Gartenbauwissenschaft, **65** (4). S. 162–169, 2000, ISSN 0016–478X. © Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

Studien zur generativen Vermehrung von Arthybriden aus der Kreuzung *Cyclamen persicum* MILL. x *C. purpurascens* MILL.

Sexual Reproduction of Interspecific Hybrids between *Cyclamen persicum* MILL. and *Cyclamen purpurascens* MILL.

Aloma Ewald, L. Lepper, R. Lippold, H.-G. Schwenkel
(Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V., Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Spezielle Botanik)

Zusammenfassung

Aus der interspezifischen Kreuzung diploider *C. persicum* MILL. ‚Reinweiß' (2n = 2x = 48) und *C. purpurascens* MILL. (2n = 2x = 34) entstanden 1993 nach der In-vitro-Kultur von Fruchtknoten Arthybriden mit 2n = 2x = 41 Chromosomen (EWALD 1996) und 2n = 4x = 82 Chromosomen.

Die Mikrosporenanalyse diploider interspezifischer Hybriden zeigte Störungen in den frühen Stadien der Meiose. In der Anaphase I wurde eine hohe Anzahl von Univalenten beobachtet. Zwischen den Chromosomen der Eltern bestand partielle Homologie, da in der Anaphase I auch interspezifische Bivalente gebildet wurden. Der hohe Anteil Univalente führte in einigen Fällen durch Ausbleiben der ersten meiotischen Teilung zur Restitutionskernbildung. Die so entstandenen Mikrosporen hatten 1n = 2x = 41 Chromosomen. Nur diese aus Dyaden entstandenen Pollenkörner waren vital und normal ausgebildet und hatten die gleiche Größe wie die von spontan entstandenen amphidiploiden Pflanzen (2n = 4x = 82).

Diploide Hybriden hatten nach Färbung mit Fluoreszeindiacetat eine Pollenvitalität von 0,3 bis 34,0 %, amhidiploide von 9,7 bis 54,0 %. Das Pollenschlauchwachstum verlief bei allen geprüften Kreuzungskombinationen im Griffel ungestört. Jedoch nur in der Kreuzungskombination tetraploider *C. persicum* (2n = 4x = 96) mit amphidiploiden Hybriden und reziprok wurde eine geringe Anzahl in die Mikropyle einwachsender Pollenschläuche gefunden. Die Möglichkeit der generativen Vermehrung und die weitere Kreuzbarkeit mit *C. persicum*-Typen war nur auf tetraploidem Niveau gegeben. Die spontan entstandenen amphidiploiden Arthybriden bildeten sowohl nach Selbstung als auch in den Kreuzungen mit tetraploiden *C. persicum* Samen. Aus den Samen der Kombination tetraploide *C. persicum* x amphidiploide Arthybriden entwickelten sich sowohl muttergleiche als auch intermediär aussehende Nachkommmen.

Summary

Interspecific crosses between the diploid *C. persicum* MILL. 'Reinweiß' (2n = 2x = 48) and *C. purpurascens* MILL. (2n = 2x = 34) were carried out in 1993 and hybrids were obtained using ovary culture (EWALD 1996). Sexual plant reproduction of these interspecific hybrids (2n = 2x = 41 and 2n = 4x = 82) has been studied.

The analysis of the microspores of interspecific hybrids revealed abnormalities in early stages of meiosis. In the anaphase I a high number of univalents was observed. Pairing between some chromosomes of *C. persicum* and *C. purpurascens* is assumed to be due to homologous regions. The presence of several univalents completely hindered in some cases the separation of chromosomes, so that cell division did not take place. These microspores showed 1n = 2x = 41 chromosomes, and the resulting pollen grains were viable, normal shaped and of the same size as those of spontaneous occurring amphidiploid hybrid plants (2n = 4x = 82).

Pollen viability ranged after staining with fluorescein diacetate between 0.3 % and 34.0 % in diploid, and between 9.7 % and 54.0 % in amphidiploid hybrids. The growth of pollen tubes in the tissue of the pistils was normal in all cross combination. But only in the combination tetraploid *C. persicum* x amphidiploid hybrid and reciprocal low frequences of micropylar penetration were observed. Sexual reproduction and further cross breeding with *C. persicum* were only successfull when tetraploid plants were used. Spontaneous amphidiploid hybrids developed seeds as well as after selfing and in cross combinations with tetraploid *C. persicum*. From the seeds of the cross combination tetraploid *C. persicum* x amphidiploid hybrids plants were grown till flowering which were true to *C. persicum* or intermediary.

Einleitung

Die Gattung *Cyclamen* L. umfaßt 20 Arten (GREY-WILSON 1997), von denen *C. persicum* MILL. die bekannteste und wirtschaftlich bei weitem bedeutendste Art darstellt. Jährlich werden ca. 25 Millionen Cyclamen als Topfpflanzen in Deutschland verkauft.

Daneben besitzen einige Arten z. T. interessante Eigenschaften. Die aus den Alpen bekannte *C. purpurascens* zeichnet sich durch Winterhärte (GRÜNDLER 1987), intensiven Blütenduft und vermeintliche Fusariumresistenz (GERLACH 1954) aus, weshalb diese auch als Kreuzungspartner ausgewählt wurde.

