

gebildeten Kalli (20,2 %) noch relativ viele eine transferierbare Größe. Nach 66-87 d aber war die Anzahl entsprechender Kalli mit 63 von 708 gebildeten (8,9 %) schon deutlich reduziert und anschließend nur noch gering bis vereinzelt (ca. 3,5 %). Es gingen nach ca. 65 d zunehmend Kalli aus Antheren hervor, die schon Kalli gebildet hatten. Die spät gebildeten Kalli wiesen meist keine Fähigkeit zur Pflanzenregeneration auf (s. Tab. 17). Sie blieben entweder sehr klein oder bildeten nur einen weichen, körnigen Zellhaufen ohne Gewebestruktur.



Abb. 49: 2-Blatt-Stadium einer Albinopflanze auf Regenerationsmedium (RM)

Abb. 50: Teilweise grüne Pflanze auf RM: Der Albinoteil des Regenerates verkümmerte später, während sich das grüne Segment weiterentwickelte.

Abb. 51: Pflanze auf RM mit nur einem geringen Anteil chlorophyllhaltigen Gewebes



Abb. 50

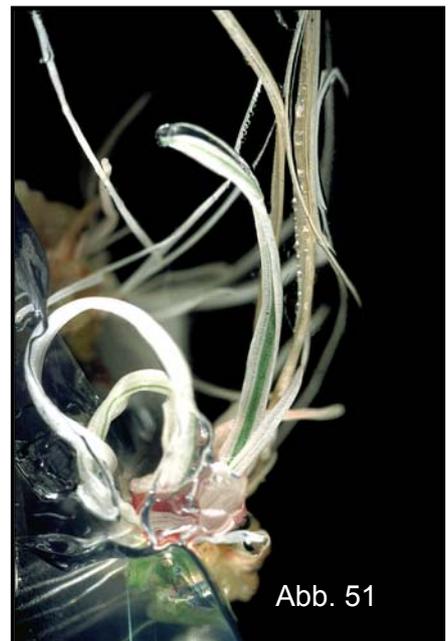


Abb. 51

Je länger die Kalli bis zum Erreichen einer transferierbaren Größe brauchten (von IM auf RM), desto mehr reduzierte sich der Anteil von ihnen regenerierter Pflanzen (grüne und Albinos, s. Tab. 17). Offensichtlich werden nur bis zu einem gewissen Zeitpunkt Kalli mit der Fähigkeit zur Regeneration von Pflanzen gebildet. Langsam wachsende Kalli, die erst nach mehr als ca. 90 d die erforderliche Größe zur Regeneration erreichten, bildeten keine grünen Pflanzen und nur sehr selten Albinos.

Für 120 grüne Pflanzen, die aus der Antherenkultur hervorgegangen waren, wurde die Ploidiestufe ermittelt (s. Tab. 18 + Tab. 19; s. Abb. 52 bis Abb. 56 und 2.7.2). 76,7 % der analysierten, von tetraploiden Donorpflanzen regenerierten grünen Pflanzen waren diploid. 15,0 % waren tetraploid, 7,5 % aneuploid und 0,8 % (eine Pflanze) haploid (s. Tab. 18).

Je länger die Kallusphase dauerte, d. h. je länger der Kallus brauchte, um eine Größe zu erreichen, die einen Transfer auf RM zuließ, desto größer scheint die Wahrscheinlichkeit, dass ein aneuploides oder mixoploides Regenerat gebildet wurde. Eine Unterscheidung zwischen Aneuploidie und Mixoploidie wurde nicht durchgeführt. Die Kalli wurden nach Erreichen eines Durchmessers von wenigstens 2 mm transferiert (s. 2.7.1).

Tabelle 18: Abhängigkeit der Ploidiestufe der Regenerate von der Wachstumsgeschwindigkeit der Kalli bei *Lolium-Festuca*-Hybriden ($2n=4x$)

<u>Zeitspanne vom Aufsetzen der</u>		<u>Anzahl der Regenerate in den Ploidiestufen:</u>			
<u>Antheren bis zum:</u>		2x	4x	1x	deutlich aneuploid
Transfer des Kallus	Pikieren der grünen Regenerate	Anzahl n (Anteil in %)	Anzahl n (Anteil in %)	Anzahl n (Anteil in %)	Anzahl n (Anteil in %)
28 - 29 d	38 - 111 d	9 (64,3 %)	5 (35,7 %)	0	0
31 - 35 d	38 - 111 d	49 (94,2 %)	1 (1,9 %)	1 (1,9 %)	1 (1,9 %)
37 - 48 d	50 - 122 d	13 (56,5 %)	6 (26,1 %)	0	4 (17,4 %)
55 - 69 d	71 - 110 d	8 (53,3 %)	3 (20,0 %)	0	4 (26,7 %)
unbekannt ¹	unbekannt ¹	13 (81,3 %)	3 (18,8 %)	0	0
Summe:		92 (76,7 %)	18 (15,0 %)	1 (0,8 %)	9 (7,5 %)

¹ Die 16 Regenerate waren von POSSELT (unveröffentlicht) bezogen wurden.

Tab. 19 zeigt für 13 tetraploide *Lolium-Festuca*-Donorpflanzen, von wievielen grüne Regenerate in welchen Ploidiestufen hervorgebracht wurden. Es ist ersichtlich, dass alle außer einer der 13 Donorpflanzen diploide (reduzierte) Pflanzen regeneriert haben. Diese Donorpflanze bildete allerdings insgesamt nur ein einziges Regenerat (tetraploid). Von den 13 Donorpflanzen bildeten nur 6 tetraploide und nur 4 aneuploide Regenerate. Die Fähigkeit, tetraploide und aneuploide Regenerate zu bilden, könnte wie die generelle Fähigkeit zur Pflanzenregeneration genotypabhängig sein. Von einigen Donorpflanzen waren alle untersuchten Regenerate diploid, von anderen hingegen mehr als die Hälfte tetraploid und aneuploid (s. Tab. 19).

Tabelle 19: Ploidiestufen der Regenerate bezogen auf die Donorpflanzen

<u>Donorpflanze</u> (2n=4x)	<u>Anzahl n der Regenerate in den Ploidiestufen:</u>			
	2x n (Anteil in %)	4x n (Anteil in %)	1x n (Anteil in %)	deutlich aneuploid n (Anteil in %)
Pflanze 6	1 (100 %)	0	0	0
Pflanze 7	2 (28,6 %)	5 (71,4 %)	0	0
Pflanze 8	22 (95,7 %)	0	0	1 (4,3 %)
Pflanze 9	12 (100 %)	0	0	0
Pflanze 11	7 (43,8 %)	4 (25,0 %)	1 (6,3 %)	4 (25,0 %)
Pflanze 12	21 (100 %)	0	0	0
Pflanze 13	7 (77,8 %)	1 (11,1 %)	0	1 (11,1 %)
Pflanze 14	4 (44,4 %)	2 (22,2 %)	0	3 (33,3 %)
Pflanze 15	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)	0	0
Pflanze 16	1 (100 %)	0	0	0
Pflanze 17	1 (100 %)	0	0	0
Pflanze 18	0	1 (100 %)	0	0
'Paulita'-Pflanze 1 ¹	13 (81,3 %)	3 (18,8 %)	0	0
Summe:	13	18 (15,0 %)	1 (0,8 %)	9 (7,5 %)

¹ Sämtliche 16 Regenerate dieser Donorpflanze waren von POSSELT (unveröffentlicht) bezogen wurden.

Ergebnisse

Abb. 52 - Abb. 54 zeigen die Ploidiestufenbestimmung mittels Durchflusscytometrie bei aus Antherenkultur regenerierten *Lolium-Festuca*-Hybriden anhand des relativen DNS-Gehaltes von Zellkernen aus Blättern. Aus der Lage des Histogrammscheitelwertes auf der Abszisse lässt sich auf die Ploidiestufe schließen.

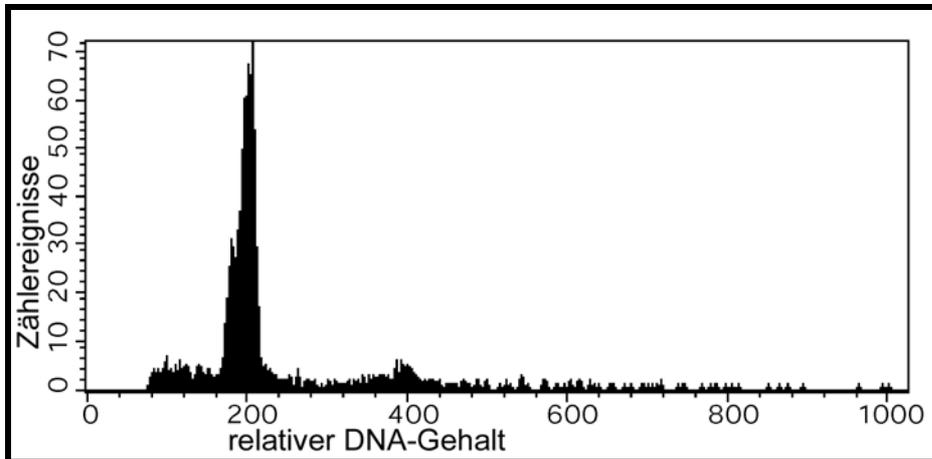


Abb. 52: Histogramm eines diploiden Regenerates

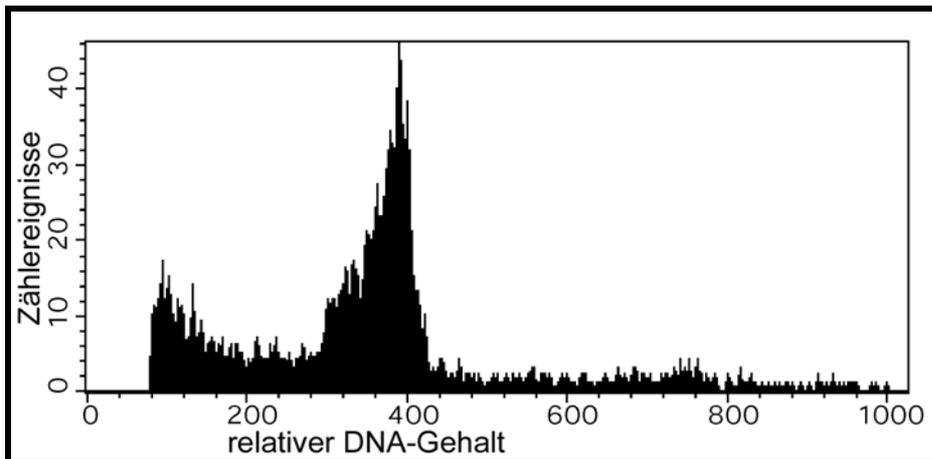


Abb. 53: Histogramm eines tetraploiden Regenerates

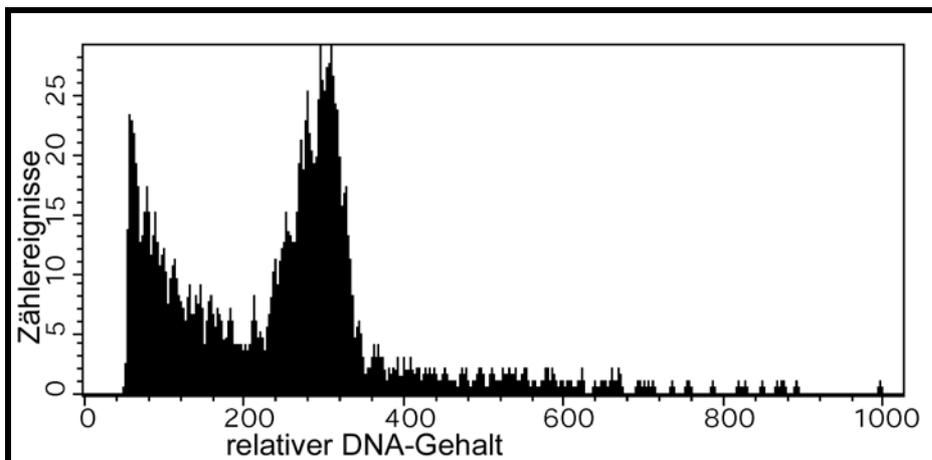


Abb. 54: Histogramm einer triploiden F_1 -Hybride (Kontrolle) der Kombination *L. multiflorum* (2x) \times *F. pratensis* (4x)

In Abb. 55 - Abb. 56 ist die mikroskopische Bestimmung (Phasenkontrast) der Chromosomenzahl und damit auch der Ploidiestufe von *Lolium-Festuca*-Hybriden zu sehen.

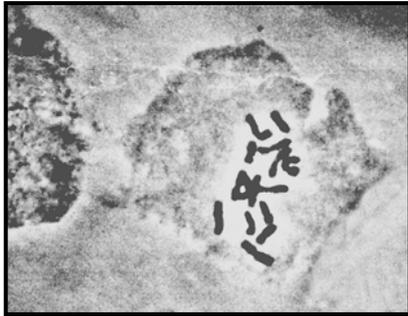


Abb. 55: 14 Chromosomen einer diploiden Regeneratpflanze (Vergrößerung 400fach)



Abb. 56: 28 Chromosomen einer tetraploiden Regeneratpflanze (Vergrößerung 1600fach)

3.2.2 Wirkung der Dauer von Kältevorbehandlungen auf die Antherenkultur

Tabelle 20 und Abb. 57 dienen zur Darstellung der für die Antherenkultur optimalen Länge der Kältevorbehandlung der Blütenstände mit den Antheren. Die Prozentangaben für regenerierte Pflanzen beziehen sich dort auf die Anzahl aufgesetzter Antheren (wie in Abb. 45 und im Gegensatz zu Tab. 14, Tab. 16 und Tab. 17, wo die Anzahl gebildeter Kalli zugrunde gelegt wurde).

In Tab. 20 sind Daten aus den Jahren 1999 und 2000 ausschließlich von Donorpflanzen mit hoher Regenerationsfähigkeit in Antherenkultur enthalten (s. Tab. 14 und Tab. 15), um den Effekt des Genotyps bezüglich der Regeneration bei allen Varianten möglichst gleich zu halten.

Eine Kältevorbehandlung der Antheren (Blütenstände) von einer bis vier Wochen wirkt sich günstig auf die Regeneration aus. Bei den ein bis vier Wochen kältebehandelten Antheren war meistens eine höhere Ausbeute an Kalli, Pflanzen insgesamt und grünen Pflanzen als bei den unbehandelten Antheren zu verzeichnen (s. Abb. 57). Dauerte die Kältebehandlung länger als 3 Wochen war zu beobachten, dass der Anteil von Blütenständen, die aufgrund von Pilzkontamination nicht mehr verwertbar waren, stark zunahm. Die Tendenz konnte beobachtet werden, dass Antheren, die mehr als 12 d kältebehandelt waren, Kalli schneller entwickelten (Daten nicht aufgeführt).

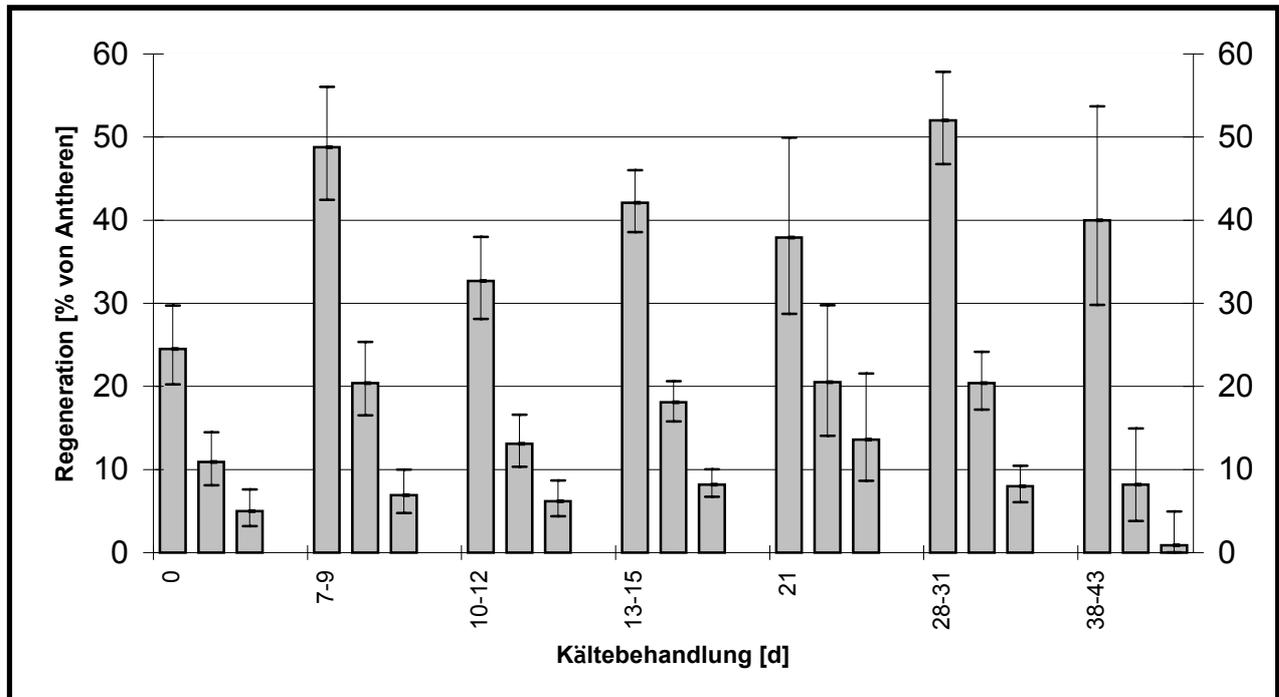
Tabelle 20: Häufigkeit der Kallusbildung und Pflanzenregeneration in Abhängigkeit von der Dauer der Kältevorbehandlung der Antheren

Tage Lagerung bei 4°C [d]	Anzahl der Antheren (und Donorpfl. ¹)	Kalli		Regenerierte Pflanzen insgesamt ²		Grüne Regenerate	
		Anzahl (v. Anz. Donorpfl.) ¹	Ausbeute in % von Antheren	Anzahl (v. Anz. Donorpfl.) ¹	Ausbeute in % von Antheren	Anzahl (v. Anz. Donorpfl.) ¹	Ausbeute in % von Antheren
0	424 (10)	104 (8)	24,5 %	46 (6)	10,9 %	21 (4)	5,0 %
7 - 9	406 (7)	198 (7)	48,8 %	83 (5)	20,4 %	28 (4)	6,9 %
10 - 12	520 (8)	170 (6)	32,7 %	68 (5)	13,1 %	32 (4)	6,2 %
13 - 15	1180 (13)	497 (12)	42,1 %	213 (12)	18,1 %	97 (9)	8,2 %
21	132 (3)	50 (3)	37,9 %	27 (3)	20,5 %	18 (3)	13,6 %
28 - 31	652 (11)	339 (10)	52,0 %	133 (10)	20,4 %	52 (10)	8,0 %
38 - 43	110 (3)	44 (2)	40,0 %	9 (2)	8,2 %	1 (1)	0,9 %

¹ Anzahl der Donorpflanzen, von denen Antheren aufgesetzt wurden, bzw. von denen dann jeweils Kalli, Pflanzen insgesamt (Albino- und grüne) und grüne Pflanzen regeneriert wurden.

² Hier sind alle regenerierten Pflanzen aufgeführt, d. h. sowohl Albinopflanzen als auch grüne Pflanzen.

Abb. 57: Regeneration an Kalli, Pflanzen insgesamt und grünen Pflanzen mit den jeweiligen Konfidenzintervallen ($\alpha = 0,05$) in Abhängigkeit von der Dauer der Kältebehandlung der Antheren: In den einzelnen Zeitintervallen gibt die erste Säule (von links) den Anteil regenerierter Kalli, die zweite den Anteil regenerierter Pflanzen insgesamt und die dritte den Anteil regenerierter grüner Pflanzen an, jeweils bezogen auf die Anzahl aufgesetzter Antheren.



3.2.3 Fertilität der grünen Regenerate aus Antherenkultur

Die meisten grünen Regenerate (ca. 90 - 95 %) bildeten Blütenstände. Die Fertilität der Pflanzen (s. 2.4) wurde im Folgenden nach den Kriterien Dehiszenz der Antheren (s. Abb. 58), KES-Färbbarkeit der Pollenkörner (s. Abb. 60 und Abb. 61) und Kornansatz bewertet. Unterschiede in der Zahl der PK pro Anthere ließen sich zwischen den Regeneraten nicht feststellen.

Die meisten aus Antherenkultur regenerierten Pflanzen waren sowohl männlich (s. Tab. 21) als auch weiblich (s. Tab. 22) steril. Nur wenige Regenerate zeigten mittlere Fertilität (s. u., vgl. Abb. 58 - Abb. 61) und erreichten damit den unteren Bereich der Fertilität der Ausgangseltern.

Tabelle 21: Beziehung zwischen männlicher Fertilität und der Ploidiestufe bei Regeneraten aus Antherenkultur

Ploidie- stufe	Anzahl der untersuchten Pflanzen	Pflanzen in Fertilitätsklassen				
		Anzahl (Anteil in %) Antheren		Anzahl (Anteil in %) KES-Färbung der PK		
		indehiszent	dehiszent	≤ 5 %	5,1 - 40 %	> 40 %
2x	49	46 (93,9 %)	3 (6,1 %)	17 (34,7 %)	26 (53,1 %)	6 (12,2 %)
4x	11	9 (81,8 %)	2 (18,2 %)	2 (18,2 %)	5 (45,4 %)	4 (36,4 %)
deutlich aneuploid	6	6 (100 %)	0	1 (16,7 %)	5 (83,3 %)	0

Tabelle 22: Beziehung zwischen weiblicher Fertilität (Kornansatz) und der Ploidiestufe bei Regeneraten aus Antherenkultur

Ploidie- stufe	Anzahl der untersuchten Pflanzen	Pflanzen in Fertilitätsklassen			
		Anzahl (Anteil in %)			
		ohne Kornansatz –	vereinzelter Kornansatz +	mäßiger Kornansatz ++	hoher Kornansatz +++
2x	65	52 (80,0 %)	9 (13,8 %)	4 (6,2 %)	0
4x	9	5 (55,6 %)	2 (22,2 %)	2 (22,2 %)	0
deutlich aneuploid	10	5 (50,0 %)	3 (30,0 %)	2 (20,0 %)	0

Bzgl. der Untersuchung der Dehiszenz der Antheren oder des Kornansatzes (s. Tab. 21 und Tab. 22) erwiesen sich ca. 6,1 % (7/114) der diploiden Regenerate aus Antherenkultur als fertil (für $\alpha = 0,05$ das Konfidenzintervall von 2,5 % bis 12,2 % fertile Pflanzen). Bei den tetraploiden Regeneraten waren dies 20 % (4/20) der Pflanzen (für $\alpha = 0,05$ das Konfidenzintervall von 5,7 % bis 43,7 % fertile Pflanzen). Aufgrund der geringen Anzahl tetraploider Pflanzen weist die letzte Angabe ein sehr großes Konfidenzintervall auf. Die Anzahl Pflanzen, deren Antheren > 40 % KES-färbbarer PK hatten, lag sowohl bei diploiden wie auch bei tetraploiden Regeneraten über der Anzahl Pflanzen mit dehiszenten Antheren und Kornansatz (s. Tab. 21). Die aneuploiden Pflanzen waren völlig männlich steril (s. Tab. 21), aber zwei von ihnen (= 20 %) wiesen mäßigen Kornansatz auf (s. Tab. 22).

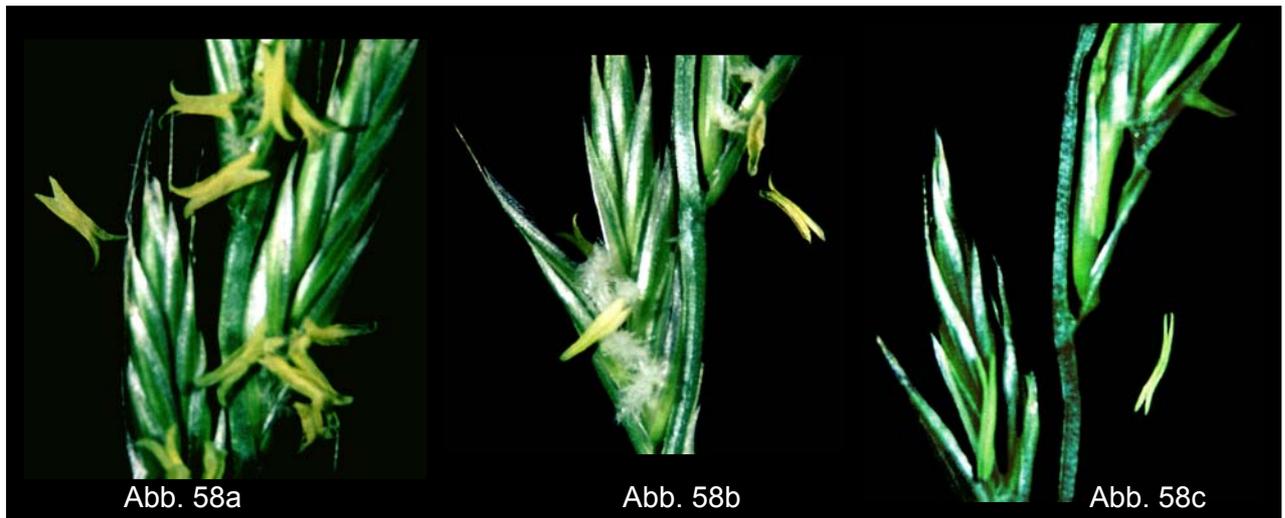


Abb. 58a-c: *Lolium-Festuca*-Hybriden mit dehiszenten Antheren (a), teilweise bzw. verzögert dehiszenten Antheren (b) und indehiszenten Antheren (c)



Abb. 59: Meiotische Metaphase I eines aus Antherenkultur erhaltenen diploiden fertilen Regenerates (Vergrößerung 1600fach): 7 Ring-Bivalente belegen die reguläre Paarung der Chromosomen, worauf sich die relativ hohe Fertilität begründet.



Abb. 60: Pollenkörner (PK) eines aus Antherenkultur erhaltenen diploiden sterilen Regenerates mit indehiszenten Antheren (Vergr. 640fach): Die meisten PK waren tot, maximal 20 % KES-färbbarer PK (s. Pfeile) wurden gefunden.

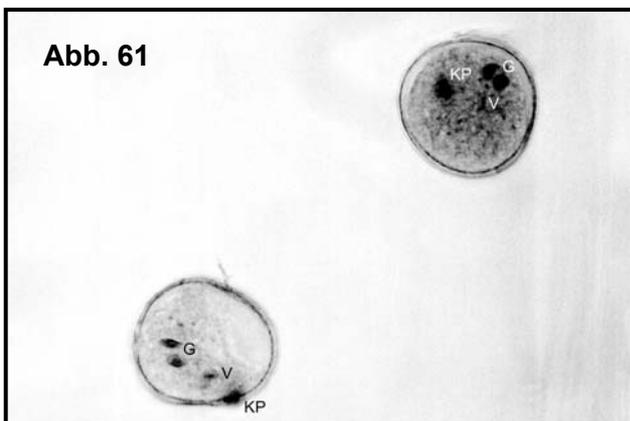


Abb. 61: PK eines diploiden fertilen Regenerates (Vergrößerung 1600fach): Deutlich sind in den zwei PK die beiden generativen Kerne („G“) und der davon etwas abseits gelegene vegetative Kern („V“) sichtbar. Des Weiteren ist die Keimpore („KP“) erkennbar.

Abb. 28 zeigt zum Vergleich KES-gefärbten Pollen einer fertilen, tetraploiden Pflanze der Art *L. multiflorum*.

3.2.4 Genom- und Chromosomenzusammensetzung von *Lolium-Festuca*-Hybriden

Die Abb. 62 - Abb. 64 zeigen mitotische Metaphasen grüner Regenerate aus Antherenkultur von *Lolium-Festuca*-Hybriden.

Intergenerische Translokationen sind bei *Lolium-Festuca*-Hybriden häufig (s. Abb. 62 und Abb. 64). Bei den Hybriden, die aus 2 bis mehr als 6 Generationen freier Abblüte oder Pärchenkreuzungen hervorgegangen waren, wiesen 103 von insgesamt 179 Chromosomen (58,5 %) intergenerische Translokationen auf, die mittels GISH nachweisbar waren. Bereits nach 2 bis 3 Generationen hatten 60 von 106 Chromosomen (56,6 %) intergenerische Translokationen. Die Translokationen wurden sowohl in der Telomerregion, interstitiell als auch in der Centromerregion beobachtet.

Die GISH-Untersuchungen zeigten, dass prinzipiell die Möglichkeit besteht, *Lolium-Festuca*-Hybriden mit dem gewünschten Translokationsmuster (s. 1.2: Centromer-Region von *Lolium* und terminale Region von *Festuca* oder umgekehrt) zu selektieren (s. Abb. 63). Mit diesen Hybriden ließe sich dann die Strategie zur Erzeugung balancierter Hybriden zwischen *Lolium* und *Festuca* (s. 1.2) weiterverfolgen.

Es kann bei der GISH sowohl DNS von *L. multiflorum* (s. Abb. 62 und Abb. 63) als auch von *F. pratensis* (s. Abb. 64) als Proben-DNS verwendet werden. Die DNS des anderen Elters wurde jeweils als Blocking-DNS eingesetzt (s. 2.6.3).

