

H. Fehrmann

Aus dem Max-Planck-Institut für Kulturpflanzenzüchtung,
(Hamburg-Volksdorf¹⁾)

Die cytologische Identifizierung der genetisch unterschiedlichen
Gruppen von Artbastarden in den späteren Generationen
der Kreuzung *Secale cereale* × *Secale montanum* in ihrer
Bedeutung für die Züchtung eines perennierenden Kulturroggens

Von
R. REIMANN-PHILIPP und HANNA ROHDE

Mit 2 Abbildungen

I. Einleitung

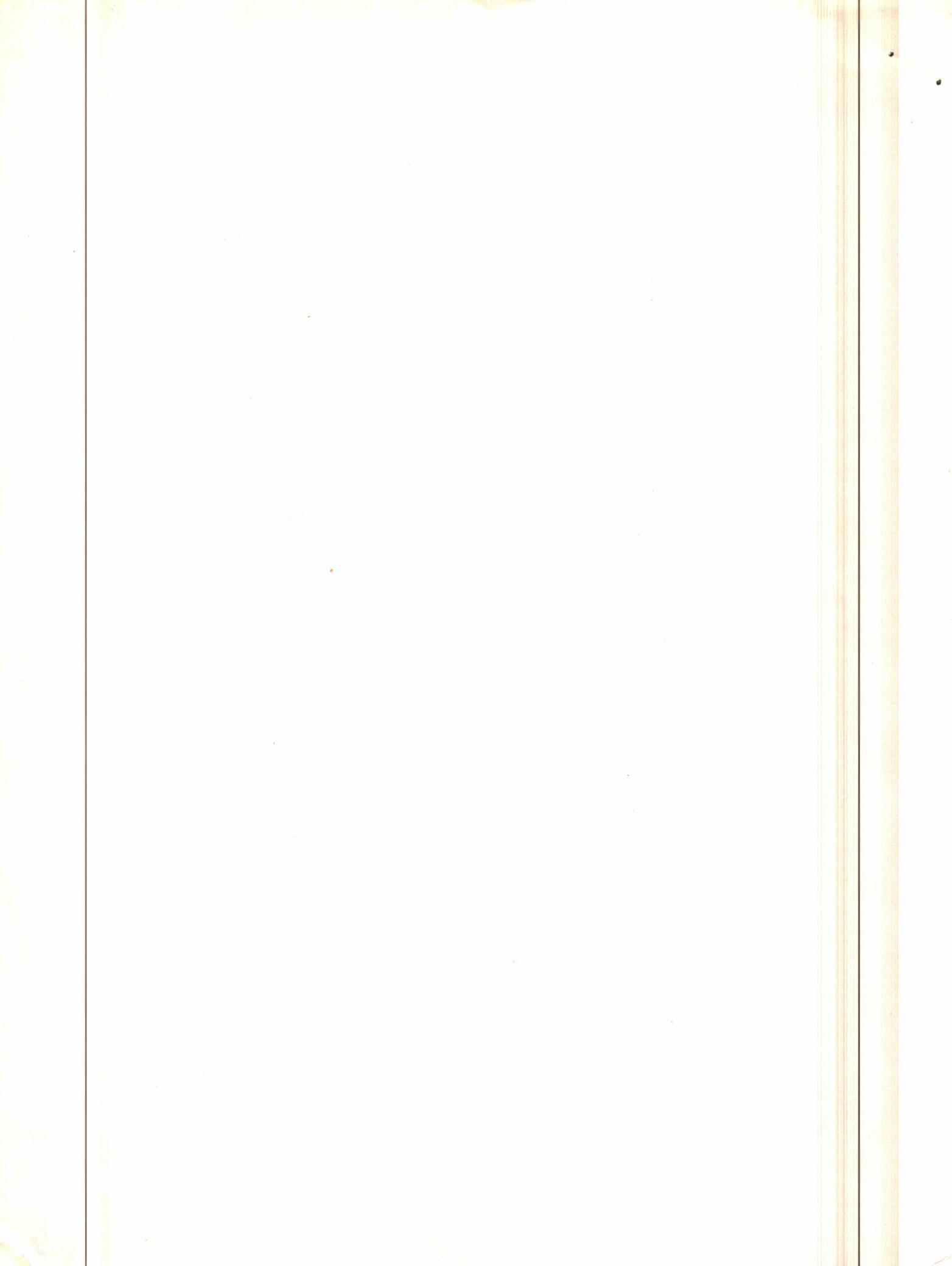
Die aus der Kreuzung von *Secale cereale* und *Secale montanum* entstehenden Artbastarde sind in der F_1 semisteril. Da auf Grund von Translokationen die Chromosomen dreier Paare dieser Arten nur teilweise homolog sind, bilden sie in der Meiose an Stelle dreier Bivalente eine Paarungskonfiguration in Form eines Ringes oder einer Kette aus sechs Gliedern, deren zufallsgemäße Verteilung in der Anaphase in nur 25 % der möglichen Fällen funktionsfähige Gameten hervorbringt. Die Ähren der Bastardpflanzen sind daher zu nur rund 25 % mit Körnern besetzt.

Fertile Individuen entstehen in der F_2 oder den späteren Generationen nur aus solchen Gametenkombinationen, die hinsichtlich der an der Bildung der Paarungskonfiguration in der F_1 beteiligten drei Chromosomenpaare entweder je zweimal die betreffenden drei Chromosomen des *Secale cereale* oder die betreffenden drei Chromosomen des *Secale montanum* enthalten (DIERKS und REIMANN-PHILIPP 1966). Beide Gruppen bilden in der Meiose sieben Bivalente.