Artbastardierungen mit Kulturformen von *C. persicum* waren bisher über konventionelle Kreuzungstechniken nicht realisierbar. Erstmals gelang es ISHIZAKA und UEMATSU 1990 mit Hilfe von In-vitro-Techniken *C. persicum* mit *C. repandum* zu kombinieren. Danach folgten weitere Kombinationen von *C. persicum* mit *C. hederifolium* (ISHIZAKA und UEMATSU 1992), C. *libanoticum* und *C. rohlfsianum* (KOBAYASHI und OGAWA 1994), *C. purpurascens* (ISHIZAKA und UEMATSU 1995a) und mit *C. graecum* (ISHIZAKA 1996). 1993 entstanden in Anlehnung an die Arbeit von IHIZAKA und UEMATSU (1990) Arthybriden zwischen *C. persicum* 'Reinweiß' (2n = 2x = 48) und *C. purpurascens* (2n = 2x = 34) mit 2n = 2x = 41 Chromosomen (EWALD 1996).

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Prüfung der interspezifischen Hybriden auf generative Vermehrbarkeit und Eignung für Züchtungsprogramme. Dazu wurden cytologische Analysen während der Meiose, Untersuchungen zur Pollenqualität- und quantität, zum Pollenschlauchwachstum sowie zur Samenbildung und Aufzucht von Rückkreuzungspflanzen durchgeführt.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Zur Verfügung standen 115 Arthybriden aus der Ovarienkultur *in vitro* (EWALD 1996). Nach Erfassung der Merkmale Blütenfarbe, -form, -größe, Blütenstiellänge, Stand der Blüten über dem Laub erfolgte eine Unterteilung in 21 Genotypen, von denen 20 2n = 2x = 41 Chromosomen und einer 2n = 4x = 82 Chromosomen aufwies. Der amphidiploide Genotyp entstand spontan während der Ovarienkultur. Für vergleichende Untersuchungen wurden der mütterliche *Partner C. persicum* 'Reinweiß' (RW) (2n = 2x = 48), der väterliche Partner *C. purpurascens* (2n = 2x = 34) und für die Bestäubungsexperimente zusätzlich diploide *C. persicum* der Sorte 'Kati', der Samenträgerlinie RS 1 sowie tetraploide Pflanzen aus der Kreuzung 'Salmon Scarlet' x 'Purple Flamed' (2n = 4x = 96) verwendet.

Cytologische und flowzytometrische Untersuchungen

Zur Untersuchung der Meiose in Pollenmutterzellen wurden Knospen von fünf verschiedenen diploiden Arthybriden verwendet, deren Petalen ca. 1 mm über die Sepalen herausragten. Sepalen und Petalen wurden entfernt und die Antheren in einem Ethanol-Eisessig Gemisch nach CARNOY (3 : 1) mindestens eine Stunde fixiert. Im weiteren Verlauf wurde das Material in 1n Salzsäure bei 60°C für sieben Minuten hydrolysiert. Zur Färbung wurde eine Karminessigsäurelösung verwendet. Analysiert wurden die Syndeseverhältnisse homologer Chromosomen im Anaphase I-Stadium der Mikrosporogenese, die Verteilung der Chromosomen in der Metaphase II und das Mikrosporenbild von fünf verschiedenenArthybriden.

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte mit einem Cellanalyser CA II (Partec, Münster, Germany) nach EWALD 1996. Zur Bestätigung der Ploidiebestimmung wurden stichprobenartig Ermittlungen der somatischen Chromosomenzahl durchgeführt(EWALD 1996).

Pollenqualität und -quantität

Jeweils 100 Pollenkörner aus einem Pollengemisch, das sich aus Pollen aller Antheren von 3–5 Blüten des entsprechenden Genotyps zusammensetzte, dienten der Messung der Pollenkornlänge. Zur Bestimmung der Pollenvitalität wurden von jedem Genotyp Antheren von 3–5 Blüten unmittelbar vor bzw. zu Anthesebeginn verwendet. Die Untersuchungen erfolgten nach einer Methode von HESLOP-HARRISON und HESLOP-HARRISON (1970) mit FDA (Fluoreszeindiacetat) über zwei Vegetationsperioden. Dabei wurde jeder Genotyp wiederholt untersucht. Grundlage der Bewertung bildeten je Probe 300 Pollenkörner. Für die Auswertung wurde ein Fluoreszenzmikroskop DM RB (Leica, Bensheim) verwendet. Als vital bewertet wurden dabei die kräftig gelbgrün gefärbten Pollenkörner.

Von elf Arthybriden und beiden Eltern wurden in der Regel von jeweils zwei Blüten alle Antheren (in der Regel fünf) unmittelbar vor der Dehiszenz analysiert. Nach dem mechanischen Öffnen der Antheren wurden diese einzeln in Aqua dest. mit einem Zusatz von DMSO (Dimethylsulfoxid) für 10 Minuten auf einem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurden die groben Bestandteile der Antherenwand entfernt und die Lösung mit Aqua dest. auf 1 ml aufgefüllt. Mit einem Cellanalyser CA II (Partec, Münster) wurden die Partikel in 0,2 ml der Lösung gezählt. Multipliziert mit fünf ergab sich die Anzahl Pollenkörner der entsprechenden Anthere. Anschließend wurden die Werte aller Antheren aus einer Blüte zusammengefasst.