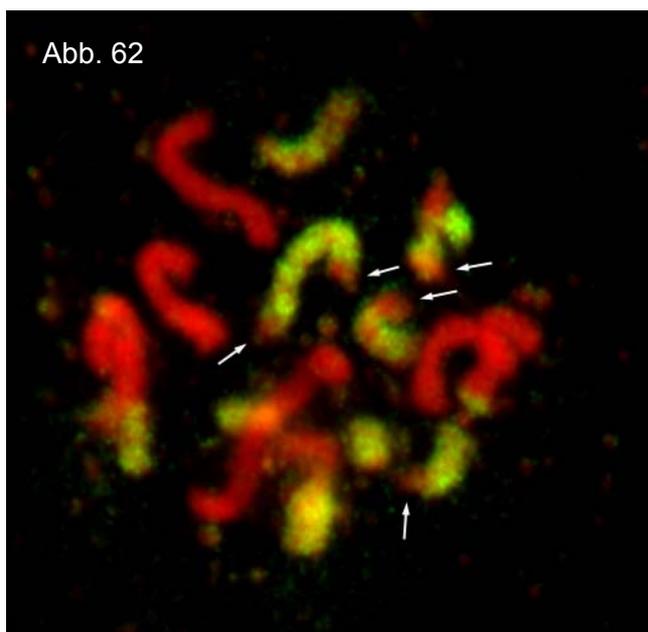


Abb. 62

Abb. 62: Mitotische Metaphase eines diploiden Regenerates: DNS von *L. multiflorum* erscheint durch FITC-Markierung gelbgrün, während die von *F. pratensis* durch Gegenfärbung rot erscheint. Es sind vor allem Translokationen von *F. pratensis* an terminalen Regionen verschiedener *L. multiflorum* Chromosomen zu sehen (s. Pfeile).

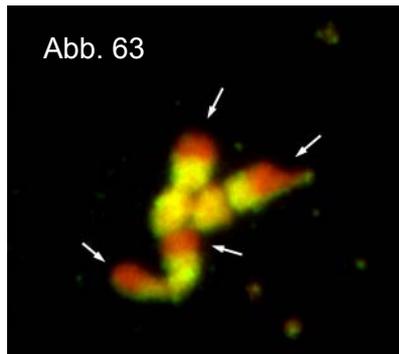


Abb. 63

Abb. 63: Symmetrische Translokationen: Zu sehen ist ein Beispiel von 3 Chromosomen, die das gewünschte Muster an symmetrischen Translokationen aufweisen. Die Centromer-Regionen stammen von *L. multiflorum*. Sie erscheinen durch FITC-Markierung gelbgrün. 4 der 6 terminalen Regionen stammen von *F. pratensis* und erscheinen aufgrund der Gegenfärbung rot (s. Pfeile).

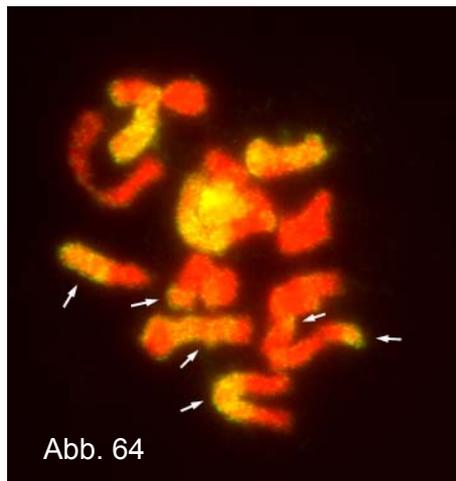


Abb. 64

Abb. 64: Reziproke Markierung: In dieser mitotischen Metaphase eines diploiden Regenerates sind Chromosomen oder Chromosomenabschnitte, die von *F. pratensis* stammen, durch FITC gelbgrün markiert (s. Pfeile), während DNS von *L. multiflorum* aufgrund der Gegenfärbung rot erscheint.

4 Diskussion

4.1 Kreuzbarkeit und Kreuzungsbarrieren zwischen Arten der Poaceae

Amphidiploide Hybriden, erzeugt durch Genomverdoppelung aus Hybriden zwischen diploiden Arten oder aus Hybriden zwischen autotetraploiden Arten, eröffnen die Chance zur Züchtung völlig neuartiger Kulturpflanzen. Besitzen die Elternarten zueinander inhomologe Genome, so sollte die Meiose in den amphidiploiden Hybriden regulär ablaufen, da keine intergenomische Paarung stattfindet und somit weitestgehend Bivalentbildung auftritt.

Es zeigte sich, dass alle erzeugten F₁-Hybriden aus Kreuzungen zwischen den hier untersuchten Arten mit inhomologen Genomen – trotz meist tetraploider Ausgangsstufe der Eltern – als steril angesehen werden müssen, was wahrscheinlich auf starke Disharmonien zwischen den beiden Elterngenomen zurückzuführen ist, die zu den Störungen vor allem in der generativen Entwicklung führten. Gründe hierfür könnten auch in epigenetischen Modifikationen der Genome liegen. OERTEL et al. (1996a) und OERTEL (1997) vermuteten als Ursache für die hohe Sterilität Störungen in der Makro- und Mikrosporogenese. Spezifische Störungen bei Hybriden aufgrund epigenetischer Effekte und allgemeiner Genomdisharmonien sind Bestandteil der postzygotischen Kreuzungsbarrieren, da sich die Elterngenome ja erst mit der Befruchtung vereinigen. Es ist wahrscheinlich, dass beide möglichen Ursachen verantwortlich für die Entwicklungsstörungen der erzeugten Hybriden sind.

Es waren aber Schwankungen im Grad der Sterilität zu verzeichnen. 3 der 4 F₁-Hybriden zwischen *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) zeigten – zumindest zeitweise – fertile Mikro- oder Makrosporen, so dass die Erzeugung von Nachkommen gelang (s. 3.1.2). Die Hybride F₁-Pflanze 6 zwischen *Lolium multiflorum* (4x) und *Dactylis glomerata* (4x) z. B. war trotz regulärer Meiose zu einem hohen Maße steril (OERTEL et al. 1996a, OERTEL 1997), doch schwankte der Grad der Sterilität zwischen den Jahren und auch jahreszeitlich stark. Zwar trat meistens eine Abortion in der generativen Entwicklung auf, z. T. vor Erreichen der Meiose, z. T. postmeiotisch (wie schon von OERTEL et al. 1996a und OERTEL 1997 untersucht), doch im Jahr 2000 wurde bei einigen Blütenständen bzw. Klonteilen ein Anteil KES-gefärbter Pollenkörner von bis zu 1 % gefunden. Dies entspricht in etwa den 1995 gemachten Beobachtungen (1,6 %, OERTEL 1997). In den Jahren dazwischen hingegen, 1998 und 1999, hatte F₁-Pflanze 6 meist entweder keine Blütenstände oder keine Pollenkörner; die wenigen vorhandenen Pollenkörner waren alle nicht KES-färbbar und damit völlig steril.

Insgesamt betrachtet müssen aber auch die F₁-Hybriden zwischen *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) als steril angesehen werden. Die Erzeugung von Nachkommen gelang nur selten und nur unter Zuhilfenahme von Phytohormonbehandlung und Embryokultur (OERTEL 1997: 2 BC₁-Pflanzen; s. Tab. 6: 23 BC₁-Pflanzen) bzw. Induktion durch Antherenkultur (s. Tab. 7: 2 Regenerate).

Die Kreuzungsbarrieren zwischen *L. multiflorum* × *D. glomerata* erscheinen geringer als die zwischen *F. pratensis* × *D. glomerata*. Die Ursache könnte in stärkeren postzygotischen Barrieren zwischen *F. pratensis* × *D. glomerata* liegen. Die Hybriden zwischen diesen Arten abortierten in ihrer generativen Entwicklung früher als die entsprechenden Hybriden gleicher Ploidie zwischen *L. multiflorum* × *D. glomerata*. Nur eine allotetraploide *F. pratensis* - *D. glomerata* Hybride (F₁-Pflanze 8) bildete Blütenstände, deren Antheren aber nie Pollenkörner enthielten. Die Entwicklung brach hier also immer vor der Meiose ab.

Für Hybriden zwischen *F. pratensis* (2x, 4x) × *D. glomerata* (4x) können, was die Gründe für die Sterilität und fehlende Vitalität der Pflanzen betrifft, die gleichen Aspekte wie für die *L. multiflorum* - *D. glomerata* Hybriden zur Betrachtung herangezogen werden.

Die Embryofrequenzen und die Pflanzenausbeute unterschieden sich zwischen Kreuzungen der verschiedenen Ploidiestufen zweier Elternarten nicht deutlich (*L. multiflorum* (2x, 4x) × *D. glomerata* (4x), *F. pratensis* (2x, 4x) × *D. glomerata* (4x) und *L. multiflorum* (2x, 4x) × *Ph. pratense* (2x, 6x)). Die Fertilität der Hybriden war hingegen erwartungsgemäß von der Ploidie der Elternarten abhängig. Die allotetraploiden Hybriden zwischen *L. multiflorum* × *D. glomerata* und *F. pratensis* × *D. glomerata* abortierten später in ihrer generativen Entwicklung als die allotriploiden (s. 3.1.2.2).

Als Kontrolle für die Kreuzungen zwischen Arten mit inhomologen Genomen dienten Kreuzungen mit Kastration, Phytohormonbehandlung und Embryokultur zwischen Pflanzen der Art *L. multiflorum*. Entsprechende Kreuzungen ohne Kastration, Phytohormonbehandlung und Embryokultur wurden nicht durchgeführt, da bei den Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologen Genomen zur Erzeugung von Pflanzen Phytohormonbehandlung und Embryokultur unerlässlich sind. Die Kastration verhindert Selbstungen, die trotz der Selbstinkompatibilität bei den verwendeten Arten gelegentlich auftreten können.

OERTEL (unveröffentlicht, s. Tab. 23, z. T. in OERTEL 1997) beschreibt eine geringere Embryofrequenz (0,19 %, 523 kastrierte und bestäubte Blütchen) für die Kombination *L. multiflorum* (2x) × *D. glomerata* (4x) als für die Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x), die eine durchschnittliche Frequenz von 1,78 % (4489 Blütchen) aufwies. Er verwendete aber nur eine diploide Form *L. multiflorum*, nämlich die Sorte 'Lema'. Eine relativ ähnliche Embryofrequenz (OERTEL 1997: 0,4 %, 1125 Blütchen) wurde von ihm auch bei den Kreuzungen einer tetraploiden Form *L. multiflorum*, nämlich der Sorte 'Manito', mit *D. glomerata* erhalten. Der Umfang der Kreuzungen war für die zwei Kombinationen bei OERTEL (1997) deutlich geringer als in dieser Arbeit

(1777 Blütchen diploides, 21960 Blütchen tetraploides *L. multiflorum*), wo für beide Kombinationen eine Embryofrequenz von 1,01 % ermittelt wurde.

OERTEL (1997) beschrieb recht große Schwankungen in der Embryofrequenz zwischen verschiedenen Sorten und Einzelpflanzen von tetraploidem *L. multiflorum*. Bereits MATZK (1981) fand bei Kreuzungen zweier Arten in der Kombination *F. arundinacea* (6x) × *D. glomerata* (4x) individuelle Unterschiede zwischen einzelnen Pflanzen in der Kreuzbarkeit. Neben individuellen (genotypspezifischen) und sortenspezifischen Faktoren sind auch Umweltfaktoren verantwortlich für eine Streuung der Kreuzungsergebnisse. Um Aussagen über die Kreuzungschancen zwischen zwei Arten treffen zu können, ist deshalb ein gewisser Umfang an Kreuzungen mit möglichst vielen Einzelpflanzen (Genotypen) der Kreuzungseltern und verschiedenen Sorten nötig. Kreuzungen bei möglichst konstanten Umweltbedingungen und über einen längeren Zeitraum, wie in dieser Arbeit durchgeführt, garantieren eine möglichst hohe Unabhängigkeit der Ergebnisse von Umweltfaktoren. Der Umfang an Kreuzungen zwischen *L. perenne* (2x) × *D. glomerata* (4x) ist aus diesen Gründen, auch bei OERTEL (1997), als zu gering für Schlussfolgerungen zu bewerten.

Weitgehende männliche und weibliche Sterilität ist bei intergenerischen und interspezifischen Hybriden generell sehr häufig (STEBBINS 1957: *Elymus* × *Sitition*, GRANT 1966: *Gilia malior* × *G. modocensis*, COMAI et al. 2000: *Arabidopsis thaliana* × *Cardaminopsis arenosa*, SUPUTTITADA et al. 2000: *Oryza sativa* × *O. minuta*, MATZK 1981: *Festuca arundinacea* × *Dactylis glomerata*). Dies trifft auch für resynthetisierte allopolyploide Pflanzen zu (RIESEBERG et al. 1996, LEITCH und BENNETT 1997, COMAI 2000), deren natürliche Verwandte derselben Kombination hohe Fertilität zeigen. Wie sich auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Pflanzen zeigte, vor allem bei der Kombination *L. multiflorum* (2x, 4x) × *D. glomerata* (4x), treten aber Schwankungen im Phänotyp zwischen den erzeugten Hybriden einer Kreuzungskombination auf, so dass einzelne Pflanzen Fertilität zeigen können.

Meist ist sicherlich das Zusammenwirken vieler Gene an der Sterilität und fehlenden Vitalität von Hybriden beteiligt (LI et al. 1997, zusammengefasst in RIESEBERG und CARNEY 1998). TADMOR et al. (1987) vermuten allerdings bei *Lens culinaris* und *Lens ervoides* eine einzelne Translokation als entscheidenden Faktor für Fertilitätsunterschiede bei interspezifischen Hybriden zwischen beiden Arten. Diese Autoren kamen zu dem Schluss, dass alle F₂-Hybridpflanzen zwischen den beiden Arten mit einer Pollenvitalität unter 65 % heterozygot für diese Translokation waren, während alle Pflanzen mit mehr als 85 % vitalem Pollen homozygot für diese Translokation waren. Insgesamt lässt sich lediglich formulieren, dass die Fertilität bzw. Sterilität von interspezifischen oder intergenerischen Hybriden wesentlich vom Genotyp der Ausgangspflanzen abhängt.

Optimale Umweltbedingungen scheinen für die Fertilität der Hybriden von großer Bedeutung zu sein. Trotz der weitgehenden Kontrolle über die Umweltfaktoren durch die Möglichkeit, Temperatur und Tageslänge im Gewächshaus bestimmen zu können, sind diese aufgrund der Vielzahl der möglichen Faktoren nur schwer bis ins Detail zu kontrollieren.

Aus Rückkreuzungen der F₁-Pflanze 6 der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) bei erhöhter Umgebungstemperatur von 35°C gingen keine Embryonen hervor (s. 3.1.3.1). Ein positiver Einfluss von erhöhten Temperaturen auf die Fertilität bei weitgehend sterilen Hybriden ist aber wahrscheinlich. YAMADA et al. (2000, 2001) fanden bei *Nicotiana*-Hybriden, dass Apoptose bei Temperaturen von 36°C unterdrückt wurde, während sie bei einer Temperatur von 28°C zum Tod dieser Hybriden führte. Ähnliches könnte für die generative Entwicklung der allotetraploiden Hybriden *L. multiflorum* × *D. glomerata* angenommen werden. Es ist vorstellbar, dass bei deutlich erhöhten Temperaturen die Exprimierung gewisser für die Apoptose notwendiger Gene, welche ja im Gegensatz zur Nekrose einen aktiven Prozess darstellt, unterdrückt werden.

Unterstützt wird diese Hypothese auch dadurch, dass hohe Temperaturen während der Blüte die Reaktion der Selbstinkompatibilität, die wie Apoptose als aktiver Prozess angesehen werden kann, vermindern können. Für Roggen wird dies von WRICKE (1974), für *L. perenne* von WILKINS und THOROGOOD (1992) und für *L. multiflorum* von EICKMEYER (1994) berichtet.

Für die Applikation von Dauerlicht könnte Ähnliches gelten, entweder aufgrund des ständigen Ablaufs der Photosynthese oder auch durch eine von der Lichtstrahlung bedingte Temperaturerhöhung im Pflanzengewebe.

Epigenese wurde – neben der DNS-Sequenz des Genoms – in den letzten Jahren als ein wichtiger Mechanismus, den Phänotyp einer Art festzulegen, erkannt (VONGS et al. 1993, MATZKE und MATZKE 1998, MORGAN et al. 1999, KOOTER et al. 1999, CUBAS et al. 1999, FINNEGAN et al. 2000, ALLEMAN und DOCTOR 2000). Epigenese spielt auch bei interspezifischen oder intergenerischen Hybriden eine entscheidende Rolle (FINCH und BENNETT 1980, HESLOP-HARRISON 1990). So ist es denkbar, dass in solchen Hybriden letale Gene, deren Expression vorher durch Methylierung unterdrückt worden war, nun exprimiert werden oder aber die Methylierung wichtiger Gensequenzen, die z. B. für Spindelfaser- oder Kinetochorproteine kodieren, neu auftritt und somit deren Expression dann unterdrückt wird oder der Grad der Expression verändert wird. Viele der daraus resultierenden Folgen lassen sich dann unter dem Begriff Genomdisharmonien zusammenfassen. Untersuchungen zu dieser Problematik liegen von LIU et al. (1998) und COMAI et al. (2000) vor.

COMAI et al. (2000) schließen als Ursache für die geringe Vitalität und phänotypische Instabilität von Hybriden zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Cardaminopsis arenosa* meiotische Störungen aus. Sie untersuchten mittels AFLP-cDNA Analyse die Expression von Genen in den Hybriden im Vergleich zu den Eltern und fanden Unterschiede. COMAI et al. (2000) vermuteten, dass „gene silencing“ als epigenetischer Effekt (MEYER und SAEDLER 1996, MATZKE und MATZKE 1998) verantwortlich für die hohe phänotypische Instabilität bzw. Variabilität der von ihnen untersuchten Hybriden ist.

Es liegen auch Untersuchungen vor, dass bereits die Ploidiestufe Einfluss auf die Expression von Genen hat (GUO et al. 1996: Mais; MITTELSTEN SCHEID et al. 1996, SCOTT et al. 1998: *Arabidopsis*). Allerdings hatten bei den in dieser Arbeit untersuchten Hybriden die Elternarten meist die gleiche Ploidiestufe, so dass dies hier wohl keine Bedeutung hat.

Sowohl prä- wie postzygotische Kreuzungsbarrieren traten bei den untersuchten Kombinationen auf. Auch wenn die geringe Embryofrequenz von < 1 % bis 2,5 % die Effektivität der Kreuzungen senkt, so sind die postzygotischen Kreuzungsbarrieren doch bedeutender. Die meisten Embryonen abortierten bereits, bevor sie sich zu Pflanzen entwickeln konnten. Gelänge es, dies in größerem Umfang zu vermeiden (z. B. ideale Stimulierung durch Phytohormone, optimierte Umweltbedingungen), so wäre eine höhere Pflanzenausbeute zu erwarten. Sicherlich sind viele Embryonen aufgrund ihres Genoms einfach nicht lebensfähig, eine Verzögerung der Abortion würde bei diesen folglich letztendlich nichts bringen. Im Durchlaufen der Embryonalentwicklung sehe ich allerdings eine kritische Phase für eine große Anzahl von Embryonen. Schaffen diese Embryonen es, jene Barriere zu überwinden, so könnten sie später lebensfähig sein. Begründet wird diese Annahme dadurch, dass viele intergenerische Embryonen aufgrund der gestörten Endospermentwicklung abortierten, und nicht, weil ihre Genomzusammensetzung letal war. Als es gelang, die fehlende Stimulierung seitens des Endosperms auf den Embryo durch exogene Phytohormon-applikation wenigstens weitgehend zu ersetzen (MATZK 1991, MATZK und MAHN 1994), konnte sich ein Teil der Embryonen zu Hybridpflanzen entwickeln.

Die Abortion von Embryonen interspezifischer oder intergenerischer Kombinationen, oft bereits im undifferenzierten globularen Stadium, ist häufig. Bei Kreuzungen innerhalb der Unterfamilie Pooideae sowie bei Kreuzungen zwischen Arten der Unterfamilie Pooideae mit Arten der Unterfamilie Panicoideae (Systematik nach WATSON und DALLWITZ 1999) fanden ZENKTELER und NITZSCHE (1984) in vielen Kombinationen globulare Embryonen, die aber alle 6 bis 10 Tage nach dem Bestäubungszeitpunkt abstarben. Der Umfang an bestäubten Blütchen variierte dabei sehr stark, so dass Vergleiche zwischen den Kombinationen wenig aussagekräftig waren. Ebenso

beobachteten MATZK et al. (1980) bei intergenerischen Kreuzungen innerhalb der Poaceae die Entwicklung von Embryonen, die aber auch hier abortierten. Eine Ausnahme bildete die bereits in dieser Arbeit erwähnte Kombination *F. arundinacea* (6x) × *D. glomerata* (4x), in der Hybriden erhalten wurden (s. Tab. 24, Tab. 25, s. Abb. 17, Abb. 23, s. auch MATZK 1981).

Auch bei Kreuzungen zwischen *Oryza sativa* × *O. minuta* abortierten die Embryonen meist 6 bis 12 d nach der Bestäubung vor dem oder im globularen Stadium, obgleich nach Embryokultur einige vitale Hybriden erhalten wurden (SUPUTTITADA et al. 2000). Aus interspezifischen Kreuzungen bei der Gattung *Nicotiana* gingen zahlreiche Hybridpflanzen hervor, die ab 15 d nach der Keimung abzusterben begannen und maximal 30 d überlebten (MARUBASHI et al. 1999).

Die Genomzusammensetzung der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten F₁-Hybriden war über einen längeren Zeitraum stabil. Dies unterscheidet sich von Kreuzungen zwischen Arten der Unterfamilie Pooideae als Samenelter mit solchen der Unterfamilie Panicoideae als Pollenelter. Die Chromosomen des Pollenelters werden meist bald nach Bildung der Zygote eliminiert und es verbleibt nur das Genom der Eizelle (z. B. LAURIE und BENNETT 1986, 1990: Weizen × Mais [*Zea mays* L.], CHEN et al. 1991, INAGAKI et al. 1991: Gerste × Mais, MATZK und MAHN 1994: Weizen × Mais und Weizen × *Pennisetum americanum* (L.) Leeke, z. T. zusammengefasst in RIERA-LIZARAZU et al. 1996). Viele Embryonen abortierten zwar auch hier während ihrer Entwicklung, aber zahlreiche Pflanzen waren lebensfähig, wiesen dann aber keinen Hybridcharakter auf. Kreuzungen vor allem zwischen Weizen (Unterfamilie Pooideae, Tribus Triticeae) × Mais (Unterfamilie Panicoideae, Tribus Andropogoneae) werden deshalb seit einiger Zeit zur Erzeugung von haploiden Pflanzen genutzt (z. B. LAURIE und BENNETT 1986, SUENAGA und NAKAJIMA 1989, MATZK und MAHN 1994).

Bei Kreuzungen zwischen Saatweizen (*Triticum aestivum*) × Gerste (*Hordeum vulgare*) kommt es regelmässig (ca. 30 - 50 % der Nachkommen) zur Eliminierung von einigen bis allen väterlichen Chromosomen (KOKA et al. 1991, MALYSHEVA et al. 2003). Bei der Kreuzung von *H. vulgare* oder *T. aestivum* mit *H. bulbosum* als Pollenelter wird wie bei der mit Mais das Genom des Pollenelters bald nach der Befruchtung vollständig eliminiert (KASHA und KAO 1970, BARCLAY 1975), weshalb alle zur Erzeugung haploider Pflanzen genutzt werden können. Bei der reziproken Kreuzung von *H. bulbosum* × *H. vulgare* zeigten die Nachkommen hingegen intermediären Phänotyp. Es wurden Chromosomen beider Eltern eliminiert (SYMKO 1969).

Bei einigen Nachkommen aus Kreuzungen zwischen Arten der Pooideae mit Arten der Panicoideae als Pollenelter wurden allerdings Chromosomen des Pollenelters nachgewiesen. Dabei liegt in der Pflanze nicht das gesamte Genom des Pollenelters vor, sondern nur einzelne Chromosomen. Bei Kreuzungen zwischen Hafer und Mais

existieren diverse Hybriden, bei denen insgesamt alle 10 Maischromosomen zum Hafergenom addiert wurden, teilweise als Monosome, meist aber als Disome (RIERALIZARAZU et al. 1996, KYNAST et al. 2001). MATZK (1996) und MATZK et al. (1997) gelangen bei Verwendung von Hafer als Samenelter und den Arten *Tripsacum dactyloides*, *Pennisetum americanum* sowie Mais (*Zea mays*) als Polleneltern die Erzeugung von Hybriden, bei denen Chromosomen des jeweiligen Pollenelters neben dem Hafergenom vorlagen. Die Chromosomen des Pollenelters werden z. T. später in der F₁-Hybride eliminiert (MATZK 1996). Die Eliminierung von Teilen oder des gesamten väterlichen Genoms läßt sich mit Effekten des Cytoplasma, das ja vom Samenelter stammt, erklären. Bei interspezifischen Hybriden der Gattung *Brassica* wurde dies von SONG et al. (1995) nachgewiesen. Dieser Effekt ist sicherlich auch teilweise verantwortlich für die Eliminierung von *D. glomerata* Chromosomen bei den BC₂- und BC₃-Pflanzen der Kombination *L. multiflorum* × *D. glomerata* (s. 4.2). Bei allen erzeugten F₁-Hybriden dieser Kombination war immer *L. multiflorum* der Samenelter.

Eine Ausnahme stellt die Kombination *F. arundinacea* (6x) × *D. glomerata* (4x) dar (MATZK 1981, s. auch Tab. 25), bei denen beide Kreuzungspartner der Tribus Poeae, Unterfamilie Pooideae, angehören, aber trotzdem bei zwei von drei untersuchten Hybriden somatische Variabilität hinsichtlich der Chromosomenzahl bereits in der F₁-Generation auftrat (MATZK 1981). Es wurden bei einer Pflanze Chromosomenzahlen zwischen 14 und 56 (meistens 28) und bei der anderen Zahlen zwischen 28-42 ermittelt (meist 42). Eine genaue Analyse der Herkunft der Chromosomen mittels GISH war zum damaligen Zeitpunkt nicht möglich. Die dritte Pflanze, als einzige vital, zeigte eine stabile Zahl von den theoretisch zu erwartenden 35 Chromosomen. Diese Pflanze wurde in Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit einbezogen. Die Chromosomenzahl war auch nach 20 Jahren noch stabil.

Bei Kreuzungen von *L. multiflorum* mit Arten der Unterfamilie Panicoideae kam es oft zur Embryobildung, die wenigen erhaltenen Pflanzen wiesen alle nur das reduzierte *L. multiflorum* Genom auf (MATZK et al. 1997).

Die Aussichten, in absehbarer Zeit fertile und stabile allotetraploide Hybriden in den untersuchten Kombinationen (s. Tab. 3) produzieren zu können, sind gering. Die oft geringe bis mittlere Vitalität, besonders in Form einer schwachen Bewurzelung ausgeprägt, und die hohe Sterilität stellen große Hindernisse dar. Aufgrund der phänotypischen Schwankungsbreite der Hybriden sollte es aber zumindest in der Kombination *L. multiflorum* × *D. glomerata* langfristig möglich sein, dieses Ziel zu erreichen. Nur durch die Erzeugung amphidiploider Hybriden mittels weiter Kreuzungen wird es möglich sein, zahlreiche wünschenswerte Eigenschaften zweier Elternarten in einer Pflanzenhybride zu vereinen. Diese neuartigen Pflanzen würden die Eigenschaften der Elternarten in einer einzigartigen Kombination miteinander vereinen und

könnten ihren Eltern dann unter bestimmten Bedingungen oder für bestimmte Anforderungen (Infektionsdruck durch Krankheiten, spezifische Umweltbedingungen, Futterwert, Inhaltsstoffe, u. a.) deutlich überlegen sein. Die Kombination derart umfangreichen genetischen Materials bei Arten der Pooideae kann bislang nur durch Kreuzungen, nicht aber durch andere Verfahren wie z. B. der genetischen Transformation erreicht werden.

Die Erzeugung von fertilen und stabilen allotetraploiden Hybriden in den in dieser Arbeit untersuchten Kombinationen wird einen sehr großen Aufwand erfordern, hinter dem ein ausreichendes wirtschaftliches Interesse stehen müsste. Die züchterische und wirtschaftliche Bedeutung von Futtergräsern spielt aber im Vergleich zu der von z. B. Getreide, Raps und Zuckerrüben nur eine untergeordnete Rolle. Bei Triticale vergingen von der Beschreibung der ersten, sterilen Hybride 1875 durch WILSON (in MÜNTZING, 1979) bis zur züchterischen Nutzung (LARTER 1976) immerhin ca. 100 Jahre.

4.2 Nachkommen der F₁-Hybriden zwischen *L. multiflorum* × *D. glomerata* – Barrieren bei der Schaffung disomer chromosomaler Additionslinien und Möglichkeiten zum Gentransfer mittels intergenerischer Translokationen

Bei der Erzeugung chromosomaler Additionslinien aus den F₁-Hybriden der Kombination *L. multiflorum* (2x, 4x) × *D. glomerata* (4x) treten verschiedene Barrieren auf. Neben geringer Vitalität und Fertilität, gestörter Endospermentwicklung sowie wahrscheinlich bei den BC₁- und BC₂-Hybriden einer meiotischen Eliminierung von *D. glomerata* Chromosomen und geringeren Konkurrenzfähigkeit von Gameten mit *D. glomerata* Chromosomen stellt auch die in der BC₂-Generation auftretende chromosomale Instabilität ein entscheidendes Hindernis bei der Entwicklung von disomen chromosomalen Additionslinien zwischen diesen Arten dar.