Man sollte meinen, daß diese beiden Gruppen von fertilen Artbastarden sich äußerlich leicht unterscheiden lassen, da ihre Genotypen in drei Chromosomenpaaren verschieden sind. Diese Annahme erwies sich aber als falsch; es gelang nicht, die beiden Gruppen mit genügender Sicherheit auf Grund von unterschiedlichen morphologischen Merkmalen zu trennen.

Geht es um die Züchtung eines perennierenden Kulturroggens, wie im vorliegenden Fall, dann sind von der F_2 ab in großer Zahl fertile Individuen auszulesen, die hinsichtlich der drei kritischen Chromosomen dem *Secale cereale*

¹⁾ Herrn Professor Dr. H. KUCKUCK zum 65. Geburtstag gewidmet.



entsprechen. Die mit gleicher Häufigkeit auftretenden, hinsichtlich der drei kritischen Chromosomen dem *Secale montanum* entsprechenden fertilen Genotypen sind zu entfernen; denn aus Bestäubung mit ihrem Pollen würden von neuem semisterile Individuen hervorgehen.

Da der die Eigenschaft des Perennierens vererbende Locus auf einem der drei translozierten Chromosomen des *Secale montanum* liegt, müssen schließlich Genotypen gefunden werden, bei welchen dieser Locus auf Grund von Austauschvorgängen innerhalb der aus sechs Chromosomen gebildeten Paarungskonfigurationen in das Genom des *Secale cereale* gelangte. Diese Genotypen treten zwar mit nur geringer Häufigkeit auf, sind aber leicht zu erfassen, da es sich bei ihnen um diejenigen fertilen und hinsichtlich der kritischen Chromosomen dem *Secale cereale* entsprechenden Individuen handelt, die perennieren.

Die am meisten ins Gewicht fallende Arbeit bei der Züchtung eines perennierenden Kulturroggens besteht also darin, die besagten verschiedenen beiden Gruppen von Artbastarden zu trennen, wobei die Trennung bisher durch Testkreuzungen der hinsichtlich ihres Genotyps zu identifizierenden fertilen und perennierenden Einzelpflanzen mit *Secale cereale* und anschließende Prüfung der Nachkommenschaften erfolgte.

Da dieses Verfahren einen großen Arbeitsaufwand und eine lange Versuchsdauer erfordert, wurde von uns die im folgenden beschriebene cytologische Methode zur Identifizierung der beiden verschiedenen Gruppen von Genotypen entwickelt, die als ein Frühtest wirkt und deren Anwendung daher zu großen Einsparungen an Zeit und Arbeit führt.

II. Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial wurden die gleichen Herkünfte von *Secale cereale* und *Secale montanum* benutzt, die schon 1966 von DIERKS und REIMANN-PHILIPP beschrieben worden waren. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in 6-cm-Töpfen im temperierten Gewächshaus, und zwar im Winter unter Zusatzlicht.

Zur Anreicherung der Wurzelspitzenmitosen wurde etwa 2 Stunden vor der Abnahme der Wurzelspitzen mit 25 °C warmem Wasser gegossen, nachdem die Töpfe einige Tage zuvor möglichst trocken gehalten worden waren. Ferner wurden die entnommenen Wurzelspitzen in einer gesättigten Lösung von α -Bromnaphthalin für die Dauer von 4 bis 5 Stunden im Kühlschrank Temperaturen zwischen 0 und 3 °C ausgesetzt. Auch diese Vorbehandlung dient hauptsächlich der Anreicherung der Wurzelspitzenmitosen.

Die anschließende Fixierung erfolgte in einem Gemisch von 2 Teilen absolutem Alkohol und 1 Teil Eisessig bei Aufbewahrung der Präparate im Kühlschrank.