Bestäubungen

Die Blüten wurden unmittelbar vor der Anthese kastriert und anschließend bestäubt. Nach drei Tagen wurde die Bestäubung wiederholt. Folgende Kreuzungskombinationen wurden gewählt:

- diploide Arthybride x diploide Arthybride (DPP × DPP)
- diploide Arthybride x diploide *C. persicum* 'RW' und reziprok (DPP × RW und RW × DPP)
- amphidiploide Arthybride x tetraploide *C. persicum* und reziprok (APP × TP und TP × APP)
- amphidiploide Arthybride x amphidiploide Arthybride (APP × APP)

Tab. 1. Verteilung der *C. purpurascens*- und *C. persicum*-Chromosomen auf beide Metaphase II-Platten am Beispiel einer diploiden Arthybride.
Distribution of C. purpurascens- and C. persicum-chromosoms of a diploid hybrid plant at metaphase II-plates, ×2000.

Platte 1	10	16	16	16	16	17	17	17	17	18	18	19	19	19	20
Anzahl *C. purpurascens*-Chromosomen	2	5	6	7	8	7	8	8	8	6	8	4	8	8	8
Anzahl *C. persicum*-Chromosomen	8	11	10	9	8	10	9	9	9	12	10	15	11	11	12
Platte 2	31	25	25	25	25	24	24	24	24	23	23	22	22	22	21
Anzahl *C. purpurascens*-Chromosomen	15	12	11	10	9	10	9	9	9	11	9	13	9	9	9
Anzahl *C. persicum*-Chromosomen	16	13	14	15	16	14	15	15	15	12	14	9	13	13	12

Pollenschlauchwachstum

Die für die Untersuchungen vorgesehenen Blüten wurden unmittelbar vor der Anthese kastriert und mit dem entsprechendem Pollengemisch belegt. Ein Pollengemisch setzte sich aus Pollen von Blüten mehrerer Pflanzen zusammen. Untersuchungen erfolgten in folgenden Kombinationen:
- diploide Arthybride x diploide *C. persicum* 'RW' und reziprok (DPP × RW und RW × DPP)
- diploide Arthybride x diploide *C. persicum* (Pollengemisch Kati, RS1) (DPP × KR)
- amphidiploide Arthybride x diploider *C. persicum* (Pollengemisch Kati, RS1) (APP × KR)
- amphidiploide Arthybride x tetraploide *C. persicum* und reziprok (APP × TP und TP × APP)

Das Pollenschlauchwachstum im Griffel, die Anzahl Pollenschläuche im Fruchtknoten und in der Mikropyle der Samenanlagen wurden zehn, zwölf oder 18 Tage nach der Bestäubung nach einer Färbemethode von NAETHER (1971) unter Auflichtfluoreszenz analysiert.

Samenbildung, Fruchtknoten- und Embryokultur

In den Kreuzungskombinationen DPP × DPP, DPP × RW und RW × DPP wurden 21, 28, 35 und 42 Tage nach der ersten Bestäubung die bis dahin nicht abortierten Fruchtknoten isoliert und *in vitro* auf hormonfreiem MS-Medium (MURASHIGE und SKOOG 1962) mit 6 % Saccharose und 1 % Agar in 45 ml Gläsern dunkel bei 20 °C kultiviert.

Die in den übrigen Kombinationen gebildeten Kapseln verblieben bis zum Weichwerden der Fruchtstiele an der Pflanze. Die aus reifen Samen isolierten Embryonen der Kreuzung TP × APP wurden auf N 69 (NITSCH-Medium) dunkel bei 20 °C kultiviert. Bei 23 °C und im 14 Stunden-Tag erfolgte die weitere Kultivierung der sich entwickelnden Pflänzchen. Fünf bis elf Monate nach der Isolation der Embryonen wurden die Pflanzen in das Gewächshaus überführt. Die Samen aus zwei Kapseln wurden in Erde ausgesät und bis zur Differenzierung der Kotyledonen dunkel bei 20 °C kultiviert. Bis zur Blüte wurden die Pflanzen unter praxisüblichen Bedingungen herangezogen.

Ergebnisse

Cytologische Befunde

Die Auszählung der Chromosomen im Metaphase II-Stadium der Mikrosporogenese erbrachte für die geprüften diploiden Hybriden die theoretisch erwartete Chromosomengesamtzahl beider Metaphase-Platten von 41. Da die Chromosomen von *C. purpurascens* etwa um das Doppelte größer sind als die von *C. persicum*, sind sie leicht unterscheidbar und den beteiligten Eltern-Genomen zuzuordnen. Danach stammen 24 Chromosomen von *C. persicum* und 17 von *C. purpurascens*.

Die Meiose der Pollenmutterzellen war in hohem Maße gestört. Nicht nur die ungerade diploide Ausgangsbasis, sondern vor allem irreguläres Syndeseverhalten und verstärktes Auftreten von Nachzüglern während der ersten meiotischen Teilung führten regelmäßig zu einer Ungleichverteilung der Chromosomen auf die beiden neuen Zellkerne. In Tabelle 1 werden Verteilungsmuster der einzelnen *persicum*- bzw. *purpurascens*-Chromosomen in den Metaphase II-Platten am Beispiel einer Hybride dargestellt. Trotz großer Unterschiede in der Verteilung kam es doch überwiegend zu einer ausgewogenen Zahlenbalance sowohl des gesamten Chromosomensatzes als auch seiner beteiligten Eltern-Genome. Extreme Ungleichverteilungen, wie 2 : 15 und 5 : 12 bei *purpurascens*- bzw. 5 : 19 und 8 : 16 bei *persicum*-Chromosomen waren relativ selten.