Zwar ist die Fertilität der BC₁- und BC₂-Hybriden meist höher als die der F₁-Hybriden, nimmt also im Laufe der Rückkreuzung zu (s. Tab. 10, s. 3.1.6.1), doch ist sie weiterhin gering. Es fand sich eine asynchrone und abnormale Entwicklung der Mikrosporen z. B. bei der BC₁-Pflanze 1 (s. Abb. 38). Verschiedene Entwicklungswege zu diesen abnormalen Mikrosporen bei intergenerischen Hybriden zwischen *Triticum turgidum* ssp. *durum* × *Secale cereale* und *Triticum turgidum* ssp. *durum* × *Aegilops squarrosa* wurden von XU und JOPPA (2000) beschrieben. Die weibliche Fertilität war ebenfalls eingeschränkt. Aufgrund des geringen Kornansatzes sind, ähnlich wie bei der Mikrosporenentwicklung, Störungen während der Gametogenese zu vermuten.

Nach erfolgter Befruchtung abortierten wohl viele Embryonen mit Hybridcharakter aufgrund gestörter Endospermentwicklung, denn erst durch eine Phytohormonapplikation wie bei der Erzeugung der F₁-Hybriden konnten 23 BC₁- und 6 BC₂-Pflanzen (davon 3 erzeugt von OERTEL 1998, persönliche Mitteilung), die Hybriden waren, erhalten werden (s. 3.1.3.2 und 3.1.5.2). Bei Rückkreuzungen der BC₁- und BC₂-

Hybriden wurden ohne Auxinapplikation zwar zahlreiche Nachkommen erzeugt, doch diese waren sämtlich keine Hybriden (s. 3.1.5.2 und 3.1.6.3). Mittels GISH-Analyse wurde bei den Nachkommen, die phänotypisch Abweichungen zu *L. multiflorum* aufwiesen, bestätigt, dass sie keine Hybriden waren. Deshalb erfolgten die Rückkreuzungen in großem Umfang mit Anwendung der Auxinbehandlung und Embryokultur (MATZK 1991, MATZK und MAHN 1994), um eine Abortion wegen gestörter Endospermentwicklung bei den Embryonen mit Hybridcharakter zu verhindern. Als Grund für die gestörte Endospermentwicklung sind Disharmonien zwischen den beiden Genomen anzunehmen.

Abgesehen von einer Abortion der Nachkommen mit Hybridcharakter nach der Befruchtung könnten als präzygotische Kreuzungsbarrieren der BC₁- und BC₂-Hybriden auch eine bevorzugte Selektion von Gameten ohne zusätzliche *D. glomerata* Chromosomen oder die Eliminierung der *D. glomerata* Chromosomen in der Meiose I eine Rolle spielen. Eine Eliminierung kann mit Unterschieden im Zellzyklus oder in der Kinetochorstruktur (Kinetochorproteine) der beiden Genome sowie weiteren Genomdisharmonien erklärt werden. Schließlich erscheint es möglich, dass Gameten, die nur *L. multiflorum* Chromosomen enthalten, bevorzugt in einer vollen Ploidiestufe (7, 14 oder 21), im Durchschnitt lebensfähiger sind als die Gameten mit einer aneuploiden Chromosomenzahl, vor allem wenn darin *D. glomerata* Chromosomen enthalten sind. Alle diese Barrieren führen zu Nachkommen, die reinem *L. multiflorum* entsprechen.

Nur Rückkreuzungen mit *L. multiflorum* als Samenerter und den F₁-Hybriden als Pollenerter waren erfolgreich. Möglicherweise sind Kreuzungen mit der F₁-Hybride als Pollenerter generell aussichtsreicher, doch gelang OERTEL (1997) die Erzeugung einer vitalen BC₁-Hybride bei Verwendung der F₁-Pflanze 6 als Samenerter.

Eine Kreuzung von BC₂-Pflanze 1 als Pollenerter mit *L. multiflorum* als Samenerter brachte 30 Pflanzen hervor, die aber – im Gegensatz zu den 23 erzeugten BC₁-Hybriden – alle reinem *L. multiflorum* entsprachen. Die 7 *D. glomerata*-Chromosomen könnten zwar bei allen Nachkommen eliminiert worden sein, aber dies halte ich für unwahrscheinlich. Durch die Phytohormonbehandlung war auch die Entwicklungsmöglichkeit von Embryonen mit Hybridcharakter sichergestellt. Wahrscheinlich lag eine Kontamination mit arteigenem, kompatiblen Pollen vor, z. B. durch unsauberen Verschluss der Tüte, Risse in dieser oder Verunreinigungen der Geräte mit unerwünschtem Pollen während der Bestäubung.

In einer der beiden aus Antherenkultur von der F₁-Pflanze 3 erhaltenen Nachkommen [Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x)] wurden sowohl Zellen mit dem kompletten unreduzierten Genom der Donorpflanze als auch darüber hinaus Zellen mit einigen weiteren Chromosomen gefunden. Die Antherenkultur scheint hier zu

somaklonaler Variation (LARKIN und SCOWCROFT 1981, PHILLIPS et al. 1994, VAZQUEZ 2001) mit daraus resultierender Mixoploidie und somatischer Vermehrung der Chromosomenzahl geführt zu haben. Das andere Regenerat war wahrscheinlich dihaploid (reduziertes Genom). Mixoploidie ist ein bei Antherenkultur häufig beobachtetes Phänomen, auch bei intergenerischen Hybriden (SHARMA et al. 1999: *Triticum aestivum* × *Thinopyrum spec.*).

Nach Antherenkultur von Hartweizen (*T. turgidum*, $2n=4x=28$, AABB) wurden von DOĞRAMACI-ALTUNTEPE et al. (2001) neben anderen Änderungen und Abnormalitäten in der Chromosomenstruktur Translokationen zwischen dem A- und B-Genom gefunden. Bei 10 Weizen-Roggen-Hybriden entdeckten LAPITAN et al. (1984) nach Gewebekultur Änderungen in der Chromosomenstruktur und insgesamt 3 Weizen-Roggen- und eine Weizen-Weizen- Translokation. MOLNÁR-LÁNG et al. (2000a) schließlich fanden, dass etwas mehr als 20 % der BC₂F₂-Weizen-Gerste-Hybriden (12 von 51 Pflanzen), deren F₁-Hybriden einen Zyklus *in vitro* Vermehrung durchlaufen hatten (Gewebekultur von Teilen junger Blütenstände), Translokationen zwischen den Chromosomen beider Elterngenome aufwiesen. MOLNÁR-LÁNG et al. (2000a) führen die hohe Frequenz intergenerischer Translokationen auf die *in vitro* Kultur zurück.

Die Antherenkultur könnte somit zur Manipulation des Genoms der Hybriden genutzt werden, wobei intergenerische Translokationen bei den beiden *Lolium-Dactylis*-Antherenkulturregeneraten nicht beobachtet wurden.

Wichtiger als ein Mittel zur somaklonalen Variation ist die Antherenkultur zur Erzeugung von chromosomalen Additionslinien (s. 1.1). Antherenkultur stellt eine Alternative oder Ergänzung zur rekurrenten Rückkreuzung dar, im vorliegenden Fall mit diploidem *L. multiflorum* als Kreuzungspartner, da die Rückkreuzungen aller *L. multiflorum* - *D. glomerata* - Hybriden mit *D. glomerata*, auch die der F₁-Hybriden, erfolglos verliefen. Von den durch Rückkreuzung mit *L. multiflorum* erzeugten BC₁- und BC₂-Hybriden wurden in dieser Arbeit allerdings keine grünen Regenerate aus Antherenkultur erhalten. Bei intergenerischen Hybriden zwischen Weizen × *Thinopyrum* (F₁, BC₁, BC₂ und BC₂F₂) gelangen SHARMA et al. (1999) im Gegensatz dazu die erfolgreiche Reduzierung des Genomes mittels Antherenkultur.

Bei der Anwendung der Antherenkultur zur Erzeugung disomer chromosomaler Additionslinien liegen nach Halbierung des Genoms durch Antherenkultur und anschließender spontaner oder artifizierlicher Verdoppelung alle Chromosomen doppelt vor. Sämtliche vorher in der Pflanze vorhandenen Univalente, im Idealfall die zusätzlich zum euploiden *Lolium*-Genom (diploid oder tetraploid) vorhandenen *D. glomerata* Chromosomen, sind somit entweder zusammen mit einem identischen und damit auch in der Meiose homologen Chromosom vorhanden oder fehlen. Ob ein Univalent noch vorliegt, hängt vom Verlauf der Meiose der PMZ ab. Zusätzlich neben dem *Lolium*-

Genom vorhandene *D. glomerata* Chromosomen werden während der Meiose zwar wahrscheinlich bevorzugt eliminiert und euploide Gameten ohne zusätzliche *D. glomerata* Chromosomen zeichnen sich wohl durch eine erhöhte Konkurrenzfähigkeit aus, doch nach Verdoppelung sollten sich die Paare von *D. glomerata* Additionschromosomen über die Generationen hinweg stabil verhalten. Die meiotische Paarung der *D. glomerata* Chromosomen könnte dann erfolgen und bei Kreuzung zweier Pflanzen mit Paaren der gleichen Additionschromosomen hätten die Nachkommen wieder zwei zueinander homologe Chromosomen, die sich meiotisch paaren können.

Als Beispiele hierfür dienen disome Additionslinien aller 7 Gerste-Chromosomen bei Weizen-Gerste-Hybriden (ISLAM et al. 1981, ISLAM und SHEPHARD 2000) und disome Additionslinien von 7 der 10 Maischromosomen bei Hafer-Mais-Hybriden (KYNAST et al. 2001). Aufgrund der Selbstinkompatibilität (SI) bei den verwendeten Futtergräsern gestaltet sich die Erzeugung von Additionslinien allerdings schwieriger. Es müssten mehrere Pflanzen mit dem gleichen *D. glomerata* Chromosomenpaar erzeugt werden, die sich genetisch in den SI-Allelen voneinander unterscheiden, um eine Additionslinie zu erschaffen. Nur bei Unterschieden in den SI-Allelen wäre die Möglichkeit zu einer hohen Fertilität bei gegenseitiger Bestäubung gegeben. Dieses Ziel könnte erreicht werden, indem eine Pflanze, die neben dem *L. multiflorum* Genom ein zusätzliches *D. glomerata* Chromosomenpaar besitzt, mit *L. multiflorum* als Kreuzungspartner rückgekreuzt wird, mit den Nachkommen Antherenkultur durchgeführt wird und nachfolgend die grünen Regenerate, die noch ein *D. glomerata* Chromosom aufweisen, polyploidisiert werden. Durch die Rückkreuzung mit *L. multiflorum* besteht die Chance, andere SI-Allele einzukreuzen; die anschließende Antherenkultur und Polyploidisierung sind nötig, um die nach der Rückkreuzung als Univalente vorhandenen *D. glomerata* Chromosomen wieder paarweise zu erhalten (s. 1.1).

Bei den 9 Nachkommen der komplett sterilen, allotriploiden F₁-Pflanze 1 der Kombination *L. multiflorum* (2x) × *D. glomerata* (4x), die aus Gewebekultur von Teilen unreifer Blütenstände hervorgegangen waren, wurde keine somaklonale Variation beobachtet. Die Gewebekultur erwies sich hier als Mittel zur Klonierung, aber nicht zur Veränderung der Chromosomenzahl oder zur Induktion von intergenerischen Translokationen.

Im Gegensatz zu der stabilen Chromosomenzahl bei den F₁-Hybriden der Kombinationen *F. pratensis* (2x; 4x) × *D. glomerata* (4x) und *L. multiflorum* (2x; 4x) × *D. glomerata* (4x) (s. Tab. 4) sowie bei den BC₁-Hybriden zwischen *L. multiflorum* × *D. glomerata* (s. Tab. 8) fand in 3 der 6 BC₂-Hybriden eine somatische Eliminierung von *D. glomerata* Chromosomen statt (s. Tab. 11). Dies legt die Vermutung nahe, dass

somatische Eliminierung der *D. glomerata* Chromosomen bei Hybriden dieser Kombination vorrangig – oder möglicherweise auch ausschließlich – erst in einer weiter fortgeschrittenen Generation (ab BC₂/F₂) erfolgt, bzw. erst, wenn die *D. glomerata* Chromosomen nur noch einen geringen Anteil am Gesamtgenom der Hybride stellen.

Gründe für die somatische, also nach der Meiose auftretende, Eliminierung von in der Minderzahl vorliegenden *D. glomerata* Chromosomen könnten, wie bei der meiotischen Eliminierung, in Genomdisharmonien und Unterschieden im Zellzyklus sowie in der Kinetochorstruktur, also in Unterschieden bei den Kinetochorproteinen, zu suchen sein. Wurden *D. glomerata* Chromosomen somatisch eliminiert, ist es möglich, dass Pflanzensegmente ohne oder mit weniger zusätzliche(n) *D. glomerata* Chromosomen vitaler sind, sich im Laufe der Pflanzenentwicklung als konkurrenzfähiger erweisen und vorhandene Segmente mit *D. glomerata* Chromosomen verdrängen. Denkbar ist auch ein aktives Absterben (Apoptose) von Segmenten mit *D. glomerata* Chromosomen. Von MARUBASHI et al. (1999) ist dies für *Nicotiana glutinosa* × *N. repanda* - Hybriden und von YAMADA et al. (2000, 2001) für *Nicotiana suaveolens* × *N. tabacum* - Hybriden untersucht worden.

Die Erstellung von Additionslinien zwischen *L. multiflorum* und *D. glomerata* wird durch die auftretende somatische Eliminierung der Additionschromosomen erheblich erschwert. Über die generelle Häufigkeit dieses Phänomens bei *Lolium-Dactylis*-Hybriden lässt sich allerdings keine Aussage machen. Zwar wurde bei 50 % der erzeugten BC₂-Hybriden die somatische Eliminierung von *D. glomerata* Chromosomen beobachtet, doch ist die absolute Zahl von 6 BC₂-Hybriden zu gering, um allgemein bestimmen zu können, wie häufig somatische Eliminierung bei Hybriden zwischen diesen beiden Arten wirklich stattfindet. Auch wäre es denkbar, dass bestimmte *D. glomerata* Chromosomen davon häufiger betroffen sind als andere, so dass für einige *D. glomerata* Chromosomen die Chancen zur Schaffung von Additionslinien deutlich besser stehen. Besondere Schwierigkeiten bei der Erstellung von Additionslinien eines bestimmten Chromosoms traten beispielsweise zwischen Saatweizen (*Triticum aestivum*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) auf, wo es für Gerste-Chromosom 1H erst im Jahr 2000 gelang, Additionslinien dieses Chromosoms zu schaffen (ISLAM und SHEPHARD 2000), während dies für die anderen 6 Gerste-Chromosomen bereits ca. 20 Jahre früher möglich war (ISLAM et al. 1981). Gerste-Chromosom 1H führte, wenn es zum Saatweizengenom addiert war, zu starken meiotischen Störungen und daraus folgend zu hoher Sterilität (ISLAM et al. 1981). Erst durch die Erzeugung von disomischen-monotelodisomischen Additionslinien (Weizengenom + Disom 6H + Monotelodisom 1H/1HS) konnte das Problem überwunden werden (ISLAM und SHEPHARD 2000). Für die Arten *L. multiflorum* und *D. glomerata* ist so auch denkbar, dass Additionslinien für bestimmte Chromosomenpaare stabil sind, möglicherweise

ähnlich wie den erwähnten Saatweizen-Gerste Additionslinien bei Vorliegen von 2 bestimmten *D. glomerata* Chromosomenpaaren.

Wenn Additionslinien von *L. multiflorum* mit *D. glomerata* Chromosomen oder *L. multiflorum* Linien mit *D. glomerata* Translokationen, bei denen der Transfer agronomisch interessanter Gene stattfand, erfolgreich produziert wurden, dann können diese *L. multiflorum* Pflanzen auch für eine Brückenkreuzung zwischen *F. pratensis* und *D. glomerata* genutzt werden. Auf diesem Weg könnten dann Eigenschaften von *F. pratensis* und *D. glomerata* kombiniert werden, falls dies durch eine direkte Kreuzung zwischen diesen beiden Arten nicht möglich ist. Beispielsweise wurde dies von SEARS (1956) zwischen *Aegilops umbellulata* und *Triticum aestivum* über die Kreuzung (*Ae. umbellulata* × *T. dicoccoides*) × *T. aestivum* durchgeführt. DOUSSINAULT et al. (1983) gelang über eine Brückenkreuzung mit *T. turgidum* der Transfer von Krankheitsresistenz von *Ae. ventricosa* in Saatweizen (*T. aestivum*).

Die drei erzeugten 3-Weg-Hybriden zwischen (*L. multiflorum* × *F. pratensis*) × *D. glomerata* stellten einen Ansatz in dieser Richtung dar. Ihre Vitalität war sehr gering, doch befanden sich in den Antheren der 3-Weg-Hybride F₁-Pflanze 11, die als einzige einen Blütenstände bildete, sterile Pollenkörner. Im Gegensatz dazu abortierte die Entwicklung bei den beiden *F. pratensis* - *D. glomerata* - Hybriden, die von den vier Hybriden zwischen diesen beiden Arten Blütenstände bildeten, früher. Bei der allotriploiden F₁-Pflanze 7 waren während der Blüte keine Antheren/Fruchtknoten mehr vorhanden und bei der allotetraploiden F₁-Pflanze 8 enthielten die Antheren keine Pollenkörner. Dies unterstützt die bereits getroffene Aussage (s. 4.1), dass die Kreuzbarkeit von *L. multiflorum* mit *D. glomerata* höher war als die von *F. pratensis* mit *D. glomerata*.

Obwohl die Genome von *L. multiflorum* und *D. glomerata* als inhomolog betrachtet werden können, da weder in dieser Arbeit noch von OERTEL et al. (1996a) und OERTEL (1997) intergenerische meiotische Paarung beobachtet wurde und diese daher nicht oder sehr selten auftritt, konnte eine Translokation zwischen beiden Genomen nachgewiesen werden. Unter den 6 BC₂-Pflanzen, deren Hybridcharakter mittels GISH bestätigt wurde, weist BC₂-Pflanze 5 (s. Tab. 11) eine von *D. glomerata* stammende terminale Translokation an einem *L. multiflorum* Chromosom auf. Im jungen Stadium dieser Pflanze wurden in einem Teil mehrere *D. glomerata* Chromosomen gefunden, in einem anderen Teil keine, aber stattdessen jene Translokation. Alle späteren Analysen zeigten die terminale Translokation, aber keine *D. glomerata* Chromosomen.

Hinweise zu einer möglichen intergenerischen meiotischen Paarung der Chromosomen in der BC₁-Pflanze 1 ließen sich von OERTEL (1997) nicht finden. Gepaarte nicht-homologe Chromosomen führte er auf intragenomische Paarung innerhalb des *L.*

multiflorum Genoms zurück. MORGAN (1990) wies dasselbe Verhalten intragenomischer Paarung inhomologer Chromosomen in PMZ allotriploider Hybriden der Kombinationen *L. multiflorum* × *F. donax*, *L. multiflorum* × *F. drumeja* und *F. scariosa* × *F. donax* nach.

In der BC₂-Pflanze 5 ist sehr wahrscheinlich von einer somatisch induzierten Translokation auszugehen. Wäre die Translokation meiotischen Ursprungs, so müsste sie auch in dem Teil der Pflanze vorhanden gewesen sein, der die *D. glomerata* Chromosomen enthielt. Dies war nicht der Fall. Später wurde in allen untersuchten Wurzelspitzen und PMZ ausschließlich die terminale Translokation nachgewiesen und es fanden sich keine *D. glomerata* Chromosomen mehr. Offensichtlich kam es nach der Befruchtung zu einer somatisch induzierten Translokation; die *D. glomerata* Chromosomen wurden während dieses Vorgangs oder bald danach eliminiert. Ein Segment der Pflanze enthielt weiterhin die zusätzlichen *D. glomerata* Chromosomen, ohne die intergenerische Translokation aufzuweisen. Später konnte dann dieses Segment nicht mehr nachgewiesen werden und es wurde auch keines ohne *D. glomerata* Chromosomen und ohne Translokation gefunden. Ein solches Segment hätte durch somatische Eliminierung der *D. glomerata* Chromosomen in dem Pflanzenteil ohne die intergenerische Translokation entstehen können.

Dies legt die Vermutung nahe, dass das Segment der Pflanze mit den zusätzlichen *D. glomerata* Chromosomen und ohne die Translokation im Laufe der Pflanzenentwicklung abortierte oder aufgrund verminderten Wachstums im Vergleich zu den Teilen ohne *D. glomerata* Chromosomen verdrängt wurde. Eine Ursache hierfür könnten Genomdisharmonien und mitotische Störungen sein.

Die Translokation in einem *L. multiflorum* Chromosom scheint im Gegensatz zu zusätzlichen *D. glomerata* Chromosomen, deren Eliminierung oft nachgewiesen wurde (s. o.), stabil zu sein. Die Existenz von intergenerischen Translokationen stellt eine Möglichkeit zum Gentransfer mittels Introgression dar. Die somatische Instabilität bereitet bei der Schaffung von Additionslinien Probleme. Dies würde sehr wahrscheinlich beim Transfer von Genen mittels Introgression umgangen werden. Bei *Lolium-Festuca*-Hybriden ist der Transfer von erwünschten Genen mittels Introgression eine erprobte Methode mit unmittelbarem Nutzen für die praktische Pflanzenzüchtung. Als Beispiel mag hier der Transfer der Resistenz gegen Kronenrost von *Festuca* in *L. multiflorum* dienen (OERTEL 1997 und OERTEL und MATZK 1999). Der kurze Arm des Roggenchromosomes 1R, der mehrere Gene für Krankheitsresistenzen trägt, wurde erfolgreich in viele hoch ertragreiche Weizensorten eingebracht (RAJARAM et al. 1983). Bei *L. multiflorum* × *D. glomerata* - Hybriden sind hier noch weitere Untersuchungen nötig, um die praktische Nutzbarkeit bewerten zu können. Vor allem müsste untersucht werden, ob eine Expression der von *D. glomerata* stammenden translozierten Gene im

Lolium-Genom stattfindet. Bei der BC₂-Pflanze 5 wurden phänotypisch keine Merkmale von *D. glomerata* festgestellt.

Überlegenswert ist in diesem Zusammenhang die Erhöhung der Translokationshäufigkeit. Sie könnte z. B. mit Durchlaufen eines Kallusstadiums, sei es im Rahmen einer Antherenkultur oder bei Gewebekultur von Teilen unreifer Blütenstände, gesteigert werden (s. o.). Als weitere Behandlungen, die intergenerische Translokationen induzieren können, sind mutagene Strahlen wie z. B. Neutronen- oder Röntgenstrahlen (zusammengefasst in SHARMA und SHARMA 1999) und Chemikalien zu nennen. In diesem Zusammenhang sind auch die DNS demethylierende Chemikalien wie 5-Azacytidin interessant.

Bei den vorliegenden F₁-Hybriden erscheint das Durchlaufen einer Kallusphase im Gegensatz zu Weizen-Gerste-Hybriden (MOLNÁR-LÁNG et al. 2000a) als weniger geeignet zum Induzieren von intergenerischen Translokationen (s. o.). Eine Behandlung mit 5-Azacytidin könnte effizienter sein. Bei den Hybriden weiter fortgeschrittener Generation (ab der BC₂) hingegen könnten beide Ansätze erfolgreich sein. Es treten bei diesen Pflanzen somatische Instabilität und Eliminierung und, wie in einem Fall nachgewiesen, intergenerische Translokation auf. Eine Kallusphase könnte aufgrund somaklonaler Variation deren Häufigkeit möglicherweise erhöhen.

Hypomethylierung bei intergenerischen Hybriden, untersucht an Triticalekeimpflanzen mit 5-Azacytidin, führt nach CASTILHO et al. (1999) zu einer Vermischung der DNS beider Genome im Interphasekern. Normalerweise vermischt sich die DNS der verschiedenen Genome bei Hybriden nicht oder nur sehr wenig (s. 3.1.4, s. 4.6). Die mit 5-Azacytidin behandelten, hypomethylierten Triticalepflanzen wiesen zum Teil Weizen-Roggen Translokationen auf, was bei den unbehandelten von CASTILHO et al. (1999) nicht beobachtet wurde. Diese Methode kann auch bei *L. multiflorum* × *D. glomerata* - Hybriden als vielversprechend zur Induktion von intergenerischen Translokationen bewertet werden.

Nach Induktion der Hypomethylierung könnte die Erfassung der Vermischung der DNS beider Eltern Genome im Interphasenucleus mittels GISH erfolgen. Die Wirksamkeit der Demethylierung lässt sich mittels von der Methylierung abhängigen Restriktionsenzymen über AFLP Analyse (MATTHES et al. 2001) oder Änderungen in der Genexpression über AFLP-cDNA Analyse (COMAI et al. 2000, COMAI 2000) überprüfen.

COMAI (unveröffentlicht, zitiert in COMAI 2000) beobachtete allerdings bei *Arabidopsis*-Hybriden, die mit 5-Azacytidin behandelt wurden, eine im Vergleich zur Kontrolle weitaus höhere Intensität und Häufigkeit von phänotypischen Störungen (Zwergwuchs, Tumorbildung u. ä.). Dies schränkt die Nützlichkeit einer 5-Azacytidinanwendung zur Induktion intergenerischer Rekombination deutlich ein.

Neben gattungs- und artspezifischen Unterschieden in der Effizienz von einzelnen Mutagenen sowie Unterschieden in der Mutationsform (Punkt-, Leseraster-, Chromosomen- oder Genommutation) sind nach LUNDQVIST und LUNDQVIST (1988) verschiedene Mutagene unterschiedlich effizient je nach Locus des Chromosoms. Es ist wahrscheinlich nötig, durch Versuche die optimale Methode zur Induktion von Translokationen bei den *L. multiflorum* × *D. glomerata* - Hybriden herauszufinden.

Zahlreiche intergenerische Hybriden mit Weizen wurden erzeugt. Roggen-Weizen-Hybriden (Triticale) sind seit ca. 125 Jahren bekannt (1875 von WILSON beschrieben – in: MÜNTZING, 1979), eine Gerste-Weizen Hybride wurde erstmalig von KRUSE 1973 erzeugt und beschrieben.

Es treten mehr oder weniger regelmäßig bei Hybriden zwischen *Triticum* und näher verwandten Gattungen (innerhalb der Tribus Triticeae) intergenerische Translokationen auf, überwiegend wohl aufgrund der auch beobachteten intergenomischen meiotischen Chromosomenpaarung, (z. B. JAUHAR und CHIBBAR 1999: Zusammenfassung; MILLER et al. 1994, BENAVENTE et al. 1996 + 1998, SÁNCHEZ-MORÁN et al. 1999: *Triticum aestivum* × *Secale cereale*; ISLAM und SHEPHERD 1988 + 1992, MOLNÁR-LÁNG et al. 2000a+b, MALYSHEVA et al. 2003: *Triticum aestivum* × *Hordeum vulgare*; BENAVENTE et al. 2001: *T. turgidum* × *Aegilops ovata*; SHARMA et al. 1995: *T. aestivum* × *Thinopyrum intermedium*). JAUHAR und PETERSON (2001) fanden bei allotetraploiden Hybriden zwischen *Thinopyrum junceiforme* ($2n=4x=28$; $J_1J_1J_2J_2$) und *Triticum turgidum* ($2n=4x=28$; AABB) trotz der weitgehenden Sterilität der F_1 -Hybriden gelegentliche intergenerische meiotische Chromosomenpaarung und daraus resultierende intergenerische Translokationen.

Das Ph1-Gen (Ph = Pairing homologues, OKAMOTO 1957, SEARS und OKAMOTO 1958, RILEY und CHAPMAN 1958) und einige weitere Gene des Weizens (SEARS 1977), besonders noch das Ph2-Gen (BENAVENTE et al. 1998, RAINA und RANI 2001), spielen hierbei eine wichtige Rolle. Fehlt das Ph1-Gen (z. B. ph1b-Mutante, SEARS 1976), so ist die Frequenz intergenerischer bzw. intergenomischer Translokationen deutlich höher (SEARS 1977, z. T. zusammengefasst in ISLAM und SHEPHERD 1988, ISLAM und SHEPHERD 1992, SHERMAN et al. 2001, BENAVENTE et al. 2001). Im allotetraploiden Hartweizen (*Triticum turgidum* ssp. *durum*, $2n=4x=28$, AABB) oder im allohexaploiden Saatweizen (*T. aestivum*, $2n=6x=42$, AABBDD) selber erfüllt das Ph1-Gen die Aufgabe, eine ausschließliche meiotische Chromosomenpaarung zwischen den homologen Chromosomen innerhalb eines der jeweils 2 bzw. 3 Genome zu fördern (SEARS 1976, GILLIES 1987, MARTINEZ-PEREZ et al. 1999), so dass eine Paarung zwischen den homöologen Chromosomen der 2 (Hartweizen) bzw. 3 (Saatweizen) Genome nicht vorkommt. Dies gewährleistet die genetische Stabilität und Balance dieser Arten über die Generationen.