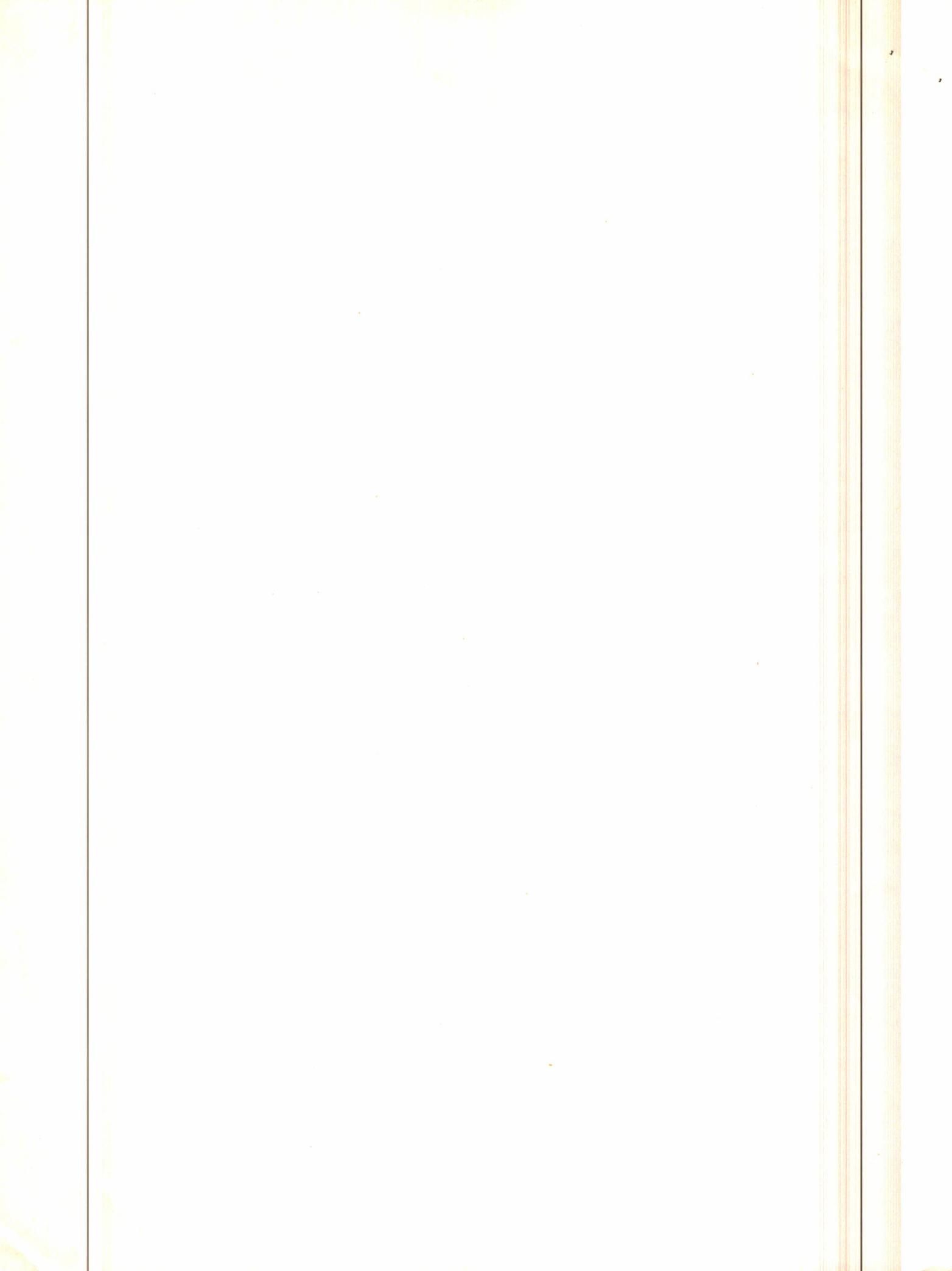
Zur Färbung nach FEULGEN wurden die Wurzelspitzen zunächst in 1 n HCl 10 Minuten lang im Wasserbad von 60 °C hydrolysiert und anschließend in Präparatengläser mit Fuchsin-schweifeliger Säure (Reagenz nach SCHIFF von Merck/Darmstadt) umgefüllt.

Zur Auflösung der Mittellamellen wurden die Wurzelspitzen 5 bis 10 Minuten lang in fünfprozentigen Lösungen von „Pectinol“ oder „Mazerase“ (Carl Roth/Karlsruhe) nachbehandelt und anschließend in Aqua dest. überführt.

Zur Anfertigung der Präparate wurden die Wurzelspitzen in 5%iger Karminessigsäure unter Zusatz von Spuren von Eisen(III)chlorid unter dem Deckglas mit einem Schreibmaschinenradiergummi gequetscht.

Die Herstellung der Dauerpräparate erfolgte mit „Euparal“ (Chromo-Gesellschaft/Stuttgart) nach ZEILINGA und KROON (1965).

Für die Untersuchungen stand ein Zeiss-Mikroskop des Typs „Standard WL“ zur Verfügung.



III. Ergebnisse

Von *Secale cereale* und *Secale montanum* ist zwar seit langem bekannt, daß sich drei ihrer sieben Chromosomen durch Translokationen unterscheiden, doch fanden wir in der Literatur keine Hinweise für das Vorhandensein von Unterschieden in der Morphologie somatischer Chromosomen beider Arten, wie sie möglicherweise als Folge der Translokationereignisse hätten entstanden sein können. In der Hoffnung, daß solche Unterschiede dennoch existieren und bei früheren Analysen lediglich übersehen wurden, führten wir Untersuchungen über die Morphologie der somatischen Chromosomen beider Arten durch, in denen wir für Chromosom Nr. VI eine nicht sehr auffällige, aber einwandfrei feststellbare Verschiedenheit fanden. Bei der Bezeichnung der Chromosomen richteten wir uns nach dem von LIMA-DE-FARIA (1952) für Pachytänchromosomen von *Secale cereale* aufgestellten Idiogramm, wobei es ohne Schwierigkeiten gelang, auf Grund von relativen Schenkellängen, Lage der Centromere und sekundären Einschnürungen die von LIMA-DE-FARIA im Pachytän beschriebenen Chromosomen in Wurzelspitzenmitosen zu identifizieren.

Wie Abbildung 1 zeigt, befindet sich bei *Secale cereale* die sekundäre Einschnürung von Chromosom VI näher am Centromer als bei *Secale montanum*, so daß man die Längenverhältnisse der drei Abschnitte von Chromosom VI bei *Secale cereale* mit „— lang — kurz — lang“, bei *Secale montanum* dagegen mit „— lang — lang — kurz“ angeben kann.