Neben Autosyndese (*persicum-persicum*- und *purpurascens-purpurascens*-Bivalente) trat auch Allosyndese (Paarungen zwischen Chromosomen von *C. persicum* und *C. purpurascens*) während der ersten meiotischen Teilung auf (Abb. 1). Eine sichere Aussage zur Anzahl auto- und allosyndetischer Bivalente konnte nicht

Tab. 2. Prozentuale Anteile der Teilungsmuster von Mikrosporen an der Gesamtpollenzahl bei vier Arthybriden (n = 300 Mikrosporozysten pro Pflanze im Tetradenstadium).

Percentage of microspore-types of four different interspecific hybrids on total number of pollen grains (n=300 microspore mother cells at tetrad stage per plant).

Pflanze	Tetrade: Mikrosporen ±gleich	Tetrade: 2 große, 2 kleine Mikrosporen	Tetrade mit einem Mikronukleus	Dyade	Dyade mit einem Mikronukleus
1	74,5	5,4	13,6	0,7	0,4
2	84,5	2,5	2,7	5,7	2,1
3	51,9	14,7	9,0	7,4	2,3
4	73,2	8,6	8,4	1,2	0,0

getroffen werden. In der Regel traten aber mehr interspezifische Bivalente auf als solche, die nur von *persicum*- bzw. *purpurascens*-Chromosomen gebildet wurden. Neben den Bivalenten ging ein zahlenmäßig variabler und schwer erfaßbarer Anteil von Chromosomen als Univalente in die erste meiotische Teilung. Multivalente waren nicht nachweisbar. Folge der gestörten Syndese und der unterschiedlichen Zahl von Bi- und Univalenten sind die weit gestreuten Haploidzahlen. Eine extreme Ungleichverteilung von 10:31 Chromosomen in der Metaphase II wäre beispielsweise auf das Vorhandensein von nur maximal 10 Bivalenten und damit mindestens 21 Univalenten zurückzuführen. Die 21 Univalente verteilen sich in der Anaphase I nicht, sondern wandern alle zum gleichen Pol. Verläuft die zweite Teilung störungsfrei, so findet man im Tetradenstadium der Mutterzelle zwei relativ große und zwei kleine Mikrosporen. Zeitliche Verzögerungen der Teilungsvorgänge und der Polwanderung der Chromosomen in den Anaphase I- und Anaphase II-Stadien führten zur Restitutionskernbildung und damit zu diploidisierten Dyaden mit 41 Chromosomen.

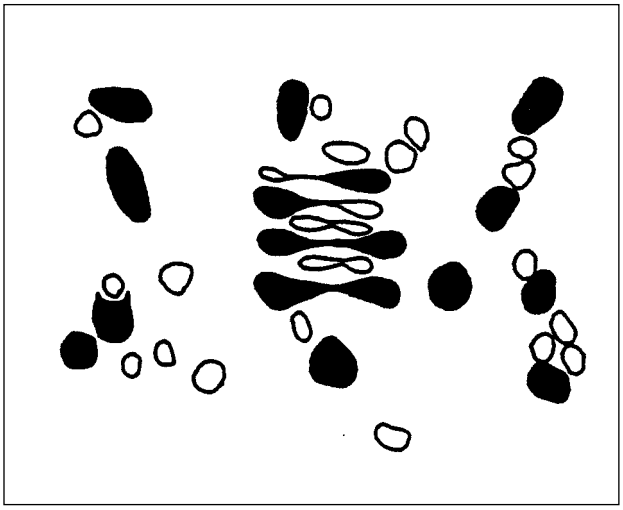


Abb. 1 Syndeseverhalten von *C. purpurascens*- und *C. persicum*-Chromosomen im Anaphase I-Stadium der Meiose einer diploiden Arthybride (6 Bivalente, 29 Univalente), *C. purpurascens*-Chromosomen schwarz, ×2000.
Syndesis of C. purpurascens- and C. persicum-chromosoms of a diploid hybrid plant at anaphase I of meiosis (6 bivalents, 29 univalents), chromosomes of C. purpur-ascens are black, ×2000.

Das Mikrosporenbild von vier untersuchten Arthybriden zeigte neben den zu erwartenden normalen Fällen mit vier haploiden, gleich oder annähernd gleich großen Mikrosporen (Tetraden) auch solche, bei denen sich die aus einer Mutterzelle hervorgehenden Sporen sowohl in der Zahl als auch in der Größe – entsprechend der Anzahl eingeschlossener Chromosomen – unterscheiden. Es traten fast alle erdenklichen Kombinationen von normal-großen, übergroßen und kleinen Mikrosporen sowie Mikronuclei auf. Aus den unterschiedlich großen und hinsichtlich ihrer Chromosomengarnitur verschieden ausgestatteten Mikrosporen gehen auch verschiedenartige Pollenkörner hervor. Die vier aus Tetraden sich entwickelnden sind morphologisch fast identisch, im Vergleich dazu sind die Pollenkörner aus diploidisierten Dyaden wesentlich größer - und wie sich zeigte, die einzigen vitalen. Durch Auswertung der Mikrosporenzysten im Tetradenstadium wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Teilungsmuster von Mikrosporen (bei Vernachlässigung sonstiger Kombinationen mit mehr als einem Mikronucleus) an der Gesamtpollenzahl errechnet und in Tabelle 2 dargestellt. Zwischen den vier untersuchten Pflanzen ergaben sich Unterschiede: 51,9 - 84,5 % der Mikrosporenmutterzellen lagen postmeiotisch als Tetraden und 0,7 - 7,4 % als reine Dyaden vor. Die übrigen Einheiten waren Tetraden mit zwei großen und zwei kleinen Mikrosporen, Tetraden mit einem Mikronucleus sowie Dyaden mit einem Mikronucleus.