In Weizenhybriden, bei denen keine homologen Chromosomen vorhanden sind, findet unabhängig davon, ob das Ph1-Allel vorhanden ist oder nicht, meiotische Paarung zwischen homöologen Chromosomen statt (GILLIES 1987). MARTINEZ-PEREZ et al. (1999) schließen daraus, dass das Ph1-Gen die meiotische Paarung homologer Chromosomen fördert und nicht die Paarung homöologer unterdrückt.

Nach Identifikation eines dem Ph1-Gen entsprechendem Genes in Hybriden zwischen *L. multiflorum* × *D. glomerata* könnte dessen Inaktivierung auch bei diesen Hybriden zu einer erhöhten Translokationsfrequenz führen. Es ist allerdings fraglich, ob hier ein solches Gen überhaupt existiert. Hart- und Saatweizen sind stabile, fertile amphiploide Arten, bei denen das Ph1-Gen einen wichtigen, aber nicht alleinigen Teil zur Stabilität und Fertilität beiträgt. Die erzeugten Hybriden zwischen *L. multiflorum* / *F. pratensis* × *D. glomerata* sind steril und es treten verschiedene Entwicklungsstörungen auf (s. o.). Definiert man die Genome zwischen *L. multiflorum* / *F. pratensis* und *D. glomerata* als zueinander inhomolog, und die Genome des Weizens als zueinander homöolog, so erklärt sich die unterschiedliche Frequenz intergenomischer Translokationen zwischen *Lolium/Festuca-Dactylis*-Hybriden und Weizenmutanten ohne aktives Ph1-Gen mit der verschiedenen verwandtschaftlichen Nähe der Genome.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang aber der Transfer (am Erfolg versprechendsten wohl mit gentechnischen Methoden) eines Ph1-Genes in F₁-Hybriden zwischen *L. multiflorum* und *L. perenne* × *F. pratensis*. Würde es hier exprimiert und wie in Weizen funktionieren, wäre ein Weg gefunden, stabile und fertile *Lolium-Festuca pratensis* - Hybriden zu erzeugen (s. 4.4), da die Häufigkeit intergenerischer Translokationen erheblich verringert würde.

Weitere Wege bei weiten Kreuzungen mit Weizen, die Frequenz intergenerischer Translokationen zu erhöhen, waren das Einbringen eines gametoziden Chromosoms von *Aegilops cylindrica* in Weizen, das Chromosomenbrüche zur Folge hatte und damit zu einer erhöhten Frequenz auch intergenerischer Translokationen führte (SCHUBERT et al. 1998, SHI und ENDO 1999) sowie die Selektion von Weizenpflanzen mit einer erhöhten Kreuzbarkeit mit Gerste und einer erhöhten Frequenz intergenerischer Translokationen (KOBAYASHI et al. 1997).

Die erste Methode müsste zuerst für *L. multiflorum* × *D. glomerata* - Hybriden adaptiert werden und aufgrund der verwandtschaftlichen Distanz zwischen *Aegilops* einerseits und *Lolium*, *Festuca* und *Dactylis* andererseits sind hierbei größere Schwierigkeiten zu erwarten. OERTEL (1997) gelang die Identifizierung einer *L. multiflorum* Pflanze mit erhöhter Kreuzbarkeit mit *D. glomerata*. Es wurden allerdings nur 2 Hybriden erhalten (OERTEL 1997). Bei diesen wurden keine intergenerischen Translokationen gefunden. Über eine möglicherweise erhöhte Frequenz intergenerischer meiotischer

Rekombination läßt sich aufgrund der geringen Pflanzenzahl und der geringen Anzahl fertiler Gameten keine Aussage treffen.

Desweiteren ist *L. multiflorum* keine ausdauernde Pflanze, so dass die Erhaltung von einzelnen Pflanzen mit erhöhter intergenerischer Kreuzbarkeit schwierig ist, vor allem nachdem die Pflanzen bereits blühen. Die Vitalität ist anschließend nur noch gering. Erst durch die Erzeugung von *L. multiflorum* Linien, bei denen alle Pflanzen die erhöhte Kreuzbarkeit mit *D. glomerata* haben, könnten immer wieder neue derartige Pflanzen mit hoher Vitalität zum Kreuzen erzeugt werden.

Die Möglichkeit, durch intergenerische Translokationen, auch in somatischen Zellen, einen Gentransfer zu vollziehen, wird unter anderem auch in Weizen × Mais - Hybriden untersucht, bei denen nur in den frühen Embryonalstadien das Maisgenom vorhanden ist (OERTEL et al. 1996b, CHEN et al. 2000). Bei Verwendung von Maislinien, deren Genom aktive Transposons enthält, ist die Chance zu intergenerischen Translokationen deutlich höher. Für Gerste-Mais Kreuzungen (Ac- und Mu-Transposon) wurde dies von CHEN et al. (1991) untersucht, für Weizen-Mais Kreuzungen (diverse Retrotransposons) von CHEN et al. (2000) und für Hafer-Mais Kreuzungen (Mu-Transposon) von RIERA-LIZARAZU et al. (1996). RIERA-LIZARAZU et al. (1996) gelang es, eine Maistranslokation im Hafergenom mittels GISH nachzuweisen.

Gene aber, die eng mit Genen gekoppelt sind, welche mit Sterilität oder fehlender Vitalität in den Hybriden einhergehen, sind schwierig mittels Introgression zu transferieren. Hier bieten nur amphiploide Hybriden oder Additionslinien bzw. Substitutionslinien eine Möglichkeit, bei denen das gesamte Chromosom vorliegt, auf dem sich das gewünschte Gen befindet. Bei diesem Chromosom sollte im Regelfall, wie in dem Ausgangselter, die Exprimierung der letalen Gene unterdrückt sein.

Zwar wurde eine intergenerische Translokation zwischen *L. multiflorum* und *D. glomerata* nachgewiesen, aber die Genome beider Arten müssen trotzdem als zueinander inhomolog betrachtet werden, auch wenn die Beurteilung zweier Genome als zueinander homöolog oder inhomolog bis zu einem gewissen Grad willkürlich ist. Intergenomische meiotische Chromosomenpaarung wurde weder im Rahmen dieser Arbeit noch von OERTEL et al. (1996a) und OERTEL (1997) beobachtet.

4.3 Antherenkultur als Mittel zur Erzeugung homozygoter *Lolium-Festuca*-Hybriden

Antheren, deren Pollenkörner sich etwa im späten Einzell-Stadium befanden, hatten sich als am besten geeignet für Antherenkultur bei Poaceae erwiesen (OLESEN et al.

1988, WENZEL und FOROUGH-WEHR 1984). Dies wurde bei der Durchführung der Antherenkultur beachtet.

Benötigten Kalli zum Erreichen einer Größe, die einen Transfer von IM auf RM sinnvoll erscheinen ließ, mehr als 90 Tage, so war die Wahrscheinlichkeit sehr gering, dass aus ihnen Pflanzen, vor allem grüne, gebildet wurden (s. Tab. 17). Als Empfehlung für die Verwendung der Antherenkultur in der Pflanzenzüchtung bei *Lolium-Festuca*-Hybriden kann gesagt werden, dass die auf Medium aufgesetzten Antheren nach ca. 90 Tagen verworfen werden können.

Regenerationsfähigkeit in Antherenkultur

Eine Kältevorbehandlung der Antheren der *Lolium-Festuca*-Hybriden von 1 bis 3 Wochen bei 4°C war bis zu einem bestimmten Grad förderlich für die Regeneration in der Antherenkultur und ist empfehlenswert. Während ZARE (1996; in ZARE et al. 2002) im Gegensatz dazu keine Erhöhung der Regenerationsfähigkeit durch eine Kältevorbehandlung bei Antherenkultur von *Lolium-Festuca*-Hybriden fand, betrachteten POSSELT und RAPP (1997) für die Antherenkultur bei *L. multiflorum* / *perenne* eine Kältevorbehandlung der Antheren von 1 bis 3 Wochen als optimal. Eine Kältevorbehandlung ist in jedem Fall vorteilhaft, wenn zu einem bestimmten Zeitpunkt viele Pflanzen in das günstigste Stadium für die Antherenkultur eintreten, es vom Umfang aber nicht möglich ist, alle Pflanzen zu diesem Zeitpunkt zu behandeln. Durch Variation in der Länge der Kältevorbehandlung kann so die anfallende Arbeit auf einen größeren Zeitraum verteilt werden. Insgesamt ist aber hervorzuheben, dass der Genotyp der Donorpflanze weitaus entscheidender als eine Kältevorbehandlung für die Regenerationsfähigkeit in Antherenkultur war (s. u.).

Für die Betrachtung der Regenerationsfähigkeit in Antherenkultur sind vor allem zwei Aspekte wichtig: Die Regenerationsfrequenz und die Vitalität der Regenerate. Während eine hohe Regenerationsfrequenz notwendig für die Erzeugung zahlreicher Pflanzen ist, stellt eine ausreichende Vitalität eine entscheidende Voraussetzung für die weitere Entwicklung der Regenerate dar.

Die überwiegende Anzahl der Antherenkulturregenerate der vorliegenden Arbeit in den Ausgangskombinationen 1; 3 und 4 (s. 2.1.3) waren vital, so dass weniger als 10 % der Regenerate im ersten Jahr starben. Die wenigen produzierten Regenerate der Ausgangskombination 2 [*Festuca pratensis* (4x) × *Lolium perenne* (4x)] erwiesen sich als schwach vital und starben zum großen Teil während des ersten Jahres. Regenerate der tetraploiden Sorten 'Sulino' und 'Felopa' der Kombination *F. pratensis* × *L. multiflorum* zeigen eine hohe Vitalität, da nach LEŚNIEWSKA et al. (2001) 95 % der durch Antherenkultur gebildeten Pflanzen dieser beiden Sorten im ersten Jahr blühten, was in der Regel eine gewisse Vitalität voraussetzt.

ZWIERZYKOWSKI et al. (1998a) beobachteten bei Antherenkultur von *Festuca arundinacea* (6x) × *L. multiflorum* (4x) F₁-Hybriden, dass die Regenerate aus Antherenkultur zu einem großen Teil schwach vital waren und ein Drittel im ersten Jahr abstarben. Bei den Untersuchungen von ZARE et al. (2002) in der reziproken Kreuzung starben von 1339 grünen Regeneraten sogar 832 (62 %) bald nach ihrer Entstehung ab. In beiden Fällen wurde oft eine schwache Wurzelentwicklung beobachtet – ähnlich wie bei vielen der in dieser Arbeit untersuchten Hybriden zwischen Eltern mit inhomologen Genomen.

Regenerate von Hybriden zwischen *L. multiflorum* × *F. pratensis* scheinen weitaus vitaler zu sein als die von den anderen *Lolium-Festuca*-Hybriden. Die Ausgangskombination 4 (*F. pratensis* × *L. boucheanum*) bei den in dieser Arbeit verwendeten Donorpflanzen kann durchaus dazu gerechnet werden, da *L. boucheanum* eine Hybridart von *L. multiflorum* × *L. perenne* darstellt.

Gründe dafür könnten in einer größeren Disbalance bei den Hybriden zwischen *F. arundinacea* und *L. multiflorum* als zwischen *F. pratensis* und *L. multiflorum* (Kombinationen 1; 3 und 4; s. 2.1.3) liegen, verursacht durch größere genetische Distanz zwischen dem Genom von *L. multiflorum* und dem von *F. arundinacea* var. *glaucescens* stammenden Teilgenom von *F. arundinacea* (HUMPHREYS et al. 1995; s. 4.5). Die geringe Vitalität der Regenerate aus der Kombination 2 (*F. pratensis* × *L. perenne*) könnte ihre Ursache ebenfalls in größerer genetischer Distanz und daraus folgender Disbalance zwischen den Hybridgenomen haben. Der pentaploide Charakter verursacht bei den Hybriden zwischen *F. arundinacea* (6x) × *L. multiflorum* (4x) wahrscheinlich ebenfalls vermehrt Störungen in den Regeneraten aus Antherenkultur, bedingt durch meiotische Irregularitäten wie Multi- und Univalentbildungen (KLEIJER 1984, HUMPHREYS 1989) und daraus folgenden hohen Schwankungen in der Chromosomenzahl in den Gameten (ZWIERZYKOWSKI et al. 1998a).

ZWIERZYKOWSKI et al. (1999b) erhielten aus 6360 Antheren von F₁-Hybriden der Kombination *F. arundinacea* (6x) × *L. multiflorum* (4x) 3460 Albinopflanzen (54,4 %) und 676 grüne Regenerate (10,6 %), was einer hohen Regenerationfrequenz entspricht. Beachtenswert ist, dass insgesamt 6950 Kalli (109 %) generiert wurden, d. h. es gingen im Mittel aus einer Anthere mehr als ein Kallus hervor, wie es auch gelegentlich in dieser Arbeit beobachtet wurde. ZARE et al. (2002) erzeugten mittels Antherenkultur (3326 Antheren) von einem einzigen Genotyp der reziproken Kombination *L. multiflorum* (4x) × *F. arundinacea* (6x) 1010 Albinopflanzen (30 %) und 1339 grüne Regenerate (40 %), wobei aber nur 507 grüne Regenerate (15 % Regenerationsfrequenz bezogen auf Antheren) nach dem Pikieren in Erde überlebten. LEŚNIEWSKA et al. (2001) produzierten von 18083 Antheren der amphidiploiden Sorten 'Sulino' und 'Felopa' (*F. pratensis* × *L. multiflorum*) 1280 Albinopflanzen (17,1 % bezogen auf gebildete Embryonen; 7,1 %

bezogen auf Antheren) und 1130 grüne Regenerate (15,1 % bezogen auf gebildete Embryonen; 6,2 % bezogen auf Antheren).

Im Wesentlichen stimmen die von LEŚNIEWSKA et al. (2001) erzielten Regenerationsfrequenzen mit den Werten dieser Arbeit überein. Zum Vergleich dient hierbei der 1. Zyklus 1999, in dem vitale und fertile tetraploide Donorpflanzen zufällig, d. h. unabhängig von ihrer genotypischen Antherenkultureignung und unter optimalen Bedingungen (anders als im 1. Zyklus 1998) für die Antherenkultur verwendet wurden. Die Werte für die Regeneration, bezogen auf die Anzahl gebildeter Kalli bzw. Embryonen, sind mit 17,1 % Albinopflanzen und 15,1 % grünen Pflanzen bei LEŚNIEWSKA et al. (2001) ungefähr gleich mit den 21,1 % Albinopflanzen und 15,6 % grünen Pflanzen aus dieser Arbeit. Der Begriff „Kalli“ aus dieser Arbeit entspricht dem Begriff „Embryonen“ bei LEŚNIEWSKA et al. (2001). Diese Autoren erzielten allerdings bei der Sorte 'Felopa' eine deutlich höhere Kallusregeneration (Medium C17: 63,4 %; Medium PII: 52,7 %) als in der vorliegenden Arbeit im vergleichbaren 1. Zyklus 1999 erreicht wurde (23,2 %), was sich dann auch in einer höheren Frequenz an regenerierten Pflanzen niederschlägt, sofern man diese auf die Anzahl aufgesetzter Antheren und nicht auf die Anzahl produzierter Kalli bezieht. Die Kallusregeneration der Sorte 'Sulino' (LEŚNIEWSKA et al. 2001: Medium C17: 24,8 %; Medium PII: 14,3 %) entsprach der vom 1. Zyklus 1999.

Die deutlich geringere Ausbeute im 1. Zyklus 1998 im Vergleich zum 1. Zyklus in den Jahren 1999 und 2000 (s. Tab. 14) kann wahrscheinlich auf Jahreseffekte durch suboptimale Bedingungen (geringere Vitalität der Donorpflanzen; hoher Infektionsdruck und damit höhere mikrobielle Kontamination der *in vitro* Kultur) zurückgeführt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten tetraploiden *Lolium multiflorum* / *boucheanum*-*Festuca pratensis* Hybriden entsprachen in ihrer Regeneration in Antherenkultur, ihrer Vitalität und ihrer Fertilität (s. u.) im Wesentlichen den von LEŚNIEWSKA et al. (2001) verwendeten Sorten 'Sulino' und 'Felopa'. Die Sorte 'Paulita' von *Festulolium braunii* (*F. pratensis* × *L. multiflorum*) regenerierte Kalli mit ähnlicher Frequenz wie die *Lolium-Festuca*-Hybriden des 1. Zyklus und die von LEŚNIEWSKA et al. (2001) verwendete Sorte 'Sulino'. Die geringere Pflanzenregeneration läßt sich sehr wahrscheinlich durch die große Zufallsschwankung aufgrund des geringen Versuchsumfangs erklären (129 Antheren, 2 Genotypen).

Die tetraploiden *L. multiflorum* / *boucheanum*-*F. pratensis* Hybriden zeigten eine hohe Regenerationsfähigkeit in Antherenkultur, höher als die der autopolyploiden Ausgangseltern ohne Hybridcharakter (*D. glomerata*, *F. pratensis*, *L. multiflorum* und *Ph. pratense*) und höher als die der tetraploiden *F. pratensis* (4x) × *L. perenne* (4x) Hybriden (Kombination 2) und können folglich als besser geeignet angesehen werden. Die geringere Kallus- und Pflanzenregeneration der meist diploiden *Lolium-Festuca*

Regenerate, die aus dem 1. Zyklus hervorgegangen waren, im Vergleich zu diploidem *L. multiflorum* ist mit der hohen Sterilität der Regenerate erklärbar (s. u.).

LEŚNIEWSKA et al. (2001) vermuten ebenfalls eine hohe Eignung von amphidiploiden Hybriden der Kombinationen *L. multiflorum* × *F. pratensis* und *F. pratensis* × *L. multiflorum* für die Antherenkultur, wobei sie sich zu einem großen Teil auf unveröffentlichte Daten stützen. Im Vergleich zu der Kombination *F. arundinacea* × *L. multiflorum* (und reziprok) war die Regeneration bei *F. pratensis* × *L. multiflorum* Hybriden (und reziprok) nicht höher, ist sogar als niedriger zu bewerten, aber die Regenerate in letzterer Kombination zeigten eine weitaus höhere Überlebensrate (Vitalität) und Fertilität.

Fertilität der Regenerate

Die Charakteristika Dehiszenz der Antheren, KES-Färbbarkeit der Pollenkörner und Kornansatz geben einen sehr guten Anhaltspunkt für die Fertilität der Pflanzen. Die aus Antherenkultur regenerierten Pflanzen waren weitgehend steril. In Hinblick auf das Ziel, *Lolium-Festuca*-Hybriden mit balancierten Genomen zu erzeugen, ist die Produktion von fertilen, diploiden Regeneraten aus Antherenkultur aber essentiell (s. 4.4).

Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen blühten 90 % bis 95 % der grünen *Lolium-Festuca pratensis*-Regenerate nach der Vernalisation. LEŚNIEWSKA et al. (2001) hatten bei Antherenkultur von den tetraploiden Sorten 'Sulino' und 'Felopa' (*F. pratensis* × *L. multiflorum*) ähnliche Ergebnisse. 95 % der von ihnen produzierten 1130 grünen Regenerate blühten. 10 % der blühenden Regenerate erwiesen sich bei LEŚNIEWSKA et al. (2001) als fertil (dehiszente Antheren und Pollenfärbbarkeit zwischen 8,5 % bis 87,6 %). Anders als in dieser Arbeit, wo die tetraploiden Regenerate eine etwas höhere Fertilität als die diploiden aufwiesen, fanden LEŚNIEWSKA et al. (2001) keine Unterschiede in der Fertilität von diploiden und tetraploiden Regeneraten. Der Anteil fertiler diploider Regenerate in dieser Arbeit beträgt ca. 6 %, wobei die Kriterien zur Definition „fertil“ etwas strikter waren (dehiszente Antheren und Pollenfärbbarkeit > 40 %). HUMPHREYS et al. (2001) fanden nach Antherenkultur von tetraploiden *Lolium-Festuca*-Hybriden unter den diploiden, d. h. reduzierten Regeneraten einen Anteil von ca. 10 % als fertil angesehener Pflanzen, wobei HUMPHREYS et al. (2001) anstatt diploid die Regenerate als dihaploid bezeichneten.

Nur 61 % (295 Pflanzen) der 485 grünen Regenerate aus Antherenkultur von F₁-Hybriden der Kombination *F. arundinacea* (6x) × *L. multiflorum* (4x), die von ZWIERZYKOWSKI et al. (1999b) untersucht wurden, bildeten Blütenstände nach Vernalisation. Von den 295 Pflanzen, die Blütenstände bildeten, wurden 38 (12,9 %) als fertil beschrieben. Allerdings hatten davon 21 Pflanzen nur teilweise dehiszente

Antheren und eine Pollenfärbbarkeit zwischen 7,7 % und 30,7 %. Werden entsprechend den in dieser Arbeit verwendeten Kriterien nur die Regenerate mit vollständig dehiszenten Antheren und einer Pollenfärbbarkeit von mehr als 40 % als fertil definiert, so entsprechen diese 17 Pflanzen einem Anteil von 5,8 %. ZARE et al. (2002) analysierten nach Antherenkultur eines einzigen Genotyps der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *F. arundinacea* (6x) 88 Regenerate, von denen nur 39 nach Vernalisation blühten.

Die Fertilität von Regeneraten aus Antherenkultur der Arten *L. perenne*, *L. multiflorum* und *F. pratensis* bewerten POSSELT und RAPP (1997) als hoch. Zwar reicht bei deren Untersuchungen der Anteil der Regenerate, die keine Blütenstände bildeten, von 10 % bei *L. perenne* über 18-33 % bei *L. multiflorum* bis zu 40 % bei *F. pratensis*, aber sie berichten von einem hohem Anteil blühender Pflanzen mit Samenansatz – 100 % der Pflanzen bei *L. perenne*, 92,6 % bei *L. multiflorum* und immerhin noch 73 % bei *F. pratensis*. Dies ist deutlich mehr als bei den *Lolium-Festuca*-Hybriden (s. o., s. 3.2.3, s. LEŚNIEWSKA et al. 2001, HUMPHREYS et al. 2001). Die Unterschiede könnten sich teilweise damit erklären lassen, dass POSSELT und RAPP (1997) zur Bewertung der Fertilität nur den Kornansatz heranzogen, während LEŚNIEWSKA et al. (2001) ausschließlich die männliche Fertilität (Dehiszenz Antheren und Pollenfärbbarkeit) betrachteten. HUMPHREYS et al. (2001) machten zum Kriterium für die Fertilität keine Angabe. In dieser Arbeit zeigte sich aber, dass männliche und weibliche Fertilität der Regenerate meist auf dem gleichen Niveau lagen, wenn auch Pollenfärbbarkeit und Kornansatz dabei teilweise einer höheren Fertilität entsprachen, als es die indehiszenten Antheren zuließen.

Weitaus wahrscheinlicher liegen Gründe für die ungenügende Fertilität der Regenerate in der Disbalance des Hybridgenoms, die durch den eingeschlagenen Ansatz letztendlich ja überwunden werden sollte. Selbst wenn einzelne gut fertile *Lolium-Festuca*-Hybriden selektiert werden, so treten in der Folgegeneration aufgrund der Disbalance zwischen den homöologen Genomen Probleme z. B. durch Genduplikationen oder Deletionen auf. JAUHAR (1993) stellte fest, dass männliche Sterilität in F₁-Hybriden der Kombination *L. multiflorum* (2x) × *F. arundinacea* (6x) durch meiotische Paarung der homöologen Chromosomen verursacht wird, was zu chromosomaler Instabilität und Disbalance führt. Dies sei durch die hemizygote Situation der Paarungskontrollgene in den F₁-Hybriden verursacht (JAUHAR 1975b, JAUHAR 1993). Polyploidisierte F₁-Hybriden zeigen eine höhere meiotische Regularität und damit Stabilität (zusammengefasst in JAUHAR 1993). Diese Disbalance der Paarungskontrollgene könnte eine Ursache für die hohe Sterilität der reduzierten *Lolium-Festuca*-Hybriden (2n=2x) nach dem ersten Zyklus Antherenkultur darstellen.

Bei einem großen Teil der Regenerate aus Antherenkultur von pentaploiden F₁-Hybriden zwischen *F. arundinacea* (6x) × *L. multiflorum* (4x) vermuten HUMPHREYS et al. (1998) und ZWIERZYKOWSKI et al. (1998a), dass die Genome hochgradig unbalanciert sind, was dann zu der geringen Vitalität und Fertilität führe. Sie erklären dies mit häufiger intergenomischer Rekombination und hoher Variabilität in der Chromosomenzahl aufgrund Uni- und Multivalentbildungen in der Meiose. Während bei sexueller Fortpflanzung solche unbalancierten Gameten, vor allem wenn es sich um männliche handelt, einem starken Konkurrenzdruck unterliegen und ihr genetisches Material meist nicht an Nachkommen weitergeben würden, hätten sie bei der Antherenkultur eine ungleich größere Chance, sich zu Pflanzen zu entwickeln. Beide Autorengruppen betonen die höhere genetische Variabilität aber auch die geringere Vitalität und Fertilität, die sie bei dieser Kreuzungskombination unter den Nachkommen aus Antherenkultur im Vergleich zu denen aus Rückkreuzungen gefunden hätten. Damit läßt sich der hohe Anteil an Regeneraten dieser Kombination erklären, die trotz Vernalisation nicht blühten (s. o.: ZWIERZYKOWSKI et al. 1999b; ZARE et al. 2002).

Die hohe Sterilität der diploiden Regenerate hat Ursachen möglicherweise auch in weiteren Disharmonien der beiden Genome sowie in genetischen Defekten, die in den tetraploiden Donorpflanzen noch kompensiert wurden, in den diploiden Regeneraten nun aber stark hervortreten. Bei den tetraploiden Regeneraten lässt sich die hohe Sterilität damit erklären, dass sie möglicherweise zu einem hohen Anteil verdoppelt diploide Pflanzen sind, also durch spontane Genomverdoppelung diploider Kalli oder Regenerate zustande kamen. Einige der fertilen tetraploiden Regenerate könnten aus unreduzierten Mikrosporen oder somatischem Gewebe der Antheren hervorgegangen sein. Aneuploidie resultiert bei den Regeneraten wahrscheinlich in erhöhter genetischer Disbalance und reduziert damit die Vitalität und Fertilität weiter. Ein genereller negativer Einfluss der Kallusphase ist bei Regeneraten jeglicher Ploidiestufe ebenfalls denkbar.

Ploidie der Regenerate

Es ist davon auszugehen, dass die überwiegende Mehrheit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Lolium-Festuca*-Donorpflanzen wirklich tetraploid und nicht aneuploid waren. Ausschließlich hoch vitale und fertile Pflanzen wurden für die Antherenkultur verwendet. Unter diesen ist ein noch geringerer Anteil aneuploider Pflanzen als in der Gesamtpopulation zu erwarten, da bei aneuploiden eine höhere Neigung zu verminderter Vitalität und Sterilität zu vermuten ist (s. o.).

ZWIERZYKOWSKI et al. (1998b) analysierten 25 tetraploide F₈-Hybriden (2n=4x=28) der Kombination *F. pratensis* × *L. multiflorum* und fanden 6 aneuploide Pflanzen (ca. 25 %), die dabei allerdings jeweils nur um ein Chromosom von der euploiden Chromosomenzahl abwichen (4 Pflanzen 2n=29; 2 Pflanzen 2n=27). Aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Pflanzen war der Einfluss der Zufallsstreuung hoch. Bei 615

untersuchten F₆-Hybriden derselben Kombination fanden ZWIERZYKOWSKI et al. (1993) lediglich einen Anteil aneuploider Pflanzen von 11,7 %.

Die Mehrheit (76,7 %) der hier untersuchten Regenerate der tetraploiden *Lolium-Festuca*-Ausgangseltern waren reduziert (diploid). HUMPHREYS et al. (2001) fanden eine Mehrheit diploider Regenerate nach Antherenkultur ähnlicher Ausgangseltern. 15 % der Regenerate erwiesen sich in dieser Arbeit als tetraploid, 7,5 % als deutlich aneuploid. Für das eine gefundene haploide Regenerate (0,8 %) kann keine Erklärung gefunden werden, möglich ist evtl. dass durch meiotische Unregelmäßigkeiten in der Chromosomenverteilung eine Mikrosporenzelle nur den haploiden Chromosomensatz erhielt oder dass zu Beginn der Kallusphase, vielleicht induziert durch die Bedingungen der Zellkultur, somatische Eliminierung von Chromosomen erfolgte. LEŚNIEWSKA et al. (2001) analysierten 644 grüne Regenerate der Sorten 'Felopa' und 'Sulino' (beide 4x). 83 % erwiesen sich als diploid, 12 % als tetraploid, 5 % als aneuploid und 0,5 % (3 Pflanzen) als mixoploid. Abgesehen von der Unterscheidung zwischen aneuploid und mixoploid, die in dieser Arbeit nicht gemacht wurde, ist die Verteilung der Regenerate auf die verschiedenen Ploidiestufen (di-, tetra- und aneu- bzw. mixoploid) in der vorliegenden Arbeit und bei LEŚNIEWSKA et al. (2001) sehr ähnlich.