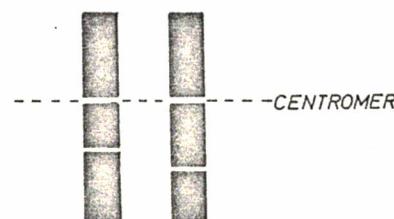


Abb. 1. Schematische Darstellung des Chromosoms Nr. VI im Genom von *S. cereale* (links; Längenverhältnisse der drei Abschnitte „lang-kurz-lang“) und von *S. montanum* (rechts; „lang-lang-kurz“)

Schematic representation of chromosome No. VI in the genome of *S. cereale* (left; length relationships of the three segments "long-short-long") and of *S. montanum* (right; "long-long-short")

beiden Typen von Chromosom Nr. VI mit den verschiedenen Stadien der Fertilität sollten nur ausnahmsweise als Folge von Austauschvorgängen auftreten, da die von semisterilen Bastarden gebildeten Gameten nur dann funktionsfähig sind, wenn sie hinsichtlich der besagten drei kritischen Chromosomen entweder dem einen oder dem anderen Elter entsprechen. Normalerweise werden also in den Nachkommenschaften der F_1 -Bastarde diese drei Chromosomen gewissermaßen „gekoppelt“ vererbt.

Für den Fall, daß Chromosom VI zu den drei Chromosomenpaaren gehört, die sich durch Translokationen unterscheiden und die in der Meiose der Bastarde den bekannten Sechserverband bilden, sollten in fertilen Nachkommen der F_1 -Bastarde entweder zwei Chromosomen Nr. VI von *Secale montanum* oder zwei Chromosomen Nr. VI von *Secale cereale* vorhanden und in Wurzelspitzenmitosen leicht nachweisbar sein. In semisterilen Bastarden dagegen, wie sie in der F_1 auftreten und wie sie auch in den späteren Generationen mit einer Häufigkeit von etwa 50 % vorkommen, sollte sich je ein Chromosom VI von *Secale cereale* und von *Secale montanum* nachweisen lassen. Andere Möglichkeiten der Kombination der

Um
des Sechs
in diesem
von fertili
cytologisc
Analysen
Zu diesen
(‘Petkuse
solcher F_2
maßen de
die Präpa
sehen, die

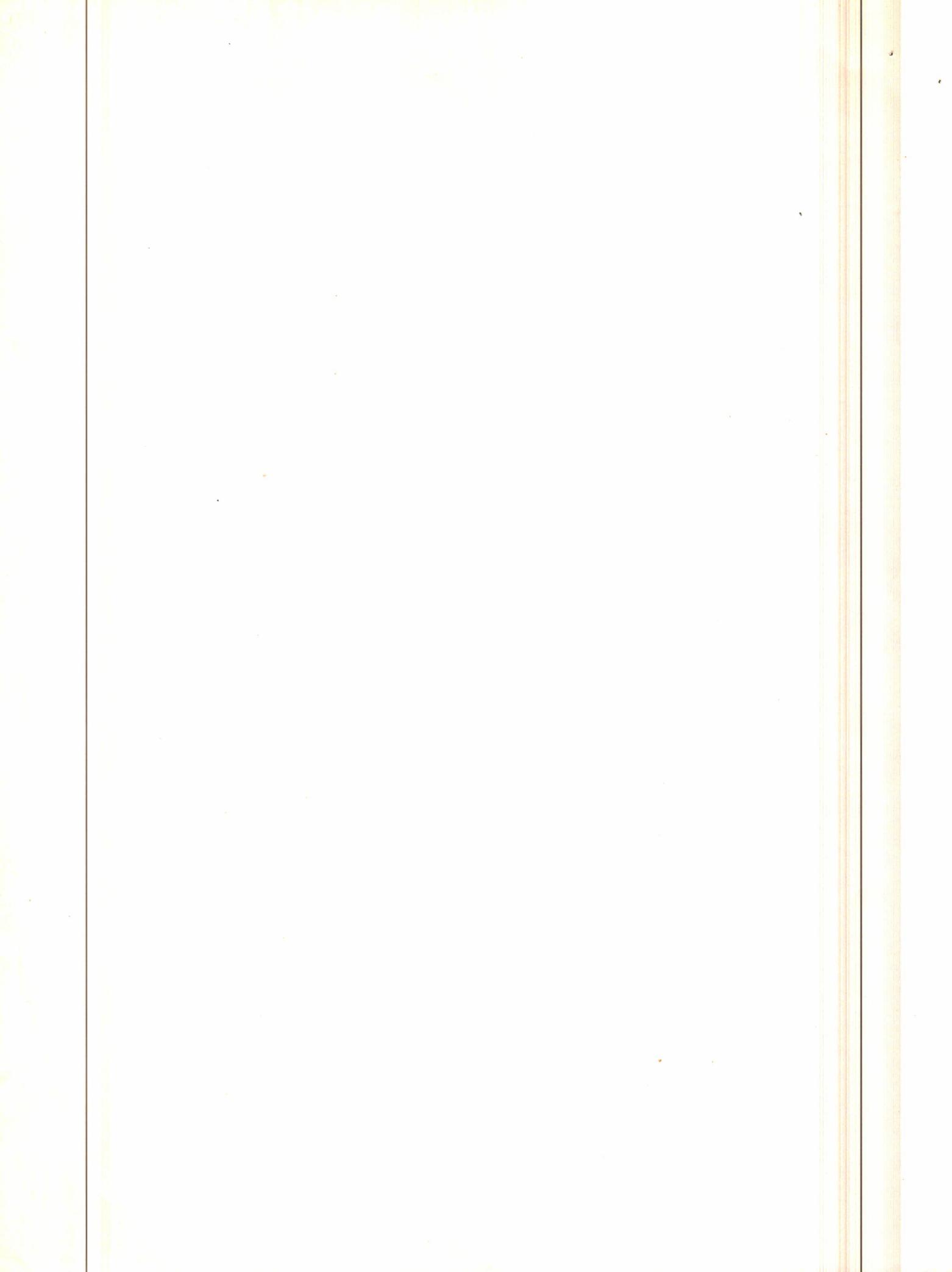
Zwe
Identifizi
standen a
liche Lage
einwandf
quellen v
der Fehlb
Fehlern h
beiden je
der Brauc
klassifizi
cereale mi

Wir
größerer I

Erg
durch Erm

by me

Zahl de
untersu
Zahl de
entnom
ohne Er
eignete
vorhand
richtig i
falsch
identifi
ziert als



Um zu prüfen, ob Chromosom Nr. VI tatsächlich zu den drei an der Bildung des Sechserverbandes in der Meiosis beteiligten Chromosomen gehört und ob sich in diesem Fall die Möglichkeit bietet, die einleitend erwähnten beiden Gruppen von fertilen Individuen in den Nachkommenschaften der F_1 -Artbastarde durch cytologische Wurzel spitzenuntersuchungen auf leichte Weise zu trennen, wurden Analysen an verschlüsseltem Material von bekanntem Genotyp vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden Wurzel spitzen von Individuen des *Secale cereale* ('Petkuser Kurzstroh'), des *Secale montanum* und der F_1 -Bastarde sowie auch solcher F_2 -Pflanzen, die hinsichtlich der drei kritischen Chromosomen erwiesenermaßen dem *Secale montanum* oder dem *Secale cereale* entsprachen, fixiert und die Präparatengläser anschließend von einer dritten Person mit Nummern versehen, die keinen Hinweis auf die Herkunft der Präparate gaben.

Zwei solcher „Blindteste“ wurden durchgeführt. Schwierigkeiten bei der Identifizierung der beiden verschiedenen Typen von Chromosom Nr. VI entstanden anfangs durch ungenügende Beachtung der Tatsache, daß die unterschiedliche Lage der sekundären Einschnürung nur in späteren Stadien der Metaphase einwandfrei erkennbar ist. Bereits im zweiten Blindtest, in welchem die Fehlerquellen vorangegangener Untersuchungen ausgeschaltet wurden, war die Zahl der Fehlbestimmungen mit 4 von 77 = etwa 5 % relativ sehr gering. Bei den vier Fehlern handelt es sich zudem um Fehlbestimmungen hinsichtlich des einen der beiden jeweils vorhandenen Chromosomen Nr. VI, die wir bei der Beurteilung der Brauchbarkeit der Methode als weniger schwerwiegend werten als Fehlklassifizierungen beider Chromosomen, z. B. also Verwechslungen von *Secale cereale* mit *Secale montanum* (Tab. 1).

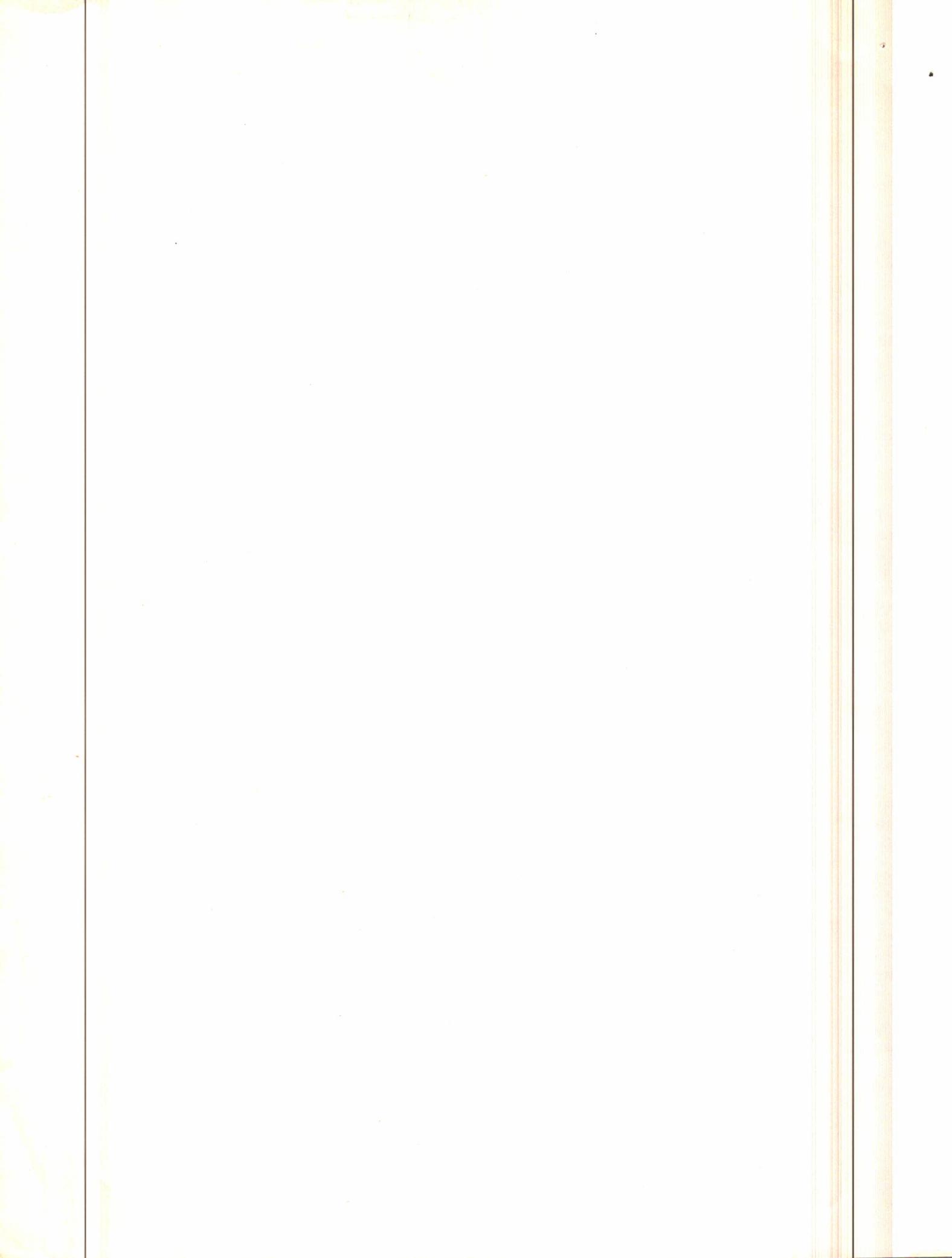
Wir sind der Überzeugung, daß sich die Zahl der Fehlklassifizierungen bei größerer Routine weiter vermindern läßt.

Tabelle 1

Ergebnisse einer Identifizierung von *S. cereale*, *S. montanum* und F_1 -Bastarden durch Ermittlung der Konstitution der beiden Chromosomen Nr. VI in Wurzel spitzen mitosen

Results of identification of *S. cereale*, *S. montanum* and F_1 hybrids
by measuring the constitution of the two Nr. VI chromosomes in root-tip mitoses

	<i>S. cereale</i>	<i>S. montanum</i>	F_1 (<i>S. cereale</i> \times <i>S. montanum</i>)	Summe	% von insgesamt	% der untersuchten Proben
Zahl der untersuchten Pflanzen	10	10	10	30		
Zahl der entnommenen Proben	30	30	30	90		
ohne Ergebnis, weil geeignete Stadien nicht vorhanden	4	4	5	13	14,4	
richtig identifiziert	25	24	24	73	81,1	95
falsch <i>cereale</i> identifiziert als <i>montanum</i>			1	4	4,45	5
identifiziert als F_1	1	2				



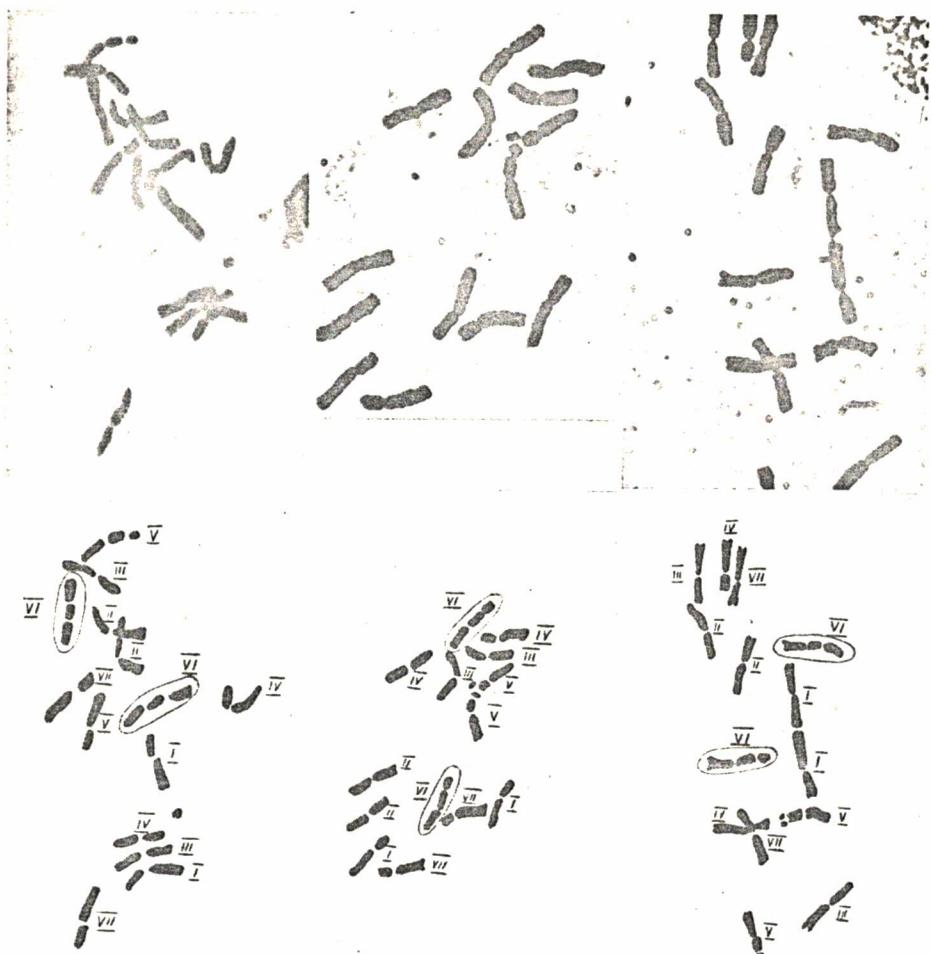


Abb. 2. Chromosom Nr. VI (jeweils umrandet) in Wurzelspitzenmitosen von *S. cereale* (links; zweimal lang-kurz-lang), *S. montanum* (Mitte; zweimal lang-lang-kurz) und der F_1 (*S. cereale* \times *S. montanum*, rechts; je einmal lang-kurz-lang und lang-lang-kurz); oben Photos (etwa 2000 \times), unten Zeichnungen

Chromosome Nr. VI (in each case with a line round it) in root-tip mitoses of *S. cereale* (left; both long-short-long), *S. montanum* (centre; both long-long-short) and the F_1 *S. cereale* \times *S. montanum* (right; one long-short-long and one long-long-short); above, photographs (about 2000 \times), below drawings

IV. Diskussion und Zusammenfassung der Ergebnisse

Für Chromosom Nr. VI (entsprechend der Bezifferung der Chromosomen von LIMA-DE-FARIA 1952) wurde in Wurzelspitzenmitosen festgestellt, daß es sich in den Genomen von *Secale cereale* und *Secale montanum* durch die Lage der sekundären Einschnürung unterscheidet. Ferner wurde nachgewiesen, daß Chromosom Nr. VI zu den drei Chromosomen gehört, die sich in den Genomen der beiden Arten auf Grund von Translokationen unterscheiden und die in den Artbastarden den bekannten Sechserverband bilden, der „Semisterilität“ hervorruft.

Da von den sind, die hinsichtl anderen Elter ent drei Chromosome fertil sind und sie sterl sind und in e perennierenden K Individuen in den nierenden *Secale* m ter Bedeutung, die fertilen Nachkomm sterile Pflanzen en identifizierenden L schaft einer Testkr 100 % aus semister Pflanze hinsichtlich dem *Secale monta* licher Handarbeit zwei Jahren bis zu besonders gut und Generationen nach Fertilität der betr

Die neue cyt großen Zeitersparn hochwertiger cytol Bestimmung der C die Wintermonate Arbeiten zur Züchtung verwendete Verfah zu ersetzen.

Herrn Prof. Dr. und sein Interesse an i

Cytological ident in the later and its imp

Though *Secale* ent karyotypes, due somes, no visible di somatic chromosomes is a small but dete (numbering of the some denotation) w

If chromosome (or "ring of six") w

Da von den semisterilen Pflanzen nur diejenigen Gameten funktionsfähig sind, die hinsichtlich dieser drei Chromosomen entweder dem einen oder dem anderen Elter entsprechen, entstehen aus ihrer Kombination hinsichtlich dieser drei Chromosomen Homozygoten des einen oder des anderen Typs, die beide fertil sind und sieben Bivalente bilden, oder wiederum Heterozygoten, die semisteril sind und in der Meiose den Sechserverband zeigen. Bei der Züchtung eines perennierenden Kulturroggens ist es daher nicht nur erforderlich, die fertilen Individuen in den Nachkommenschaften aus der Artkreuzung mit dem perennierenden *Secale montanum* auszulesen, sondern es ist darüber hinaus von großer Bedeutung, die beiden oben erwähnten, genetisch verschiedenen Gruppen von fertilen Nachkommen zu trennen, da aus Kreuzung zwischen ihnen wieder semisterile Pflanzen entstehen. Um dies zu erreichen, wurden bisher von uns die zu identifizierenden Pflanzen mit *Secale cereale* testgekreuzt. Die Nachkommenschaft einer Testkreuzung bestand dann entweder zu 100 % aus fertilen oder zu 100 % aus semisterilen Individuen, je nachdem, ob die betreffende testgekreuzte Pflanze hinsichtlich der drei kritischen Chromosomen dem *Secale cereale* oder dem *Secale montanum* entsprach. Dieses Verfahren erforderte außer beträchtlicher Handarbeit bei den Kreuzungen auch eine Versuchsdauer von mehr als zwei Jahren bis zum Vorliegen des Ergebnisses, und es ist überhaupt nur mit besonders gut und mehrmals perennierenden Pflanzen, wie sie in den frühen Generationen nach der Kreuzung und insbesondere in der Kombination mit voller Fertilität der betreffenden Pflanze nur relativ selten auftreten, durchführbar.

Die neue cytologische Methode wirkt im Vergleich dazu angesichts der großen Zeitersparnis wie ein Frühtest. Zwar erfordert sie mehr Aufwand an hochwertiger cytologischer Arbeit als beispielsweise eine Serienuntersuchung zur Bestimmung der Chromosomenzahl, doch kann diese Arbeit ohne Zeitverlust in die Wintermonate verlegt werden. Wir beabsichtigen daher, in den eigenen Arbeiten zur Züchtung eines perennierenden Kulturroggens zukünftig das bisher verwendete Verfahren der Testkreuzungen durch die neue cytologische Methode zu ersetzen.

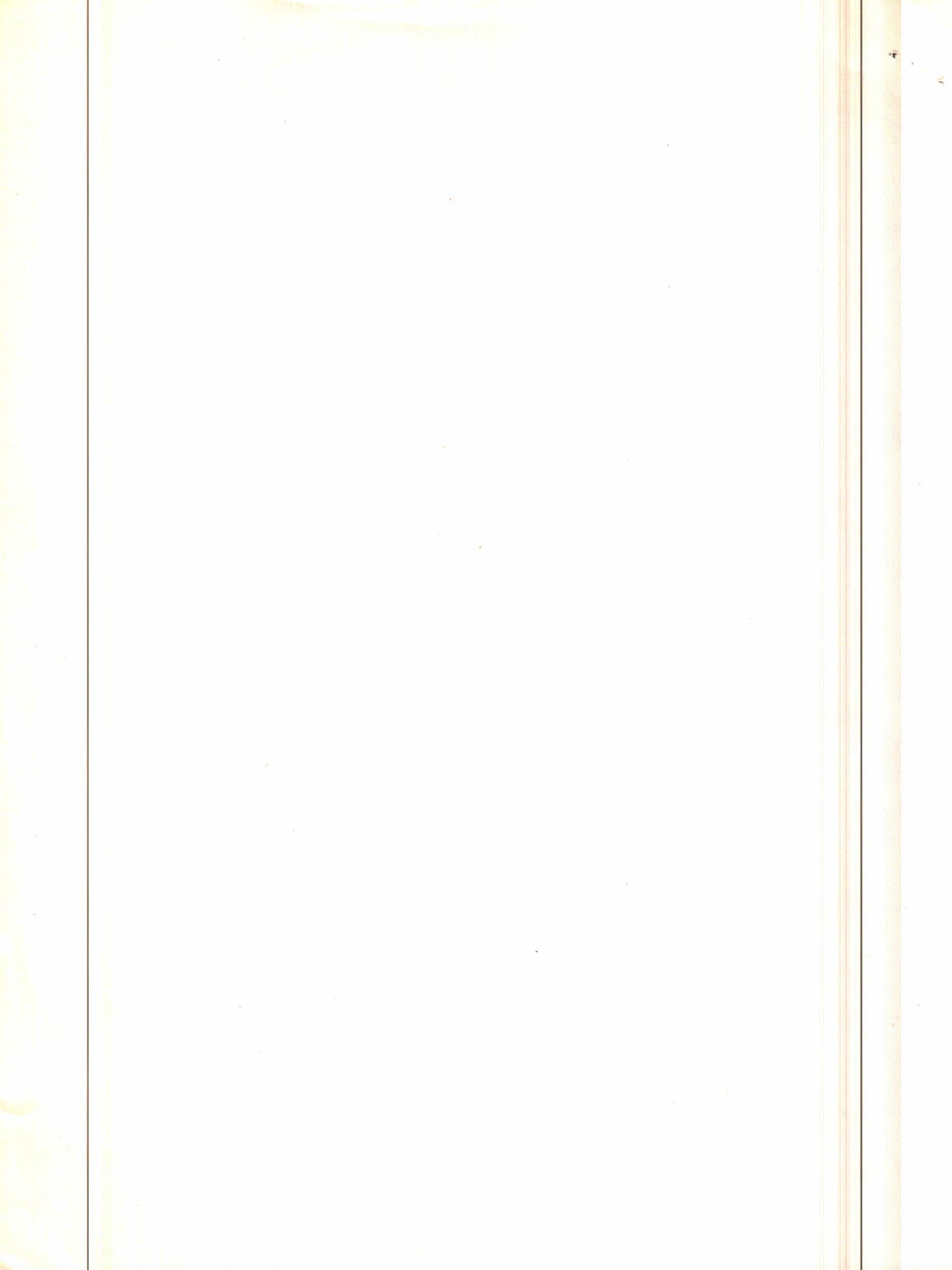
Herrn Prof. Dr. von SENGBUSCH danken wir herzlich für die Förderung dieser Arbeit und sein Interesse an ihrem Verlauf.

Summary

Cytological identification of genetically different groups of interspecific hybrids in the later generations of the cross *Secale cereale* \times *Secale montanum* and its importance for breeding a perennial form of cultivated rye

Though *Secale cereale* and *Secale montanum* are known to represent different karyotypes, due to translocations, with respect to three of the seven chromosomes, no visible differences between the two species in the morphology of the somatic chromosomes have so far been reported. As we can show, however, there is a small but detectable difference in the morphology of chromosome No. VI (numbering of the chromosomes after LIMA-DE-FARIA's pachytene rye chromosome denotation) with respect to the position of the secondary constriction.

If chromosome No. VI were a member of the well known "chain of six" (or "ring of six") which appears regularly in the species hybrids of the first gene-



ration, which results from translocation differences in three chromosome pairs and which produces a degree of 75 % sterility in the hybrids, then fertile individuals in the later generations would either contain twice the chromosome Nr. VI of the *S. cereale* type or twice the chromosome No. VI of the *S. montanum* type while in the sterile individuals both types of chromosome No. VI would be found.

As experiments have shown that this indeed is the case the separation of second and later generation hybrids which are homozygous for the three translocated chromosomes or which are homozygous for the three non-translocated chromosomes and which cannot be distinguished by external morphological characters of the individuals can easily be done by checking the somatic chromosome constitution while previously it was obligatory to carry out test-crosses between the plants to be identified and *S. cereale*.

In breeding a perennial form of rye of high quality the above-mentioned separation of the two types of fertile hybrids was the most important procedure and was moreover, together with the method of test-crossing, also the most laborious, since intercrossing between the two types will, if they are to remain together in a population, continuously result in the production once more of sterile plants.

Literaturverzeichnis

- DIERKS, W., und R. REIMANN-PHILIPP, 1966: Die Züchtung eines perennierenden Roggens als Möglichkeit zur Verbesserung der Roggenzuchtmethode und zur Schaffung eines mehrfach nutzbaren Grünfutter- und Körnerroggens. Z. Pflanzenzüchtg. 56, 343—368.
- LIMA-DE-FARIA, A., 1952: Chromomere analysis of the chromosome complement of rye. Chromosoma 5, 1—68.
- ZEILINGA, A. E., and G. H. KROON, 1965: A method for making root-tip squashes permanent, without removal of the cover slip. Euphytica 14, 36—38.