Pollenanalyse

Die mittlere Pollenlänge betrug genotypabhängig bei diploiden Arthybriden 10 μm bis 14 μm (Min. 8 μm, Max. 20 μm), bei amhidiploiden 17 μm (Min. 12 μm, Max. 20 μm). Unterschiede zwischen den Genotypen bestanden im Anteil großer Pollen im Bereich von 18 μm bis 20 μm. Alle nicht in diesem Bereich liegenden

Tab. 3. Anzahl Pollenkörner je Blüte und Anthere (Min. - Max.) sowie mittlere Pollenvitalität der Kreuzungseltern und elf ausgewählten Arthybriden.
Number of pollen grains per flower and anther (min. - max.) and average pollen viability of cross parents and of 11 interspecific hybrids.

Genotyp	Pollen je Blüte (Mio.)	Pollen je Anthere (Mio.)	mittlere Pollenaktivität (%)
RW Pflanze 1	3,8–4,3	0,66–0,99	35,5
RW Pflanze 2	1,6–1,8	0,15–0,52	35,5
C. purpurascens	0,7	0,10–0,15	29,4
DPP 1	1,1–1,3	0,11–0,34	7,2
DPP 2	1,3–1,4	0,20–0,40	4,1
DPP 3	1,8–2,0	0,28–0,45	3,4
DPP 4	1,6–1,8	0,28–0,41	5,3
DPP 5	1,7–2,6	0,28–0,75	5,5
DPP 6	1,6–2,2	0,18–0,52	5,2
DPP 7	1,2–1,4	0,20–0,31	2,4
DPP 8	2,4–2,4	0,34–0,56	21,0
DPP 9	0,7–0,7	0,10–0,18	10,4
DPP 10	0,8–1,1	0,17–0,23	13,0
APP	1,4–1,7	0,17–0,44	24,6

diploide Arthybriden	DPP	diploide C. persicum „Reinweiß“	RW
amphidiploide Arthybriden	APP		
diploid interspecific hybrids	*DPP*	*diploid C. persicum „Reinweiß“*	*RW*
amphidiploid interspecific hybrids	*APP*		

Pollenkörner waren deformiert. Während der Anteil großer Pollen bei diploiden zwischen 3,0 % und 10,0 % lag, bildeten amphidiploide Pflanzen bis zu 31,0 % große Pollen aus (Abb. 2). Die Analysen zur Pollenvitalität ergaben, daß nur diese großen Pollenkörner, die aus diploidisierten Dyaden hervorgegangen waren, vital waren.

Untersuchungen der Arthybriden über zwei Vegetaperioden ergaben, daß sich die einzelnen Genotypen in ihrer mittleren Pollenvitalität unterschieden (Tab. 3). Bei diploiden Pflanzen waren zwischen 0,3 % und 34,0 %, bei amphidiploiden Pflanzen zwischen 9,7 % und 54,0 % der Pollen vital. Alle Pflanzen bildeten somit vitalen Pollen aus.

Sowohl bei den Arthybriden als auch bei den Kreuzungseltern war die Anzahl Pollen je Blüte zwischen den Blüten einer Pflanze und zwischen den einzelnen Antheren einer Blüte verschieden (Tab. 3). Die Blüten von *C. persicum* 'RW' entwickelten 1,6–4,3 Mio., *C. purpurascens* 0,7 Mio., diploide Arthybride 0,7–2,6 Mio. und eine der amphidiploiden Einzelpflanzen 1,4–1,7 Mio. Pollenkörner je Blüte.

Pollenschlauchwachstum

Durch überlagerndes Griffelgewebe war im oberen Griffelteil die exakte Anzahl gekeimter Pollenkörner schwierig zu bestimmen. Das Pollenschlauchwachstum verlief im Griffel in der Regel ungestört. Hemmreaktionen, wie Verknäulungen der Pollenschläuche, blasige Ausstülpungen oder eingestelltes Wachstum der Pollenschläuche waren äußerst selten. Da sich im Gegensatz zu den diploiden Arthybriden bei den amphidiploiden Pflanzen die Pollenschläuche schwach vom Griffelgewebe abhoben, konnte deren Verlauf nur sehr schwer verfolgt werden.

Arthybriden bei den amphidiploiden Pflanzen die Pollenschläuche schwach vom Griffelgewebe abhoben, konnte deren Verlauf nur sehr schwer verfolgt werden. Die Pollenschläuche im Fruchtknoten waren häufig

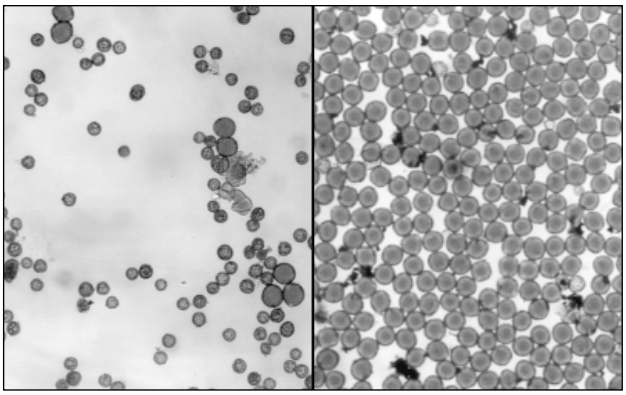


Abb. 2. Pollengemisch diploider (links) und amphidiploider Arthybriden (rechts), ×240.
Mixture of pollen of diploid (left) and of amphidiploid interspecific hybrids (right), ×240.