Von der Verteilung der Regenerate auf die Ploidiestufen her betrachtet, sind die Bedingungen bei *Lolium-Festuca*-Hybriden günstig, den verfolgten Ansatz zur Selektion von *Lolium-Festuca*-Hybriden mit symmetrischem Translokationsmuster verwirklichen zu können. Ein hoher Anteil reduzierter Regenerate ist für die Realisierung wichtig, da unter reduzierten Regeneraten die Chancen für die Selektion von geeigneten Genotypen weitaus höher sind. Gleichzeitig ist auch ein deutlicher Anteil nicht-reduzierter Regenerate (hier tetraploide, nach dem 2. Zyklus Antherenkultur wären es diploide) vorteilhaft, wenn diese durch spontane Verdoppelung und nicht aus somatischem Gewebe oder unreduzierten Gameten entstanden sind. Es müsste dann nach dem 2. Zyklus, sofern es gelingt Regenerate zu erhalten, das Genom nicht artifiziell mit Chemikalien verdoppelt werden. Aneuploide Regenerate sind in jedem Fall ungünstig, da bei ihnen eine höhere genetische Disbalance zu erwarten ist. Je geringer deren Anteil also ist, desto besser.

Es zeigte sich, dass in Antherenkultur eine hohe Genotypabhängigkeit bei den untersuchten *Lolium-Festuca*-Hybriden bzgl. der Regenerationsfähigkeit an Kalli, Pflanzen insgesamt und grünen Pflanzen vorhanden ist. Eine starke Genotypabhängigkeit bzgl. der Regenerationsfähigkeit in Antherenkultur fanden auch ZWIERZYKOWSKI et al. (1999b) bei F₁-Hybriden der Kombination *F. arundinacea* (2n=6x=42) × *L. multiflorum* (2n=4x=28) und IMMONEN und ROBINSON (2000) zwischen Pflanzen von 10 verschiedenen Triticalesorten. LEŚNIEWSKA et al. (2001) fanden Unterschiede in der Regeneration zwischen den beiden *F. pratensis* - *L. multiflorum*

Sorten 'Felopa' und 'Sulino' (beide 4x). Obwohl bei 'Felopa' die Ausbeute an Embryonen weitaus höher war, wurden bei 'Sulino' deutlich mehr grüne Pflanzen bezogen auf die Anzahl aufgesetzter Antheren erzielt.

Es ist daher aufgrund der starken Genotypabhängigkeit, sofern eine hohe Ausbeute an Regeneraten erforderlich ist, wie es bei dieser Arbeit der Fall war, für die Anwendung der Antherenkultur bei *Lolium-Festuca*-Hybriden unerlässlich, geeignete Donorpflanzen zu selektieren.

Darüber hinaus war neben der Regenerationsfähigkeit die Ploidiestufe der Regenerate genotypabhängig. Ähnliches wurde bisher nur von SADASIVAIAH et al. (1999) berichtet, die bei der Antherenkultur von Weizen neben einer Genotypabhängigkeit bzgl. der Regeneration auch eine Genotypabhängigkeit bzgl. der auftretenden spontanen Genomverdoppelung fanden. Da sich in der vorliegenden Arbeit des Weiteren zeigte, dass wohl die Ploidie der Regenerate bis zu einem gewissen Grade auch von der Wachstumsgeschwindigkeit der Kalli abhing, könnte ebenfalls die Wachstumsgeschwindigkeit bis zu einem gewissen Grade genotypabhängig sein.

4.4 Erzeugung stabiler und fertiler balancierter Hybriden zwischen *L. multiflorum*, *L. perenne* und *L. boucheanum* × *F. pratensis*

Nach der Auswahl geeigneter tetraploider *Lolium-Festuca*-Hybriden war es das Ziel, fertile diploide Regenerate nach dem 1. Zyklus Antherenkultur zu selektieren, mittels GISH-Analyse teilweise eine Vorauswahl erfolgversprechender Genotypen zu treffen (möglichst symmetrische Translokationen, s. Abb. 63 und Abb. 2) und diese in den 2. Zyklus Antherenkultur zu führen. Aus dem 2. Zyklus würden dann, evtl. nach erforderlicher artifizierlicher Polyploidisierung mittels Chemikalien, verdoppelt haploide *Lolium-Festuca*-Hybriden hervorgehen. Unter diesen könnte schließlich die Selektion der balancierten Genotypen mit gewünschtem Translokationsmuster erfolgen (Centromer-Regionen von *Lolium* und terminale Enden von *F. pratensis* oder umgekehrt).

Da sich aber bereits nach dem 1. Zyklus Antherenkultur die diploiden Regenerate als zu einem hohen Grade steril erwiesen haben und nur geringe Regeneration im 2. Zyklus zeigten (s. 3.2.3 und 4.3), war die weitere Verfolgung der gewünschten Strategie nicht möglich. Es ist zu erwarten, dass die verdoppelt-haploiden Pflanzen, die am Ende des 2. Zyklus Antherenkultur stehen würden, mindestens ebenso steril wie die diploiden Regenerate aus dem 1. Zyklus wären. Eine größere Anzahl fertiler verdoppelt-haploider Regenerate sind aber erforderlich, um Pflanzen mit dem gesuchten Translokationsmuster selektieren zu können. Nur mit einem erheblich größeren Aufwand, der wohl als inpraktikabel angesehen werden kann, wäre der Ansatz weiterzuverfolgen.

Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass Chromosomen mit einem symmetrischen Translokationsmuster (Centromer-Region von *L. multiflorum* bzw. *L. perenne* und terminale Region von *F. pratensis* oder jeweils umgekehrt) existieren (s. Abb. 62 - Abb. 64). Die Möglichkeit wurde damit bestätigt, Hybriden selektieren zu können, deren sämtliche Chromosomen dieses Translokationsmuster aufweisen. Die Analyse der veröffentlichten Arbeiten über *Lolium-Festuca*-Hybriden unterstützt diese Möglichkeit.

Intergenerische Translokationen kommen bei *Lolium-Festuca*-Hybriden häufig vor (THOMAS et al. 1994, ZWIERZYKOWSKI et al. 1998b + 1999a, CANTER et al. 1999, GHESQUIÈRE et al. 2000, KING et al. 2000, u. a.).

KING et al. (2000) wiesen in BC₁-Pflanzen nach Rückkreuzung allotriploider F₁-Hybriden der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *F. pratensis* (2x) mit *L. multiflorum* (2x) bei 58 von 78 BC₁-Hybriden (=74 %) z. T. mehrere intergenerische Translokationen nach. 74 % translozierte Chromosomen nach einer Generation sind deutlich mehr als die 57 % translozierten Chromosomen, die nach 2 Generationen freier Abblüte bei den in dieser Arbeit untersuchten Hybriden gefunden wurden. Ursachen für das unterschiedliche Ergebnis können in genotypspezifischen Unterschieden vermutet werden, da im Rahmen dieser Arbeit Pflanzenmaterial anderen Ursprungs und mehr Ausgangsarten verwendet wurden. Auch sind die Umfänge an analysierten Pflanzen sowohl bei KING et al. (2000) als auch in dieser Arbeit nicht so groß, als dass Zufallsstreuung ohne Auswirkung ist und möglich ist ebenfalls eine höhere Auflösung bei der GISH bei KING et al. (2000).

ZWIERZYKOWSKI et al. (1999a) berechneten die Wahrscheinlichkeit für die Bildung eines intergenerischen Chiasmata pro einzelner *F. pratensis* Chromosom bei allotriploiden F₁-Hybriden der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *F. pratensis* (2x) zu 65 %, während JAUHAR (1993) hier auf 90 % kam. JAUHAR (1975a) gibt die Wahrscheinlichkeit bei allodiploiden F₁-Hybriden der Kombination *F. pratensis* (2x) × *L. multiflorum* (2x), bei denen ja nur Rekombination zwischen homöologen und nicht zwischen homologen Chromosomen möglich ist, mit 80 % an. ZWIERZYKOWSKI et al. (1999a) räumen allerdings ein, dass die Zahl intergenerischer Chiasmata wohl höher war, als von ihnen angegeben, da sie die Chiasmatafrequenz ausgehend von der Zahl intergenerischer Translokationen bei den Nachkommen berechneten. Sie führen dies auf eine Selektion gegen Gameten mit hohem Anteil *F. pratensis*-Chromatin, also auch hohem Anteil intergenerischer Translokationen, zurück. Eine fehlende Erfassung kleiner Translokationen mit der GISH erklärt ebenfalls diese Diskrepanz. Sehr kleine Translokationen können mittels GISH nicht nachgewiesen werden, wie es auch von ZWIERZYKOWSKI et al. (1998b), ZHANG et al. (1999), CRASTA et al. (2000) und MALYSHEVA et al. (2003) festgestellt wurde (s. auch 4.6).

Aufgrund der hohen Frequenz intergenerischer Rekombination vermuten ZWIERZYKOWSKI et al. (1998b + 1999a), dass die Genpoole von *L. multiflorum* und *F. pratensis* austauschbar sind und frei gemischt werden können.

Innerhalb der Arten *Lolium perenne* / *multiflorum* und *Festuca pratensis* treten Rekombinationen meistens nicht an allen Stellen eines Chromosoms auf, da Chiasmata bei diesen Arten in der Regel distal lokalisiert seien (REES und DALE 1974, KARP und JONES 1983). Die Örtlichkeit der Chiasmatabildung sei nach den genannten Autoren allerdings genotypabhängig; vor allem bei nicht-ausdauernden Arten und Inzuchtlinien zeige sich eine Tendenz, Chiasmata im interstitiellen Chromosomenbereich und in der Centromerregion zu bilden. Bei Hybriden zwischen den obigen *Lolium-Festuca*-Arten scheint intergenerische Rekombination hingegen an allen Stellen der Chromosomen aufzutreten, wie es auch von ZWIERZYKOWSKI et al. (1999a), CANTER et al. (1999), KING et al. (2000) und ARMSTEAD et al. (2001) beschrieben wurde. Die Rekombinationshäufigkeit ist dabei nicht über die gesamte Chromosomenlänge gleich, sondern die höchste Frequenz wurde im interstitiellen Bereich (zwischen der Centromer- und Telomerregion des Chromosoms) beobachtet (ZWIERZYKOWSKI et al. 1999a, CANTER et al. 1999, KING et al. 2000, ARMSTEAD et al. 2001).

Für die Erzeugung von Hybriden mit dem gewünschten Translokationsmuster ist eine Häufung der Rekombination im interstitiellen Bereich günstig, da genau ein intergenerisches Rekombinationsereignis pro Chromosomenarm in diesem Bereich erforderlich ist, um Chromosomen mit der Centromerregion von *Lolium* und der Telomerregion von *Festuca* (oder umgekehrt) zu erhalten.

Durch die hohe Frequenz intergenerischer Translokationen sind gute Chancen für die zufällige Entstehung einer Hybride gegeben, deren Genom das gewünschte symmetrische Translokationsmuster hat. Je weniger Chromosomen die Hybride aufweist, desto wahrscheinlicher ist dies.

Die Erzeugung stabiler und fertiler balancierter *Lolium-Festuca*-Hybridlinien durch die Selektion von einzelnen Hybriden mit symmetrischem Translokationsmuster ist möglich, auch wenn die Schaffung und Selektion dieser Hybriden mit erheblichen Schwierigkeiten belastet ist, solange nicht die Effizienz der Antherenkultur drastisch gesteigert wird oder sich ein alternativer Weg zur Schaffung gewünschter Genotypen eröffnet und eine weniger aufwändige Methode als die GISH zur Detektion gefunden wird.

4.5 Kreuzbarkeit zweier Arten in Abhängigkeit von deren systematischer Stellung

Die Kreuzbarkeit zweier Arten hängt primär von ihrer systematischen Stellung ab. Allgemein gilt, dass die Kreuzbarkeit mit zunehmend enger Verwandtschaft steigt.

Ausnahmen wurden allerdings besonders im Falle allopatrischer (d. h. räumlich isolierter) Arten beobachtet. Bei allopatrischen Arten besteht kein Selektionsdruck zur Entwicklung oder Aufrechterhaltung von Kreuzungsbarrieren (GRANT 1971, MATZK et al. 1980, zusammengefasst in NOOR 1999), vor allem was die präzygotischen Barrieren wie Hemmung der Pollenkeimung oder verschiedene Blütezeiten betrifft.

Bei Kreuzungen zwischen allopatrischen Arten der Unterfamilien Pooideae als Samenelter und Panicoideae als Pollenelter kommt es häufig zur Befruchtung, doch tritt eine Eliminierung der Chromosomen des väterlichen Elters im Embryo oft bereits kurz nach Entstehung der F₁-Hybride auf (s. 4.1, MATZK et al. 1997, MATZK 1996, RIERA-LIZARAZU et al. 1996, LAURIE und BENNETT 1990). Die regelmäßige und frühzeitige Eliminierung der väterlichen Chromosomen bald nach der Zygotenbildung bei Kreuzungen zwischen Arten der Pooideae (Weizen, Gerste, teilweise bei Hafer) und Arten der Panicoideae (meist Mais) belegt starke postzygotische Kreuzungsbarrieren, wie sie zwischen entfernt verwandten Arten zu erwarten sind. Trotz der relativ schwachen präzygotischen Kreuzungsbarrieren geben die starken postzygotischen Barrieren einen Beleg für die verwandtschaftliche Ferne der Elternarten.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kreuzungen innerhalb der Tribus Poeae zwischen *L. multiflorum* × *D. glomerata* und *F. pratensis* × *D. glomerata* trat im Gegensatz hierzu keine Eliminierung der Chromosomen des Pollenelters in den F₁-Hybriden auf. Erst in der BC₂-Generation der Kombination *L. multiflorum* × *D. glomerata* ließ sich Eliminierung der Chromosomen des Pollenelters *D. glomerata* beobachten.

Anders war dies allerdings bei Kreuzungen zwischen *F. arundinacea* × *D. glomerata* (MATZK 1981, s. auch 4.1). Bei zwei von drei erzeugten F₁-Hybriden trat somatische Variabilität hinsichtlich der Chromosomenzahl (14 bis 56) auf. Es ist davon auszugehen, dass auch Chromosomen des Samenelters *F. arundinacea* betroffen waren, also nicht nur väterliche Chromosomen wie bei den Kreuzungen Pooideae × Panicoideae, da höchstens 14 Chromosomen von *D. glomerata* stammen konnten und die maximale Differenz bei der Chromosomenzahl 42 umfasste. Die Gründe dafür könnten in der Medienzusammensetzung liegen, wären in diesem Fall folglich primär unabhängig von der Kreuzungskombination.

In welchem Entwicklungsstadium Chromosomen des väterlichen Elters eliminiert werden, scheint von der Kreuzungskombination abzuhängen. Bei weiter entfernt verwandten Eltern werden die väterlichen Chromosomen eher bereits in den F₁-Hybriden eliminiert (s. 4.1, Vgl. intergenerische Kreuzungen Tribus Poeae × Tribus Poeae mit Unterfamilie Pooideae [Triben Aveneae, Poeae und Triticeae] × Unterfamilie Panicoideae [Triben Andropogoneae und Paniceae]). Es scheint eine Korrelation zur verwandtschaftlichen Stellung der Eltern zu bestehen, allerdings nicht absolut, wie Kreuzungen innerhalb der Tribus Triticeae zeigen (s. 4.1). Besonders Kreuzungen mit

H. bulbosum als Pollenelter zeichneten sich durch eine vollständige Eliminierung des väterlichen Genoms aus, obwohl die zur gleichen Gattung gehörende Gerste (*Hordeum vulgare*) der Samenelter war (KASHA und KAO 1970). Das Genom von *H. bulbosum* wird bei weiten Kreuzungen offensichtlich besonders häufig und vollständig eliminiert.

Die vollständige Eliminierung des väterlichen Genoms bei intergenerischen Kreuzungen ist keine generelle Eigenschaft der Unterfamilie Panicoideae, denn bei Kreuzungen innerhalb der Unterfamilie (EUBANKS 1995 + 1997: *Tripsacum dactyloides* × *Zea diploperennis* und reziprok), entstanden F₁-Nachkommen mit Hybridcharakter.

Bei *Lolium perenne/multiflorum* - *Festuca pratensis/arundinacea* - Hybriden (auch bei reziproker Kreuzungsrichtung) findet intergenerische Chromosomenpaarung in der Meiose statt, woraus intergenerische Rekombination (Translokation) resultiert. Die Genome werden als zueinander homöolog angesehen. Bastardisierung kommt auch unter natürlichen Bedingungen vor und Hybriden zeigen oft zumindest mäßige Fertilität (JAUHAR 1993, s. 1.2).

L. multiflorum - *D. glomerata*-, *F. pratensis* - *D. glomerata*- und *L. multiflorum* - *Cynosurus cristatus*-Hybriden (sämtlich Gattungen der Tribus Poeae) hingegen lassen sich nur artifiziell durch Phytohormonbehandlung und Embryokultur erzeugen und die Hybriden selbst sind hochgradig steril. Bei *Lolium-Dactylis*-Hybriden paaren sich die Chromosomen beider Gattungen nicht oder nur überaus selten in der Meiose. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde bei einer BC₂-Hybride eine intergenerische Translokation nachgewiesen (s. 4.2). Ihr Ursprung kann aber sowohl in einer intergenerischen meiotischen Chromosomenpaarung (Rekombination) als auch in einer extern induzierten Translokation (durch die Embryokultur, die Chemikalien des Krusemediums oder elektromagnetische Strahlung wie z. B. UV-Licht) liegen. Für Gerste-Weizen-Hybriden wurde dies von MALYSHEVA et al. (2003) diskutiert, die Indizien für die Rekombination durch Paarung homöologer Chromosomen fanden.

Der Vergleich zwischen den oben genannten *Lolium-Festuca*-Hybriden einerseits und den übrigen intergenerischen Hybriden andererseits läßt eine enge Verwandtschaft der Gattungen *Lolium* und *Festuca* vermuten. Bereits 1956 (STEBBINS) wurde erstmals vorgeschlagen, *Lolium* und *Festuca* zu einer Gattung zusammenzufassen. Die verwandtschaftliche Nähe wurde mit verschiedenen Methoden mehrfach belegt (BULIŃSKA-RADOMSKA und LESTER 1988, JAUHAR 1993, PAŠAKINSKIENĖ et al. 1998, GAUT et al. 2000, u. a.). *Lolium* kann wohl eher als eine Sektion der Gattung *Festuca* angesehen werden, in welcher die „Sektion“ *Lolium* dabei der Sektion Bovinae besonders nahe steht. *Lolium* zeigt eine hohe Kreuzbarkeit mit der Sektion Bovinae (*F. pratensis*, *F. arundinacea* und *F. gigantea*) – im Gegensatz z. B. zur Sektion Ovinae (u. a. *F. rubra*), mit der die Kreuzbarkeit deutlich geringer ist (JAUHAR 1993, OERTEL 1997).

Der Vorschlag, beide Gattungen in einer zusammenzufassen, setzte sich aber bislang nicht durch, vielleicht aus praktischen oder historischen Erwägungen.

Historisch bedingt erfolgte die systematische Klassifizierung von *Lolium* innerhalb der Poaceae vor allem aufgrund des Merkmals, dass der Blütenstand eine Ähre bildet. Es kommen aber immer wieder einzelne reine *L. multiflorum* Pflanzen vor, die statt einer Ähre eine Rispe wie *Festuca* aufweisen. Die Ähre von *Lolium* hat sich unabhängig von z. B. der Ähre der Tribus Triticeae (*Triticum*, *Agropyrum*, *Hordeum*) entwickelt, weshalb *Lolium* heute unbestritten der Tribus Poeae und nicht der Triticeae zugeordnet wird (erstmalig von HUBBARD 1948, zusammengefasst in JAUHAR 1993). Die alleinige Klassifizierung der Gattung *Lolium* anhand des Merkmals der Blütenstandsausbildung als Ähre ist sicherlich unzureichend.

Zwischen nahe verwandten Arten können deutliche Unterschiede in der Kreuzbarkeit zu einer 3. Art auftreten. Neben recht großen Unterschieden in der Kreuzbarkeit bei einzelnen Genotypen oder Sorten innerhalb einer Art (MATZK 1981: *F. arundinacea* × *D. glomerata*, OERTEL 1997: *L. multiflorum* × *D. glomerata*, Koba et al. 1997: *T. aestivum* × *H. vulgare*) wurden auch innerhalb einer Gattung artspezifische Unterschiede in der Kreuzbarkeit zu einer 3. Art gefunden.

L. perenne lässt sich mit *L. multiflorum* problemlos kreuzen. Hybridsorten zwischen diesen beiden Arten sind zugelassen (*L. × boucheanum*). Die Embryofrequenz war bei Kreuzungen von *L. perenne* mit *D. glomerata* in etwa gleich der von *L. multiflorum* und *F. pratensis* gekreuzt mit *D. glomerata*. Während in den Kombinationen *L. multiflorum* × *D. glomerata* und *F. pratensis* × *D. glomerata* jeweils mehrere Hybriden erhalten wurden, gingen aus den Kreuzungen *L. perenne* × *D. glomerata* keine hervor. Vermutlich traten hier stärkere postzygotische Kreuzungsbarrieren zwischen dem globularen und reifen Stadium der Embryoentwicklung auf, so dass die potenziellen Hybriden nicht lebensfähig waren, auch wenn eine endgültige Aussage der Umfang an kastrierten und bestäubten *L. perenne*-Blütchen (incl. der Daten aus OERTEL 1997) nicht zulässt. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang ebenfalls, dass 3-Weg-Hybriden zwischen (*Lolium* × *F. pratensis*) × *D. glomerata* nur erhalten wurden, wenn *L. multiflorum* beteiligt war, aber nicht, wenn *L. perenne* oder *L. × boucheanum* eine Hybride mit *F. pratensis* bildete, die dann mit *D. glomerata* gekreuzt wurde.

Allein aus der Kreuzbarkeit mit *D. glomerata* können keine Rückschlüsse auf die systematische Stellung der drei Arten *L. multiflorum*, *L. perenne* und *F. pratensis* zueinander gezogen werden. Die postzygotischen Barrieren bei Kreuzungen mit *D. glomerata* sind bei *L. perenne* am höchsten, wohl deutlich größer als bei *L. multiflorum* und *F. pratensis*. *L. multiflorum* und *L. perenne* können aber unbestritten als verwandtschaftlich näher zueinander stehend als zu *F. pratensis* angesehen werden. Entscheidend ist die Kreuzbarkeit dieser drei Arten untereinander, die immer deutlich

höher ist als die mit *D. glomerata* und die zwischen *L. multiflorum* und *L. perenne* erwartungsgemäß am höchsten ist, da beide zu einer Gattung gehören.

SEBERG und PETERSEN (1998) sehen die Möglichkeit als gering an, anhand des Grades der meiotischen Paarung zweier Genome bei interspezifischen und intergenerischen Hybriden Aussagen über die verwandtschaftliche Stellung der Genome und der Elternarten treffen zu können. Sie räumen bei ihrer Kritik aber selber ein, dass den Charakteristika „völlige Paarung“ und „keine Paarung“ zwischen 2 Genomen durchaus Bedeutung zukommt. Andere Autoren bewerten insgesamt günstiger (KIYHARA 1937, ALONSO und KIMBER 1981, CHAPMAN und KIMBER 1992, JAUHAR 1975a + 1993, JAUHAR und JOPPA 1996, SYBENGA 1996, KING et al. 2000), auch wenn durch die Existenz von Genen wie dem Ph1-Gen bei Weizen, die die meiotische Paarung kontrollieren und die Paarung homöologer Chromosomen verschiedener Genome unterdrücken, Aussagen mit größerer Vorsicht zu treffen sind. Die Existenz solcher Gene ist aber eher bei stabilen, evolutiv entstandenen allopolyploiden Arten zu erwarten als bei kürzlich artifiziell erschaffenen Hybriden.

Gerade im *Lolium-Festuca*-Komplex wurde die meiotische Chromosomenpaarung in interspezifischen und intergenerischen Hybriden ausführlich zur Analyse der verwandtschaftlichen Stellung der Elternarten und der Genome verwendet (CHANDRASEKHARAN und THOMAS 1971, JAUHAR 1975a, JAUHAR 1993, KING et al. 2000, CAO et al. 2000). Durch Rückschlüsse aus dem Kreuzungsverhalten und dem Paarungsverhalten der Chromosomen während der Meiose in Hybriden zwischen *F. pratensis* (2x) × *F. arundinacea* (6x) kam JAUHAR (1993) zu dem Schluss, dass eines der Genome von *F. arundinacea* (6x) von *F. pratensis* stamme. Zwischen den beiden verbliebenen Genomen von *F. arundinacea* wurde Chromosomenpaarung beobachtet (JAUHAR 1993). Spätere Analysen bestätigten diese Theorie. HUMPHREYS et al. (1995) konnten mittels GISH die Vorfahren von *F. arundinacea* (6x) als *F. pratensis* (2x; PP) und *F. arundinacea* var. *glaucescens* (GGGG) bestimmen. HUMPHREYS et al. (1995) beschrieben das Genom von *F. arundinacea* (6x) mit PPGGGG, später die meisten Autoren (HUMPHREYS et al. 1998, PAŠAKINSKIENĖ et al. 1998, MORGAN et al. 2001, CAO und SLEPER 2001) mit PPGGG´G´ oder FpFpFgFgFg₁Fg₁. Mittels GISH konnte so im Nachhinein bestätigt werden, dass die Analyse der systematischen Stellung der Hybridelternarten aufgrund der meiotischen Chromosomenpaarung in der Hybride korrekt war und auf diese Weise durchgeführt werden kann.

Gleiche Möglichkeiten zur Analyse gelten für die Kreuzbarkeit (s. o.). Dies um so mehr, als in der Kreuzbarkeit, sofern man den Begriff weiter fasst und auf die Fertilität und Stabilität der Hybriden in der F₁- und den Folgegenerationen ausdehnt, viele Aspekte (wie die Existenz und Stärke prä- und postzygotischer Barrieren, Stärke von Genomdisharmonien) berücksichtigt werden. Vor allem bei großen, deutlichen

Unterschieden im Kreuzungsverhalten lassen sich zwischen verschiedenen Kombinationen Aussagen treffen. Die Kreuzbarkeit bzw. das Kreuzungsverhalten stehen dabei aber neben morphologischen, anatomischen, cytologischen und genetischen Merkmalen, die zur systematischen Klassifizierung verwendet werden.

4.6 GISH als Methode zur Analyse von Art- und Gattungshybriden

Die GISH ist gut geeignet, um zu bestimmen, ob Nachkommen zwischen verwandtschaftlich weiter entfernten Elternarten Hybridcharakter besitzen. Es können hierzu auch Interphasekerne herangezogen werden. Dadurch reduziert sich der Aufwand für diese Methode, weil nicht in jedem Fall vollständige Metaphasekerne notwendig sind. Für eine Bestimmung der gesamten Chromosomenzahl sind diese allerdings unumgänglich.

Bereits bei der Erstbeschreibung der GISH (SCHWARZACHER et al. 1989) bei Hybriden der Kombination *Hordeum chilense* × *Secale africanum* wurde beobachtet, dass in den Hybriden im Interphasekern keine zufällige Durchmischung der DNS auftrat, sondern die DNS jeder Elternart sich jeweils in bestimmten Bereichen des Kerns konzentrierte. Dies wurde auch von LEITCH et al. (1990, 1991) bei Hybriden zwischen *Hordeum chilense* × *Secale africanum* und bei Hybriden zwischen *H. vulgare* × *S. africanum* beschrieben. Einzelne fremde Chromosomen bei Additions- oder Translokationslinien von Weizen bleiben in Interphasekernen ebenfalls von den Weizenchromosomen getrennt und vermischen sich nicht (HESLOP-HARRISON et al. 1990, MUKAI und GILL 1991).

Dies konnte jetzt auch für die untersuchten Hybriden der Kombinationen *L. multiflorum* × *D. glomerata*, *F. pratensis* × *D. glomerata* und *F. arundinacea* × *D. glomerata* beobachtet werden. Sind nur noch wenige oder einzelne Chromosomen vorhanden, so kann ihre Zahl aufgrund dessen an Interphasekernen zumindest geschätzt werden.

Die GISH kann auch zur Analyse von Hybriden naher verwandter Arten geeignet sein. Es müssen zu diesem Zweck zwischen beiden Arten ausreichend viele und ausreichend große DNS-Sequenzen unterschiedlich sein.

Obwohl *Cynosurus cristatus* verwandtschaftlich weiter von *L. multiflorum* entfernt ist, als *F. pratensis* oder *F. arundinacea* dies von *L. multiflorum* sind (z. B. CLAYTON und RENVOIZE 1986 oder GAUT et al. 2000; s. 4.5), ließen sich mittels GISH die Chromosomen beider Arten in der Hybride der Kombination *L. multiflorum* × *Cyn. cristatus* nicht unterschiedlich markieren. Bei Hybriden zwischen *L. multiflorum* × *F. pratensis* (s. 3.2.4 oder z. B. ZWIERZYKOWSKI et al. 1999a) oder *L. multiflorum* × *F. arundinacea* (z. B. HUMPHREYS und PAŠAKINSKIENĖ 1996) war dies aber möglich. Alle hier genannten Arten gehören der Tribus Poeae an (CLAYTON und RENVOIZE 1986).

Die Genome von Gerste (*Hordeum vulgare*) und *Hordeum bulbosum* hingegen können mittels GISH unterschieden werden (ANAMTHAWAT-JÓNSSON und HESLOP-HARRISON 1993), obwohl beide zur gleichen Gattung gehören.