Tab. 4. Pollenschlauchwachstum in verschiedenen Kreuzungskombinationen.
Pollen tube growth in different cross combinations.

Kreuzungs-kombination	Anzahl bestäubter Blüten	Anzahl Blüten mit Pollenschläuchen im Fruchtknoten	Anzahl Blüten mit in die Micropyle einwachsenden Pollenschläuchen
DPP x RW	25	10	0
RW x DPP	15	15	0
DPP x KR	26	25	3[1)]
APP x KR	9	7	1[1)]
APP x TP	22	9	1
TP x APP	17	13	2 + 4[1)]

[1)] nicht eindeutig durch Gewebeüberlagerungen

[1)] *not clear as a result of overlapping tissue*

diploide Arthybriden	DPP	diploide C. persicum „Reinweiß“	RW
amphidiploide Arthybriden	APP	diploide C. persicum (Mischung Kati, RS)	KR
		tetraploide C. persicum	TP
diploid interspecific hybrids	*DPP*	*diploid C. persicum 'Reinweiß'*	*RW*
amphidiploid interspecific hybrids	*APP*	*diploid C. persicum (mixture Kati, RS1)*	*KR*
		tetraploid C. persicum	*TP*

schwach gefärbt und im Vergleich zu denen im Griffel dünner. In der Kombination DPP × KR wurde in einigen Präparaten eine hohe Anzahl (bis zu 60) Pollenschläuche im Fruchtknoten nachgewiesen. Die Anzahl Pollenschläuche im Fruchtknoten war in der Kombination APP × TP mit 1-15 und reziprok (TP × APP) nur gering. In der Kombination APP × TP waren in 59 % der bestäubten Blüten keine Pollenschläuche vorhanden (Tab. 4).

Eine sehr geringe Anzahl (2 und 4) in die Micropyle der Samenanlagen einwachsende Pollenschläuche wurden mit Sicherheit nur in der Kombination TP × APP bei zwei von insgesamt 17 bestäubten Blüten (Tab. 4) nachgewiesen. Reziprok (APP × TP) war nur bei einer von 22 bestäubten Blüten ein einwachsender Pollenschlauch zu beobachten. Vereinzelt wurden Hemmreaktionen im Samenanlagenbereich beobachtet, die sich in Verknäulungen der Pollenschläuche vor der Mikropyle, ungerichtetem Wachstum der Pollenschläuche um die Samenanlage und in Umkehrwachstum nach Eindringen in die Micropyle äußerten.

Samenbildung und Pflanzenanzucht

Nach freier Abblüte wurde bei den diploiden Hybriden wiederholt die Ausbildung von Kapseln beobachtet. Bisher wurde eine reife Kapsel geerntet, die zwei Samen mit Embryonen enthielt. Die isolierten und *in vitro* kultivierten Embryonen zeigten keine Weiterentwicklung.

Tabelle 5 gibt einen Überblick der Ergebnisse der rchgeführten Kreuzungskombinationen. Nach der Bestäubung von 1030 Blüten in der Kombination DPP × DPP entwickelte sich während der In-vitro Kultur aus der Samenanlage eines Fruchtknotens, 28 Tage nach der Bestäubung isoliert, ein Embryo. Die daraus kultivierte Pflanze hatte 2n=4x=82 Chromosomen und doppelten DNA-Gehalt. In der Kombination DPP × RW und reziprok wurden keine Kapseln entwickelt. Die spontan entstandenen amphidiploiden Arthybriden bildeten sowohl nach Selbstung (APP × APP) als auch in den Kombination APP × TP und TP × APP Samen. Nach Selbstung von 80 Blüten wurden drei Kapseln mit 19 Samen geerntet. Die Bestäubung von 480 Blüten in der Kombination TP × APP ergab 21 Kapseln mit insgesamt 148 Samen (Tab. 5). Bisher wurden aus sechs dieser Kapseln 29 Embryonen isoliert und in vitro kultiviert. Davon wurden elf blühende Pflanzen erhalten, von denen sieben phänotypisch dem mütterlichen *C. persicum*-Elter entsprachen und vier von beiden Eltern verschieden waren. Aus den zehn aus einer dieser Kapseln isolierten Embryonen entwickelten sich drei zu muttergleichen Pflanzen, und drei waren von den Eltern verschieden. Die aus den anderen Kapseln isolierten Embryonen waren entweder alle muttergleich oder von den Eltern verschieden. Aus zwei weiteren Kapseln mit jeweils sieben Samen entstanden nach der direkten Aussaat in Substrat neun muttergleiche Pflanzen.

Diskussion

Durch Kombination verschiedener Arten einer Gattung entstandene Hybriden sind wichtige Bindeglieder bei der Aufklärung der Phylogenese. Für die Züchtung bilden sie eine wichtige Quelle zur Erweiterung der genetischen Basis.