Offensichtlich kann die Unterscheidbarkeit zweier Genome mittels GISH nicht zur Beurteilung der taxonomischen Stellung herangezogen werden. OERTEL (1997) führte an, dass bei der GISH an intergenerischen Hybriden die Möglichkeit wegen geringer Kreuzhybridisierung auf Blocking-DNS zu verzichten, auf größere phylogenetische Distanz hindeutet. Er gab aber gleichzeitig zu bedenken, dass eine größere phylogenetische Distanz zweier Hybrideltern nicht den Umkehrschluss zulässt, dass nur wenig ähnliche DNS-Sequenzen existieren, die miteinander zu einer Kreuzhybridisierung führen, und deshalb auf Blocking-DNS verzichtet werden könne. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten ZHANG et al. (1995) bei Hybridisierungsexperimenten zwischen gesamtgenomischer DNS von *Zea mays* und Chromosomen von *Triticum aestivum* und *Avena sativa*. Beide Autoren führen die Kreuzhybridisierungen bei der GISH zwischen entfernter verwandten Arten auf Sequenzhomologien meist in Centromernähe zurück. Erklärbar ist die Untauglichkeit, aus der Anwendbarkeit der GISH Rückschlüsse auf die systematische Stellung zu machen, wie folgt:

Aufgrund der hohen Syntenie der Gene innerhalb der Poaceae (z. B. GALE und DEVOS 1997, DEVOS und GALE 2000) ist bei den kodierenden DNS-Sequenzen nur eine geringe Differenz, gerade bei kleineren taxonomischen Stufen wie Arten oder Gattungen, zu finden. Dies lässt sich durch den Selektionsdruck auf solche DNS-Bereiche erklären, der bei nicht-kodierenden Bereichen fehlt. Zur Artunterscheidung werden traditionell vor allem aber die kodierenden Bereiche des Genoms heran-gezogen, die ja auch den Phänotyp bestimmen. Bei der GISH macht man sich hingegen vor allem die nicht-kodierenden, repetitiven Sequenzen zu Nutze (JIANG und GILL 1994), die sich oft auch bei nahe verwandten Arten oder Unterarten unterscheiden, da Mutationen in ihnen nur geringe Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit von Organismen haben. Die Unterschiede bei den repetitiven Sequenzen sind nun zwischen *L. multiflorum* und *Cyn. cristatus* offensichtlich gering, so dass sie für eine Markierung mittels GISH nicht ausreichend sind. Es könnte sein, dass *Cyn. cristatus* insgesamt nur wenig repetitive Sequenzen hat oder evolutiv nach der Artdifferenzierung innerhalb der Tribus Poaceae nur wenig neue repetitive Sequenzen erworben hat.

Neben der GISH bzw. FISH sind auch eine Reihe weiterer molekularer Methoden zur Untersuchung von Hybriden nutzbar. Der Hybridcharakter von Pflanzen aus der Kreuzung *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. × *Cardaminopsis arenosa* (L.) Hay. wurde mit molekularen Markern (RAPD, Mikrosatelliten) erfolgreich festgestellt (COMAI et al. 2000). Desweiteren wurden bei diversen interspezifischen und intergenerischen Hybriden weitere Techniken benutzt (z. B. von MALYSHEVA et al. 2003, RIBEIRO-

CARVALHO et al. 2001: Mikrosatellitenmarker; von EUBANKS 1997, ZHANG et al. 1999, CRASTA et al. 2000: RFLP-Marker; von JAUHAR und CHIBBAR 1999: Zusammenfassung der Anwendung von RFLP- und RAPD-Marker; von KING et al. 1998, ARMSTEAD et al. 2001: RAPD-, RFLP- und AFLP-Marker; von FEDAK 1999: RAPD-, RFLP-, AFLP- und Mikrosatellitenmarker; von SHERMAN et al. 2001: STS-PCR Marker sowie von HODKINSON et al. 2002: ITS-Sequenzanalyse und AFLP-Marker).

Diese molekularen Techniken sind zwar eine sinnvolle Ergänzung zur GISH, können sie aber nicht ersetzen. Während mittels der oben genannten Techniken beispielsweise der Ursprung von Introgressionen bestimmt werden kann (MALYSHEVA et al. 2003: Mikrosatelliten) und auch sehr kleine Introgressionen detektiert werden (MALYSHEVA et al. 2003: Mikrosatelliten; ZHANG et al. 1999, CRASTA et al. 2000: RFLP-Marker), die von der GISH nicht erfasst werden, erlaubt die GISH die Identifizierung des Zielortes der Introgression (MALYSHEVA et al. 2003), verschafft einen Überblick über den Umfang des transferierten genetischen Materials und vermittelt ein Gesamtbild des Pflanzengenoms. Methoden wie AFLP und ITS-Sequenzanalyse ermöglichen allerdings die Bestimmung des Hybridcharakters von Nachkommen zweier Elternarten, bei denen dies mit GISH oder FISH aufgrund sehr ähnlicher DNA-Sequenzen (auch der repetitiven) nicht durchführbar ist (HODKINSON et al. 2002).

4.7 Weite Kreuzungen als Mittel die genetische Variabilität bei Gräsern zu erweitern

Eine gute Möglichkeit zur züchterischen Verbesserung einer Kulturpflanzenart stellt seit langer Zeit die Einkreuzung von Genen und Chromosomen aus anderen Arten oder Gattungen dar. LIM et al. (2000) weisen darauf hin, dass die Verwendung von nicht-kultivierten Arten (Wildarten) in der Pflanzenzucht häufig mit Skepsis betrachtet werde, da der Prozess der Introgression arbeits- und zeitaufwendig ist und die Ergebnisse nicht immer vorhersagbar sind. Die Bedeutung von Wildarten für die züchterische Verbesserung von Kulturpflanzen wird im Allgemeinen aber immer wieder positiv betont (zusammengefasst in KHUSH und BRAR 1992; KALLOO 1992, MIFLIN 2000). Auch landwirtschaftlich unbedeutende Arten wie Kammgras (*Cynosurus cristatus*) können die Eigenschaften von Kulturpflanzen wie z. B. Welsches Weidelgras (*L. multiflorum*) erheblich verbessern.

Die Schaffung neuer erfolgreicher und zulassungsreifer Sorten aus Weiten Kreuzungen, seien es amphiploide Hybriden oder Additions- bzw. Substitutionslinien, erfordert sicherlich einen hohen Aufwand. Auch die Introgression von einzelnen Eigenschaften einer Art in eine andere mittels Kreuzung ist – trotz aller bisherigen Erfolge – relativ arbeitsaufwändig. Trotzdem stellen diese Kreuzungen einen wichtigen Weg zur züchterischen Verbesserung der Kulturpflanzen dar, da mit ihnen ein größerer Genpool zur Verfügung steht.

Gewünschte Eigenschaften der Kulturpflanzen wie Futtermasse, Vitalität oder Kornansatz werden bei intergenerischen Hybriden potenziell durch Heterosis erhöht. Auch wenn in Pflanzen früher Hybridgenerationen interspezifische/ intergenerische Disharmonien den positiven Effekt der Heterosis zunichte machen, so kann dies bei stabilen Hybriden späterer Generationen (balancierte amphiploide Hybriden oder Additionslinien) korrigiert werden.

Methoden wie die GISH tragen durch eine erhebliche Verbesserung in der Detektion und Analyse von Hybriden dazu bei, die Effizienz in der Nutzung weiter Kreuzungen für die Pflanzenzüchtung zu erhöhen.

Die Möglichkeit, in naher Zukunft stabile und fertile amphidiploide Hybriden zwischen *L. multiflorum* und *D. glomerata* oder zwischen *F. pratensis* und *D. glomerata* zu erzeugen, muss als gering bewertet werden. Da die erzeugten F₁-Hybriden eine hohe Variabilität bzgl. des Phänotypes zueinander aufweisen, besteht durchaus eine reale Chance, eine einzelne Hybride mit hoher Stabilität und Fertilität zu erzeugen. Für die züchterische Nutzung wären aber mehrere fertile Hybriden notwendig, um eine Linie amphidiploider Hybriden generieren zu können. Dies erscheint mir, wenn überhaupt, nur mit enormen Aufwand realisierbar.

Zum Problem der Züchtung neuer Kulturpflanzen über intergenerische oder interspezifische Kreuzungen schreibt BECKER (1993) Folgendes: „Das Beispiel *Triticale* zeigt deutlich, daß solche neuen Kulturpflanzen eine gewisse Bedeutung erlangen können, dass dies aber nach der Herstellung der ersten Kombinationen noch einen sehr langen Weg konventioneller Züchtung erfordert.“

5 Zusammenfassungen

5.1 Zusammenfassung

Das Potenzial zur Schaffung intergenerischer Hybriden wurde bei Futtergräsern (Subfamilie Pooideae) in Hinblick auf die Verbesserung kultivierter Gräserarten untersucht. Die Untersuchung wies zwei Schwerpunkte auf:

- I.) Die Erzeugung neuartiger, fertiler Hybriden zwischen Eltern mit weitgehend inhomologen Genomen
- II.) Die Produktion einer Anzahl Regenerate aus Antherenkultur von *Lolium-Festuca*-Hybriden (homöologe Genome) als Mittel zur Schaffung von Hybriden mit einem symmetrischen Translokationsmuster (Centromer-Region von *L. multiflorum* bzw. *L. perenne* und terminale Region von *F. pratensis* oder jeweils umgekehrt). Derartige Hybriden sollten balanciert sein sowie stabil und hoch fertil sein.

Die Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologen Genomen wurden nach Kastration des Samenelterns mit Auxinbehandlung (Dicamba) und Embryokultur durchgeführt. Die Genomzusammensetzung wurde mit Hilfe der GISH (genomische *in situ* Hybridisierung) ermittelt.

Folgende Thesen lassen sich formulieren:

1. Bei weiten Kreuzungen zwischen Eltern mit weitgehend inhomologen Genomen wurden in den Kombinationen *Lolium multiflorum* (2x, 4x) × *Dactylis glomerata* (4x), *Festuca pratensis* (2x, 4x) × *D. glomerata* (4x), [*L. multiflorum* (4x) × *F. pratensis* (4x)] × *D. glomerata* (4x) sowie *L. multiflorum* (4x) × *Cynosurus cristatus* (2x) Hybriden erhalten.
2. Die Hybride zwischen *L. multiflorum* (4x) × *Cynosurus cristatus* (2x) war schwach vital und bildete keine Blütenstände.
3. Bei den allotriploiden F₁-Hybriden der Kombinationen *L. multiflorum* (2x) × *D. glomerata* (4x) und *F. pratensis* (2x) × *D. glomerata* (4x) war die generative Entwicklung, sofern die Pflanzen in diese Phase eintraten, früher gestört als bei den allotetraploiden F₁-Hybriden der gleichen Kombinationen.
4. Bei allotetraploiden F₁-Hybriden zwischen *F. pratensis* (4x) × *D. glomerata* (4x) war die Ausbildung generativer Organe erheblich gestört, ebenso bei den schwach vitalen 3-Weg-Hybriden zwischen [*L. multiflorum* (4x) × *F. pratensis* (4x)] × *D. glomerata*. Allotetraploide F₁-Hybriden zwischen *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) waren trotz regulärer Meiose weitgehend steril. Die Wahrscheinlichkeit ist gering, in naher Zukunft fertile amphidiploide (allotetraploide) Linien der untersuchten Hybriden schaffen zu können.
5. Nur in der Kombination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) wurden – nach Rückkreuzung mit *L. multiflorum*, Auxinbehandlung und Embryokultur – BC₁- und BC₂-Pflanzen von den F₁-Hybriden erhalten. Sie wiesen z. T. Hybridcharakter auf

und bieten damit die Möglichkeit, disome chromosomale *L. multiflorum* Additionslinien eines oder weniger Zusatzchromosomes(n) von *D. glomerata* zu schaffen. Die gleiche Möglichkeit könnte sich auch, evtl. über Kreuzung dieser BC₁- und BC₂-Hybriden mit *F. pratensis* (Brückenkreuzung), für die Kombination *F. pratensis* × *D. glomerata* bieten.

6. Die F₁- und BC₁-Hybriden aller untersuchten Kombinationen hatten eine erwartungsgemäße und stabile Genomzusammensetzung. Das ist unterschiedlich zu der Situation bei anderen weiten Kreuzungen, z. B. bei *Triticum aestivum* × *Zea mays* (LAURIE und BENNETT 1986) oder *Oryza sativa* × *Pennisetum americanum* (MATZK 1996), bei denen Chromosomen des Pollenelters bald nach der Befruchtung eliminiert werden. In den BC₂-Hybriden der Kombination *L. multiflorum* × *D. glomerata* trat bei einigen Pflanzen somatische Instabilität auf. Diese äußerte sich in der somatischen Eliminierung von *D. glomerata* Chromosomen, die neben einer Mehrzahl von *L. multiflorum* Chromosomen vorlagen. Die potenzielle somatische Eliminierung von Additionschromosomen erschwert die Erzeugung stabiler chromosomaler Additionslinien.
7. Eine intergenerische Translokation zwischen *L. multiflorum* und *D. glomerata* wurde mittels GISH nachgewiesen. Durch die Existenz von intergenerischen Translokationen zwischen diesen beiden weit entfernt verwandten Arten der Pooideae bietet sich die Möglichkeit zur Introgression einzelner Gene von *D. glomerata* in *L. multiflorum*, wie es z. B. bei den näher verwandten Arten *L. multiflorum* und *F. pratensis* möglich ist.
8. Bei der Antherenkultur von *Lolium-Festuca*-Hybriden war der einzelne Genotyp der Donorpflanzen der wichtigste Einflussfaktor für die Regeneration. Die Häufigkeit der Regeneration von Kalli, Pflanzen insgesamt (Albino- und grünen Pflanzen), speziell grünen Pflanzen und die Ploidie der grünen regenerierten Pflanzen (di-, tetra- oder aneuploid) hingen von ihm ab. Donorpflanzen mit hoher Regenerationsfähigkeit konnten gefunden werden.
9. Eine Kältebehandlung (4°C) der Antheren der *Lolium-Festuca*-Hybriden vor Beginn der Antherenkultur war etwas förderlich für die Regenerationsfähigkeit, weitaus entscheidender war aber der Genotyp.
10. Die regenerierten grünen Pflanzen aus dem ersten Zyklus Antherenkultur waren gering fertil. Dies betraf diploide, tetraploide und aneuploide Regenerate, wobei die Fertilität der tetraploiden Regenerate am höchsten war.
11. Ausschließlich der hohe Anteil der relativ schnell wachsenden Kalli (≤ 62 d bis zum Erreichen ausreichender Größe für den Transfer auf Regenerationsmedium, d. h. ≥ 2 mm Kallusdurchmesser) regenerierte häufig Pflanzen. Langsam wachsende Kalli (> 62 d bis zum Transfer) regenerierten nur wenige Pflanzen. Ist die Wachstumsgeschwindigkeit der Kalli geringer (> 37 d bis zum Transfer), so finden

sich unter den grünen Regeneraten deutlich mehr tetraploide und aneuploide Pflanzen als bei den schnell wachsenden Kalli.

12. Intergenerische Translokationen kommen bei *Lolium-Festuca*-Hybriden häufig vor. Die Existenz von Chromosomen mit einem symmetrischen Translokationsmuster (Centromer-Region von *L. multiflorum* bzw. *L. perenne* und terminale Region von *F. pratensis* oder jeweils umgekehrt) konnte mittels GISH nachgewiesen werden. Die Bildung von Pflanzen, deren sämtliche Chromosomen jeweils eines der beiden Translokationsmuster aufweisen, könnte einen Weg zur Erzeugung stabiler und fertiler *Lolium-Festuca*-Hybriden mit balancierten Genomen darstellen, der allerdings erheblichen Aufwand erfordert.
13. Die genomische *in situ* Hybridisierung (GISH) ist eine geeignete Methode zur Analyse der Genomzusammensetzung intergenerischer oder interspezifischer Hybriden. Die Genome der Elternarten müssen zur Unterscheidung mittels GISH nicht inhomolog, sondern können auch homöolog sein, sofern sie sich in genügend DNS-Sequenzen deutlich voneinander unterscheiden.
14. Der Hybridcharakter von Pflanzen kann auch an Interphasekernen mittels GISH bestimmt werden. Bei Elternarten mit inhomologen Genomen konnte, falls nur wenige Chromosomen eines Elters (*D. glomerata*) neben dem Genom des anderen Elters (*L. multiflorum*) vorlagen, deren Zahl an Interphasekernen geschätzt werden. Diese Möglichkeit beschleunigt die Bewertung von Nachkommen in Pflanzenzuchtprogrammen.

5.2 Summary

In this work there were investigated the chances to produce intergeneric hybrids among forage grasses (Subfamilia Pooideae) in order to evaluate the prospects to improve the quality of cultivated grass species. The two main tasks concentrated on:

- (i) The generation of novel fertile hybrids between parents having inhomologous genomes
- (ii) The production of a series of regenerated plants via anther culture from *Lolium-Festuca* hybrids (homoeologous genomes) with the aim to achieve plants with symmetrical intergeneric chromosome-translocation-pattern (centromeric region from *Lolium* and terminal from *Festuca* or vice versa). Such plants should be balanced and show stability and high fertility.

The crosses between parents having inhomologous genomes were accomplished after emasculation of the female parent. Auxin treatment (dicamba) and embryo rescue were used to obtain hybrid plants. The genome constitution of both kinds of hybrids was analyzed by GISH (genomic *in situ* hybridization).

The following conclusions can be drawn:

1. By crossing parents with inhomologous genomes hybrid plants were obtained in the combinations *Lolium multiflorum* (2x, 4x) × *Dactylis glomerata* (4x), *Festuca pratensis* (2x, 4x) × *D. glomerata* (4x), [*L. multiflorum* (4x) × *F. pratensis* (4x)] × *D. glomerata* (4x) and *L. multiflorum* (4x) × *Cynosurus cristatus* (2x).
2. The hybrid plant between *L. multiflorum* (4x) × *Cynosurus cristatus* (2x) was weakly vital and did not produce any generative organs.
3. In the allotriploid hybrids of the combinations *L. multiflorum* (2x) × *D. glomerata* (4x) and *F. pratensis* (2x) × *D. glomerata* (4x) the generative development – if the plants reached this level – aborted earlier than in the allotetraploid hybrids of the same combination.
4. The allotetraploid F₁-hybrids between *F. pratensis* (4x) × *D. glomerata* (4x) showed strong disturbances in the development of the generative organs, as did the weakly vital trigeneric-hybrids between [*L. multiflorum* (4x) × *F. pratensis* (4x)] × *D. glomerata*, too. The allotetraploid F₁-hybrids between *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) were – despite regular meiosis – to a high extend sterile. The chance to be able to generate in near future fertile amphidiploid (allotetraploid) lines of the examined hybrids seems to be low.
5. Only in the combination *L. multiflorum* (4x) × *D. glomerata* (4x) BC₁- and BC₂-plants were obtained – after backcrossing with *L. multiflorum*, auxin treatment and embryo rescue. Several of these plants were proved to be hybrids and therefore could be used to generate disomic chromosomal addition lines of *L. multiflorum* having one or few additional chromosome(s) of *D. glomerata*. This opportunity might also exist for the combination *F. pratensis* × *D. glomerata*, may be by crossing *L. multiflorum* - *D. glomerata* chromosomal addition lines with *F. pratensis* (bridge crossing).
6. The F₁- and BC₁-hybrids of all examined combinations had the expected and a stable genome constitution. This is different to the situation in other crosses between distantly related species, e. g. *Triticum aestivum* × *Zea mays* (LAURIE and BENNETT 1986) or *Oryza sativa* × *Pennisetum americanum* (MATZK 1996), in which chromosomes of the male parent are eliminated soon after fertilization. Among the BC₂-hybrids of the combination *L. multiflorum* × *D. glomerata* several plants showed instability in the number of chromosomes. *D. glomerata* chromosomes, which were clearly outnumbered by *L. multiflorum* chromosomes, were somatically eliminated in several plants. The possibility of a somatic elimination of additional chromosomes makes the generation of stable chromosomal addition lines more difficult.
7. The presence of an intergeneric translocation between *L. multiflorum* and *D. glomerata* was proven by GISH. The occurrence of such translocations between these distantly related species offers the opportunity to introgress single genes from

D. glomerata in *L. multiflorum*, like it is for instance possible between the more closely related species *L. multiflorum* and *F. pratensis*.

8. The regeneration in anther culture of *Lolium-Festuca* hybrids was most strongly influenced by the genotype of the donor plants. The frequency of calli formation, plant regeneration (albino and green plants together) and regeneration of green plants particularly as well as the ploidy level of the regenerated green plants (di-, tetra- and aneuploid) was highly dependent on the genotype. Donor plants having high capability of regeneration were found.
9. Cold treatment (4°C) to the anthers of the *Lolium-Festuca* hybrids before the anther culture improved to some extent the capability of regeneration, but much more important was the genotype.
10. The regenerated green plants from the first cycle of anther culture were weakly fertile. This was valid for diploid, tetraploid and aneuploid regenerants, among them the tetraploids showed the highest fertility.
11. Only the quite fast growing calli (≤ 62 d before transfer to regeneration medium, i. e. ≥ 2 mm callus diameter), which represented the majority of the produced calli, frequently regenerated plants. The slow growing calli (> 62 d before the transfer) gave rise to only few plants. Among the green regenerants from calli growing with medium speed (> 37 d before the transfer) the percentage of tetraploid and aneuploid plants was higher as compared to the green regenerants from fast growing calli.
12. Intergeneric translocations are often occurring in *Lolium-Festuca* hybrids. The existence of chromosomes with a symmetrical translocation-pattern (centromeric region from *L. multiflorum* or *L. perenne*, respectively and terminal from *Festuca*, or vice versa) was proven by GISH. The generation of plants having all chromosomes according to one of the two possible translocation-patterns could be a way to produce stable and fertile *Lolium-Festuca* hybrids with balanced genomes. But very strong efforts would be necessary to realize this approach.
13. The genomic *in situ* hybridization (GISH) is an efficient method to analyze the genome constitution of intergeneric or interspecific hybrids. To be differentiated by GISH the genomes of the parents need not to be inhomologous, but can also be homoeologous to each other, if they differ in enough DNA-sequences.
14. The hybrid origin of plants generated by wide crosses can be determined by GISH to interphase nuclei, too. At crosses between parents having inhomologous genomes the number of chromosomes of one parent could be estimated by GISH at interphase nuclei, if there are only few chromosomes of one parent (*D. glomerata*) present in the majority of chromosomes of the other parent (*L. multiflorum*). This possibility significantly accelerate evaluation of the progeny in plant breeding programmes.

6 Literaturverzeichnis

- Alleman, M. und J. Doctor, 2000: Genomic imprinting in plants: observations and evolutionary implications. *Plant Mol. Biol.* **43**, 147-161.
- Alonso, L. C. und G. Kimber, 1981: The analysis of meiosis in hybrids. II. Triploid hybrids. *Can. J. Genet. Cytol.* **23**, 221-234.
- Anamthawat-Jónsson, K. und J. P. Heslop-Harrison, 1993: Isolation and characterization of genome-specific DNA sequences in *Triticeae* species. *Mol. Gen. Genet.* **240**, 151-158.
- Armstead, I. P., A. Bollard, W. G. Morgan, J. A. Harper, I. P. King, R. N. Jones, J. W. Foster, M. D. Hayward und H. M. Thomas, 2001: Genetic and physical analysis of a single *Festuca pratensis* chromosome segment substitution in *Lolium perenne*. *Chromosoma* **110**, 52-57.
- Barclay, I. R., 1975: High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature (London)* **256**, 410-411.
- Becker, H., 1993: Pflanzenzüchtung. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 175-177.
- Benavente, E., B. Fernandez-Calvin und J. Orellana, 1996: Relationship between the levels of wheat-rye metaphase I chromosomal pairing and recombination revealed by GISH. *Chromosoma* **105**, 92-96.
- Benavente, E., J. Orellana und B. Fernandez-Calvin 1998: Comparative analysis of the meiotic effects of wheat *ph1b* and *ph2b* mutations in wheat × rye hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **96**, 1200-1204.
- Benavente, E., K. Alix, J.-C. Dusautoir, J. Orellana und J. L. David, 2001: Early evolution of the chromosomal structure of *Triticum turgidum* - *Aegilops ovata* amphiploids carrying and lacking the Ph1 gene. *Theor. Appl. Genet.* **103**, 1123-1128.
- Bulińska-Radomska, Z. und R. N. Lester, 1988: Intergeneric relationships of *Lolium*, *Festuca*, and *Vulpia* (Poaceae) and their phylogeny. *Pl. Syst. Evol.* **159**, 217-227.
- Bundessortenamt, 1997: Beschreibende Sortenliste Gräser, Klee, Luzerne. Bundessortenamt (Hrsg.), Landbuch-Verlag, Hannover.
- Bundessortenamt, 1999: Beschreibende Sortenliste Gräser, Klee, Luzerne. Bundessortenamt (Hrsg.), Landbuch-Verlag, Hannover.
- Canter, P. H., I. Pašakinskienė, R. N. Jones und M. W. Humphreys, 1999: Chromosome substitutions and recombination in the amphiploid *Lolium perenne* × *Festuca pratensis* cv. Prior (2n=4x=28). *Theor. Appl. Genet.* **98**, 809-814.
- Cao, M. und D. A. Sleper, 2001: Use of genome-specific repetitive DNA sequences to monitor chromatin introgression from *Festuca mairei* into *Lolium perenne*. *Theor. Appl. Genet.* **103**, 248-253.

- Cao, M., D. A. Sleeper, F. Dong und J. Jiang, 2000: Genomic *in situ* hybridization (GISH) reveals high chromosome pairing affinity between *Lolium perenne* and *Festuca mairei*. *Genome* **43**, 398-403.
- Castilho, A., N. Neves, M. Rufini-Castiglione, W. Viegas and J. S. Heslop-Harrison, 1999: 5-Methylcytosine distribution and genome organization in Triticale before and after treatment with 5-azacytidine. *J. Cell Sci.* **112**, 4397-4404.
- Chandrasekharan, P. und H. Thomas, 1971: Studies in *Festuca* V. Cytogenetic relationships between species of *bovinae* and *scariosae*. *Z. PflZücht* **65**, 345-354.
- Chapman, C. G. D. und G. Kimber, 1992: Developments in the meiotic analysis of hybrids. I. Review of theory and optimization in triploids. *Heredity* **68**, 97-103.
- Chen, C.-X., J.-S. Sun und L.-H. Zhu, 2000: Inheritance and sequence homology analysis of the maize DNA introgressed into the wheat doubled haploid plant through wheat × maize cross. *Acta Bot. Sin.* **42**, 728-731.
- Chen, F. Q., P. M. Hayes und C. J. Rivin, 1991: Wide hybridization of *Hordeum vulgare* × *Zea mays*. *Genome* **34**, 603-605.
- Clayton, W. D. und Renvoize, S A., 1986: Genera Graminum. Kew Bulletin Additional Series XIII, Her Majesty's Stationary Office, London.
- Comai, L., 2000: Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol. Biol.* **43**, 387-399.
- Comai, L., A. P. Tyagi, K. Winter, R. Homes-Davis, S. H. Reynolds, Y. Stevens und B. Byers, 2000: Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Cell* **12**, 1551-1567.
- Crasta, O. R., M. G. Francki, D. B. Bucholz, H. C. Sharma, J. Zhang, R. - C. Wang, H. W. Ohm und J. M. Anderson, 2000: Identification and characterization of wheat-wheatgrass translocation lines and localization of barley yellow dwarf virus resistance. *Genome* **43**, 698-706.
- Cubas, P., C. Vincent und E. Coen, 1999: An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* **401**, 157-161.
- Darlington, C. D. und L. F. La Cour, 1962: Methoden der Chromosomenuntersuchung. Deutsche Übersetzung. Franckh'sche Verlagsbuchhandlung W. Keller & Co., Stuttgart, 104.
- Devos, K. M. und M. D. Gale, 2000: Genome relationships: the grass model in current research. *Plant Cell* **12**, 637-646.
- Doğramaci-Altuntepe, M., T. S. Peterson und P. P. Jauhar, 2001: Anther culture-derived regenerants of Durum wheat and their cytological characterization. *J. Hered.* **92**: 56-64.
- Doussinault, G., A. Delibes, R. Sanchez-Monge und F. Garcia-Olmeda, 1983: Transfer of a dominant gene for resistance to eyespot disease from a wild grass to hexaploid wheat. *Nature (London)* **303**, 698-700.