Eine Voraussetzung für die Bildung von funktionsfähigem Pollen ist eine ungestörte Meiose mit regulärer Chromosomenpaarung. Obwohl zwischen den Chromosomen von *C. persicum* und *C. purpurascens* Größenunterschiede bestehen und in der Mikrosporo-

Tab. 5. Kreuzungskombinationen
Cross combinations

Kreuzungs-kombination	Anzahl bestäubter Blüten	Anzahl Kapseln mit Samen	Anzahl Samen	Anzahl Pflanzen
DPP x DPP[1)]	1030	1[2)]	-	1[3)]
RW x DPP[1)]	205	0[2)]	-	0
DPP x RW[1)]	469	0[2)]	-	0
APP x TP	50	7	57	-
TP x APP	480	21	148	-
APP x APP	80	3	19	-

[1)] In-vitro-Kultur von Fruchtknoten 21, 28, 35, 42 Tage nach der Bestäubung
[2)] Fruchtknoten mit entwickeltem Embryo
[3)] amphidiploide Pflanze nach der In-vitro-Kultur von Fruchtknoten

[1)] in vitro propagation of ovaries 21, 28, 35, 42 days after pollination
[2)] ovary with developed embryo
[3)] amphidiploid plant after in vitro propagation of ovaries

diploide Arthybriden	DPP	*diploid interspecific hybrids*	*DPP*
amphidiploide Arthybriden	APP	*amphidiploid interspecific hybrids*	*APP*
diploide C. persicum „Reinweiß“	RW	*diploid C. persicum 'Reinweiß'*	*RW*
tetraploide C. persicum	TP	*tetraploid C. persicum*	*TP*

genese recht unterschiedliche Komplemente aufeinandertrafen, konnte neben Autosyndese auch Allosyndese gefunden werden. Dies ist nicht zuletzt ein Ausdruck für die noch bestehende, wenigstens partielle Homologie der beiden Kreuzungspartner, die innerhalb der Gattung *Cyclamen* verschiedene Entwicklungswege eingeschlagen haben und sich vor allem in ihrer Chromosomenzahl unterscheiden. Durch die Möglichkeit eines *crossing-over* während der Paarung interspezifischer Chromosomen wäre es denkbar, daß wertvolle Eigenschaften von *C. purpurascens*, wie z. B *Fusarium*-Toleranz, auf *C. persicum*-Chromosomen übertragen werden können.

Die Auszählung der Chromosomen im Metaphase II-Stadium ergab für die geprüften diploiden Arthybriden eine Gesamtzahl von 41 mit ungleicher Verteilung auf die beiden Metaphase-Platten. Das bestätigte die Ergebnisse der Auszählung an Wurzelspitzen (EWALD 1996). Bedingt durch die ungerade Anzahl, die irreguläre Syndese und durch zeitliche Verzögerungen war die erste meiotische Teilung derart gestört, daß es in der Telophase I neben einer Ungleichverteilung der Chromosomen vereinzelt zur Restitutionskernbildung kam. In solch einem Fall setzte die Telophase ein, noch ehe die Verteilung der Chromosomen auf die Pole abgeschlossen war. Infolgedessen entstanden Dyaden mit 41 Chromosomen. Die Untersuchungen ergaben, dass ausschließlich der aus diploidisierten Dyaden hervorgegangene dihaploide Pollen mit 1n=2x=41 Chromosomen für die Befruchtung zur Verfügung stand. Die nach intraspezifischer Kreuzung diploider Hybriden entstandene amphidiploide Pflanze ist offenbar das Produkt der Verschmelzung unreduzierter Pollenkörner mit einer ebenfalls unreduzierten Eizelle. Die Mikrosporogenese amphidiploider Pflanzen wurde noch nicht analysiert. Es sind auch hier erhebliche Meiosestörungen zu vermuten.

Da alle Arthybriden vitalen Pollen bildeten, besteht die Möglichkeit ihrer Nutzung für weitere Kreuzungsexperimente. Unterschiede in der Pollenvitalität zwischen diploiden Arthybriden können, wie von ATLAGIC, DOZET und SKORIC (1993) bei Arthybriden zwischen *Helianthus tuberosus* L. und *H. annuus* L. nachgewiesen wurde, im unterschiedlichen Grad der Meiosestörungen begründet liegen. Umfangreiche Untersuchungen von WERTHER und EWALD (1998) ergaben, daß die Bestimmung der Pollenvitalität mit Karminessigsäure (KES) zu einer deutlichen Überschätzung des Anteils vitaler Pollen führt. Die größte Konformität mit der Keimfähigkeit des Pollens ergab sich nach FDA-Färbung. Im Vergleich zu den von ISHIZAKA und UEMATSU (1995 a,b) ermittelten Werten für die Pollenvitalität nach KES-Färbung, wurden für die eigenen diploiden Pflanzen nach FDA-Färbung z.T. noch deutlich darüber liegende Werte bestimmt.

In der praktischen Pflanzenzüchtung ist es seit langem bekannt, daß durch die Polyploidisierung von Art- und Gattungshybriden deren Fertilität erhöht bzw. wiederhergestellt werden kann. Das bestätigen auch die eigenen Untersuchungen. Die generative Vermehrung der Arthybriden bzw. Rückkreuzungen mit *C. persicum* cv. waren nur auf tetraploidem Niveau möglich. Darauf deuteten bereits die Ergebnisse der Untersuchungen zum Pollenschlauchwachstum hin. Es ist möglich, daß insbesondere bei den diploiden Arthybriden die weiblichen Gameten ebenso wie eine Vielzahl der männlichen durch einen stark gestörten Meioseablauf funktionsunfähig sind und deshalb die Pollenschläuche nicht oder nur in sehr geringer Anzahl in die Mikropyle eindringen. Nicht auszuschließen sind zusätzlich postzygoti-

sche Unverträglichkeitsreaktionen. Auch ISHIZAKA und UEMATSU (1995 b) verweisen auf die höhere Fertilität ihrer amphidiploiden Arthybriden die, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit vorgestellten spontan aufgetretenen amphidiploiden Pflanzen, durch Kolchizinbehandlung von Samenanlagen induziert wurden.

Der inzwischen große Pflanzenbestand, bedingt durch die sehr effektive Methode der In-vitro-Verklonung über somatische Embryogenese (SCHWENKEL und WINKELMANN 1998) und das damit verbundene spontane Auftreten weiterer amphidiploider Genotypen (EWALD, et al. 1998), ermöglichen weiterführende Untersuchungen zur generativen Vermehrbarkeit. Bis zur kommerziellen Nutzbarkeit dieses neuen Ausgangsmaterials für die Cyclamenzüchtung ist es allerdings noch ein sehr zeitaufwendiger Prozess.

Danksagung

Die cytologischen Untersuchungen wurden von R. LIPPOLD im Rahmen einer von Dr. L. LEPPER betreuten Staatsexamensarbeit durchgeführt.

Bei Frau Sabine Kalkofe und Frau Christel Zießler möchten wir uns ganz herzlich für die sorgfältige technische Vorbereitung und Versuchsdurchführung bedanken.

Die Untersuchungen erfolgten mit Förderung des Bundesministers für Landwirtschaft und Forsten, des Ministers für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten des Landes Brandenburg und des Ministers für Landwirtschaft und Forsten des Freistaates Thüringen.

Literatur

ATLAGIC, J., B. DOZET und D. SKORIC 1993: Meiosis and pollen viability in *Helianthus tuberosus* L. and its hybrids with cultivated Sunflower. Plant Breeding **111**, 318–324

EWALD, A. 1996: Interspecific hybridization between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill.. Plant Breeding **115**, 162–166

EWALD, A., A. ORLICZ-LUTHARDT, T. WINKELMANN und H.-G. SCHWENKEL 1998: Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. x *C. purpurascens* Mill: Propagation, somaclonal variation, resistence to Fusarium wilt and suitability as an outdoor crop. Proceedings, EUCARPIA 1998, Angers, France, (in press)

GERLACH, W. 1954: Untersuchungen über die Welkekrankheit des Alpenveilchens (Erreger: Fusarium oxysporum SCHL. f. cyclaminis n. f.). Phytopath. Z. Band **22**, 125–176

GREY-WILSON, C. 1997: *Cyclamen*. A guide for gardeners, horticulturists and botanist. Timber press, Inc., Portland, Oregon, USA

GRÜNDLER, I.-G. 1987: Das Alpenveilchen. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag DDR, 1. Auflage

ISHIZAKA, H. und J. UEMATSU 1990: Production of interspecific hybrids between *Cyclamen persicum* and *C. repandum* through ovule culture. Japan. J. Breed **40** (Suppl. 1), 60–61

ISHIZAKA, H. und J. UEMATSU 1992: Production of interspecific hybrids between *Cyclamen persicum* MILL. and *C. hederifolium* AITON by ovule culture. Japan. J. Breed. **42**, 353–366

ISHIZAKA, H. und J. UEMATSU 1994: Amphidiploids between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. hederifolium* Aiton induced through colchicine treatment of ovules in vitro and plants. Breed. Sci. **44**, 161–166

ISHIZAKA, H. und J. UEMATSU 1995a: Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. produced by ovule culture. Euphytica **82**, 31–37

ISHIZAKA, H. und J. UEMATSU 1995b: Amphidiploids between between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. by treating ovules with colchicine in vitro and sesquidiploids between the amphidiploid and the parental species induced by conventional crosses. Euphytica **86**, 211–218

ISHIZAKA, H. 1996: Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* and *C. graecum*. Euphytica **91**, 107-117

HESLOP-HARRISON, J. und Y. HESLOP-HARRISON 1970: Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence, intra cellular-hydrolysis of fluorescein diacetat. Stain Technology **45**, 115–120

KOBAYASHI, N. und K. OGAWA 1994: Production of interspecific hybrids between *Cyclamen persicum* Mill. and C. rohlfsianum Aschers. or *C. libanoticum* Hildebr. by ovule culture. Breed Sci. **44** (Suppl. 2), 85

LIPPOLD, R. 1995: Morphologische-anatomische und cytologische Untersuchungen an der interspezifischen Hybride von *Cyclamen persicum* MILL. und *Cyclamen purpurascens* MILL.. Staatsexamensarbeit, Friedrich-Schiller Universität Jena, **56**

MURASHIGE , T. und F. SKOOG 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue for rapid growth and bioassays with tobacco tissuculture. Physiol. Plant. **15**, 473–497

NAETHER, J. 1971: Verfahren für die genetische Analyse der sporophytisch bedingten Selbstinkompatibilität auf diploider Stufe und ihre Anwendung in der Hybridzüchtung. Diss., Akad. Landwirtsch.-Wiss., Berlin

SCHWENKEL, H.-G. und T. WINKELMANN 1998: Plant regeneration via somatic embryogenesis from ovules of *Cyclamen persicum* Mill.. Plant Tissue Culture and Biotechnology, **4**, 28–34

WERTHER, S. und A. EWALD 1998: Prüfung von Methoden zur Bestimmung der Pollenvitalität bei *Cyclamen persicum* Mill.. Vorträge für Pflanzenzüchtung **42**, 220–222

Anschrift der Verfasser: Dr. Aloma Ewald, Dr. Hans-Georg Schwenkel, Institut für Gemüse-& Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V., Abteilung Pflanzenvermehrung, Kühnhäuser Str. 101, 99189 Erfurt-Kühnhausen

Dr. Lothar Lepper, Rico Lippold, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Spezielle Botanik, Philosophenweg 16, 07743 Jena