- Durnam, D. M., R. Gelinas und D. Myerson, 1985: Detection of species specific chromosomes in somatic cell hybrids. *Somatic Cell Mol. Genet.* **11**, 571-577.
- Eickmeyer, F., 1994: Erstellung von molekularen Markern und Untersuchungen zur Hybridzüchtung mit Hilfe der genetischen Inkompatibilität bei Weidelgras-Arten (*Lolium* spp.). Dissertation Universität Hannover.
- Eubanks, M. W., 1997: Molecular analysis of crosses between *Tripsacum dactyloides* and *Zea diploperennis* (Poaceae). *Theor. Appl. Genet.* **94**, 707-712.
- Eubanks, M., 1995: A cross between two maize relatives: *Tripsacum dactyloides* and *Zea diploperennis* (Poaceae). *Econ. Bot.* **49**, 172-182.
- Fagan, T., 1996: Quickbasic program for exact and mid-P confidence intervals for a binomial proportion. *Comput. Biol. Med.* **26**, 263-267.
- Fedak, G., 1999: Molecular aids for introgression of alien chromatin through wide crosses. *Genome* **42**, 584-591.
- Finch, R. A. und M. D. Bennett, 1980: Mitotic and meiotic chromosome behaviour in new hybrids of *Hordeum* with *Triticum* and *Secale*. *Heredity* **44**, 201-209.
- Finnegan, E. J., W. J. Peacock und E. S. Dennis, 2000: DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 217-223.
- Fuchs, J. und I. Schubert, 1995: Localization of seed protein genes on metaphase chromosomes of *Vicia faba* via fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosome Res.* **3**, 94-100.
- Gale, M. D. und K. M. Devos, 1997: Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol. Biol.* **35**, 3-15.
- Gardner, F. P. und W. E. Loomis, 1952: Floral induction and development in orchard grass. Journal paper no. J-2125 of the Iowa Agricultural Experimental Station, Ames, Iowa, projects 1001 and 1139.
- Gaut, B. S., L. P. Tradway, C. Kubik, R. L. Gaut und W. Meyer, 2000: Phylogenetic relationships and genetic diversity among members of the *Festuca-Lolium* complex (Poaceae) based on ITS sequence data. *Plant. Syst. Evol.* **224**, 33-53.
- Gerlach, D., 1969: Botanische Mikrotechnik. Eine Einführung. Bd. 2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 256.
- Ghesquière, M., F. Durand, P. Le Quilliec und F. Gaullier, 1991: Use of electrophoretic markers in chromosome manipulating of *Festuca* × *Lolium* hybrids. In: Proc. of the 18th EUCARPIA Fodder crops section meeting, Alghero, Italy.
- Ghesquière, M., Ph. Barre, S. Marhadour und M.-C. Kerlan, 2000: Estimation of introgression rate of a fescue isozymic marker into tetraploid Italian ryegrass at early generations of backcross. *Euphytica* **114**, 223-231.
- Gillies, C. B., 1987: The effect of the Ph gene alleles on synaptonemal complex formation in *Triticum aestivum* × *T. kotschy* hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **74**, 430-438.

- Grant, V., 1966: Selection for vigour and fertility in the progeny of a highly sterile species hybrid in *Gilia*. *Genetics* **53**, 757-775.
- Grant, V., 1971: Plant speciation. Columbia University Press, New York, London.
- Guo, M., D. Davis und J. A. Birchler, 1996: Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics* **142**, 1349-1355.
- Haeckel, E., 1882: Monographia Festucarum Europearum. Theodor Fischer, Kassel, Berlin.
- Heslop-Harrison, J. S. und M. D. Bennett, 1990: Nuclear architecture in plants. *Trends Genet.* **6**, 401-405.
- Heslop-Harrison, J. S. und Y. Heslop-Harrison, 1970: Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Techn.* **45**, 115-120.
- Heslop-Harrison, J. S., 1990: Gene expression and parental dominance in hybrid plants. *Development* **1105**, 21-28.
- Heslop-Harrison, J. S., A. R. Leitch, T. Schwarzacher und K. Anamthawat-Jónsson, 1990: Detection and characterization of 1B/1R translocations in hexaploid wheat. *Heredity* **65**, 385-392.
- Hodkinson, T. R., M. W. Chase, C. Takahashi, I. J. Leitch, M. D. Bennett und S. A. Renvoize, 2002: The use of DNA sequencing (ITS and *TRNL-F*), AFLP, and Fluorescent in situ Hybridization to study allopolyploid *Miscanthus* (Poaceae). *Am. J. Bot.* **89**, 279-286.
- Houben, A., 1993: Experimentelle Untersuchungen zur Isolierung individueller Pflanzenchromosomen und deren Nutzungsmöglichkeiten. Dissertation Universität Halle-Wittenberg.
- Hubbard, C. E., 1948: Gramineae. In: J. B. Hutchinson (Hrsg.): British flowering plants. Gawthorn, London, 284-348.
- Humphreys, M. W., 1989: The controlled introgression of *Festuca arundinacea* genes into *Lolium multiflorum*. *Euphytica* **42**, 105-116.
- Humphreys, M. W. und I. Pašakinskienė, 1996: Chromosome painting to locate genes for drought resistance transferred from *Festuca arundinacea* into *Lolium multiflorum*. *Heredity* **77**, 530-534.
- Humphreys, M. W. und M. Ghesquière, 1994: Assessing success in gene transfer between *Lolium multiflorum* and *Festuca arundinacea*. *Euphytica* **77**, 283-289.
- Humphreys, M. W., A. G. Zare, I. Pašakinskienė, H. Thomas, W. J. Rogers und H. A. Collin, 1998: Interspecific genomic rearrangements in androgenic plants derived from a *Lolium multiflorum* × *Festuca arundinacea* (2n=5x=35) hybrid. *Heredity* **80**, 78-82.
- Humphreys, M. W., H. M. Thomas, W. G. Morgan, M. R. Meredith, J. A. Harper, H. Thomas, Z. Zwierzykowski und G. Ghesquière, 1995: Discriminating the ancestral

- progenitors of hexaploid *Festuca arundinacea* using genomic *in situ* hybridization. *Heredity* **75**, 171-174.
- Humphreys, M. W., M. Ghesquière, Z. Zwierzykowski, M. Rapacz, O. A. Rognli und L. Østrem, 2001: A Pan-European approach to "Dissecting" stress resistance traits in the forage grasses. In: Proc. of the 23rd. EUCARPIA Fodder crops and amenity grasses section meeting, Angra do Heroísmo, Portugal, 139-145.
- Immonen, S. und J. Robinson, 2000: Stress treatments and ficoll for improving green plant regeneration in triticale anther culture. *Plant Sci.* **150**, 77-84.
- Inagaki, M. N., W. Al-Ek und M. Tahir, 1991: A comparison of haploid production frequencies in barley crossed with maize and *Hordeum bulbosum* L. *Cereal Res. Commun.* **19**, 385-390.
- Index Kewensis, 1996: Version 2.0 on Compact Disk. Royal Botanic Gardens Kew, Oxford.
- Islam, A. K. M. R. und K. W. Shepherd, 1988: Induced pairing between wheat and barley chromosomes. In: T. E. Miller und R. M. D. Koebner (Hrsg.): Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp. 309-314, Cambridge
- Islam, A. K. M. R. und K. W. Shepherd, 1992: Production of wheat-barley recombinant chromosomes through induced homoeologous pairing. *Theor. Appl. Genet.* **83**, 489-494.
- Islam, A. K. M. R. und K. W. Shepherd, 2000: Isolation of a fertile wheat-barley addition line carrying the entire barley chromosome 1H. *Euphytica* **111**, 145-149.
- Islam, A. K. M. R., K. W. Shepherd und D. H. B. Sparrow, 1981: Isolation and characterization of euplasmic wheat-barley chromosome addition lines. *Heredity* **46**, 161-174.
- Jauhar, P. P und L. R. Joppa, 1996: Chromosome pairing as a tool in genome analysis: merits and limitations. In: P. P. Jauhar (Hrsg.): *Methods of genome analysis in plants* CRC Press, Boca Raton, 9-37.
- Jauhar, P. P und R. N. Chibbar, 1999: Chromosome-mediated and direct gene transfers in wheat. *Genome* **42**, 570-583.
- Jauhar, P. P und T. S. Peterson, 2001: Hybrids between durum wheat and *Thinopyrum junceiforme*: Prospects for breeding for scab resistance. *Euphytica* **118**, 127-136.
- Jauhar, P. P., 1975a: Chromosome relationships between *Festuca* and *Lolium* (Gramineae). *Chromosoma* **52**, 103-121.
- Jauhar, P. P., 1975b: Genetic regulation of diploid-like chromosome pairing in the hexaploid species, *Festuca arundinacea* Schreb. and *F. rubra* L. (Gramineae). *Chromosoma* **52**, 363-382.
- Jauhar, P. P., 1993: Cytogenetics of the *Festuca-Lolium* complex. *Monographs Theor. Appl. Genet.* **18**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Jenkin, T. J., 1924: The artificial hybridisation of grasses. Bull. Welsh Plant Breed. Stn. Series H **2**, 1-18.
- Jenkin, T. J., 1933: Interspecific and intergeneric hybrids in herbage grasses. Initial crosses. J. Genet. **28**, 205-264.
- Jenkin, T. J., 1959a: Fescue species (*Festuca* L.). In: H. Kappert und W. Rudorf (Hrsg.): Handbuch der Pflanzenzüchtung, Bd. 4, 2. Aufl., Paul Parey, Berlin, 418-434.
- Jenkin, T. J., 1959b: The ryegrasses (*Lolium* L.). In: H. Kappert und W. Rudorf (Hrsg.): Handbuch der Pflanzenzüchtung, Bd. 4, 2. Aufl., Paul Parey, Berlin, 435-452.
- Jiang J. und B. S. Gill, 1994: Nonisotopic in situ hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. Genome **37**, 717-725.
- Kaiser, K., 1988: Beziehungen morphologischer und zytologischer Merkmale zum Samenanatz bei *Festulolium braunii* A. CAMUS (*Festuca pratensis* HUDS. × *Lolium multiflorum* LAM.). Arch. Züchtungsforsch. **18**, 175-184.
- Kaloo, G., 1992: Utilization of wild species. In: G. Kaloo und J. B. Chowdhury (Hrsg.): Distant hybridization of crop plants. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 149-167.
- Karp, A. und R. N. Jones, 1983: Cytogenetics of *Lolium perenne*. Part 2. Chiasma distribution in inbred lines. Theor. Appl. Genet. **64**, 137-145.
- Kasha, K. J. und K. N. Kao, 1970: High frequency of haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature (London) **225**, 874-876.
- Kasha, K. J., 1974: Haploids from somatic cells. In: K. J. Kasha (Hrsg.): Haploids in higher plants: Advances and potentials. Universität Guelph, Kanada, 67-87.
- Kerby, K. und J. Kuspira, 1987: The phylogeny of the polyploid wheats *Triticum aestivum* (bread wheat) and *Triticum turgidum* (macaroni wheat). Genome **29**, 722-737.
- Khush, G., S. und D. S. Brar, 1992: Overcoming the barriers in hybridization. In: G. Kaloo und J. B. Chowdhury (Hrsg.): Distant hybridization of crop plants. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 47-61.
- Kihara, H., 1937: Genomanalyse bei *Triticum* und *Aegilops*. VII Kurzübersicht über die Ergebnisse der Jahre 1934-36. Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ. 41.
- King, I. P., W. G. Morgan, I. P. Armstead, J. A. Harper, M. D. Hayward, A. Bollard, J. V. Nash, J. W. Forster und H. M. Thomas, 1998: Introgression mapping in the grasses. I. Introgression of *Festuca pratensis* chromosome segments into *Lolium perenne*. Heredity **81**, 462-467.
- King, I. P., W. G. Morgan, I. P. Armstead, J. King, T. A. H. Jones, J. V. Nash, R. N. Jones, J. A. Harper, L. A. Roberts, S. Taylor und H. M. Thomas, 2000: Species relationships, introgression and physical mapping in *Lolium perenne* × *Festuca pratensis* hybrids. Chromosomes Today **13**, 277-285.
- Kleijer, G., 1984: Cytogenetic Studies of Crosses between *Lolium multiflorum* Lam. and *Festuca arundinacea* Schreb. I. The parents and the F₁ hybrids. Z. Pflanzenzüchtung **93**, 1-22.

- Kleijer, G., 1987: Cytogenetic Studies of Crosses between *Lolium multiflorum* Lam. and *Festuca arundinacea* Schreb. III. The Generations C₁, C₂ and C₃. *Plant Breeding* **99**, 144-150.
- Koba, T., S. Takumi und T. Shimada, 1997: Isolation, identification and characterization of disomic and translocated barley chromosome addition lines of common wheat. *Euphytica* **96**, 289-296.
- Koba, T., T. Handa und T. Shimada, 1991: Efficient production of wheat-barley hybrids and preferential elimination of barley chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* **81**, 285-292.
- Kooter, J. M., M. A. Matzke und P. Meyer, 1999: Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci.* **4**, 340-347.
- Kruse, A., 1973: *Hordeum* × *Triticum* hybrids. *Hereditas* **73**, 157-161.
- Kruse, A., 1974: An in vivo/vitro embryo culture technique. *Hereditas* **77**, 219-224.
- Kynast, R. G., O. Riera-Lizarazu, M. I. Vales, R. J. Okagaki, S. B. Maquieira, G. Chen, E. V. Ananiev, W. E. Odland, C. D. Russell, A. O. Stec, S. M. Livingston, H. A. Zaia, H. W. Rines und R. L. Phillips, 2001: A complete set of maize individual chromosome additions to the oat genome. *Plant Physiol.* **125**, 1216-1227.
- Langer, P. R., A. A. Waldrop und D. C. Ward, 1981: Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6633-6637.
- Lapitan, N. L. V., R. G. Sears und B. S. Gill, 1984: Translocations and other karyotypic structural changes in wheat × rye hybrids regenerated from tissue culture. *Theor. Appl. Genet.* **68**, 547-554.
- Larkin, P. J. und W. R. Scowcroft, 1981: Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* **60**, 197-214.
- Larter, E. N., 1976: Triticale. In: N. W. Simmonds (Hrsg.): *Evolution of crop plants*. Longman Publisher, London, 117-120.
- Laurie, D. A. und M. D. Bennett, 1986: Wheat × maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.* **28**, 313-316.
- Laurie, D. A. und M. D. Bennett, 1988: Chromosome behaviour in wheat × maize, wheat × sorghum und barley × maize crosses. In: P. E. Brandham (Hrsg.): *Kew chromosome Conf.* **3**, 167-178.
- Laurie, D. A. und M. D. Bennett, 1990: The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses. *Genome* **32**, 593-596.
- Le, H T., K. C. Armstrong und B. Miki, 1989: Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. *Plant Mol. Biol. Rep.* **7**, 150-158.
- Leitch, A. R., T. Schwarzacher, D. Jackson und I. J. Leitch, 1994: *In situ hybridization – a practical guide*. Royal Microscopical Society: *Microscopy handbooks* 27. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford.

- Leitch, A. R., T. Schwarzacher, W. Mosgöller, M. D. Bennett und J. S. Heslop-Harrison, 1991: Parental chromosomes are separated throughout the cell cycle in a plant hybrid. *Chromosoma* **101**, 206-213.
- Leitch, A. R., W. Mosgöller, T. Schwarzacher, M. D. Bennett und J. S. Heslop-Harrison, 1990: Genomic *in situ* hybridization to sectioned nuclei shows chromosome domains in grass hybrids. *J. Cell. Sci.* **95**, 335-341.
- Leitch, I. J. und M. D. Bennett, 1997: Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci.* **2**, 470-476.
- Leśniewska, A., A. Ponitka, A. Ślusarkiewicz-Jarzina, E. Zwierzykowska, Z. Zwierzykowski, A. R. James, H. Thomas und M. W. Humphreys, 2001: Androgenesis from *Festuca pratensis* × *Lolium multiflorum* amphidiploid cultivars in order to select and stabilize rare gene combinations for grass breeding. *Heredity* **86**, 167-176.
- Lewis, E. J., 1975: *Lolium* L. In: C. A. Stace (Hrsg.): Hybridization and the flora of the British Isles. Academic Press, London, 555-557.
- Li, Z., S. R. M. Pinson, A. H. Paterson, W. D. Park und J. W. Stansel, 1997: Genetics of hybrid sterility and hybrid breakdown in an intersubspecific rice (*Oryza sativa* L.) population. *Genetics* **145**, 1139-1148.
- Lim, K.-B., J.-D. Chung, B. C. E. v. Kronenburg, M. S. Ramanna, J. H. de Jong und J. M. v. Tuyl, 2000: Introgression of *Lilium rubellum* Baker chromosomes into *L. longiflorum* Thunb.: a genome painting study of the F₁ hybrid, BC₁ and BC₂ progenies. *Chromosome Res.* **8**, 119-125.
- Liu, B., J. M. Vega und M. Feldman, 1998: Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low-copy coding DNA sequences. *Genome* **41**, 535-542.
- Lundqvist, U. und A. Lundqvist, 1988: Mutagen specificity in barley for 1580 *eceriferum* mutants localized to 79 loci. *Hereditas* **108**, 1-12.
- Malysheva, L., T. Sjakste, F. Matzk, M. Röder und M. Ganal, 2003: Molecular cytogenetic analysis of wheat-barley hybrids using Genomic *in situ* Hybridization and barley microsatellite markers. *Genome* **46**, 314-322.
- Martinez-Perez, E., P. Shaw, S. Reader, L. Aragon-Alcaide, T. Miller und G. Moore, 1999: Homologous chromosome pairing in wheat. *J. Cell Sci.* **112**, 1761-1769.
- Marubashi, W., T. Yamada und M. Niwa, 1999: Apoptosis detected in hybrids between *Nicotiana glutinosa* × *N. repanda*. *Planta* **210**, 168-171.
- Matthes, M., R. Singh, S.-C. Cheah und A. Karp, 2001: Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. *Theor. Appl. Genet.* **102**, 971-979.
- Matzk, F. und A. Mahn, 1994: Improved techniques for haploid production in wheat using chromosome elimination. *Plant Breeding* **113**, 125-129.

- Matzk, F., 1981: Successful crosses between *Festuca arundinacea* Schreb. and *Dactylis glomerata* L. Theor. Appl. Genet. **60**, 119-122.
- Matzk, F., 1991: A novel approach to differentiated embryos in the absence of endosperm. Sex. Plant Reprod. **4**, 88-94.
- Matzk, F., 1996: Hybrids of crosses between oat and Andropogoneae or Paniceae species. Crop Sci. **36**, 17-21.
- Matzk, F., C. Oertel, P. Altenhofer and I. Schubert, 1997: Manipulation of reproductive systems in Poaceae to increase the efficiency in crop breeding and production. Trends in Agronomy, **Vol. 1**, 19-34.
- Matzk, F., K. Gröber und M. Zacharias, 1980: Ergebnisse von Art- und Gattungskreuzungen mit Gramineen im Zusammenhang mit den natürlichen Isolationsmechanismen zwischen den Arten. Kulturpflanze **28**, 257-284.
- Matzke, M. A. und A. J. Matzke, 1998: Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. Cell. Mol. Life Sci. **54**, 94-103.
- McAlpine, A. N., 1898: Production of new types of forage grasses – clovers and grasses. Trans. Highland Agric. Soc. Scotl. **10**, 135-158.
- Meyer, P. und H. Saedler, 1996: Homology-dependent gene silencing in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **47**, 23-48.
- Mifflin, B., J., 2000: Crop Biotechnology. Where now? Plant Physiol. **123**, 17-27.
- Miller, T. E., S. M. Reader, K. A. Purdie und I. P. King, 1994: Determination of the frequency of wheat-rye chromosome pairing in wheat × rye hybrids with and without chromosome 5B. Theor. Appl. Genet. **89**, 255-258.
- Mittelsten Scheid, O., L. Jakovleva, K. Afsar, J. Maluszynska und J. Paszkowski, 1996: A change of ploidy can modify epigenetic silencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 7114-7119.
- Molnár-Láng, M., G. Linc, B. R. Friebe und J. Sutka, 2000a: Detection of wheat-barley translocations by genomic *in situ* hybridization in derivatives of hybrids multiplied *in vitro*. Euphytica **112**, 117-123.
- Molnár-Láng, M., G. Linc, A. Logojan und J. Sutka, 2000b: Production and meiotic pairing behaviour of new hybrids of winter wheat (*Triticum aestivum*) × winter barley (*Hordeum vulgare*). Genome **43**, 1045-1054.
- Morgan, H. D., H. G. E. Sutherland, D. I. K. Martin und E. Whitelaw, 1999: Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. Nature Genetics **23**, 314-318.
- Morgan, W. G., 1990: Chromosome pairing in triploid hybrids and amphidiploids involving *Lolium* and diploid *Festuca* species. Genome **33**, 472-477.
- Morgan, W. G., H. Thomas, 1981: Cytogenetic studies in the *Lolium/Festuca* complex. Ann. Rep. Welsh Plant Breed. Stn., Aberystwyth, 109.

- Morgan, W. G., I. P. King, S. Koch, J. A. Harper und H. M. Thomas, 2001: Introgression of chromosomes of *Festuca arundinacea* var. *glaucescens* into *Lolium multiflorum* revealed by genomic *in situ* hybridisation (GISH). *Theor. Appl. Genet.* **103**, 696-701.
- Mukai, Y. und B. S. Gill, 1991: Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization. *Genome* **34**, 448-452.
- Müntzing, A., 1979: *Triticale*. Results and problems. *Fortschritte der Pflanzenzüchtung*, Beiheft **10**, Z. Pflanzenzücht., Paul Parey Verlag, Berlin Hamburg.
- Nitzsche, W. und G. Wenzel, 1977: Haploids in plant breeding. *Supplements to Journal of Plant Breeding* **8**, 46-49, Paul Parey Verlag Berlin, Hamburg.
- Noor, M. A. F., 1999: Reinforcement and other consequences of sympatry. *Heredity* **83**, 503-508.
- Oertel, C. and F. Matzk, 1999: Introgression of crown rust resistance from *Festuca* spp. into *Lolium multiflorum*. *Plant Breeding* **118**, 491-496.
- Oertel, C., 1997: Erschließung genetischer Ressourcen für die Gräserzüchtung über intergenerische Kreuzungen. Dissertation Universität Halle-Wittenberg.
- Oertel, C., J. Fuchs und F. Matzk, 1996a: Successful hybridization between *Lolium* and *Dactylis*. *Plant Breeding* **115**, 101-105.
- Oertel, C., P. Altenhofer, G. M. Ali und F. Matzk, 1996b: Wide hybridization for generating novel genetic variability in Poaceae. In: F. Bergmann, C. Ehling und R. Falge (Hrsg.): *Vergleichende Aspekte der Nutzung und Erhaltung pflanzen- und tiergenetischer Ressourcen*. *Schriften zu genetischen Ressourcen* **5**, IGR/ZADI, Bonn, 340-343.
- Okamoto, M., 1957: Asynaptic effect of chromosome 5. *Wheat. Inf. Serv.* **5**, 6.
- Olesen, A., S. B. Andersen und I. K. Due, 1988: Anther culture of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Breed.* **101**, 60-65.
- Otto, L.-G., C. Oertel, L. Malysheva und F. Matzk, 2001: Various approaches to generate basic material for breeding of forage grasses by wide hybridization. In: *Proc. of the 23rd. EUCARPIA Fodder crops and amenity grasses section meeting*, Angra do Heroismo, Portugal, 70-75.
- Pašakinskienė, I., K. Anamthawat-Jónsson, M. W. Humphreys und R. N. Jones, 1997: Novel diploids following chromosome elimination and somatic recombination in *Lolium multiflorum* × *Festuca arundinacea* hybrids. *Heredity* **78**, 464-469.
- Pašakinskienė, I., K. Anamthawat-Jónsson, M. W. Humphreys, V. Paplauskiene und R. N. Jones, 1998: New molecular evidence on genome relationships and chromosome identification in fescue (*Festuca*) and ryegrass (*Lolium*). *Heredity* **81**, 659-665.
- Perez-Vicente, R., L. Petris, M. Osusky, I. Potrykus und G. Spangenberg, 1992: Molecular and cytogenetic characterization of repetitive DNA sequences from *Lolium* and *Festuca*: applications in the analysis of *Festulolium* hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **84**, 145-154.

- Phillips, R. L., S. M. Kaeppler und P. Olhof, 1994: Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5222-5226.
- Pinkel, D., T. Straume und J. W. Gray, 1986: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 2934-2938.
- Pollard, J. H., 1977: Numerical and statistical techniques. University press Cambridge, 217-218.
- Posselt, U. K. und Rapp, C., 1997: "Entwicklung und Optimierung der Haploidentechnik bei Gräsern". Abschlußbericht des GFP-Forschungsauftrages F50/94 über den Zeitraum vom 1.12.1996 – 30.11.1997.
- Raina, S. N. und V. Rani, 2001: GISH technology in plant genome research. *Methods in Cell Science* **23 (1-3)**, 83-104. In: A. K. Sharma und A. Sharma (Hrsg.): Chromosome painting - principles, strategies and scope.
- Rajaram, S., C. H. E. Mann, G. Ortiz-Ferrara und A. Mujeeb-Kazi, 1983: Adaptation, stability and high yield potential of certain 1B/1R CIMMYT wheat. *Proc. 6th Int. Wheat Genet. Symp.*, 613-621.
- Rees, H. und P. J. Dale, 1974: Chiasmata and variability in *Lolium* and *Festuca* populations. *Chromosoma* **47**, 335-351.
- Ribeiro-Carvalho, C., H. Guedes-Pinto, J. S. Heslop-Harrison und T. Schwarzacher, 2001: Introgression of rye chromatin on chromosome 2D in the Portuguese wheat landrace 'Barbela'. *Genome* **44**, 1122-1128.
- Riera-Lizarazu, O., H. W. Rines und R. L Phillips, 1996: Cytological and molecular characterization of oat × maize partial hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **93**, 123-135.
- Rieseberg, L. H. und S. E. Carney, 1998: Tansley Review No. 102, Plant hybridization. *New Phytol.* **140**, 599-624.
- Rieseberg, L. H., B. Sinervo, C. R. Linder, M. C. Ungerer und D. M. Arias 1996: Role of gene interactions in hybrid speciation: Evidence from ancient and experimental hybrids. *Science* **272**, 741-745.
- Riley, R. und V. Chapman, 1958: Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature* **182**, 713-715.
- Sadasivaiah, R. S., B. R. Orshinsky und G. C. Kozub, 1999: Production of wheat haploids using anther culture and wheat × maize hybridization techniques. *Cereal Res. Commun.* **27**, 33-40.
- Sánchez-Morán, E., E. Benavente, E., J. Orellana, 1999: Simultaneous identification of A, B, D and R genomes by genomic *in situ* hybridization in wheat-rye derivatives. *Heredity* **83**, 249-252.
- Schubert, I., F. Shi, J. Fuchs und T. R. Endo, 1998: An efficient screening for terminal deletions and translocations of barley chromosomes added to common wheat. *Plant J.* **14**, 489-495.

- Schwarzacher, T., 1997: Three stages of meiotic homologous chromosome pairing in wheat: cognition, alignment and synapsis. *Sex. Plant Rep.* **10**, 324-331.
- Schwarzacher, T. und P. Heslop-Harrison, 2000: Practical *in situ* Hybridization. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford.
- Schwarzacher, T., 1999: Meiosis. In: M. Cresti, G. Cai, A. Moscatelli (Hrsg.): Fertilization in higher Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 53-67.
- Schwarzacher, T., A. R. Leitch, M. D. Bennett und J. S. Heslop-Harrison, 1989: In-situ localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann. Bot. (London)* **64**, 315-324.
- Schwarzacher, T., K. Anamthawat-Jónsson, G. E. Harrison, A. K. M. R. Islam, J. Z. Lia, I. P. King, A. R. Leitch, T. E. Miller, S. M. Reader, W. J. Rogers, M. Shi und J. S. Heslop-Harrison, J. S., 1992: Genomic in situ hybridization to identify alien chromosome segments in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **84**, 778-786.
- Scott, R. J., M. Spielman, J. Bailey und H. G. Dickinson, 1998: Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**, 3329-3341.
- Sears, E. R. und M. Okamoto, 1958: Intergenomic chromosome relationships in hexaploid wheat. *Proc. 10th Int. Congr. Genet.* **2**, 258-259.
- Sears, E. R., 1976: Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Ann. Rev. Genet.* **10**, 31-51.
- Sears, E. R., 1956: The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat. *Brookhaven Symp. Biol.* **9**, 1-22.
- Sears, E. R., 1977: An induced mutant with homoeologous pairing in wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* **19**, 585-593.
- Seberg, O. und G. Petersen, 1998: A critical review of concepts and methods used in classical genome analysis. *Bot. Rev.* **64**, 373-415.
- Sharma, A. K. und A. Sharma, 1999: Plant chromosomes – analysis, manipulation and engineering. Harwood academic publishers. Kapitel IV.1, 278-290.
- Sharma, H. C., H. Ohm, L. Goulart, R. Lister, R. Appels und O. Benkhabib, 1995: Introgression and characterization of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* into wheat. *Genome* **38**, 406-413.
- Sharma, H. C., O. Benlhabib und H. W. Ohm, 1999: Anther culture and chromosome reduction in wheat × *Thinopyrum* wide crosses. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **57**, 215-218.
- Sherman, J. D., L. Y. Smith, T. K. Blake und L. E. Talbert, 2001: Identification of barley genome segments introgressed into wheat using PCR markers. *Genome* **44**, 38-44.
- Shi, F. und T. R. Endo, 1999: Genetic induction of structural changes in barley chromosomes added to common wheat by a gametocidal chromosome derived from *Aegilops cylindrica*. *Genes Genet. Syst.* **74**, 49-54.
- Song, K. M., P. Lu, K. L. Tang und T. C. Osborn, 1995: Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7719-7723.

- Springer, W. D., R. C. Buckner, 1982: A meiotic examination of *Lolium multiflorum* Lam. × *Festuca arundinacea* Schreb. F₁ hybrids. *Crop Sci.* **22**, 305-309.
- Stebbins, G. L., 1956: Taxonomy and the evolution of genera, with special reference to the family Gramineae. *Evolution* **10**, 235-245.
- Stebbins, G. L., 1957: The hybrid origin of microspecies in the *Elymus glaucus* complex. *Cytologia Suppl.* **36**, 336-340.
- Suenaga, K. und K. Nakajima, 1989: Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum*) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*). *Plant Cell Reports* **8**, 263-266.
- Suputtitada, S., T. Adachi, P. Pongtongkam, S. Peyachoknagul, S. Apisitwanich und J Thongpradistha, 2000: Breeding barriers in the interspecific cross *Oryza sativa* L. and *Oryza minuta* Presl. *Breeding Science* **50**, 29-35.
- Sybenga, J., 1996: Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids: do segmental allopolyploids exist? *Genome* **39**, 1176-1184.
- Symko, S., 1969: Haploid barley from crosses of *Hordeum bulbosum* × *Hordeum vulgare* (2x). *Can. J. Genet. Cytol.* **11**, 602-608.
- Tadmor, Y., D. Zamir und G. Ladizinsky, 1987: Genetic mapping of an ancient translocation in the genus *Lens*. *Theor. Appl. Genet.* **73**, 883-892.
- Thomas, H. M., W. G. Morgan, M. R. Meredith, M. W. Humphreys, H. Thomas und J. M. Leggett, 1994: Identification of parental and recombined chromosomes in hybrid derivatives of *Lolium multiflorum* × *Festuca pratensis* by genomic in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.* **88**, 909-913.
- Thomas, H., 1993: Chromosome manipulation and polyploidy. In: M. D. Hayward, N. O. Bosemark, I. Romagosa (Hrsg.): *Plant breeding – principles and prospects*. Chapman and Hall, 79-92.
- Thomas, H., W. G. Morgan, A. M. Thomas und H. J. Ougham, 1999: Expression of the stay-green character introgressed into *Lolium temulentum* Ceres from a senescence mutant of *Festuca pratensis*. *Theor. Appl. Genet.* **99**, 92-99.
- Vazquez, A. M., 2001: Insight into somaclonal variation. *Plant Biosystems* **135**, 57-62.
- Vongs, A., T. Kakutani, R. A. Martienssen und E. J. Richards, 1993: *Arabidopsis thaliana* DNA methylation deficient mutants. *Science* **260**, 1926-1928.
- Watson, L. und M. J. Dallwitz, 1999: *Grass Genera of the world - Classification*. <http://biodiversity.uno.edu/delta/grass/www/class.htm>
- Wehling, P., B. Hackauf und G. Wricke, 1994: Phosphorylation of pollen proteins in relation to self-incompatibility in rye (*Secale cereale* L.). *Sex. Plant Reprod.* **7**, 67-75.
- Wenzel, G. und W. Foroughi-Wehr, 1984: Anther culture of cereals and grasses. In: I. K. Vasil (Hrsg.): *Cell culture and somatic cell genetics*. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Academic Press Inc., New York, 311-327.

- Wilkins, P. W. und D. Thorogood, 1992: Breakdown of self-incompatibility in perennial ryegrass at high temperature and its uses in breeding. *Euphytica* **64**, 65-69.
- Wilkins, P. W., A. J. H. Carr and E. J. Lewis, 1974: Resistance of *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* hybrids to some diseases of their parent species. *Euphytica* **23**, 315-320.
- Wricke, G., 1974: Seed set in rye after selfing under high temperature conditions. *Incomp. Newsletter* **4**, 23-26.
- Xu, S. J. und L. R. Joppa, 2000: First-division restitution in hybrids of Langdon durum disomic substitution lines with rye and *Aegilops squarrosa*. *Plant breeding* **119**, 233-241.
- Yamada, T., W. Marubashi und M. Niwa, 2000: Apoptotic cell death induces temperature-sensitive lethality in hybrid seedlings and calli derived from the cross *Nicotiana suaveolens* × *N. tabacum*. *Planta* **211**, 614-622.
- Yamada, T., W. Marubashi und M. Niwa, 2001: Facile induction of apoptosis into plant cells associated with temperature-sensitive lethality shown on interspecific hybrid from the cross *Nicotiana suaveolens* × *N. tabacum*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 204-213.
- Yan, H., G. Liu, Z. Cheng, S. Min und L. Zhu, 2001: Characterization of euploid backcross progenies derived from interspecific hybrids between *Oryza sativa* and *O. eichingeri* by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and genomic in situ hybridization (GISH). *Genome* **44**, 86-95.
- Zare, A. G., M. W. Humphreys, J. W. Rogers, A. M. Mortimer und H. A. Collin, 2002: Androgenesis in a *Lolium multiflorum* × *Festuca arundinacea* hybrid to generate genotypic variation for drought resistance. *Euphytica* **125**, 1-11.
- Zare, A.-G., M. W. Humphreys, W. J. Rogers und H. A. Collin, 1999: Androgenesis from a *Lolium multiflorum* × *Festuca arundinacea* hybrid to generate extreme variation for freezing tolerance. *Plant Breeding* **118**, 497-501.
- Zenkter, M. und W. Nitzsche, 1984: Wide hybridization experiments in cereals. *Theor. Appl. Genet.* **68**, 311-315.
- Zhang, J., B. Friebe und B. S. Gill, 1995: Detection of maize DNA sequences amplified in wheat. *Genome* **38**, 946-950.
- Zhang, L., R. Pickering und B. Murray, 1999: Direct measurement of recombination frequency in interspecific hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum* using genomic *in situ* hybridization. *Heredity* **83**, 304-309.
- Zhang, Z. Y., Z. Y. Xin, X. Chen, Y. T. Qian, Z. S. Lin, H. J. Xu und Y. Z. Ma, 2000: Molecular cytogenetic characterization of new wheat line YW443 with resistance to barley yellow dwarf virus. *Yi Chuan Bao* **27**, 614-620.
- Zimmermann, J., 1988: Untersuchungen des Einflusses der chromosomalen Stabilität auf Ertrags- und Qualitätsmerkmale in der Generationsfolge von *Festulolium*-Bastardfuttergräsern. Dissertation AdL der DDR, Paulinenaue.

- Zwierzykowsky, Z., A. J. Lukaszewski, A. Lesniewska und B. Naganowska, 1998a: Genomic structure of androgenic progeny of pentaploid hybrids, *Festuca arundinacea* × *Lolium multiflorum*. *Plant Breeding* **117**, 457-462.
- Zwierzykowsky, Z., A. J. Lukaszewski, B. Naganowska und A. Lesniewska, 1999a: The pattern of homoeologous recombination in triploid hybrids of *Lolium multiflorum* with *Festuca pratensis*. *Genome* **42**, 720-726.
- Zwierzykowsky, Z., E. Zwierzykowska, A. Slusarkiewicz-Jarzina und A. Ponitka, 1999b: Regeneration of anther-derived plants from pentaploid hybrids of *Festuca arundinacea* × *Lolium multiflorum*. *Euphytica* **105**, 191-195.
- Zwierzykowsky, Z., R. Tayyar, M. Brunell und A. J. Lukaszewski, 1998b: Genome Recombination in intergeneric hybrids between tetraploid *Festuca pratensis* and *Lolium multiflorum*. *Heredity* **89**, 324-328.
- Zwierzykowsky, Z., W. Joks und B. Naganowska, 1993: Amphitetraploid hybrids *Festuca pratensis* Huds. × *Lolium multiflorum* Lam. [= × *Festulolium braunii* (K. Richter) A. Camus]. *Bull. IHAR* **188**, 61-69.

7 Anhang

7.1 Daten anderer Autoren die untersuchten Hybridpflanzen und Kombinationen betreffend

7.1.1 F₁-Hybriden

In Tab. 23 sind Kreuzungen aufgeführt, die bereits von anderen Wissenschaftlern bei Futtergräsern zwischen Arten mit weitgehend inhomologen Genomen durchgeführt worden waren, sofern es für diese Arbeit relevant ist.

Tabelle 23: Embryofrequenz und erzeugte Hybriden bei Kreuzungen von Arten mit inhomologen Genomen

Samenelter (Ploidie) × Pollenelter (Ploidie)	Anzahl Samen- eltern	Anzahl Blütchen	Embryo- frequenz		Anzahl Hybriden ¹
			n	[%]	
° <i>F. arundinacea</i> (6x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	31	8556	94	1,10	(5) 3
* <i>F. pratensis</i> (2x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	k. A.	731	14	1,92	(1) 1
* <i>F. pratensis</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	k. A.	2292	45	1,96	(3) 2
* <i>L. multiflorum</i> (2x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	6	523	1	0,19	(0) 0
* <i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	ca. 50	4489	80	1,78	(5) 2
* <i>L. perenne</i> (2x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	5	427	5	1,17	(0) 0
* <i>L. perenne</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x)	ca. 9	752	7	0,93	(0) 0
* <i>F. rubra</i> (8x) × <i>L. perenne</i> (2x)	3	344	0	0	-
* <i>F. rubra</i> (8x) × <i>L. perenne</i> (4x)	3	345	6	1,74	2
* <i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>F. rubra</i> (6x)	2	168	13	7,74	4
* <i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>F. rubra</i> (8x)	3	301	30	9,97	14
* <i>L. perenne</i> (2x) × <i>F. rubra</i> (8x)	2	223	0	0	-
* <i>L. perenne</i> (4x) × <i>F. rubra</i> (8x)	2	257	0	0	-

° MATZK (1981)

* OERTEL (1997 und unveröffentlicht), nur Kreuzungen mit Phytohormonbehandlung und Embryokultur

¹ Die Zahl in Klammern gibt alle erzeugten Pflanzen an (ab 1-Blatt-Stadium), die möglicherweise Hybriden waren. Die Zahl hinter der Klammer bezieht sich auf Pflanzen, die das Pikieren in Erde überlebten und deren Hybridcharakter eindeutig festgestellt wurde. Lebensfähige Pflanzen, die keinen Hybridcharakter aufwiesen (z. B. durch Kontamination mit arteigenem Pollen entstanden), sind in keine der beiden Angaben mit einbezogen.

Die F₁-Pflanze 14 der Kombination *F. arundinacea* (6x) × *D. glomerata* (4x) hatte erwartungsgemäß 35 Chromosomen (MATZK 1981, s. Tab. 24 und Abb. 17). Sie war hoch vital und bildete viele Blütenstände, war aber völlig steril (s. Tab. 25). F₁-Pflanze 20 der Kombination *F. arundinacea* × *D. glomerata* erzeugte nur 2 Blütenstände, die auch nur je ein steriles Blütchen hatten (MATZK 1981).

Bei Verwendung von F₁-Pflanze 6 aus der Kreuzung von autotetraploidem *L. multiflorum* mit *D. glomerata* als Samenerter gelang die Erzeugung von 2 BC₁-Hybriden (OERTEL 1997), von denen sich eine als vital erwies und mit der BC₂-Pflanzen erzeugt werden konnten (s. 3.1.5). Die zu dieser Kombination gehörenden F₁-Pflanzen 16, 17 und 18 abortierten im 3-Blatt-Stadium (s. Tab. 25; OERTEL 1997).

Die F₁-Pflanzen 9 und 10 der Kombination *F. pratensis* (4x) × *D. glomerata* (4x) wuchsen seit 3 Jahren trotz Vernalisation ausschließlich vegetativ.

Tabelle 24: Abstammung, Phänotyp und Genomzusammensetzung der Hybriden aus intergenerischen Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologem Genom

Kombination und Pflanze	Samenerter	Bestäuber	Phänotyp	Chrom.zahl bzw. Genomzus.setzg. ¹
<i>L. multiflorum</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x)				
F ₁ -Pflanze 5 *	'Malmi'	mehrere Sorten und Ökotypen	intermediär	14 Lm + 14 Dg *
F ₁ -Pflanze 6 *	'Malmi'	mehrere Sorten und Ökotypen	intermediär	14 Lm + 14 Dg *
<i>F. pratensis</i> (2x) × <i>D. glomerata</i> (4x)				
F ₁ -Pflanze 7 *	'Cosmos 11' *	'Reda', 'Lidaglo' und 'Lidacta' *	intermediär; ähnlicher <i>D. g.</i>	7 Fp + 14 Dg *
<i>F. pratensis</i> (4x) × <i>D. glomerata</i> (4x)				
F ₁ -Pflanze 9 *	Zuchtstamm Steinach *	'Reda', 'Lidaglo' und 'Lidacta' *	intermediär	13 Fp + 14 Dg *
F ₁ -Pflanze 10 *	Zuchtstamm Steinach *	'Reda', 'Lidaglo' und 'Lidacta' *	intermediär	14 Fp + 14 Dg *
<i>F. arundinacea</i> (6x) × <i>D. glomerata</i> (4x)				
F ₁ -Pflanze 14 °	mehrere Sorten und Ökotypen °	mehrere Sorten und Ökotypen °	intermediär °	35 Chromosomen °

¹ Chromosomenzahl bzw. Genomzusammensetzung: 2n-Chromosomenzahl bzw. Anzahl der Chromosomen von den jeweiligen Elternarten: Lm = *L. multiflorum*, Dg = *D. glomerata*, Fp = *F. pratensis*, Fa = *F. arundinacea*

* Pflanzen erzeugt von OERTEL (1997 und unveröffentlicht)

° Pflanze erzeugt von MATZK (1981)

Tabelle 25: Vitalität und Fertilität von Hybriden aus intergenerischen Kreuzungen zwischen Eltern mit inhomologem Genomen

Kombination und Pflanze	Vitalität ¹	Blütenstände ²	weibliche Fertilität ³	männliche Fertilität ⁴	
				Antheren	Pollen
<u>L. multiflorum (4x) × D. glomerata (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 5 *	++	++	keine NKN	indehiszent	+; 0 % KES
F ₁ -Pflanze 6 *	++	++	NKN erhalten	indehiszent	++; 1,6 % KES *; 0 - 1 % KES
F ₁ -Pflanze 16-18 *	O	O	–	–	–
<u>F. pratensis (2x) × D. glomerata (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 7 *	++	+++	Fruchtknoten früh abortiert	früh abortiert	–
<u>F. pratensis (4x) × D. glomerata (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 9 *	+	O	–	–	–
F ₁ -Pflanze 10 *	+	O	–	–	–
F ₁ -Pflanze 19 *	O	O	–	–	–
<u>F. arundinacea (6x) × D. glomerata (4x)</u>					
F ₁ -Pflanze 14 °	++ °	+++ °	keine NKN	indehiszent	++; 0 % KES
F ₁ -Pflanze 20 °	O °	+ °	steril °	indehiszent	O °
F ₁ -Pflanze 21 °	O °	O °	–	–	–
<u>L. multiflorum (4x)</u>					
Pflanzen	++	+++	NKN erhalten	dehiszent	+++; 90 % KES; NKN erhalten

* Pflanzen erzeugt von OERTEL (1997 und unveröffentlicht)

° Pflanze erzeugt von MATZK (1981)

¹ - ⁴ s. Legende zu Tab. 5

7.1.2 Rückkreuzungsgeneration BC₁ und BC₂ von *L. multiflorum* - *D. glomerata* - Hybriden

BC₁-Pflanze 1 der Kombination *L. multiflorum* × *D. glomerata*

Die Daten sind aus OERTEL (1997). Die BC₁-Pflanze 1 stammt aus einer Kreuzung der F₁-Pflanze 6 als Samenelter mit *L. multiflorum* (4x) 'Malmi' als Pollenelter. Es wurden 21 Chromosomen von *L. multiflorum* und 7 von *D. glomerata* detektiert.

BC₂-Pflanzen 1 bis 3 der Kombination *L. multiflorum* × *D. glomerata*

Die BC₂-Pflanzen 1 und 2 wurden nach Rückkreuzung der BC₁-Pflanze 1 mit der Sorte 'Malmi' der Art *L. multiflorum* (4x) erhalten. BC₂-Pflanze 3 ging aus Rückkreuzung der BC₁-Pflanze 1 mit *L. multiflorum* (2x) 'Turilo' hervor (OERTEL unveröffentlichte Daten).

Bei den BC₂-Pflanzen 1 und 2 wurden zunächst 7 Chromosomen von *D. glomerata* detektiert, bei BC₂-Pflanze 3 ein oder zwei. (OERTEL unveröffentlichte Daten, OTTO et al. 2001, s. 3.1.6.2 Tab. 11).

7.2 Pufferlösungen und Medien

7.2.1 Kruse-Medium, modifiziert

Stammlösung-Salze (10fache Endkonzentration)

Substanz	Konzentration in mg/l
KCl	133
KNO ₃	175
KH ₂ PO ₄	50
NH ₄ NO ₃	50
(NH ₄) ₂ SO ₄	75
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	180
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	100
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	28
MgSO ₄ x 7H ₂ O	227
Fe(III)-EDTA	37

Weitere Salze (1000fache Endkonzentration)

(einzeln gelöst , da sie sonst ausflocken)

Substanz	Konzentration in mg/l
MnCl ₂ x 4H ₂ O	240
H ₃ BO ₃	149
CuSO ₄ x 5H ₂ O	75
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	550
(NH ₄)MoO ₄	150

Vitamine-Stammlösung (100fache Endkonzentration)

(Separat anzusetzen und einzufrieren, da bei mehrmaligem Autoklavieren ein Verlust an Vitaminen eintritt)

Substanz	Konzentration in mg/l
Thiamin x HCl	8.000
Riboflavin	5.000
Pyridoxin x HCl	4.300
Biotin	3.500
Nicotinsäure	3.500
Ascorbinsäure	35.000
Ca-Panthenat	5.500
Adenin	20.000
myo-Inosit	50.000

Anhang

Weitere Zusätze

Substanz	Konzentration in mg/l
Saccharose	30.000
IES	2,5
Kinetin	2,5
Agar	9.000

Kinetin-Stammlösung

25 mg Kinetin auf 10ml H₂O

Kinetin mit kleiner Menge 1 n HCl lösen

IES (Indolyl-Essigsäure)-Stammlösung

10 mg auf 100 ml

10 mg Indolyllessigsäure mit kleiner Menge 1 n NaOH lösen
mit A. dest. auf 100 ml auffüllen

Präparation (1I):

Substanz	Menge (Volumen)
Stammlösung-Salze	100 ml
Weitere-Salze-Stammlösung	je 1 ml
Vitamine-Stammlösung	10 ml
Kinetin-Stammlösung	1 ml
IES (Indolyl-Essigsäure)-Stammlösung	25 ml

und 30 g Saccharose, in A. dest. lösen,
pH-Wert auf 5,8 einstellen, mit A. dest. auf 800 ml auffüllen, dann
9 g Agar, der in 200 ml A. dest. gelöst wurde, hinzugeben,
in Röhrrchen abfüllen und autoklavieren

Endvolumen 1l

7.2.2 Induktionsmedium

in Anlehnung an POSSELT und RAPP (1997) und POSSELT (persönliche Mitteilung)

Makronährstoffe (Endkonzentration)

Substanz	Konzentration in mg/l
KNO ₃	1000
KH ₂ PO ₄	200
MgSO ₄ x 7H ₂ O	125
(NH ₄) ₂ SO ₄	100
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	100
KCl	35

Anhang

Substanz	Konzentration in g/l
Kartoffelpüree (Pfanni)	10
Gelrite	3
Maltose	90

Mikronährstoffe-Stammlösung (10.000fache Endkonzentration)

Substanz	Konzentration in mg/l
MnSO ₄ x H ₂ O	0,606
KJ	0,050
ZnSO ₄ x H ₂ O	0,187
H ₃ BO ₃	0,300
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,3

(zuerst mit NaOH bei pH = 8,0 lösen)

Vitamine-Stammlösung (10.000fache Endkonzentration)

Substanz	Konzentration in mg/l
myo-Inosit	100
Thiamin x HCl	1,0
Pyridoxin x HCl	0,5
Nicotinsäure	0,5

Aminosäuren-Stammlösung (1000fache Endkonzentration)

Substanz	Konzentration in mg/l
Glutamin	200
Glycin	2

Phytohormone-Stammlösung (10.000fache Endkonzentration)

Substanz	Konzentration in mg/l
2,4-D	1,5
(mit kleiner Menge Ethanol lösen)	
Kinetin	0,5
(mit kleiner Menge 1 n HCl lösen)	

Zur Erstellung der konzentrierten Stammlösungen wird zuerst noch eine um den Faktor 1000 (Mikronährstoffe, Vitamine und Phytohormone) bzw. 100 (Aminosäuren) höher konzentrierte Stammlösung (Menge 100 ml) erstellt, um Wägefehler klein zu halten.

Präparation (1I)

pH-Wert der Lösungen A und B nach dem Lösen der Substanzen auf 5,8 einstellen.

Präparation Lösung A (600 ml):

Makronährstoffe, Kartoffelpüree und Gelrite mit A. dest. auf 600 ml auffüllen, 20 min autoklavieren

Präparation Lösung B (400 ml):

Substanz	Menge (Volumen)
Mikronährstoffe-Stammlösung	0,1 ml
Vitamine-Stammlösung	0,1 ml
Aminosäuren-Stammlösung	1,0 ml
Phytohormone-Stammlösung	0,1 ml

und 90 g Maltose, in A. dest. lösen,

Lösung B mit A. dest. auf 400 ml auffüllen und unter einer Laminarbox sterilfiltrieren

Anmerkung: Die Sterilfiltration ist wegen der Maltose erforderlich.

Die autoklavierte Lösung A und die sterilfiltrierte Lösung B werden unter sterilen Bedingungen (Laminarbox) zusammengegeben.

Endvolumen 1l

7.2.3 Regenerationsmedium

in Anlehnung an POSSELT und RAPP (1997) und POSSELT (persönliche Mitteilung)

Makronährstoffe (Endkonzentration)

Substanz	Konzentration in mg/l
KNO ₃	1000
NH ₄ NO ₃	1000
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	500
KH ₂ PO ₄	300
MgSO ₄ x 7H ₂ O	71,5
KCl	65

Substanz	Konzentration in g/l
Saccharose	20
Gelrite	3
Aktivkohle	1

Anhang

Mikronährstoffe-Stammlösung (10.000fache Endkonzentration)

Substanz	Konzentration in mg/l
MnSO ₄ x H ₂ O	8,17
KJ	1,25
ZnSO ₄ x H ₂ O	2,81
H ₃ BO ₃	2,67
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,3

(zuerst mit NaOH bei pH = 8,0 lösen)

Vitamine-Stammlösung (10.000fache Endkonzentration)

(Separat anzusetzen und einzufrieren, da bei mehrmaligem Autoklavieren ein Verlust an Vitaminen eintritt)

Substanz	Konzentration in mg/l
myo-Inosit	166,67
Thiamin x HCl	1,67
Pyridoxin x HCl	8,33
Nicotinsäure	8,33

Glycin-Stammlösung (10.000fache Endkonzentration)

Substanz	Konzentration in mg/l
Glycin	2

Phytohormone-Stammlösung (10.000fache Endkonzentration)

Substanz	Konzentration in mg/l
IES (=IAA)	0,5
NAA	0,2

Zur Erstellung der konzentrierten Stammlösungen (Mikronährstoffe, Vitamine, Glycin und Phytohormone) wird zuerst noch eine um den Faktor 1000 höher konzentrierte Stammlösung (Menge 100 ml) erstellt, um Wägefehler klein zu halten.

Präparation (1I)

Die Makronährstoffe, die Saccharose und das Gelrite werden zusammen in Lösung gebracht, die Aktivkohle und folgendes wird noch hinzugefügt:

Substanz	Menge (Volumen)
Mikronährstoffe-Stammlösung	0,1 ml
Vitamine-Stammlösung	0,1 ml
Glycin-Stammlösung	0,1 ml
Phytohormone-Stammlösung	0,1 ml

pH-Wert nach dem Lösen der Substanzen auf 5,9 einstellen, mit A. dest. auf 1 l auffüllen, sorgfältig mischen, in Röhrchen abfüllen und autoklavieren

Endvolumen 1l

7.2.4 DAPI - Puffer für die Durchflusscytometrie

DAPI-Stammlösung: 1 mg DAPI in 10 ml H₂O

Ansatz für 1 l:

1,07 g MgCl x 6H₂O

5,00 g NaCl

12,11 g Tris

10,00 ml DAPI-Stammlösung (= 1 mg DAPI) entspricht 1 mg/l Endkonzentration

1 ml „Triton X-100“ (= 0,939 g)

1 Tropfen Tween zugeben und mit konzentrierter HCl auf pH-Wert = 7 einstellen

Puffer zum Schluß filtrieren

7.2.5 SSC-Stammlösung 20x (20fache Endkonzentration)

3M NaCl

0,3M Na₃C₆H₅O₇·2H₂O (Trinatriumcitrat)

ph=7,0

7.3 Taxonomie relevanter Arten der Poaceae

System nach CLAYTON und RENVOIZE (1986) sowie WATSON und DALLWITZ (1999)

Unterfamilie Pooideae

Tribus Aveneae

Arrhenatherum elatius (L.) P. BEAUV. ex. J. & C. PRESL

Avena sativa L.

Holcus lanatus L.

Phleum pratense L.

Tribus Poeae

Cynosurus cristatus L.

Dactylis glomerata L.

Festuca arundinacea SCHREB.

Festuca pratensis HUDS.

Festulolium braunii [K. Richt.] A. CAMUS

Lolium × *boucheanum* KUNTH.

Lolium multiflorum LAM.

Lolium perenne L.

Tribus Triticeae

Aegilops spec. L.

Hordeum bulbosum L.

Hordeum vulgare L.

Secale cereale L.

Thinopyrum junceiforme (Löve & Löve) Löve

Triticum aestivum L.

Triticum turgidum L.

Unterfamilie Panicoideae

Tribus Andropogoneae

Tripsacum dactyloides L.

Zea mays L.

Tribus Paniceae

Pennisetum americanum (L.) Leeke

8 Förderhinweis

Die experimentellen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen eines Forschungsprojektes im Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben erarbeitet (Projektleiter Dr. F. Matzk).

Das Forschungsvorhaben (AiF-Nr. 11518 BR) wurde aus Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft (BMWi) über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e. V. (AiF) gefördert.

Die Abwicklung des Forschungsprojektes erfolgte über die Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e. V. (GFP).

Danksagungen

Herrn Professor Dr. W. E. Weber für die Bereitschaft zur Übernahme der universitären Betreuung und zur Erstellung des Gutachtens

Herrn Professor Dr. Graner und Herrn Professor Dr. Becker für ihre Bereitschaft, als Gutachter zur Verfügung zu stehen

Herrn Dr. Carsten Oertel für die Überlassung von Pflanzenmaterial und die wertvollen Tips zu Beginn meiner Arbeit

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Sabine Gubatz für ihre Korrektur der Arbeit, ihre hohe Diskussionsbereitschaft und ihre kritischen und aufmunternden Kommentare.

Für die immer ausgezeichnete technische Assistenz Frau Sylvane Stegmann

Frau Pia Altenhofer für ihre große Geduld mich in viele Dinge wie der Genomischen *in situ* Hybridisierung einzuführen und mir somit den Beginn meiner Arbeit wesentlich zu erleichtern, Frau Dr. Ludmilla Malysheva für die interessanten und lehrreichen Diskussionen sowie ihre große Hilfsbereitschaft und Kollegialität sowie Frau Tina Siefken für ihre Bereitschaft, Teile der Arbeit zu lesen

Herrn Dr. Armin Meister für seine Unterstützung bei der Durchführung der durchflusscytometrischen Messungen und seine Hilfe bei der Statistik, insbesondere für die Erstellung des Programms zur Berechnung der Konfidenzintervalle bei einer Poissonverteilung

Frau Heidi Block für ihre Hilfe bei cytologischen Arbeiten und allen anderen nicht namentlich genannten momentanen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Embryogenese / Parthenogenese für die Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima

Herrn Professor Dr. I. Schubert und allen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe Karyotypevolution für die hohe Gastfreundschaft und Kollegialität, den Mitarbeitern des Fotolabors und des zeichnerischen Dienstes für deren Zusammenarbeit

Mein herzlicher Dank gilt auch den für die Gewächshäuser Genetik zuständigen Mitgliedern der AG Versuchsfeld und Gärtnerei für die sorgfältige Pflege der Pflanzen und die große Kooperationsbereitschaft

Allen Institutionen, die die Forschungsarbeiten gefördert haben

Den Menschen, die mir nahe stehen, für ihr Verständnis für meinen oft zeitlich bedingten geringen sozialen Kontakt

Erklärungen

Hiermit erkläre ich, dass mit dieser wissenschaftlichen Arbeit noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen wurden.

Ich habe diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt. Verwendete Hilfsmittel und Quellen sind an den entsprechenden Stellen kenntlich gemacht.

Des Weiteren erkläre ich, dass keine Straftaten gegen mich anhängig sind.

Gatersleben, den 10.05.2003

Lars-Gernot Otto

Lebenslauf

Daten zur Person:

Name: Lars-Gernot Otto
Straße: Amselweg 6
Wohnort: 06466 Gatersleben
Geburtsdatum: 10.12.1970
Geburtsort: Stuttgart
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsgang:

1977 - 1981: Besuch der Grundschule in Lauenburg/Elbe
1981 - 1990: Besuch des Otto-Hahn-Gymnasiums in Geesthacht. Im Mai 1990 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife
07/1990 - 06/1991: Ableistung des Wehrdienstes in Wentorf bei Hamburg
10/1991 - 02/1997: Biologiestudium an der Universität Kaiserslautern. Im Februar 1997 Abschluß des Studiums in der Abteilung Systematische Botanik mit Erlangen des akademischen Grades Diplom-Biologe.
03/1997 - 07/1997: Durchführung von vegetationskundlichen Untersuchungen für das Ingenieurbüro ASAL in Kaiserslautern
06/1997 - 07/1997: Mitarbeit an einem Projekt zur Beobachtung von Rabenkrähen an der Universität Kaiserslautern
01.03.1998 - 31.08.2001: wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben