

Nicotiana: Züchtungsforschung und Züchtung *

von Jürgen Grunewaldt

Institut für Angewandte Genetik der Universität Hannover

ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von den Strukturen, der Anzahl und dem Meioseverhalten der Chromosomen wird die Abstammung der wirtschaftlich genutzten *Nicotiana*-Arten aufgezeigt.

Die Darstellung der Grundlagen einer züchterischen Veränderung erfolgt anhand des Blühverlaufes, der zu erwartenden Fertilität, der Inkompatibilitäts- und Sterilitätsreaktionen, der Samenbildung und Samenkeimung.

Im Abschnitt Sortenzüchtung wird nach einem Überblick über die Entwicklung der Sortenzüchtung das vorhandene und herzustellende Sortenausgangsmaterial beschrieben. Dabei wird auch der Einsatz von Sterilkulturtechniken analysiert.

Der Darstellung der verschiedenen Zuchtmethoden sind Übersichten über deren erfolgreiche Anwendung beigelegt.

SUMMARY

Starting from the description of the structure, number and meiotic behaviour of chromosomes, the evolution of the economically important *Nicotiana* species is analyzed.

Flowering, expected fertility, incompatibility and male sterility, seed development, as well as germination, are

used as criteria to outline the principles of *Nicotiana* breeding.

The chapter entitled "Sortenzüchtung" (variety breeding) includes a survey of the development of varieties, the breeding material available and that to be established. The application of sterile culture techniques in *Nicotiana* breeding is discussed.

The presentation of the different breeding methods applied includes compilations of released tobacco varieties.

RESUME

L'évolution des variétés commerciales de *Nicotiana* est étudiée à partir des structures et du nombre des chromosomes ainsi que du comportement de la méiose.

La présentation des principes fondamentaux de la sélection des *Nicotiana* est effectuée au moyen des critères que constituent la floraison, la fertilité escomptée, les réactions d'incompatibilité ou de stérilité ainsi que la spermatogénèse et la germination.

Le chapitre «Sortenzüchtung» (sélection des variétés) donne un aperçu du développement des variétés ainsi que du matériau initial dont on dispose et de celui qu'il faudra produire. L'utilisation des techniques de culture stérile est également traitée.

La présentation des différentes méthodes de sélection est accompagnée de tableaux synoptiques regroupant les succès obtenus lors de leur application.

* Eingegangen: 5. Oktober 1984.

1. Cytogenetik

- 1.1. Chromosomenanzahl
- 1.2. Chromosomenstruktur
- 1.3. Chromosomenpaarung und Allopolidie
- 1.4. Allotetraploidie und Evolution

2. Reproduktion

- 2.1. Blühverlauf und Kreuzungstechnik
- 2.2. Fertilität
- 2.3. Inkompatibilität
- 2.4. Männliche Sterilität
- 2.5. Samen und Keimung

3. Sortenzüchtung

- 3.1. Entwicklung der Sortenzüchtung
- 3.2. Ausgangsmaterial für die Züchtung
 - 3.2.1. Landsorten
 - 3.2.2. Zuchtsorten
 - 3.2.3. Kreuzungsmaterial
 - 3.2.4. Mutationen
 - 3.2.5. *in vitro*-Material
 - 3.2.5.1. Kalluskultur
 - 3.2.5.2. Zygoten- und Embryokultur
 - 3.2.5.3. Gametenkultur
 - Antheren und Mikrosporen
 - Fruchtknoten und Makrosporen
 - 3.2.5.4. Protoplasten und somatische Hybriden
 - 3.2.5.5. Transformation
 - 3.2.5.6. *in vitro*-Selektion
- 3.3. Zuchtmethoden
 - 3.3.1. Selektionsverfahren
 - 3.3.1.1. Massenauslese
 - 3.3.1.2. Individualauslese
 - 3.3.2. Kombinationsverfahren
 - 3.3.2.1. Kombinationszüchtung, Rückkreuzung
 - 3.3.2.2. Hybridzüchtung
 - 3.3.3. Resistenzzüchtung
 - 3.3.4. Qualitätszüchtung
 - 3.3.5. Haploidzüchtung
- 3.4. Prüfung des Zuchterfolges

1. Cytogenetik

1.1. CHROMOSOMENANZAHL

Der ausgeprägten morphologischen und physiologischen Differenzierung der Vertreter der Gattung *Nicotiana* entspricht ein unterschiedlicher Chromosomenbestand der einzelnen Arten. Während in den in Amerika vorkommenden Arten die Chromosomenanzahl überwiegend 24 beträgt, besitzen andere 18, 20 oder 48 Chromosomen. Australische Species dagegen haben 32 bis 48 Chromosomen mit allen Übergängen, ausgenommen 34 und 46. Die Chromosomengrundzahl, entsprechend dem haploiden Chromosomensatz, beträgt für etwa die Hälfte der bisher analysierten etwa 70 Arten $n = 12$, für weitere elf Species ist $n = 24$ Chromosomen. Andere Chromosomengrundzahlen werden mit $n = 9, 10, 16, 18, 19, 20, 21$ und 22 angegeben (DARLINGTON und WYLIE 1955; GOODSPEED 1961). Nach der von GOODSPEED (1954) verwendeten taxonomischen Einordnung von *Nicotiana*-Arten enthalten der Subgenus *Rustica* mit der Sektion *Rusticae* (*Nicotiana rustica* L.) und der Subgenus *Tabacum* mit der Sektion *Genuinae* (*N. tabacum* L.) nur Arten, die ein gerades Vielfaches der Chromosomengrundzahl besitzen, also z. B. 24 oder 48 Chromosomen. Der dritte Subgenus *Petunioides* dagegen umfaßt neben Arten mit geradem Vielfachen der Chromosomengrundzahl auch solche, die Aneuploide darstellen mit einer reduzierten Chromosomenanzahl.

1.2. CHROMOSOMENSTRUKTUR

Die Chromosomen der *Nicotiana*-Arten sind vergleichsweise kurze Chromosomen. Im Subgenus *Rustica* zusammengefaßte Arten besitzen fast ausschließlich Chromosomen mit zwei gleich langen Schenkeln. Im Subgenus *Tabacum* treten in den Genomen nebeneinander Chromosomen mit etwa gleich langen Schenkeln und solche mit einem sehr langen und einem sehr kurzen Arm auf. Das Verhältnis von metazentrischen zu acrozentrischen Chromosomen beträgt etwa 5 : 2. Im Subgenus *Petunioides* ist das entsprechende Armlängenverhältnis der Chromosomen etwa 1 : 1. Es ist festzustellen, daß die morphologische Vielfalt der Arten im Subgenus *Petunioides* zusammentrifft mit einer stärkeren Chromosomendifferenzierung. Ein ursächlicher Zusammenhang sollte daraus jedoch nicht abgeleitet werden.

1.3. CHROMOSOMENPAARUNG UND ALLOPLOIDIE

Die generative Vermehrbarkeit eines Organismus hängt von dessen Fähigkeit ab, Gameten auszubilden. Diese Fähigkeit wird entscheidend von einer geordneten Paarung aller Chromosomen während der Meiose be-

stimmt, wobei bevorzugt die Paarung homologer Chromosomen erfolgt. Homologe Chromosomen sind die sich entsprechenden Chromosomen aus dem mütterlichen und dem väterlichen Genom. Sie besitzen zueinander eine größere Homologie als zu den übrigen Chromosomen. Die entstehenden Paarungsverbindungen vereinigen entsprechend der Anzahl homologer Chromosomen zwei, vier oder mehr Chromosomen und führen zu einer Bivalent-, Quadrivalent- oder Multivalent-Konfiguration.

Aus der Beobachtung des Paarungsverhaltens der Chromosomen in Kreuzungsbastarden zwischen *Nicotiana*-Arten wurde geschlossen, daß eine große Anzahl von *Nicotiana*-Arten nicht diploide oder autopolyploide Formen darstellen, sondern allotetraploide Artbastarde sind.

Werden eine Art A mit dem Genom A und eine Art B mit dem Genom B miteinander gekreuzt, so ist trotz erfolgreicher Hybridisation nicht von einer Homologie aller Chromosomen auszugehen. Neben anderen Mechanismen führt dieses zu gestörter Chromosomenpaarung und daraus resultierender mehr oder weniger stark ausgeprägter Sterilität. Sind jedoch in dem Kreuzungsbastard das Genom A zweimal und auch das Genom B zweimal vertreten, so können Paarungen zwischen homologen Chromosomen jeweils innerhalb Genom A bzw. Genom B erfolgen. Damit finden zwei Teilmeiosen statt, die bei zeitlicher Koordination zu voller Fertilität führen. In dem geschilderten Beispiel wird ein aus den beiden unterschiedlichen, verdoppelten Genomen A und B zusammengesetztes allotetraploides Genom ebenso wie das Genom A oder das Genom B allein meiotisch verteilt.

Diese amphidiploiden Konstitutionen besitzen, neben einer Reihe anderer wichtiger Kulturpflanzenarten wie Raps und Brotweizen, auch *Nicotiana*-Arten. Es wird als sicher angenommen, daß die existierenden Arten mit 24 Chromosomen aus zwölfchromosomigen, die 48chromosomigen aus 24chromosomigen über den Weg der Allotetraploidie entstanden sind.

Nicotiana tabacum L. kann auf Grund taxonomischer Daten neben zwei Genomen von *N. sylvestris* mit je 12 Chromosomen zwei Genome entweder von *N. tomentosa* R. & P., *N. tomentosiformis* GOODSP., *N. otophora* GRIS. oder von einem anderen Vertreter der Sektion *Tomentosae* enthalten. Die Chromosomengrundzahl ist für alle genannten *Nicotiana*-Arten $n = 12$, so daß bei Allotetraploidie die Gesamtzahl der Chromosomen in *N. tabacum* $2n = 48$ beträgt mit der Grundzahl $n = 24$. Neben genetischen (GERSTEL 1960) und cytogenetischen (CAMERON 1965; CLAUSEN 1932 und KOSTOFF 1938) Studien diente auch die Resynthese von *N. tabacum* aus *N. sylvestris* \times *N. tomentosiformis* (BURK 1973) der Aufklärung der Genomkomponentenherkunft. Darüber hinaus wurden Isoenzymmuster (SHEN 1972 und TRINH et al. 1981), das Fraktion-I-Protein aus Blättern (KUNG 1976), b-Proteine nach Virusinokulation (AHL et al. 1982), Kern-DNA und Heterochromatin (NARAYAN und REES 1974) sowie die Tentoxin-Reaktion (BURK und DURBIN 1978) analysiert.

Es kann auf Grund der mit diesen sehr unterschiedlichen Bestimmungsmethoden erzielten Ergebnisse als gesichert angesehen werden, daß *N. tabacum* aus der Kreuzung von *N. sylvestris* als Mutter und *N. tomentosiformis* als Pollenelter entstanden ist. *N. otophora* ist nicht beteiligt.

In *Nicotiana rustica* L. sind die Genome von *N. paniculata* oder verwandter Arten wie *N. knightiana* GOODSP., *N. cordifolia* PH., *N. glauca* GRAH. u. a. und von *N. undulata* R. & P. enthalten. Die Chromosomenanzahl von *N. rustica* beträgt wie die von *N. tabacum* $2n = 48$ und die Chromosomengrundzahl $n = 24$.

Die Kombination der Arten erfolgt spontan in den sich überschneidenden natürlichen Verbreitungsgebieten und gezielt durch Kreuzung. Die Verdoppelung der Teilgenome kommt entweder spontan durch die Vereinigung zweier unreduzierter Gameten oder einer unreduzierten mit einer reduzierten Gamete zustande. Das Auftreten unreduzierter Gameten, die ebenso viele Chromosomen enthalten wie die somatischen Zellen und nicht die um die Hälfte reduzierten einer Gamete, ist trotz geringer Frequenz bei Pflanzenarten mit einer großen Anzahl von Samenanlagen und Pollen ein relativ häufiges Ereignis. Bei der Vereinigung einer unreduzierten mit einer reduzierten Gamete entsteht eine triploide Zygote, die im Verlauf der Embryogenese spontan den nur einmal enthaltenen Chromosomensatz „verdoppeln“ kann. Damit ist die Allotetraploidie erreicht.

Experimentell kann erfolgreich die Bildung unreduzierter Gameten oder die Verdoppelung zweier Teilgenome mit Hilfe von Colchicin bewirkt werden. Colchicin verhindert den Aufbau von Spindelfaserproteinen durch Blockierung der Schwefelbrückenbildung. Dadurch können die substantiell verdoppelten Chromosomen nicht auf zwei neue Kerne verteilt werden, so daß der nächste Teilungszyklus mit der doppelten Chromosomenanzahl beginnt.

Die allopolyploiden *Nicotiana*-Formen erbringen bei generativer Vermehrung eltergleiche Nachkommen. Die dazu notwendige Meiosekonstanz kann durch experimentelle Bedingungen gestört werden. Als Folge davon treten Pflanzen mit halber (haploider) Chromosomenanzahl auf, aber auch die Eliminierung (Monosomie) und die Addition einzelner (Trisomie) und mehrerer Chromosomen ist realisierbar.

Haploide sind zierlicher im Habitus als die Ausgangsformen, aus denen sie entwickelt wurden. Über die Gewinnung und die Bedeutung dieser Genotypen wird im Abschnitt „Sortenzüchtung“ (3.2.5.3. und 3.3.5) berichtet.

Monosomie sind u. a. geeignetes Ausgangsmaterial zur Zuordnung von Eigenschaften zu einzelnen Chromosomen und zum Studium von Chromosomenhomologien in Kreuzungen genetisch entfernt stehender Kreuzungspartner. Von *Nicotiana tabacum* ist ein kompletter Monosomensatz verfügbar, bestehend aus 24 Genotypen, denen jeweils eines der *N. tabacum*-Chromosomen fehlt. Eine ausführliche Beschreibung morphologischer und physiologischer Merkmale monosomer Tabakge-

notypen einschließlich der Kopplung mit anderen Eigenschaften wurde von SMITH (1979) und CAMERON (1959) zusammengestellt. Zur Analyse von Chromosomenhomologien kreuzten verschiedene Autoren alle 24 Monosome von *N. tabacum* mit unterschiedlichen *Nicotiana*-Arten. Die Ergebnisse der Chromosomenpaarung in den Hybriden werden nach einer von GOOD-SPEED (1945) vorgeschlagenen Einteilung von kompletter Paarung aller Chromosomen in Form von Bivalenten bis Minimumpaarung weniger Chromosomen klassifiziert. Aus den Meioseanalysen ist ersichtlich, daß Chromosomenverwandtschaften bestehen zwischen *N. tabacum* und Vertretern der Sektion *Tomentosae*, aber auch mit *N. sylvestris* (CLAUSEN und CAMERON 1944).

Trisome enthalten im Gegensatz zu Monosomen ein zusätzliches Chromosom. Alle auf diesem Chromosom liegenden Gene kommen deshalb in doppelter Ausführung vor und ergeben eine höhere Gendosiswirkung, die sich in entsprechender Phänotypenveränderung auswirkt. Von *N. tabacum* ist bisher keine komplette Trisomenseerie vorhanden.

Trisome sind wegen gestörter Chromosomenpaarung in der Meiose instabil. Sie können erst nach Verdoppelung des zusätzlichen Chromosoms als Tetrasome zu genetisch stabilen Genotypen führen. Der beschriebene Weg über die Trisomie zur Tetrasomie hat in der Pflanzen evolution zur Entstehung neuer Arten geführt und ist wahrscheinlich auch an der Artendifferenzierung innerhalb der Gattung *Nicotiana* beteiligt.

1.4. ALLOTETRAPLOIDIE UND EVOLUTION

Die Allotetraploidie ist ein wesentlicher genetischer Faktor, der die Entstehung einer großen Vielfalt von *Nicotiana*-Arten ermöglichte und innerhalb der Arten eine breite Variabilität eröffnet. Die nahezu weltweite Verbreitung mancher *Nicotiana*-Arten ist als Ergebnis dieser besonderen genetischen Konstitution anzusehen.

In *N. tabacum* und *N. rustica* beispielsweise ist jedes der beiden Teilgenome zweifach enthalten. Dadurch wird die genetische Information jeweils verdoppelt, und gleichzeitig erfolgt eine Pufferung gegenüber letalen und subletalen Mutationen. In jeder Meiose können darüber hinaus umfangreiche Umkombinationen ganzer Chromosomen zwischen den Teilgenomen und durch „crossing-over“ Rekombinationen zwischen den Chromatiden aller homologen Chromosomen erfolgen. Umkombination und Rekombination werden in nachfolgenden Generationen stabilisiert und erlauben die Selektion unterschiedlichster Genotypen. Der allopolyploide Status „puffert“ jedoch auch die Expression rezessiver Mutationen. Als Folge davon werden diese, verglichen mit diploiden Species, seltener aufgefunden und haben wahrscheinlich für die Evolution eine geringere Bedeutung gehabt.

2. Reproduktion

2.1. BLÜHVERLAUF UND KREUZUNGSTECHNIK

Die Anordnung der Staubgefäße und der Narbe in derselben Blüte ermöglicht die Selbstbestäubung, die bei vielen Arten des Subgenus *Petunioides* kleistogam, bei noch geschlossener Blüte, erfolgt. *N. tabacum* und *N. rustica* sind dagegen Arten, die unter optimalen Umweltbedingungen in der Regel erst bei geöffneter Blüte befruchtungsfähigen Pollen entlassen. Dieser wird vor allem von Insekten, aber auch durch Berührung und Wind verbreitet. Um Bestäubung mit pflanzeigenem Pollen auszuschließen, werden vor beabsichtigten Kreuzungen alle aufgeblühten Blüten und Samenkapseln entfernt und den noch geschlossenen Blüten die nicht „stäubenden“ Antheren durch Aufschlitzen der Blütenröhre seitlich mit der Pinzette entnommen. Der so präparierte Blütenstand wird gegen Pollen geschützt, beispielsweise mit Pergamintüten.

Die Narben der emaskulierten Blüten sind in der Regel am Tage nach der Kastration empfängnisfähig. Die Bestäubung mit Pollen des ausgewählten Kreuzungspartners erfolgt entweder durch Abstreifen einer „stäubenden“ Anthere mit einer Pinzette auf der Narbe oder durch Auftragen von reifem Pollen, der in einer Petrischale gesammelt wurde, mit einem Pinsel. Es empfiehlt sich, auch die als Pollenelter verwendeten Pflanzen durch Eintüten vor dem Einschleppen von Fremdpollen zu schützen.

Die bestäubten Blüten werden mit einer Kreuzungsnummer auf einem um den Blütenstiel befestigten Etikett gekennzeichnet. Nach der Bestäubung werden die Blütenstände wieder eingetütet. Pinzetten, Pinsel und Petrischalen müssen nach jeder Bestäubung mit Alkohol von anhaftendem Pollen gereinigt werden.

2.2. FERTILITÄT

Pollen und Eizellen von *N. tabacum* und *N. rustica* sind voll funktionsfähig, so daß bei Kreuzungen innerhalb der beiden Arten in der Regel hoher Samenansatz erzielt wird.

Auch Bestäubungen mit Pollen derselben Einzelpflanze (Selbstungen) führen bei *N. tabacum* und *N. rustica* in der Regel zu hohem Samenansatz. Über mehrere Jahre fortgesetzte Selbstungen, die bei diploiden Arten durch Inzuchteffekte schnell zu Wuchs- und Ertragsdepressionen führen, können bei *Nicotiana* über zehn und mehr Generationen ohne erkennbare Depressionen fortgesetzt werden.

2.3. INKOMPATIBILITÄT

Es sind aber auch Beispiele bekannt, in denen die Kreuzung fertiler *Nicotiana*-Pflanzen keinen oder nur stark

reduzierten Samenansatz ergibt. In *N. glauca* treten neben überwiegend selbstkompatiblen grünblühenden Pflanzen selten selbstinkompatible rotblühende Individuen auf. Die selbstkompatiblen Pflanzen zeigen bei Interspecies-Kreuzungen mit anderen selbstinkompatiblen *Nicotiana*-Arten keinen Samenansatz, wenn sie als Kreuzungsmütter verwendet werden. Kreuzt man innerhalb *N. glauca* selbstinkompatible Pflanzen mit selbstkompatiblen als Pollenelter, so erhält man keinen Samenansatz. Der Grund dafür ist ein Sterilitätssystem, das auf der Wirkung eines Sterilitätsgenes (*S*) beruht, das in mehreren Allelen vorkommt. Neun dieser *S*-Allele untersuchte PANDEY (1981) und fand, daß sieben davon in jeweils homozygotem Zustand das Pollenschlauchwachstum im Griffelgewebe verhinderten, zwei dagegen zuließen. Diese Form der Inkompatibilität ist sporophytisch durch das somatische Gewebe der Mutterpflanze determiniert und beruht auf einer Wechselwirkung von Pollengenotyp und Mutterpflanzengenotyp.

LABROCHE et al. (1983) analysierten mit dem *S*-Locus gekoppelte Peroxidase-Isoenzyme. Sie ermittelten durch Elektrophorese mehrere kathodische und anodische Peroxidasen, die von mehreren Genen mit zwei oder drei Allelen kontrolliert werden. Pollen mit inaktiven kathodischen Peroxidasen waren nicht befruchtungsfähig.

BREDEMEIJER et al. (1981) konnten durch Bestrahlung von Griffeln emaskulierter, selbstinkompatibler *N. alata*-Pflanzen kurz vor Bestäubung mit Pollen derselben Art die Peroxidase-Aktivität in den Griffeln reduzieren. Gemessen an der Entwicklung des Pollenschlauchwachstums im Griffel, konnte die Selbstinkompatibilitätsreaktion abgeschwächt, nicht aber aufgehoben werden.

Ein anderes, gametophytisch bestimmtes Sterilitätssystem ist bei *N. langsdorffii* bekannt. Hier bestimmt die genetische Konstitution des Pollens und der Eizelle, ob eine Befruchtung erfolgen kann.

2.4. MÄNNLICHE STERILITÄT

Die Bildung und Funktionsfähigkeit der männlichen Gameten kann bei vielen Pflanzenarten, auch bei *Nicotiana*, durch das Cytoplasma verhindert werden. Solche Pflanzen besitzen eine cytoplasmatisch bedingte männliche Sterilität, ein CMS-System, das durch mitochondriale DNA gesteuert wird. Morphologisch sind diese Genotypen durch unterschiedlich stark deformierte Antheren charakterisiert, von äußerlich unverändert (*N. rustica*-Cytoplasma) bis fehlend (*N. glauca*-Cytoplasma) und von gefiedert (*N. bigelovii*-Cytoplasma) bis blütenblattartig (*N. undulata*-Cytoplasma). Eine Zusammenstellung dieser und anderer phänotypischer Veränderungen geben ROSENBERG und BONNETT (1983). Ähnlich unterschiedlich verläuft die Mikrosporenbildung. Diese wurde bei zwei männlich sterilen *N. tabacum*-Genotypen mit *N. glauca*- und *N. plumbaginifolia*-Cytoplasma von ROSENBERG und BONNETT (1983) licht- und elektronenmikroskopisch analysiert. Schon

die Entwicklung der Stamen-Primordien ist funktionell der der Petalen ähnlicher und verläuft ähnlich weiter. Mikrosporen können nicht gebildet werden.

Nach Untersuchungen von NIKOVA (1981) an männlich sterilen Formen mit *N. repanda*-Cytoplasma degeneriert ein zunächst ausgebildetes Tapetum erst in den frühen Meiosestadien zusammen mit schon ausgebildeten Pollenmutterzellen. In sterilen Genotypen mit *N. suaveolens*-Cytoplasma wird kein sporogenes Gewebe ausgebildet (NIKOVA 1981). Die Herstellung männlich steriler Genotypen erfolgt bisher über die wiederholte Rückkreuzung eines interspezifischen F₁-Bastards (z.B. *N. undulata* × *N. nicotiana*), wobei *N. nicotiana* als Pollenelter verwendet wird. Dieses ist eine zeitaufwendige Prozedur, die nur zu dem erwünschten Erfolg führt, wenn der eine Kreuzungspartner ausschließlich das Cytoplasma, der andere die kerngenetische Information beisteuert. Für den männlich sterilen Bastard aus *N. undulata* × *N. tabacum* zeigten BURNS und GERSTEL (1981), daß nur eines der drei Satellitenchromosomen von *N. undulata* als Ganzes oder auch die nukleolusorganisierende Region allein ausreichen, um die männliche Fertilität zu restaurieren.

GERSTEL (1980) hat eine Übersicht über die *Nicotiana*-Sterilitätsplasmen gegeben. Der notwendige Zeitaufwand zur Herstellung Steriler kann wahrscheinlich in Zukunft durch den Einsatz von Sterilkulturtechniken verringert werden. Ausführungen dazu sind im Abschnitt „Ausgangsmaterial für die Züchtung“ (3.2.4. und 3.2.5.4.) enthalten.

2.5. SAMEN UND KEIMUNG

Die Samen von *Nicotiana*-Arten sind 0,4 bis 1,3 mm lang. Die Samenform variiert von oval über rund bis kantig und die Samenfarbe von hellbraun bis schwarz. Die Samenoberfläche ist netzförmig. Das Endosperm und der Embryo sind hell gefärbt.

Im Subgenus *Tabacum* treten Samen von 0,4 bis 0,6 mm Länge, von ovalelliptischer bis eckiger Form und hell- bis dunkelbrauner Farbe auf. Im Subgenus *Rustica* haben die Samen etwa dieselbe Größe, sind jedoch eckiger und dunkelbraun bis schwarz gefärbt.

Die Anzahl Samen pro Kapsel variiert stark. Im Subgenus *Tabacum*, also auch bei *N. tabacum*, enthält eine Kapsel zwischen 2500 und 4500 Samen. Von Arten des Subgenus *Petunioides* werden dagegen nur zwischen 100 und 700 Samen je Kapsel ausgebildet.

Das Tausendkorngewicht von *N. tabacum* beträgt im Mittel 0,085 g. Von einer *N. tabacum*-Pflanze können zwischen 100 und 400 Kapseln geerntet werden. Bei einer angenommenen Anzahl von 2500 Samen je Kapsel ergibt sich daraus eine Samenernte von mehr als 250 000 Samen, was einer Samenmenge von ungefähr 25 g je Einzelpflanze entspricht.

Von *N. rustica* werden etwa nur 25% der Samenanzahl von *N. tabacum* geerntet. Das Tausendkorngewicht ist aber etwa dreimal so hoch.

Nach Aussaat keimen Samen von *N. tabacum* vom

5. Tag an, die von *N. rustica* vom 3. Tag an. Die Keimung erfolgt überwiegend im Dunkeln und ist von + 8 °C an möglich. Die optimale Keimtemperatur liegt zwischen + 25 °C und + 30 °C. Die beiden Kotyledonen erscheinen zwischen dem 10. und 15. Tag nach Keimungsbeginn. Davor entwickelt sich eine starke Primärwurzel mit Seitenverzweigungen.

Tabaksamen sind, auch im Boden liegend, viele Jahre keimfähig. Im Normallager bei einer Luftfeuchte um 50% und etwa + 20 °C beträgt die Keimfähigkeit etwa 15 Jahre, bei Lagerung in tiefgefrorenem Zustand mehr als 30 Jahre.

3. Sortenzüchtung

3.1. ENTWICKLUNG DER SORTENZÜCHTUNG

Sorten von *N. tabacum* und *N. rustica* sind wahrscheinlich schon vor der Entdeckung Amerikas sowohl in Amerika als auch in Europa in Kultur genommen worden (GOODSPEED 1961). Beide Artenkreise haben daher eine lange züchterische Entwicklung durchlaufen.

Die Plastizität des Genoms von *N. tabacum* ermöglichte die Selektion einer großen Anzahl von Genotypen mit extrem unterschiedlicher Anpassungsfähigkeit an klimatische Gegebenheiten, Krankheitserreger, Verarbeitungsansprüche und Kulturtechniken. Zwischen 1759 und 1850 sind über 20 Genotypen beschrieben worden, die sich auffällig in äußeren Merkmalen unterscheiden und nach der geltenden Nomenklatur zum Teil als selbständige Arten anzusehen sind (GOODSPEED 1961).

Im Formenkreis von *N. rustica* wurden zwischen 1764 und 1899 vierzehn Arten bzw. Sorten beschrieben. Nach GOODSPEED (1961) sind derzeit drei Varietäten von *N. rustica* vorhanden, nämlich *N. rustica* var. *pumila* SCHRANK, *N. rustica* var. *brasilica* SCHRANK und *N. rustica* var. *pavonii* (DUNAL) GOODSP. Die beiden zuerst genannten Varietäten sind gärtnerisch entstandene Varianten, *N. rustica* var. *pavonii* scheint dagegen im Hochland von Ecuador und Peru eine ursprüngliche Form zu sein (GOODSPEED 1961).

Die augenblickliche Verbreitung von *N. tabacum*- und *N. rustica*-Sorten ist weitgehend von deren Verwendung beeinflusst. *N. tabacum*-Sorten werden im praktischen Anbau „weltweit“ kultiviert. *N. rustica*-Sorten werden in Mexiko, Osteuropa und Westasien angebaut, besitzen aber eine erheblich geringere wirtschaftliche Bedeutung als *N. tabacum*-Sorten.

Die aktuelle Sortenzüchtung bei Tabak ist auf die Bereitstellung von Sorten mit Resistenz gegen möglichst viele biotische und abiotische Schadverursacher ausgerichtet. Die verarbeitende Industrie stellt darüber hinaus Anforderungen an den Reifegrad einzelner Blätter und an die innere und äußere Qualität. Das Ziel der Tabakzüchtung ist es daher, Sorten zu schaffen, die dem sich ständig ändernden Optimum der Produktions- und

Verarbeitungstechnologie möglichst immer besser entsprechen.

3.2. AUSGANGSMATERIAL FÜR DIE ZÜCHTUNG

Als Ausgangsmaterial für die Sortenzüchtung dient ebenso wie bei vielen anderen Pflanzenarten züchterisch mehr oder weniger intensiv bearbeitetes Tabakmaterial. Als Besonderheit kommen wegen der Möglichkeit leichter Kreuzbarkeit andere *Nicotiana*-Arten hinzu und, ebenfalls als Besonderheit bei *Nicotiana tabacum*, über *in vitro*-Techniken hergestelltes Ausgangsmaterial.

3.2.1. Landsorten

Landsorten entstehen in lokal abgegrenzten Anbaubereichen weniger durch die Selektionstätigkeit eines Pflanzenzüchters als durch die über einen langen Zeitraum wirksame Selektion der natürlichen Umwelt. Landsorten haben daher eine breitere genetische Variabilität als Zuchtsorten. Bei *Nicotiana* gleicht sich die Variabilität jedoch wegen der Fremdbefruchtungscharakteristika stärker an, als dieses in selbstbefruchtenden Arten der Fall ist.

Landsorten wurden mit Beginn der intensiven züchterischen Bearbeitung von Pflanzenarten allgemein stark zurückgedrängt und sind heute im Erwerbsanbau nicht mehr anzutreffen. Internationale Genbanken und nationale Zuchtstationen konservieren Landsorten, um vor allem deren Resistenzen, Inhaltsstoffe und andere Eigenschaften für Züchtungsvorhaben bereitzustellen.

In einer umfangreichen Übersicht hat BOLSUNOV (1961) bereits 1961 78 Landsorten von *N. tabacum* und 32 Landsorten von *N. rustica* nach Herkunft, wirtschaftlichen Eigenschaften und typischen morphologischen und physiologischen Merkmalen zusammengestellt.

3.2.2. Zuchtsorten

Zuchtsorten sind das Produkt intensiver züchterischer Tätigkeit, die auf die Anforderungen der Produzenten und Konsumenten ausgerichtet ist. Da beide ein möglichst standardisiertes Produkt wünschen, wird die genetische Vielfalt innerhalb einer Sorte ständig mehr eingeschränkt, bis im Extrem eine Sorte aus den Nachkommen einer einzelnen homozygoten Pflanze entwickelt wird. Bei den Fremdbefruchtern *N. tabacum* und *N. rustica* ist diese Gefahr jedoch weniger gravierend, da der allopolyploide Status eine Restheterozygotie aufrechterhält.

Selektionen innerhalb von Zuchtsorten führen in der Regel nicht zu neuen Sorten. Selektionen werden aber als Kreuzungseltern in großem Umfang zur Kombination von Leistungsgenen eingesetzt.

3.2.3. Kreuzungsmaterial

Kreuzungen innerhalb bzw. zwischen *Nicotiana*-Arten sind teilweise sehr leicht, teilweise nur mit Schwierigkeiten möglich. Daraus folgt, daß ein Züchter zur Kombination erwünschter Eigenschaften nicht auf das Gen-Reservoir von *N. tabacum* oder *N. rustica* beschränkt ist, sondern daß auch genetisch entfernt stehende Genotypen eingekreuzt werden können.

Je weiter entfernt die genetische Verwandtschaft der Kreuzungspartner ist, um so weiter sind die Bastarde vom Leistungsniveau der Zuchtsorten entfernt. Der Züchtungsgang verlängert sich entsprechend.

3.2.4. Mutationen

Die allopoloide Konstitution von *N. tabacum* und *N. rustica* „puffert“ das Genom gegen erwünschte Gen-Mutationen. Es sind daher, mit diploiden Arten verglichen, nur wenige spontane Mutationen bekannt geworden. Eine davon, eine Chlorophyllmutante, wurde 1864 im Staat Ohio entdeckt. Mit dieser Mutante, die wegen hellgrüner Blattaufärbung keinen Selektionsvorteil in der natürlichen Evolution bietet, wurden alle Burley-Tabaksorten entwickelt. Spontane Mutationen betreffen auch den Wuchshabitus, den Nikotingehalt, die Blütenfarbe und andere Merkmale.

Die Induktion von Mutationen, die bei vielen diploiden Pflanzenarten eine gebräuchliche Methode zur Herstellung genetischer Variabilität darstellt, ist bei *Nicotiana*-Arten trotz Verwendung effektiver Mutagenzien wie Ethylmethansulfonat (EMS) und Röntgenstrahlen mit geringem Erfolg betrieben worden.

Zur Mutationsinduktion mit EMS, einem starken Kanzerogen, werden trockene oder vorgequollene Samen zwei bis vier Stunden lang bei + 20 °C in eine 0,2%- bis 0,5%ige Lösung von EMS in Wasser gelegt. Der Zusatz eines Benetzungsmittels fördert das Eindringen des EMS in den Samen und die meristematischen Zellen des Embryos. Nach der Einwirkungszeit werden die Samen unter fließendem Wasser zwei bis zehn Stunden nachgewaschen. Dadurch wird anhaftendes und in den Samen eingedrungenes EMS entfernt und die Entstehung toxischer Hydrolyseprodukte wie Ethylalkohol und Methansulfonsäure stark eingeschränkt. Generativ reproduzierbare Mutationen sind in der Regel frühestens in der M₂-Generation, also der der Behandlungsgeneration folgenden, zu isolieren.

Bei Verwendung von Röntgenstrahlen als Mutagen werden Samen oder Pollen, die zur Bestäubung verwendet werden, mit 200 Gy (20 krad) (WERNER et al. 1984) bestrahlt. Die Selektion der Mutanten erfolgt wie nach einer EMS-Behandlung.

Die Mutationsinduktion kann auch in Verbindung mit *in vitro*-Techniken (vergl. 3.2.5.) erfolgen. Dazu werden Strahlen als Mutagenzien wegen leichter Applikationsmöglichkeit bevorzugt (z. B. RAVEH 1983). ITOH und FUTSUHARA (1983) nutzten Röntgenstrahlen, um vor der Fusion von Protoplasten (vergl. 3.2.5.4.) in einem der beiden Fusionspartner genetische Variabilität zu induzieren. Ist jedoch eine Cytoplasma-Mutagenspe-

zifität erwünscht, so werden auch Chemikalien (z. B. Harnstoffderivate wie Nitrosomethylharnstoff oder Nitrosoguanidin (LÖRZ und SCOWCROFT 1983)) erfolgreich eingesetzt.

Als Grund für die geringe Mutationsfrequenz ist anzuführen, daß bei der Induktion von Genmutationen in der Regel nur ein Allel auf einem der homologen Chromosomen verändert wird. Da die mutative Veränderung in der Regel rezessiven Status hat, kann sie sich in den tetraploiden Somazellen praktisch nie und in den diploiden Gameten selten manifestieren. Die Verwendung von dihaploiden *in vitro*-Kulturen (vergl. 3.2.5.3. und 3.2.5.4.) ist als Ausweg anzuraten.

Den geschilderten Schwierigkeiten entsprechend ist die Zahl induzierter Mutanten, die als Ausgangsmaterial in der Sortenzüchtung verwendet werden, gering. In zwei neueren Publikationen berichten MURTHY et al. (1982) und RAO und MOSES (1982) über erzielte Mutantenspektren und Kreuzungsprogramme, in die einige Mutanten integriert wurden.

3.2.5. *In vitro*-Material

In den folgenden Abschnitten wird der Einsatz von *in vitro*-Techniken zur Herstellung von Ausgangsmaterial für die Tabakzüchtung dargestellt. Unter dem Begriff „*in vitro*-Techniken“ lassen sich Verfahren zusammenfassen, mit denen unter Verwendung von Nährmedien *in vitro* Explantate zu Zellteilungen und, wenn erwünscht, zur Morphogenese und Regeneration ganzer Pflanzen angeregt werden.

Die verwendeten Nährmedien enthalten als Trägersubstanz entionisiertes Wasser, dem lösliche Nährsalze, eine Kohlenstoffquelle und Wachstumsregulatoren wie Auxine, Cytokinine, Aminosäuren, Vitamine, Extrakte von Hefen, Kokosmilch u. a. zugesetzt werden. Zur Sterilisierung und Homogenisierung werden die Komponenten autoklaviert. Wenn hitzeinstabile Bestandteile zugefügt werden müssen, wird durch Filtration sterilisiert. Das Nährmedium kann durch Zugabe von Agar-Agar verfestigt werden.

Als Grundregel gilt, daß ein Nährboden um so mehr der aufgeführten Bestandteile bedarf, je weniger Zellen das kultivierte Explantat umfaßt. Während eine Sproßspitze *in vitro* ohne Wachstumsregulatoren zu einem Sproß aufwächst, erfolgen Zellteilung und Pflanzendifferenzierung aus einer isolierten Einzelzelle nur auf einem komplexen Medium.

Nicotiana-Arten haben seit 1960, dem Beginn intensiver Bemühungen um die Entwicklung von *in vitro*-Techniken, als Modellpflanzen gedient. Entsprechend umfangreich sind die gewonnenen Erkenntnisse. Davon sollen im folgenden jene dargestellt werden, die bei der züchterischen Entwicklung von *N. tabacum* bereits eingesetzt werden oder Fortschritte in der Tabakzüchtung erkennen lassen.

3.2.5.1. Kalluskultur

Zur Induktion einer Kalluskultur, die aus sich teilenden Zellen ohne Differenzierung besteht, können Blätter

und Sproßabschnitte von jungen Pflanzen, Antheren, Fruchtknoten oder Protoplasten verwendet werden. Die Blätter und Sproßabschnitte werden an der Oberfläche mit einer 0,05%igen Natriumhypochlorid-lösung drei bis fünf Minuten lang submers sterilisiert. Anschließend wird mit sterilisiertem Wasser nachgewaschen. Das Vorgehen für die übrigen Explantate ist in den Abschnitten 3.2.5.3. und 3.2.5.4. beschrieben. Die Blattflächen werden an einem Sterilarbeitsplatz, einer „clean bench“, in quadratische Explantate von etwa 3 mm Kantenlänge, die Sproßabschnitte in etwa 2 mm hohe Segmente zerschnitten. Die Explantate werden auf festem Nährmedium in Petrischalen kultiviert. Als Nährmedium kann ein Grundmedium nach MURASHIGE und SKOOG (1962) (MS-Medium (Tabelle 1)) verwendet werden, dem je Liter 0,2 mg bis 1,0 mg 2,4-D [2,4-Dichlorphenoxyessigsäure] zugesetzt ist. Die Inkubation erfolgt bei + 26 °C entweder im Dauerdunkel oder in einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden bei etwa 2000 lx Lichtintensität.

Nach etwa drei bis vier Kulturwochen entwickelt sich, von den Schnittflächen ausgehend, Kallus, der in Kulturpassagen von etwa vier Wochen auf frisches Nährmedium umgesetzt wird. Er wird für Selektionen *in vitro* eingesetzt (vergl. 3.2.5.6.) oder zur Sproßregeneration gebracht. Dafür ist der Kallus auf ein verändertes Nährmedium umzusetzen, das kein 2,4-D, dafür aber ein Cytokinin, beispielsweise je Liter 1,0 mg BAP [Benzylaminopurin], enthält. Die Pflanzenregeneration setzt etwa vier Wochen nach dem Nährbodenwechsel ein und erlaubt es, auf Grund der erzielbaren Regenerationsrate eine Einzelpflanze in praktisch unbegrenzter Anzahl vegetativ zu vermehren. Diese identischen Kopien sind zuchtmethodisch, etwa bei der Gewinnung von Hybrideltern, äußerst effizient zu nutzen.

3.2.5.2. Zygoten- und Embryokultur

Eine große Anzahl von Kreuzungen zwischen den *Nicotiana*-Arten führt zwar zu einem Samenansatz, dieser degeneriert aber vorzeitig und erbringt keinen reifen Samen. Die Ursache dafür ist vor allem in der Degeneration des polyploiden Endosperms zu sehen, die zu einer Verkümmern der Zygoten oder sich entwickelnder Embryonen führt. REED und COLLINS (1980) analysierten histologisch Kreuzungen zwischen *N. stocktonii* × *N. tabacum* und *N. repanda* × *N. tabacum* bzw. *N. nesophila* × *N. tabacum*. Die Endospermentwicklung war neun bzw. sieben Tage nach Bestäubung beendet und die Embryonen starben ab.

Ein Nährboden kann, wenn nicht Unverträglichkeiten der Genome beider Kreuzungspartner die Ursache für die Degeneration auch der befruchteten Eizelle sind, die Funktion des Endosperms übernehmen. Ein Teil der Zygoten und Embryonen kann dadurch *in vitro* zu Pflanzen aufgezogen werden. Dazu wird *in vivo* bestäubt, nach fünf bis zehn Tagen werden die bestäubten Blüten geerntet, die Samenkapseln an der Oberfläche wie beschrieben (vergl. 3.2.5.1.) sterilisiert und die befruchteten Eizellen dem Fruchtknoten mit Nadel und

Tabelle 1.

Makro- und Mikroelemente im Nährmedium nach MURASHIGE und SKOOG (1962).

Makroelemente (mg/l)	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikroelemente (mg/l)	
KJ	0,83
H ₃ BO ₃	6,3
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
CoSO ₄ · 6H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8

Pinzette entnommen. Kultiviert wird auf einem Grundnährboden nach MURASHIGE und SKOOG in halber Konzentration, dem außer 20 g bis 40 g Saccharose und 1 mg eines Vitamin B (z. B. Pyridoxin) je Liter nichts hinzugefügt wird. Die Inkubation erfolgt im 12stündigen Tag/Nacht-Rhythmus bei + 26 °C. Nach DULIEU (1976) sollen die sich entwickelnden Embryonen nach drei bis vier Wochen auf ein Medium mit nur 8 g Saccharose je Liter und damit erniedrigtem osmotischen Wert umgesetzt werden. Wüchsige Embryonen entwickeln sich jedoch innerhalb der ersten vier Kulturwochen zu Pflänzchen, die in Erds substrat überführt werden können. Das Umsetzen entfällt entsprechend. Von den bisher *in vitro* aufgezogenen Embryonen sind die von REED und COLLINS (1978) aus *N. nesophila* × *N. tabacum* und *N. stocktonii* × *N. tabacum* wichtiges Züchtungsausgangsmaterial. Sie besitzen Resistenz gegen „black shank“. Andere, kürzlich durch Kultur von befruchteten Eizellen realisierte Kombinationen sind *N. rustica* × *N. tabacum* (DOUGLAS et al. 1983; SHIZUKUDA und NAKAJIMA 1982; SHIZUKUDA et al. 1983), *N. rustica* × *N. glutinosa* (DOUGLAS et al. 1983), *N. tabacum* × *N. knightiana* (SLUSARKIEWICZ-JERZINA und ZENKTELER 1983), *N. tabacum* × *N. amplexicaulis* und *N. tabacum* × *N. bentamiana* (DE VERA und COLLINS 1983). REED (1980) konnte *in vitro* *N. repanda*, *N. stocktonii* und *N. nesophila*, die alle Resistenz gegen *Phytophthora parasitica* enthalten, mit *N. tabacum* kombinieren.

3.2.5.3.

Gametenkultur

Die Regeneration von Pflanzen aus Gameten führt zu haploiden Organismen, die nur noch die Hälfte der Genome der Ausgangspflanze besitzen und entsprechend auch nur die halbe Chromosomenzahl. Für *Nicotiana tabacum* bedeutet dieses, daß statt der jeweils zwei Genome von *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* nur noch je eines in der haploiden Pflanze enthalten ist und die Chromosomenanzahl statt 48 jetzt 24 beträgt. Nach geltender Nomenklatur handelt es sich, da insgesamt noch zwei Genome vorhanden sind, um Dihaploide. Haploide aus der diploiden *N. sylvestris* dagegen sind „echte“ Haploide mit nur einem Chromosomensatz. Sie sind Monohaploide. Dihaploide *N. tabacum* sind von zierlichem Wuchs und wegen völlig gestörter Chromosomenpaarung in der Meiose (vergl. 1.3.) steril. Werden jedoch beispielsweise durch Einwirkung von Colchicin die beiden Genome verdoppelt, so entstehen wieder allotetraploide, fertile Pflanzen.

Antheren und Mikrosporen

Monohaploide und Dihaploide können sowohl aus Pollen als auch aus Eizellen *in vitro* regeneriert werden. Wegen des erforderlichen präparativen Aufwandes ist jedoch allein die Verwendung von Pollen gebräuchlich. Diese werden entweder als „Antherenkultur“ in der Anthere kultiviert oder als „Pollenkultur“ in Form isolierter Mikrosporen. Wiederum wegen des größeren Aufwandes wird zur Herstellung von Haploiden die Antherenkultur eingesetzt, die NITSCH und NITSCH 1969 erstmals bei *N. tabacum* und *N. sylvestris* erfolgreich benutzten. Inzwischen sind von vielen *Nicotiana*-Arten die in Tabelle 2 aufgeführten Haploiden entwickelt worden.

Kulturtechnisch ist so vorzugehen, daß geschlossene Blütenknospen definierter Länge an der Oberfläche wie beschrieben (vergl. 3.2.5.1.) sterilisiert werden. Die Blütenknospenlänge dient als Parameter für das Meioseentwicklungsstadium der Mikrosporen in den Antheren. Nach umfangreichen Untersuchungsergebnissen ist mit einer Pflanzenregeneration dann zu rechnen, wenn für die sich entwickelnden Mikrosporen die erste Pollenkornmitose begonnen hat (SUNDERLAND und WICKS 1969). Dieses gilt für *N. tabacum*, nicht aber für viele andere *Nicotiana*-Arten, die andere Explantatoptima besitzen.

Den an der Oberfläche sterilisierten Knospen werden nach Auftrennen der Blumenkronenröhre die Antheren mit einer Nadel entnommen und auf ein festes oder flüssiges Nährmedium gebracht. Dieses kann ein Grundmedium nach MURASHIGE und SKOOG sein, dem bis zu 120 g/l Saccharose zugesetzt werden. Wachstumsregulatoren sind nicht zwingend erforderlich. Die Inkubation erfolgt bei + 26 °C entweder im Dunkeln oder im Tag/Nacht-Rhythmus bei ausgewogenem Mischlicht von etwa 2000 lx. Nach wenigen Tagen beginnen sich einige der Pollen zu teilen, wobei der vegetative Kern des Pollenkornes Mitoseteilungen durch-

Tabelle 2.

Haploide aus der Kultur von Antheren (A) oder Pollen (P) in *Nicotiana*-Arten.

Art	Explantat	Autor(en)
<i>N. alata</i>	A	NITSCH 1971
<i>N. attenuata</i>	A	COLLINS u. SUNDERLAND 1974
<i>N. clevelandii</i>	A	VYSKOT u. NOVAK 1973
<i>N. glutinosa</i>	A	TOMES u. COLLINS 1976
<i>N. knightiana</i>	A	TOMES u. COLLINS 1976 COLLINS u. SUNDERLAND 1974
<i>N. otophora</i>	A	COLLINS et al. 1972
<i>N. paniculata</i>	A	SHARMA et al. 1983 TOMES u. COLLINS 1976
<i>N. raimondii</i>	A	COLLINS u. SUNDERLAND 1974
<i>N. rustica</i>	P A	IMAMURA et al. 1982 TOMES u. COLLINS 1976
<i>N. sandera</i>	A	VYSKOT u. NOVAK 1973
<i>N. sylvestris</i>	A	TOMES u. COLLINS 1976 MISOO et al. 1984 SHARMA et al. 1983 NIZEKI et al. 1982
<i>N. tabacum</i>	A P	NITSCH 1974 HARADA u. IMAMURA 1983 MISOO et al. 1984 HEBERLE-BORS 1983 KEUM u. JEH 1981 DEATON 1983 DUNWELL 1980 JAVIER 1982 HARADA u. IMAMURA 1983 HEBERLE-BORS 1980. 1983 RASHID u. REINERT 1981 IMAMURA et al. 1982
<i>N. tomentosiformis</i>	A	MISOO et al. 1984

läuft, während der generative Kern degeneriert und sich nicht weiterentwickelt. Aus den Mitoseteilungen des vegetativen Kernes resultiert ein Embryoid.

Embryoide durchbrechen nach drei bis vier Kulturwochen die Antherenwand. Die Weiterentwicklung zu Pflanzen erfolgt auf einem MS-Medium, dem 0,1 mg bis 0,2 mg BAP je Liter zugesetzt wird. Nach insgesamt acht Kulturwochen können Sprosse auf einem MS-Grundmedium mit 1,0 mg bis 2,0 mg IAA [Indoleessigsäure] je Liter innerhalb von zwei Wochen bewurzelt und in Erds substrat überführt werden.

Beim Übergang von der Sterilkultur in die Erds substratkultur ist zu beachten, daß die umgebende Luftfeuchtigkeit zu Beginn, wie in den Sterilkulturgefäßen, etwa 100 % betragen muß und innerhalb von etwa drei Wochen auf 60 % abgesenkt wird.

Der Erfolg der Antherenkultur hängt entscheidend vom Genotyp der Spenderpflanze und vom Entwick-

lungsstadium der Mikrospore bei Beginn der *in vitro*-Kultur ab. Aber auch die Kulturbedingungen bei der Anzucht der Antherenspenderpflanze wie Lichtqualität, Nährstoffversorgung und Jahreszeit (DUNWELL und SUNDERLAND 1973; RASHID und STREET 1973) bestimmen den Erfolg der *in vitro*-Kultur.

Die Anzahl Regenerate je Anthere beträgt bei *N. tabacum* für Antheren aus verschiedenen Pflanzen, aber auch aus derselben Pflanze zwischen 0 und 50 und kann durch eine Vorbehandlung von Blütenknospen oder bereits aufgelegten Antheren bei +4 °C für 48 Stunden auf dem angegebenen hohen Niveau stabilisiert werden.

Für die Pollenkultur (PAEPE et al. 1983) werden Antheren wie beschrieben steril isoliert, dann durch Siebe mit 50 µm Maschenweite passiert, in flüssigem Nährmedium aufgenommen und durch Zentrifugation von Antherenwandstücken getrennt. Die Inkubation erfolgt in flüssigem Medium oder in einem sehr dünnflüssigen Agar, der über einen festen Nährboden geschichtet wird.

Die Pollenkultur hat für die Gewinnung von Hapliden keine Vorteile gegenüber der Antherenkultur. Sie könnte Bedeutung erlangen für die genetische Transformation mit Hilfe von Vektoren (vergl. 3.2.5.5.) oder die Selektion *in vitro* (vergl. 3.2.5.6.).

Fruchtknoten und Makrosporen

Die Kultur von Eizellen im Fruchtknoten oder im isolierten Zustand ist möglich. Die erzielbare Ausbeute Haploider ist gering, gelang aber u. a. bei *N. tabacum* (WU und CHENG 1982; ZHU et al. 1983) und *N. rustica* (WU und CHENG 1982).

Die Bedeutung Haploider als Ausgangsmaterial für die Tabakzüchtung ergibt sich zunächst daraus, daß sie sich für die Gewinnung von Protoplasten zur Herstellung somatischer Hybriden besonders eignen (vergl. 3.2.5.4.). Bei der Protoplastenfusion werden die Genome addiert, so daß somatische Hybriden aus normalen, allotetraploiden *N. tabacum*-Pflanzen oktoploid sind. Dieses ist züchterisch wertlos. Die Verwendung von Protoplasten aus haploidem *N. tabacum* führt dagegen wieder zu allotetraploiden Formen. Ferner ist die Selektion rezessiver Mutationen *in vitro* (vergl. 3.2.5.6.) nur im haploiden Genom möglich.

Als verdoppelte Haploide sind *N. tabacum*-Pollenregenerate wieder allotetraploid mit dem großen Vorteil, daß sie völlig homozygot sind. Sie spalten in ihren generativen Nachkommen nicht mehr auf. Diese genetische Konstitution kann, im Gegensatz zu erzwungener Selbstung, mit einem „Schritt“ erreicht werden. Verdoppelte Haploide sind deshalb rasch herstellbares Ausgangsmaterial zur Selektion geeigneter Eltern für die Hybridzüchtung (vergl. 3.3.2.2.).

Schließlich können über verdoppelte Haploide aus stark spaltenden Nachkommenschaften Genotypen entwickelt werden, die erwünschte Merkmalskombinationen besitzen, aber nicht mehr aufspalten. Der Zeitaufwand zur Gewinnung von beispielsweise resistentem Aus-

gangsmaterial nach Einkreuzung von Wildformen in *N. tabacum* verkürzt sich dadurch um mehrere Jahre.

3.2.5.4. Protoplasten und somatische Hybriden

Zellwände sind eine Besonderheit pflanzlicher Zellen und stellen einen mechanischen Schutz gegen Veränderungen des osmotischen Wertes und das Eindringen von Mikroorganismen dar. Sie sind außerdem eine Barriere, die die Fusion von Zellen mit dem Ziel einer somatischen Kombination genetischer Information verhindert.

Seit COCKING (1960) zunächst mit geringem Erfolg versuchte, die Zellwand enzymatisch abzubauen und damit Protoplasten zu gewinnen, hat eine bis heute anhaltende Entwicklung effizienter Enzymbehandlungen stattgefunden.

Der komplexe Vorgang der Protoplastengewinnung ist in vielen Teilabschnitten zu verändern. Deshalb soll im folgenden nur eine der möglichen Protoplastenisolierungen exemplarisch dargestellt werden. Abgewandelte und andere Methoden sind u. a. bei NEGRUTTU und MOUSSEAU (1981), SANTIESTEBAN et al. (1980), MAGNIEN et al. (1980) und SCOWCROFT und LARKIN (1980) beschrieben.

Protoplasten können aus allen Teilen einer *Nicotiana*-Pflanze gewonnen werden, auch aus Kalluskulturen. Bisher ist jedoch besonders einheitliches Material mit großer Ausbeute nur aus Blattmesophyllzellen zu isolieren. Vorgesehene Spenderpflanzen, die noch nicht blühen, werden etwa 24 Stunden bei +20 °C im Dunkeln gehalten. Junge, aber voll ausgewachsene Blätter werden geerntet, an der Oberfläche sterilisiert (vergl. 3.2.5.1.) und nach mechanischem Entfernen der Epidermis in feine Streifen zerschnitten. Anschließend erfolgt eine Inkubation von etwa 0,5 g Blattmasse mit zwei bis fünf Millilitern einer Enzymlösung, die zu 0,5% aus Cellulase, zu 0,5% aus Macerase und zu 0,125% aus Driselase besteht und in einem komplexen Protoplastenkulturmedium mit einem pH-Wert von 5,6 bis 5,8 aufgelöst ist. Dieses Medium enthält Makro- und Mikronährstoffe, verschiedene Zucker, Vitamine, organische Säuren, Auxin und Cytokinin (KAO und MICHAYLUX 1975) (Tabelle 3). Die Blattmasse wird vier bis fünf Stunden im Dunkeln bei +22 °C inkubiert und dabei zur Intensivierung der enzymatischen Reaktion gerollt oder geschüttelt. Die entstehende Suspension enthält außer Protoplasten Zellfragmente, Chloroplasten und nicht aufgeschlossenes Blattmaterial. Durch wiederholte Zentrifugation werden die Protoplasten abgetrennt und dann mit einer Dichte von 5000 bis 100 000 Zellen je Milliliter bei diffusem Licht und +26 °C kultiviert. Die Regeneration der Zellwand erfolgt innerhalb von 48 Stunden, es folgen Zellteilungen zwischen dem 2. und 5. Kulturtag. Den Kulturen wird wöchentlich frisches Kulturmedium zugesetzt, und nach vier bis acht Wochen können entstehende Kallusse zur Sproßregeneration auf ein festes Medium, beispielsweise das Grundmedium nach MURASHIGE und SKOOG (1962) (Tabelle 1),

Tabelle 3.
Protoplastenkulturmedium nach KAO und MICHAYLUK (1975).

Makroelemente (mg/l)	
KNO ₃	2500
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	150
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	150
FeSO ₄ · H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
Mikroelemente (mg/l)	
KJ	0,75
H ₃ BO ₃	3,0
MnSO ₄ · H ₂ O	10,0
ZnSO ₄ · H ₂ O	2,0
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025
Vitamine (mg/l)	
Inosit	100
Thiamin	10
Nicotinsäure	1
Pyridoxin · HCl	1
weitere Zusätze:	
Zucker (mg/l)	
Saccharose	250
Glucose	68400
Fructose	250
Ribose	250
Xylose	250
Mannose	250
Rhamnose	250
Cellobiose	250
Sorbit	250
Mannit	250

umgesetzt werden. Dieses Kulturmedium enthält 0,2 mg bis 1,0 mg BAP [Benzylaminopurin] und ermöglicht eine Sproßbildung innerhalb von sechs bis acht Wochen. Insgesamt werden wenigstens zehn Wochen benötigt, um aus *Nicotiana*-Protoplasten Sprosse zu gewinnen. Diese benötigen weitere zwei Wochen, um als bewurzelte Pflänzchen in Erds substrat überführt werden zu können.

Tabelle 3 (Forts.)

Mineralsalze (mg/l)	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	450
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	50
Vitamine (mg/l)	
Ascorbinsäure	2
Cholinchlorid	1
Calciumpanthothenat	1
Folsäure	0,4
Riboflavin	0,2
p-Aminobenzoesäure	0,02
Biotin	0,01
Vitamin A	0,01
Vitamin D ₃	0,01
Vitamin B ₁₂	0,02
Organische Säuren (mg/l)	
Zitronensäure	40
Fumarsäure	40
Apfelsäure	40
Natriumpyruvat	20
Wachstumsregulatoren (mg/l)	
2,4-D	0,2
6-BAP	0,5
NAA	1,0

Die ersten Pflanzen aus *Nicotiana*-Protoplasten zogen NAGATA und TAKEBE 1971 auf; die inzwischen aus *Nicotiana*-Arten hergestellten Protoplastenregenerate sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Die Protoplastenregeneration ist die Voraussetzung für die Gewinnung somatischer Hybriden. Für *Nicotiana* gelang die somatische Hybridisation erstmals CARLSON und Mitarbeitern bereits 1972. Sie „fusionierten“ *N. glauca* mit *N. langsdorffii*. Inzwischen wurden mehrere somatische Hybriden hergestellt. In Tabelle 5 sind somatische Hybriden zwischen *Nicotiana*-Arten zusammengestellt.

Es konnten aber auch somatische Hybriden zwischen *Nicotiana*-Arten und anderen *Solanaceae* hergestellt werden. Diese sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Als Ausgangsmaterial für die Tabakzüchtung besitzen diese zunächst keine Bedeutung.

Wie ist bei der Protoplastenfusion vorzugehen? Wie für die Gewinnung von Protoplasten soll auch für die Fusion ein praktikables Verfahren vorgestellt werden. Abwandlungen und Verbesserungen werden noch entwickelt. Eine Zusammenfassung wichtiger Literatur geben FLICK und EVANS (1984) und EVANS (1984).

Als wirksames Agens für die Fusion von Protoplasten findet Polyethylenglycol [PEG] Verwendung. PEG ermöglicht einen engen physikalischen Kontakt zwischen den Protoplasten und damit deren Fusion (KAO und

Tabelle 4.
Pflanzenregeneration aus Protoplasten in *Nicotiana*-Arten und Arthybriden.

Art bzw. Arthybride	Autor(en)
<i>N. acuminata</i>	BOURGIN et al. 1979
<i>N. alata</i>	BOURGIN et al. 1979 PASSIATORE u. SINK 1981 ZHANG 1981
<i>N. alata</i> (haploid)	BOURGIN u. MISSONIER 1978
<i>N. alata</i> × <i>N. sanderae</i>	FLICK u. EVANS 1983
<i>N. bonariensis</i>	BORKIRD u. SINK 1983
<i>N. debneyi</i>	PIVEN 1981 SCOWCROFT u. LARKIN 1980
<i>N. forgettiana</i>	PASSIATORE u. SINK 1981
<i>N. glauca</i>	BOURGIN et al. 1979
<i>N. langsdorffii</i>	BOURGIN et al. 1979 EVANS 1979
<i>N. longiflora</i>	BOURGIN et al. 1979
<i>N. nesophila</i>	EVANS 1979
<i>N. otophora</i>	BOURGIN et al. 1979 BANKS u. EVANS 1976
<i>N. paniculata</i>	BOURGIN et al. 1979
<i>N. plumbaginifolia</i>	GILL et al. 1979 KHVILKOVSYA 1981
<i>N. repanda</i>	EVANS 1979
<i>N. rustica</i>	GILL et al. 1979
<i>N. sanderae</i>	PASSIATORE u. SINK 1981
<i>N. stocktonii</i>	EVANS 1979
<i>N. sylvestris</i>	BANKS u. EVANS 1976 NAGY u. MALIGA 1976 PRAT 1983
<i>N. sylvestris</i> (haploid)	FACCIOTI u. PILET 1979
<i>N. sylvestris</i> × <i>N. otophora</i>	BANKS u. EVANS 1976
<i>N. tabacum</i>	BANKS u. EVANS 1976 NAGATA u. TAKEBE 1971 DAVEY et al. 1974 GAMBORG et al. 1979 VASIL u. VASIL 1974 CHEN et al. 1981a HARKINS u. GALBRAITH 1984 BARBIER u. DULIEU 1983 SHAKUROV 1982 LÖRZ u. SCOWCROFT 1983 RAVEH 1983
<i>N. tabacum</i> (haploid)	NITSCH u. OHYAMA 1971 RAVEH 1983
<i>N. tabacum</i> × <i>N. otophora</i>	BANKS u. EVANS 1976

Tabelle 5.
Somatische Hybriden zwischen *Nicotiana*-Arten nach Protoplastenfusion.

Somatische Hybriden	Autor(en)
Intraspezifisch	
<i>N. debneyi</i> + <i>N. debneyi</i>	SCOWCROFT u. LARKIN 1981
<i>N. sylvestris</i> + <i>N. sylvestris</i>	WHITE u. VASIL 1979
<i>N. tabacum</i> + <i>N. tabacum</i>	MELCHERS u. LABIB 1974 GLIMELIUS et al. 1981 GLIMELIUS u. BONNETT 1981 FLUHR et al. 1983 EVOLA et al. 1983
Interspezifisch	
<i>N. glauca</i> + <i>N. langsdorffii</i>	CARLSON et al. 1972
<i>N. nesophila</i> + <i>N. tabacum</i>	EVANS et al. 1982
<i>N. rustica</i> + <i>N. sylvestris</i>	GLEDDIE et al. 1983
<i>N. sylvestris</i> + <i>N. knightiana</i>	MALIGA et al. 1977
<i>N. tabacum</i> + <i>N. debneyi</i>	KOSAKOVSKA 1980
<i>N. tabacum</i> + <i>N. glauca</i>	BONNETT u. GLIMELIUS 1983 EVANS et al. 1980
<i>N. tabacum</i> + <i>N. glutinosa</i>	UCHIMYA 1982 HORN et al. 1983
<i>N. tabacum</i> + <i>N. knightiana</i>	NAGY et al. 1982
<i>N. tabacum</i> + <i>N. nesophila</i>	EVANS et al. 1981
<i>N. tabacum</i> + <i>N. otophora</i>	EVANS et al. 1983
<i>N. tabacum</i> + <i>N. plumbaginifolia</i>	SIDOROV et al. 1981 MENCZEL et al. 1982 MALIGA et al. 1982
<i>N. tabacum</i> + <i>N. repanda</i>	NAGAO 1982
<i>N. tabacum</i> + <i>N. rustica</i>	NAGAO 1978 CHEN et al. 1982, 1983 ANON. 1981a WANG et al. 1983
<i>N. tabacum</i> + <i>N. stocktonii</i>	EVANS et al. 1981
<i>N. tabacum</i> + <i>N. suaveolens</i>	BONNETT u. GLIMELIUS 1983
<i>N. tabacum</i> + <i>N. sylvestris</i>	ZELCER et al. 1978 MEDGESY et al. 1980 EVANS et al. 1983 GALUN et al. 1982 FLUHR et al. 1983 MEDGESY et al. 1980
<i>N. tabacum</i> + <i>N. undulata</i>	BONNETT u. GLIMELIUS 1983

MICHAYLUK 1974). Entscheidend dabei sind ein hoher Calcium-Ionenanteil im Medium und ein hoher pH-Wert.

Die Enzymlösung wird für Fusionsvorhaben nicht mit Nährmedium, sondern in 100 ml einer Lösung (pH-Wert: 5,8) aus Sorbit (0,5 M) und $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (5,0 mM) ausgewaschen. Die Protoplasten werden dann in die Fusionslösung (pH-Wert: 5,8) überführt, die Glucose (0,2 M), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (10 μM), KH_2PO_4 (0,7 mM) und 25 g PEG (Molekulargewicht: 1540) in 50 ml enthält. In dieser Lösung verbleiben die Protoplasten 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Eluierung des toxischen Polyethylenglycol werden die Protoplasten dann in 100 ml einer Lösung (pH-Wert: 10,5) aus Glycin (50 mM), Glucose (0,3 M) und $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (50 mM) zweimal zehn Minuten lang aufgenommen. Anschließend wird mit Protoplastenkulturmedium nachgewaschen.

Die Fusion soll möglichst in Einzelzellen, z. B. auf Objektträgern, erfolgen. Die weitere Kultur erfolgt in flüssigem Protoplastenkulturmedium, die Regeneration zu Pflanzen wie für die Protoplastenregeneration beschrieben.

Das Auffinden der gewünschten somatischen Hybriden ist schwierig, da neben überwiegend nicht fusionierten Protoplasten Fusionsprodukte zwischen Protoplasten des einen oder des anderen Donors auftreten. Da es nicht effektiv ist, zunächst alle Protoplasten zu Pflanzen aufzuziehen und dann die Fusionshybriden zu selektieren, werden „marker“ zum Auffinden der Hybriden eingesetzt.

Als „marker“ dient u. a. das Gen *Su* einer „sulfur“-Mutante. Im homozygot dominanten Vorkommen (*Su Su*) entstehen Albino-Formen, im heterozygoten Zustand (*Su su*) hellgrüne und als Wildtyp (*su su*) dunkelgrüne Pflanzen. Werden Protoplasten von *Su Su*-Genotypen mit solchen von *su su*-Genotypen fusioniert, so sind die Fusionshybriden an unterschiedlichen Chloroplasten kurz nach der Fusion oder spätestens an regenerierten Sprossen zu erkennen. EVANS et al. (1983) nutzten dieses System zur Selektion von *N. tabacum* + *N. sylvestris*, *N. tabacum* + *N. otophora* u. a. Hybriden. Als Abwandlung des *Su su*-Systems können durch Einsatz von Herbiziden reversible „Ausbleichungen“ an den Chloroplasten des einen Fusionspartners induziert werden (UHRIG, pers. Mitt.).

Vielfach werden unterschiedliche Resistenzen gegen Aminosäureanaloga, beispielsweise 5-Methyltryptophan und 5-Aminoethylcystein, zur Markierung der beiden Fusionspartner benutzt. Auf einem Nährmedium, das beide Substanzen enthält, wachsen nur Protoplasten, die aus der Fusion zwischen beiden Donorgentypen entstanden sind. WHITE und VASIL (1979) nutzten dieses Markierungssystem zur Selektion von Fusionshybriden bei *N. sylvestris*.

Durch isoelektrische Fokussierung läßt sich eine unterschiedliche Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase in *Nicotiana*-Arten nachweisen. LIN et al. (1986) nutzten diese Möglichkeit zur Unterscheidung von *N. otophora*, *N. acuminata* und *N. tabacum*. Dieser

Tabelle 6.

Somatische Hybriden zwischen *Nicotiana*-Arten und anderen *Solanaceae* und *Leguminosae*.

Somatische Hybriden	Autor(en)
<i>Atropa belladonna</i> + <i>N. chinensis</i>	GLEBA 1982
<i>Glycine max</i> + <i>N. glauca</i>	KAO 1977
<i>N. glauca</i> + <i>Lycopersicon esculentum</i>	EVANS et al. 1978
<i>N. glauca</i> + <i>Petunia hybrida</i>	LI et al. 1983 SUN et al. 1982, 1983
<i>N. tabacum</i> + <i>Lycopersicon esculentum</i>	EVANS et al. 1978
<i>N. tabacum</i> + <i>Salpiglossis sinuata</i>	NAGAO 1982
<i>N. tabacum</i> + <i>Solanum chacoense</i>	GAMBORG et al. 1978

Markierungsfaktor kann auch zum Auffinden von Fusionshybriden aus Protoplasten genutzt werden.

Eine weitere Markierungsmöglichkeit bietet die Verwendung von Fusionspartnern, die Komplementation zeigen. Diese erstreckt sich zum Beispiel auf Auxinautotrophie (CARLSON et al. 1972) oder andere gegenseitige Ergänzungen (GLIMELIUS et al. 1978).

Alle dargestellten Erkennungsmöglichkeiten von Fusionshybriden setzen die Markierung der Fusionspartner voraus. Daran wird mit großem Aufwand gearbeitet. Dieser Aufwand ist gerechtfertigt, da die Protoplastenfusion zunächst nur zur Herstellung von Ausgangsmaterial für die Tabakzüchtung eingesetzt werden kann. Dieses Ausgangsmaterial ist über andere Methoden nicht zu gewinnen und wird trotz größter Bedeutung nur in geringem Umfang benötigt.

Zunehmende Intensität und Dauer züchterischer Bearbeitung schränken die Variabilität einer Kulturpflanzenart laufend stärker ein. Dies erschwert oder verhindert u.U. sogar die Selektion von Genotypen, die an drastisch veränderte Anforderungen angepaßt sind. In einigen Kulturpflanzen, etwa dem Raps, wird deshalb versucht, durch Resynthese aus den Ausgangsformen ein nicht durch langjährige Selektion bereits fixiertes Ausgangsmaterial zu erstellen.

Bei *N. tabacum* ist eine eingeschränkte Selektionsmöglichkeit derzeit für einige Qualitätsparameter erkennbar. Zur Erstellung eines geeigneten Selektionsmaterials ist neben der Resynthese aus der Kreuzung *N. sylvestris* × *N. tomentosiformis* vor allem die somatische Hybridisation dieser Elternkomponenten, aber auch die Herstellung anderer Fusionshybriden ein Anliegen der Züchtungsforschung.

Die geschilderte Verwendung von somatischen Hybriden könnte sich nach Entwicklung effektiver Hybridisations- und Selektionstechniken rasch erweitern. In Kreuzungskombinationen steuert der mütterliche Partner fast das gesamte Cytoplasma bei. Es ist sicher, daß nach Kombination nicht nur im Zellkern, sondern auch in der im Cytoplasma festgelegten genetischen Information zusätzlich genetische Variabilität entsteht, die züchterisch genutzt werden kann. Da diese Effekte in züchterisch entwickeltem Material zu erwarten sind,

muß die verfügbare Anzahl somatischer Hybriden groß genug und entsprechend mit geringem Aufwand herstellbar sein.

Bei der Herstellung von Ausgangsmaterial für die Züchtung ist es das Ziel, die Ploidiestufe und die Chromosomenzahl von *N. tabacum* nicht zu verändern. Fusionsprodukte sollten deshalb aus dihaploiden und/oder anderen 24chromosomigen Genotypen hergestellt werden.

Eine Erweiterung der genetischen Variabilität ist auch von „Cybriden“ zu erwarten. Diese entstehen aus der Fusion von Protoplasten mit inaktivierten Zellkernen in einer der beiden Donor-Linien und besitzen die kerngenetische Information nur des einen Partners und, je nach Selektionskriterium, mehr oder weniger ausschließlich die genetische Information des Cytoplasmas des anderen Partners. MEDGYESY und Mitarbeiter (1980) markierten *N. tabacum* mit einer Streptomycinresistenz und inaktivierten den Zellkern mit Jodacetat. Sie fusionierten dann mit *N. sylvestris* und konnten streptomycinresistente Cybrid-Kalluse selektieren.

Cybriden könnten zur Herstellung von cytoplasmatisch männlich sterilen Kreuzungspartnern verwendet werden, die u. a. „konventionell“ durch Kreuzung genetisch entfernt stehender Arten entwickelt werden (vergl. 2.4.). Dabei wird durch wiederholte Rückkreuzung die kerngenetische Information der Kulturform in das Cytoplasma der Wildform eingelagert, eine aufwendige Prozedur. Die Erschließung von Sterilitätsplasmen ist auf die mit *N. tabacum* kreuzbaren Arten beschränkt. Es ist wünschenswert (vergl. 3.3.2.2.), andere männlich Sterile durch Herstellung von Cybriden zu gewinnen.

Zur Herstellung von Cybriden ist die Verwendung dihaploiden Ausgangsmaterials nicht erforderlich und eher überflüssig.

3.2.5.5. Transformation

Eine gegenüber der sexuellen und somatischen Hybridisation und der Mutationsinduktion weiter differenzierte Technik zur Herstellung genetischer Variabilität ist die Transformation. Bei der Transformation wird mit Hilfe eines Vektors genetische Information in eine Zelle eingebracht und dort in das vorhandene Genom integriert. Nach erfolgter Integration wird die „Fremdinformation“ mit dem Empfänger-genom während der Zellteilungszyklen, einschließlich der Gametenbildung, redupliziert und so an alle neu gebildeten Zellen weitergegeben.

Derzeit werden Vektoren unterschiedlichster Herkunft genutzt: Caulimoviren, Geminiviren, RNS-Viren, Viroide, stabile und instabile pflanzliche Genomkomponenten, *Agrobacterium rhizogenes* und *Agrobacterium tumefaciens*. Technisch am weitesten entwickelt ist der Vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Dieses Bakterium hat unter natürlichen Bedingungen einen großen Wirtspflanzenkreis. Nach Infektion kommt es zur Bildung von Pflanzentumoren.

Molekularbiologische Analysen zeigten, daß *A. tume-*

faciens wie viele andere Organismen auch außer dem Hauptgenom ein ringförmiges Extrachromosom enthält. Dieses Plasmid trägt die tumorinduzierende Region (daher die Bezeichnung Ti-Plasmid), aber auch eine Reihe anderer „Gene“. Dazu gehören solche, die eine Phytohormonautotrophie bewirken und die Klassifizierung der Ti-Plasmide in einen Octopin- und Nopalintyp ermöglichen.

Durch Manipulation kann das Plasmid umstrukturiert werden, wobei entweder die im Plasmid festgelegte genetische Information selbst verändert oder Fremdinformation eingefügt wird. Die Bezeichnung „Gentechnologie“ beschreibt anschaulich die dabei eingesetzten aufwendigen Verfahren. Als Empfängersysteme können sowohl Pflanzen *in vivo* als auch *in vitro*-Kulturen verwendet werden. Protoplastensysteme scheinen zur Zeit jedoch besonders geeignet zu sein.

Die Inkubation von *Nicotiana*-Protoplasten mit einem Wildtyp von *A. tumefaciens*, dessen Plasmid unverändert ist, führt auf einem phytohormonfreien Kulturmedium zu wenigen Kalluskolonien. Diese sind phytohormonautotroph auf Grund einer Transformation mit Plasmid-DNA (WULLEMS et al. 1981). Bei Verwendung eines Ti-Plasmids vom Nopalintyp entstehen nach Transformation von *Nicotiana*-Zellen Teratoma, Wucherungen mit blatt- und sproßähnlichen Gebilden, die sich auf Grund gestörter apikaler Dominanz nicht zu Sprossen weiterentwickeln. Wird dem Kulturmedium jedoch 1 mg Kinetin je Liter zugesetzt, so entwickeln sich normale Sprosse. YANG und SIMPSON (1981) zeigten, daß diese kein Nopalin synthetisieren konnten und auch nicht mehr hormonautotroph waren. SLOGTEREN und Mitarbeiter (1983) regenerierten *Nicotiana*-Sprosse nach Transformation mit einem Ti-Plasmid vom Octopintyp, mußten aber dazu dem Medium entweder Auxin und Cytokinin oder in einem anderen Fall nur Auxin zufügen.

GREVE et al. (1982) erhielten, ebenfalls nach Verwendung eines Ti-Plasmid-Wildtypes, Regenerate von *Nicotiana*. Diese transformierten Pflanzen besaßen die Fähigkeit zur Octopinsynthese, zeigten aber keinerlei Tumorinduktion. Diese Region war während der Regenerationsphase spontan eliminiert worden.

Umstrukturierte, beispielsweise durch eine Lysopin-Dehydrogenase veränderte Ti-Plasmide nutzten OTTEN und Mitarbeiter (1981) zur Übertragung dieser Eigenschaft auf *N. tabacum*. In vegetativen und generativen Nachkommen einer Pflanze wurde die Lysopin-Dehydrogenase exprimiert. Sie wird monofaktoriell dominant vererbt. HORSCH et al. (1984) übertrugen kürzlich eine Canamycinresistenz in Mesophyllprotoplasten, auch diese wird monogen vererbt. NETZER (1983) berichtet von einem gelungenen Transfer des Genes für Phaseolin, dem Speicherprotein der Phaseolus-Bohne, in *Nicotiana*.

Es ist in der Regel notwendig, nach erfolgreichem Transfer von genetischer Information *A. tumefaciens* mit Hilfe von Antibiotika abzutöten.

Die Technik des Gentransfers mit Hilfe von Ti-Plasmiden ist weit entwickelt. Besondere Schwierigkeiten ent-

stehen bei der Isolierung von Genen, die wichtige Eigenschaften bestimmen, bei deren Integration in das Plasmid, deren Multiplikation und bei der Integration in Empfängergenome. Ob in jedem Fall dann eine Genexpression erfolgt, ist nicht sicher, erscheint aber möglich.

3.2.5.6. *In vitro*-Selektion

Die Möglichkeit, Tausende von Kalluszellen oder Protoplasten auf kleinstem Raum kultivieren zu können, fordert den Einsatz mikrobiologischer Selektionstechniken geradezu heraus. Als Kopie dieser Techniken wurden dem Tabakkulturmedium zunächst Aminosäureanaloga (FLICK et al. 1981), Antibiotika (MALIGA et al. 1973), aber auch Herbizide (CHALEFF und PARSONS 1978), Fungizide (POLACCO und POLACCO 1977), Salze (DIX und PEARCE 1981) und Toxine (THANUTONG et al. 1983) zugesetzt.

Das *in vitro*-Selektionssystem ermöglicht es auf Grund der praktisch unbegrenzten Anzahl kultivierbarer Zellindividuen, auch sehr seltene Mutationen aufzufinden. Zur Herstellung von Ausgangsmaterial für die Züchtung haben selektierte Zelllinien jedoch nur Bedeutung, wenn daraus Pflanzen regeneriert werden (vergl. 3.2.5.1.) und diese die gewünschten Eigenschaften besitzen. Diese Eigenschaften müssen durch Samen auf die Nachkommen übertragbar sein. Beispiele dafür sind Herbizidresistenzen, und zwar gegen Paraquat (MILLER und HUGHES 1980) und Picloram (CHALEFF und PARSONS 1978) und gegen das Toxin von *Pseudomonas syringae* und *Alternaria alternata* (THANUTONG et al. 1983). Aber auch die Inokulation von Sterilkulturen mit dem Krankheitserreger selbst kann zur Selektion von resistenten Zellklonen und Pflanzen genutzt werden. PEASLEY und COLLINS (1983) selektierten so Resistenz gegen *Phytophthora parasitica* und MURAKISHI und CARLSON (1982) TMV-resistente Tabakpflanzen.

Schwieriger gestaltet sich das Selektionsverfahren, wenn indirekte Selektionsmethoden genutzt werden müssen. Dieses trifft beispielsweise zu für eine Krankheitsresistenz, wenn das Toxin des Erregers nicht bekannt ist oder nicht genutzt werden kann. Als klassisches Beispiel dafür soll die von CARLSON 1973 erfolgreich durchgeführte Selektion von „wild fire“-resistenten *Nicotiana*-Genotypen genannt werden. CARLSON selektierte in Zellkulturen von *Nicotiana tabacum* Zellen, die gegen das Aminosäureanalogon Methioninsulfoximin resistent waren. Nach einer mehrfach wiederholten Rücktestung wurden aus resistenten Kalluslinien drei Pflanzen regeneriert, die zusätzlich zu der Aminosäure-resistenz Resistenz gegen *Pseudomonas tabaci* besaßen. CARLSON selektierte die Resistenten aus etwa $1,9 \cdot 10^7$ Zellen, für die eine Kulturraumfläche von wenigen Quadratmetern notwendig war. Um vergleichsweise dieselbe Anzahl Tabakpflanzen zu kultivieren, hätte eine Fläche von etwa 200 000 m² mit Tabaksämlingen besetzt werden müssen. Der Aufwand für die Inokulation der Sämlinge ist unter ökonomischem Gesichtspunkt unwirtschaftlich und nicht realisierbar.

3.3. ZUCHTMETHODEN

Das angestrebte Ziel züchterischer Tätigkeit ist die Entwicklung von leistungsfähigen Genotypen, die über Samen vermehrt zu Beständen von einheitlichen Einzelpflanzen führt. Die Einheitlichkeit wird dabei weitgehend von der Agrotechnik und den angewendeten Verarbeitungstechnologien bestimmt. In Ländern, in denen Tabaksorten einen Sortenschutz besitzen, setzt die den Sortenschutz erteilende Behörde die geforderte Einheitlichkeit durch Vorgabe tolerierter Abweichungen für Pflanzenhöhe, Blattform, Behaarung, Blütenform, Leistungsfähigkeit etc. fest.

Die Homogenität einer Sorte bei gleichzeitig hoher Ertragsleistung ist durch unterschiedliche Zuchtmethoden zu erzielen. Die größere Einheitlichkeit erfordert in der Regel aufwendigere Methoden und/oder eine längere Zeit.

Im folgenden sollen Zuchtmethoden für *Nicotiana tabacum* dargestellt werden, die sich im genetischen Konzept grundsätzlich voneinander unterscheiden. In der Züchtungspraxis werden diese Basismethoden vielfach teilweise kombiniert und vor allem ständig den neuesten Erkenntnissen der Züchtungsforschung angepaßt.

3.3.1. Selektionsverfahren

3.3.1.1. Massenauslese

Bei der Massenauslese betrachtet der Züchter einen Tabakbestand als Population, aus der entweder unerwünschte Individuen entfernt oder erwünschte ausgelesen werden. Entsprechend kann von einer negativen oder positiven Massenauslese gesprochen werden. Erfolgt die Selektion vor der Blüte, so tragen die eliminierten Pflanzen nicht zur Bestäubung der verbliebenen bei. Die „bereinigte“ Population muß sich daher in der angestrebten Richtung verbessern.

Grundlegende Veränderungen können mit Hilfe der Massenauslese erst nach mehreren Selektionszyklen erreicht werden: Die zur Samenbildung kommenden Pflanzen entsprechen zwar phänotypisch, nicht aber in allen Fällen genotypisch dem angestrebten Zuchtziel. Die Selektionszyklen sind daher mehrfach zu wiederholen.

Werden die Auslesepopulationen gezielt durch Kreuzung von Genotypen mit zu kombinierenden Eigenschaften hergestellt, so läßt sich mit Hilfe der Massenauslese das Zuchtziel, etwa Veränderung des Carotinoidgehaltes, genetisch manifestieren. BEATSON et al. (1984) konnten aus einer Population nach zehn Selektionszyklen Genotypen mit sowohl hohem als auch niedrigem Gehalt an Gesamtcarotinoid selektieren, der aber nicht über bzw. unter dem der verwendeten Eltern genotypen lag. Außerdem führte die Selektion auf niedrigen Gesamtcarotinoidgehalt zu reduzierten Blatterträgen, ein nicht zwingend notwendiges Ergebnis. Bei einer Massenselektion auf hohes Sämlingsgewicht erhielten SANFORD und MATZINGER (1983) unbeabsichtigt Genotypen, die gleichzeitig früher keimten als andere.

Wegen des erreichten hohen Leistungsniveaus und effektiverer Züchtungsmethoden wird die Massenselektion heute, anders als im vergangenen Jahrhundert und zu Beginn dieses Jahrhunderts, nicht zur Neuzüchtung von Sorten eingesetzt. Sie hat aber eine große Bedeutung bei der Erhaltungszüchtung bestehender Sorten, sofern diese als Liniensorten geführt werden.

3.3.1.2. Individualauslese

Bei der Individualauslese geht der Züchter von einer vorhandenen oder durch Kreuzung hergestellten genetischen Variabilität aus. Aus dieser Formenmannigfaltigkeit liest er einzelne Individuen aus, die auf Grund ihres Habitus oder anderer Eigenschaften als besonders geeignet erscheinen. Wegen der allopolyploiden Konstitution von *N. tabacum* und seiner überwiegenden Fremdbestäubungseigenschaft sind die ausgelesenen Einzelpflanzen um so heterozygoter, je inhomogener die Auslesepopulation war. Entsprechend spalten die Nachkommenschaften der selektierten Einzelpflanze mehr oder weniger stark auf. Die Auslese ist so lange zu wiederholen, bis homozygote Genotypen entstanden sind. Diese „spalten“ in ihren Nachkommen nicht mehr auf.

Die Zunahme der Homozygotie erfolgt bei Steuerung der Fremdbestäubung unerwünschter Genotypen mit jeder Generation. Der Züchter kann diesen Vorgang jedoch beschleunigen, indem er eine Selbstbefruchtung innerhalb einer Pflanze erzwingt. Bei *N. tabacum* gelingt dieses mit den in den Abschnitten 2.3. und 2.4. dargestellten Ausnahmen leicht durch Einzelpflanzenisolierung. Die Selbstung kann in zehn und mehr aufeinanderfolgenden Generationen wiederholt werden, ohne daß die bei anderen, vor allem diploiden Arten häufig eintretende Inzuchtdepression mit Leistungsabfall auftritt.

Der Nachbau annähernd homozygoter Einzelpflanzen führt zu der mit der Individualauslese angestrebten Einheitlichkeit eines *Nicotianabestandes*, zu einheitlichen Linien. Der hohe Samenertrag je Einzelpflanze ermöglicht es, die erwünschte Einheitlichkeit schon in jungen Generationen, etwa in S_1 (1. Selbstungsgeneration) bis S_3 , zu überprüfen. Nach Prüfung der Leistungsfähigkeit (vergl. Abschnitt 3.4.) kann entweder die Nachkommenschaft eines einzelnen Individuums oder die von mehreren, relativ identischen Individuen als Sorte in den Anbau gebracht werden.

In den Jahren zwischen etwa 1925 und 1945 wurden weltweit viele bedeutende Tabaksorten durch Individualauslese aus Landsorten und aus anderer genetischer Variabilität entwickelt. Sie hat heute für die Neuzüchtung keine Bedeutung mehr.

3.3.2. Kombinationsverfahren

In allen Kombinationszüchtungsverfahren wird genetische Variabilität durch die Kreuzung selektierter Eltern

hergestellt mit dem Ziel, erwünschte Eigenschaften in einer Pflanze zu kombinieren und in deren Nachkommen zu konservieren.

3.3.2.1. Kombinationszüchtung, Rückkreuzung

Werden bei der Kreuzung nahe verwandte Eltern benutzt, beispielsweise zwei Tabaksorten, so ist eine F_1 -Generation mit Sorten-Leistungsfähigkeit zu erwarten. Die Auslese erwünschter Genotypen kann wegen zu erwartender Aufspaltung jedoch endgültig erst von den Generationen F_3 bis F_6 an erfolgen. Da bessere Genotypen als die bereits vorhandenen mit zunehmender Züchtungsintensität immer seltener auftreten, muß der Tabakzüchter mit einem möglichst breiten Kreuzungsmaterial beginnen. Dieses entsteht entweder aus vielen Kreuzungskombinationen mit jeweils wenigen Pflanzen oder wenigen Kombinationen mit jeweils vielen Pflanzen. Die Wahl des Vorgehens hängt davon ab, ob die zu erwartende Variabilität auf Grund von Testkreuzungen oder schon erfolgreichen Selektionen bekannt ist. Bei der ohne Mühe und mit hohem Samenansatz durchzuführenden Kreuzung wird in der Regel viel gekreuzt. Das umfangreiche daraus resultierende Pflanzenmaterial muß aus Kostengründen so schnell wie möglich auf das erfolgversprechende eingeeengt werden. Dazu werden die Samen der einzelnen Kreuzungskombinationen getrennt geerntet und als „Familie“ in der F_1 -Generation und den nachfolgenden Generationen mit 20 bis 50 Pflanzen angebaut. Als besonders negativ erscheinende Familien können komplett von der F_2 -Generation an verworfen werden. Von 100 Kreuzungsfamilien erreichen zum Beispiel nur zwischen 3 % und 5 % die F_4 -Generation, wenn die Möglichkeit der Frühselektion, etwa Resistenzprüfung von Sämlingen, genutzt werden kann.

Eine aussagefähige Beurteilung des agrotechnischen und verarbeitungstechnischen Wertes einer Familie ist jedoch frühestens von der F_4 -Generation, in der Regel erst von der F_5 -Generation an möglich. Durch die Anzucht von mehr als einer Generation je Jahr und die hohe Reproduktionsrate der Einzelpflanze ist die Beurteilung des Wertes einer Familie schon im zweiten oder dritten Jahr nach der Kreuzung möglich.

Der Züchter führt die besten ausgelesenen Familien entweder bis zur F_7 -Generation weiter und selektiert von dieser Generation an diejenigen mit Sorteneigenschaften. Er nutzt aber auch die Möglichkeit, durch Individualauslese, u.U. unterstützt durch Selbstungsgenerationen, von den Generationen F_3 bis F_5 an Einzelpflanzen-Nachkommen aufzuziehen und getrennt voneinander zu prüfen. Setzt er diese Selektion von Generation zu Generation fort, so erhält er einen Stammbaum („pedigree“) — daher die Bezeichnung „Pedigree-Züchtung“. Die besten Nachkommenschaften werden Sortenprüfungen unterzogen (vergl. Abschnitt 3.4.).

Werden zur Herstellung der Ausgangsvariabilität nicht Sorten, sondern genetisch entfernt stehende Kreuz-

zungspartner verwendet, so entstehen zunächst Bastarde ohne Anbauwürdigkeit im Sinne von Sorten. Die F₁-Bastarde sind hochgradig heterozygot, häufig steril und zeigen in nachfolgenden Generationen eine anhaltende starke Aufspaltung. In diesem Material lohnt sich in der Regel die Selektion auf Sorteneigenschaften erst in späteren Generationen. Die Zwischenzeit wird dazu „genutzt“, in jeder Meiose durch Umkombination und Rekombination selektierbare Genotypen entstehen zu lassen.

Ist dagegen der Transfer eines bestimmten Merkmals, etwa der Virusresistenz aus *N. glutinosa* in *N. tabacum*-Sorten, beabsichtigt, so werden von der F₃-Generation an durch Sämlingstest alle nicht wenigstens teilresistenten Pflanzen verworfen. Um möglichst schnell Leistungsfähigkeit und Sortencharakter zurückzugewinnen, werden nach Selektion der erwünschten Genotypen Leistungstypen eingekreuzt. In den Nachkom-

men wird streng nach Pflanzen ausgelesen, die resistent sind, aber sonst dem Leistungstyp entsprechen. Diese „Rückkreuzung“ mit dem Leistungstyp muß mehrfach bei unveränderter Selektion wiederholt werden. Je nach genetischer Distanz und Kopplung des zu integrierenden Merkmals mit unerwünschten Eigenschaften entstehen erst nach zehn bis 20 Rückkreuzungen Zuchtlinien. Diese werden, wie bei der Kreuzung zwischen Sorten beschrieben, zu Sorten entwickelt.

Die Kombinationszüchtung ist die gebräuchlichste Methode der Sortenzüchtung: Die Auswertung von 86 Sortenbeschreibungen in internationalen Zeitschriften der Jahrgänge 1981 bis 1983 ergab, daß 78 durch Kombinationszüchtung entstanden sind. Dabei wurde überwiegend von Einfachkreuzungen ausgegangen, seltener waren mehrere Kreuzungseltern eingeschlossen. Einige der Sorten sind in Tabelle 7 mit Angabe von Kreuzungseltern und Sorteneigenschaften aufgeführt.

Tabelle 7.
Beschreibung von Sorten, die durch Kombinationszüchtung entwickelt wurden.

Sortenname	Eltern	Zuchtmethode	Verbesserte Eigenschaften der Sorten	Autor(en)
'B 106' (Burley)	'Mito 3' 'Burley 21'	Kreuzung	Resistenz: TMV <i>Thielaviopsis basicola</i> <i>Alternaria longipes</i> Rauchqualität	OHORI et al. 1981 HARADA et al. 1981
'Windel'	'Virginia 115' 'Delhi 34'	Kreuzung	Ertrag Rauchqualität Blattfall Windtoleranz	WHITE et al. 1983 PANDEYA et al. 1982/1983
'VA 182' (Virginia)	'NC 95' 'Coker 319'	Kreuzung	Resistenz: <i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i> <i>Pseudomonas solanacearum</i> Seitentriebbildung Blütezeit (spät)	TERRILL et al. 1983
'82 OD 9' (TL 9)	'TL 38' 'TL 33'	Kreuzung nach Inzucht	Resistenz: <i>Erysiphe cichoracearum</i> TMV <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>nicotianae</i> Zucker (reduziert) Ertrag	LAMPRECHT et al. 1982
'Maryland 341'	'Catterton' Linien Md. 64	Kreuzung	Resistenz: TMV <i>Pseudomonas tabaci</i> <i>Fusarium oxysporum</i> weather fleck Alkaloide (weniger)	SKOOG et al. 1981
'Cabaiguán 72'	black tobaccos p-5-11 'Corralio'	Kreuzung	Resistenz: <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>nicotianae</i> Ertrag Qualität	BARROSO et al. 1980

Tabelle 7. Beschreibung von Sorten, die durch Kombinationszüchtung entwickelt wurden (Forts.).

'ZZ 100'	'Speight g 28' 'CSIRO 40 T'	Kreuzung	Resistenz: <i>Peronospora tabacina</i> <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>nicotianae</i> <i>Pseudomonas solanacearum</i>	ANON. 1980 b
'N 507' 'N 508'	'Shiroenshu 202' 'PD 121'	Kreuzung	Resistenz: <i>Alternaria alternata</i> <i>Phytophthora parasitica</i> TMV	OHBU et al. 1981
'BG 35' (Burley, Gleisdorf)	'Neptun' 'Poseldon' 'Semphyra' 'Burley Forchheim'	Komplexe Kreuzungen	Standfestigkeit Spätere Blüte und Reife	SCHIFFER 1982
'BG 37'	'Semperante' 'K27/2'	Kreuzung	Resistenz: Virus Pilze Standfestigkeit Größere Blätter	SCHIFFER 1982
'NC 744'	Rhodesische Sorte 'Coker 86'	Kreuzung verdoppelter Haploider	Resistenz: aggressive Virenrasse Toleranz: Kartoffel Y Virus	ANON. 1980 a
'Hybrid 17'	'Sandanski 144' (<i>N. debneyi</i> - Cyto- plasma) 'Immunyj 580'	Kreuzung, CMS	Resistenz: <i>Peronospora tabacina</i> Toleranz: <i>Phytophthora nicotianae</i>	TSIKOV U. POPIVANOV 1981
'ER 1' 'ER 2' 'ER 3'	'T.I. 1372'	Einfachkreuzung, Doppelkreuzung, Rückkreuzung	Früherer Erntetermin Pflücktermin (weniger) Ertrag Zucker (reduziert)	CHEN et al. 1981 c
'Dzhebel Basma 5'	'Dzhebel Basma 359' <i>N. goodspeedii</i> × <i>N. tabacum</i> <i>N. tabacum</i>	Dreifache Rückkreuzung	Resistenz: <i>Peronospora tabacina</i> <i>Erysiphe cichoracearum</i> <i>Pseudomonas tabaci</i>	PALAKARCHEVA et al. 1980
'Escambray 70'	'PW 1' 'Habana Ligero'	Pedigree-Selektion	Resistenz: <i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i> TMV Qualität	ESPINO et al. 1980
'Clemson PD4'	'Hicks Broadleaf' × 'Burley' 'NC 95'	Doppelkreuzungen	Ertrag Qualität	CURRIN et al. 1981
'Delgold'	'Virginia 115' × 'Barbor' 'Virginia 115' 'Hicks Broadleaf' 'Virginia 110'	Doppelkreuzung, Rückkreuzungen	Ertrag Qualität: Gesamtalkaloide (erhöht) Teer (vermindert) Nikotin (vermindert) Resistenz: <i>Thielaviopsis basicola</i> weather fleck	PANDEYA et al. 1981/1982
'F 112' 'F 113'	'Bright Yellow 4' 'Coker 319'	Kreuzung verdoppelter Haploider	Resistenz: 'F 112': <i>Pseudomonas solanacearum</i> <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>nicotianae</i> 'F 113': <i>Pseudomonas solanacearum</i>	KAWAMATA et al. 1983

3.3.2.2. Hybridzüchtung

Aus vielen Beobachtungen ist bekannt, daß die Leistung einer F_1 -Generation größer sein kann als die der darin enthaltenen Kreuzungseltern (AYCOCK 1980; BAYUBAY und LOPEZ 1980; CHAUDHARY und FAREED 1978; DE VERNA und AYCOCK 1983; AYCOCK 1980). Diese als „Transgression“ bezeichnete Erscheinung ist besonders ausgeprägt in Kreuzungsnachkommen von zwei oder mehreren Eltern, die mit Hilfe spezieller Testverfahren, dem „polycross“ und dem „topcross“, ausgelesen wurden. Die in diese Tests gestellten potentiellen Elterngenotypen sind selbst, zum Teil durch wiederholte Inzuchtung, weitgehend homozygot. Sie zeigen dadurch artbedingt häufig ausgeprägte Inzuchtdepressionen, wie Kümmerwuchs, reduzierte Reproduktivität und allgemeine Subvitalität.

In „polycross“- und „topcross“-Tests selektierte Genotypen besitzen eine allgemeine und eine spezielle Kombinationseignung in dem Sinn, daß sie in der F_1 -Generation Bastardwüchsigkeit oder Heterosis zeigen. Diese übertrifft die Leistung der Eltern um bis zu 20%, bezogen auf die Gesamtleistung.

Der Heterosiseffekt ist an die starke Heterozygotie der F_1 -Generation gebunden. Im Nachbau von F_1 -Hybriden tritt Aufspaltung ein, der einheitlich heterozygote Zustand wird aufgehoben und die Leistung sinkt unter das Niveau der Elterngenotypen ab. Diese Leistungsdepression ist besonders ausgeprägt in Einfachhybriden, die aus zwei Eltern entwickelt werden. In Doppelhybriden aus vier Eltern ist der Leistungsabfall geringer, das Heterosisniveau in der Regel aber auch niedriger als in Einfachhybriden.

Neben der größeren Ertragsleistung zeichnen sich Hybridsorten vor allem dadurch gegenüber anderen Sortentypen aus, daß sie aus genetisch sehr einheitlichen Einzelpflanzen zusammengesetzt sind. Dieses bietet vor allem für die technologische Verarbeitung des Ernteproduktes große Vorteile, da beispielsweise bei *Nicotiana* der Reifegrad der einzelnen Blätter, deren Inhaltsstoffzusammensetzung und deren Größensortierung sehr homogen ausfallen.

Der gravierende Nachteil von Hybridsorten ist an der einheitlichen Reaktion auch auf Schaderreger abzulesen. In den U.S.A. wurden in den 1970er Jahren Mais-Hybridsorten angebaut, die auf Grund desselben Sterilitätsplasmas eine hohe Anfälligkeit gegenüber *Helminthosporium maydis*, dem Erreger einer Streifenkrankheit, besitzen. Das Massenaufreten dieses Erregers führte zu Ertragsseinbußen von 50 %, die nur durch die Verwendung mehrerer anderer Sterilitätsplasmen jetzt zu verhindern sind.

Da die Hybridleistung an die F_1 -Generation gebunden ist, muß das Saatgut für den Anbau ständig aus den Elternteilkomponenten der Hybriden neu hergestellt werden. Dieses ist ein aufwendiges Verfahren, wenn der eine Kreuzungselter nicht „von Natur aus“ männlich oder weiblich steril ist. Die dafür genutzten Mechanismen sind cytoplasmatische männliche Sterilität (vergl. Abschnitt 2.4.) und Inkompatibilität (vergl. Abschnitt 2.3.).

Bei einigen Pflanzenarten kann, wegen räumlicher Trennung von männlichen und weiblichen Geschlechtsorganen, eine Emaskulierung leicht mechanisch zum Beispiel durch Entfernen der „Fahnen“ bei Mais erreicht werden.

Im Gegensatz zu anderen bedeutenden Pflanzenarten, wie Mais und Zuckerrübe, von denen weltweit fast ausschließlich Hybridsorten kultiviert werden, beschränkt sich der Anbau von Tabak- F_1 -Hybriden auf sehr geringe Flächenanteile. Als Grund dafür ist die mit anderen Sortentypen erzielbare hohe Leistung anzugeben und die Tatsache, daß F_1 -Hybriden ihr Leistungspotential nur bei optimaler Versorgung mit Nährstoffen, Wasser etc. ausschöpfen können. Deshalb ist „robustieren“, genetisch weniger eingegengten Sorten in vielen Tabakanbaugebieten derzeit der Vorzug zu geben.

Die Entwicklung der Tabakhybridzüchtung ist jedoch nicht beendet. Es stehen vor allem cytoplasmatisch männlich sterile Formen zur Verfügung, zum Beispiel aus *N. suaveolens* (CHAPLIN 1964) und anderen *Nicotiana*-Arten (BURK 1960; CLAYTON 1950; IZARD und HITIER 1955), die genutzt werden können. SFICAS und IOANNIDIS (1980) berichten von einer Möglichkeit, die Resistenz gegen *Peronospora tabacina* in Sorten einzulagern. Sie verwendeten männlich sterile Linien aus der F_1 -Generation von *N. suaveolens* × Orient- bzw. Burley-Sorten, die achtmal mit dem Sortenelter rückgekreuzt wurden. Die männlich sterilen Linien wurden von Hand mit Pollen von ausreichend gegen *Peronospora* feldresistenten Linien von Orient- bzw. Burley-Tabak bestäubt. Die erhaltenen F_1 -Samen keimten zu 85% bis 95% und lieferten Pflanzen mit folgenden Heterosiseffekten: bis zu 16% für Blattertrag, bis zu 15% für Qualität (gemessen als Gesamtalkaloidgehalt, als Brennwert und als Blattfrischgewicht/Trockengewicht-Index) und bis zu 95% für *Peronospora*-Resistenz.

3.3.3. Resistenzzüchtung

Die Resistenzzüchtung soll wegen ihrer wirtschaftlichen Bedeutung hier getrennt dargestellt werden, obwohl sie zuchtmethodisch den bereits behandelten Verfahren zuzuordnen ist. Die Darstellung umfaßt allgemeine Prinzipien der Tabakresistenzzüchtung. Detaillierte Angaben zu speziellen Krankheiten und Schädlingen enthält Tabelle 8, in der wegen der gebotenen Beschränkung des Umfangs „klassische“ und wenige neuere Arbeiten zusammengefaßt sind.

Die Widerstandsfähigkeit von Sorten gegenüber biotischen und abiotischen Faktoren steht heute im Vordergrund der praktischen Tabakzüchtung.

Voraussetzung für die Resistenzzüchtung ist eine Analyse des Schaderregers oder der Pflanzenkrankheit. Diese Analyse ist wesentlich für die Massenvermehrung des Erregers, der für Inokulationen benötigt wird. Ferner müssen Inokulations- und Infektionsbedingungen handhabbar sein, um resistente Genotypen sicher aus einem genetisch divergierenden Ausgangsmaterial frühzeitig auslesen zu können. Im Freiland auftretender na-

Tabelle 8.
Resistenzquellen für wichtige Krankheiten und Schaderreger sowie Resistenzausprägung.

Resistenzquelle	Resistenz	Autor(en)
1. VIREN		
1.1. Gurkenmosaikvirus [CMV, cucumber mosaic virus]		
Linie 470, 413, 418	Toleranz	CHEN et al. 1981b
Linie GAT 2, GAT 4	Unvollständige Immunität, Gene: N, rm ₁ , rm ₂ , t ₁ , t ₂	CHEN et al. 1983b
'Holmes'	Unvollständige Immunität, Gene: N, rm ₁ , rm ₂ , t ₁ , t ₂	WAN et al. 1984
1.2. Kartoffel Y Virus [PVY]		
'Enshu', Okinawa 1, 'Perevi', Virgin A Mutante	Stamm T-Resistenz, je ein rezessives Gen	YAMAMOTO u. SATO 1982
'Perevi', Virgin A Mutante	Je ein rezessives Gen mit pleiotroper Wirkung	YAMAMOTO u. MIYACHI 1983
Resistente Sorten und Linien	Nekrosen	SUZUKI et al. 1983
<i>N. africana</i>	Immunität	LUCAS et al. 1980
<i>N. benavidesii</i> , <i>N. glauca</i> , <i>N. raimondii</i> , <i>N. tomentosiformis</i> , <i>N. wigandiovdes</i> , Virgin A Mutante	Immunität	BURK et al. 1982
<i>N. tomentosa</i> , Selektion 58 G	Stamm M ^S N ^R , Nekrosen, ein dominantes Gen	RUFTY 1982
1.3. Tabakmosaikvirus [TMV, tobacco mosaic virus]		
H 76, 'Cavalla'	Nekrosen, ein rezessives Gen	} LAMPRECHT u. LOUW 1981
'Trapezunt'	Ein dominantes Gen aus <i>N. glutinosa</i>	
<i>N. glutinosa</i> , <i>N. debneyi</i>	Hypersensitivität, Gen N	AHL et al. 1983
T 66	Ambalema-Toleranz	QUINTERO u. SANTIESTEBAN 1980
<i>N. glutinosa</i>	Nekrosen	HARTANA 1981, 1983; VALLEAU 1961; WIDOYO u. HARTANA 1980
<i>N. glutinosa</i> × <i>N. debneyi</i>	Hypersensitivität	AHL u. GIANINAZZI 1982
Stamm 1504 aus U.S.A.	Lokale Läsionen	CHUNG et al. 1980
'Vamorr 50' (<i>N. glutinosa</i>)	Nekrosen	SASTRI et al. 1981
'Samsun', 'Samsun NN'	Gen N	LAAT u. LOON 1983
'Samsun', 'Samsun NN'	Hypersensitivität	KONATE et al. 1982
'Xabthi — nc'	Gen N (nekrotische Lokalläsionen)	} FRASER 1983
'White Burley'	Gen N' (Lokalläsionen)	
'Vamorr 50'	Ein dominantes Gen	SASTRI et al. 1982
Md. 872, Md. 201	Hypersensitivität	DIALLO et al. 1981

Tabelle 8 (Forts.).

Resistenzquelle	Resistenz	Autor(en)
<i>N. tabacum</i> 'Immunyl 580' × <i>N. setchellii</i>	Immunität	LAR'KINA U. SEMENOVA 1981
'Maryland 341' aus Md. 10 × Md. 64	Resistenz	McKEE 1982
'888' und 854, 733, 432	Ein dominantes Gen	} MANUN U. PALAKARCHEVA 1981
Linie 8	Zwei dominante Gene	
'Ambalema'	Zwei bis drei rezessive Genpaare, Virusvermehrung in Blättern verringert	VALLEAU 1961
1.4. Tabak etch Virus [TEV, tobacco etch virus]		
T.I. 1406	Verringerte Virusvermehrung und Ausbreitung, ein rezessives Gen	JOHNSON 1980
'Md. 64'	Toleranz	DIALLO et al. 1981
1.5. Tomato spotted wilt		
<i>N. alata</i>	Hypersensitivität, zwei dominante Gene	GAJOS 1981
<i>N. rustica</i> × <i>N. glauca</i>	Voll resistent	} VINOGRADOV et al. 1982
'Dubec 44' × <i>N. glauca</i>	Symptomlos	
2. BAKTERIEN		
2.1. <i>Pseudomonas solanacearum</i> E.F.S. [bacterial wilt disease] (Übersicht über die Resistenzzüchtung in KELMAN (1953))		
'Bright Yellow 4' × 'Coker 319'	Resistenz	KAWAMATA et al. 1983
3. PILZE		
3.1. <i>Alternaria alternata</i> [tobacco brown spot]		
'Beinhart 1000-1'	Nekrotische Läsionen	SU U. SUN 1981
'Florida', 'Bauer', 'Beinhart 1000' und 'Beinhart 1000-1', 'Ambalema'	Resistenz	STAVELY et al. 1981
3.2. <i>Erysiphe cichoracearum</i> D.C. [powdery mildew]		
H 76 ('Kuofan'-Resistenz), 'Cavalla'	Ein rezessives Gen	} LAMPRECHT U. LOUW 1981
'Trapezunt'	Ein dominantes Gen	
Irabourbon N1	Toleranz	SARAGONI 1981
'Kuoten', <i>N. debneyi</i> , <i>N. glutinosa</i>	Toleranz	SARAGONI 1982
<i>N. glutinosa</i>	Immunität	} DELON U. SCHILTZ 1982
'Kutsaga FI', 'Kokubu', 'TL 33', 'H 76', 'PMR'	Resistenz	

Tabelle 8. Resistenzquellen für wichtige Krankheiten und Schaderreger sowie Resistenzausprägung (Forts.).

Resistenzquelle	Resistenz	Autor(en)
<i>N. glutinosa</i>	Resistenz	COHEN et al. 1983.
<i>N. debneyi</i> , <i>N. tomentosiformis</i>	Immunität	COHEN 1982
'Kuantan'	Zwei rezessive Gene	SASTRI et al. 1982
<i>N. glutinosa</i> , <i>N. debneyi</i>	Partielle Resistenz	ITAGAKI U. NAKAMURA 1981
3.3. <i>Peronospora tabacina</i> [blue mold]		
'Ege 64', 'Ege 64' × <i>N. debneyi</i>	Resistenz	EMIROĞLU et al. 1979
Sorten mit R-Gen	Hohe Resistenz	VINOGRADOV U. NAUMENKO 1981
'Immunyi 580' × <i>N. setchellii</i>	Resistenz	LAR'KINA U. SEMENOVA 1981
'Hicks Lea', 'Ege 64' × <i>N. debneyi</i>	Resistenz	INCEKARA U. EMIROĞLU 1982
'Ostrolist 1519', 'Samsun 417', 'Soboldiskii' u.a.	Resistenz gegen PT 2	PASHCHENKO 1983
'Bel 61-10', Hybrid 10	Resistenz korreliert mit Blattproteingehalt (Asparagin, Phenylalanin)	PASHCHENKO 1982
'V. Hercegovac' × 'VH 32'	Resistenz	BELJO et al. 1982
3.4. <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>nicotianae</i>		
'OS 802'	{ Resistenz Dominante Polygene	ANON. 1981b
		WIDOYO U. HARTANA 1980
'F 112'	Resistenz	KAWAMATA et al. 1983
3.5. <i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i> [black shank]		
'Burley 49' × 'Burley 21' und 'Ky. 10'	Resistenz	YOSHIDA et al. 1981
<i>N. tabacum</i> , <i>N. longiflora</i>	Monogen und polygen	DEATON et al. 1982
'North Carolina 88'	Partielle Resistenz	} MOORE U. ORCUTT 1982
'North Carolina 1071'	Volle Resistenz	
'TV' × 'G. of Vorstenland'	Resistenz	WIDOYO 1981
'McNair 944'	Volle Resistenz	} GRANT U. REILLY 1982
'Coker 319'	Partielle Resistenz	
BL 3003, BL 3009	ähnlich L8-Resistenz	GUPTON 1982
'Coker 411', 'NC 82'	Resistenz	SHAW 1983
L8	Resistenz	LEGG et al. 1982
3.6. <i>Thielaviopsis basicola</i> [black root rot]		
'Ky. 17'	Resistenz	ANDERSON U. WELACKEY 1982
<i>N. debneyi</i> , 'Burley 49'	Kopplung mit anderen <i>N. debneyi</i> -Merkmalen	LEGG et al. 1981
<i>N. debneyi</i>	Resistenz	LITTON 1983

türlicher Befall ist dazu wegen der Unsicherheit und von Vegetationsperiode zu Vegetationsperiode schwankender Befallsstärke nicht effizient einsetzbar.

Die Suche nach resistentem Material beginnt in der Regel in Sorten oder Genotypen mit Anbaueignung. Es ist überraschend, daß häufig in diesen die fehlenden Resistenzen gefunden werden, beispielsweise die gegen *Peronospora tabacina* (SFICAS und IOANNIDIS 1980).

Können die Resistenzen nicht aus den Kulturformen ausgelesen werden, wird genetisch entfernt stehendes Material, bis hin zu Vertretern anderer *Nicotiana*-Arten, untersucht. Die Selektion erfolgt entweder direkt nach Einwirkung des Schadverursachers oder „indirekt“, indem mit der Resistenzreaktion in Verbindung stehende Systeme analysiert werden. Eines dieser Systeme ist das b-Protein, das in Blättern resistenter *Nicotiana*-Pflanzen zusammen mit einer Hypersensitivitätsreaktion auf Virus- (GIANINAZZI et al. 1970; VAN LOON und VAN KAMMEN 1970), Bakterien- (AHL et al. 1981) und Pilz-Infektion (GIANINAZZI et al. 1980) gebildet wird. Anstelle einer Inokulation mit Tabakmosaikvirus können Polyacrylsäure (GIANINAZZI und KASSANIS 1974; ANTONIV und WHITE 1980) oder Aspirin (WHITE 1979) zur Induktion einer b-Proteinbildung in TMV-resistenten Pflanzen verwendet werden.

In praktisch allen Selektionen entsprechen die Resistenzen nicht der für eine Sorte geforderten Leistungsfähigkeit. In allen Fällen soll in einer Tabakpflanze nicht nur eine Resistenz vorliegen, sondern es müssen möglichst viele Resistenzen und dazu auch noch solche gegen verschiedene Pathotypen desselben Erregers kombiniert werden. Dieses ist nur durch Kombination verschiedener Selektionen möglich.

Der Kreuzungsaufwand richtet sich nach der genetischen Verwandtschaft der Kreuzungspartner, der genetischen Grundlage der Resistenz und der Kopplung der Resistenz mit unerwünschten Eigenschaften. Es kann davon ausgegangen werden, daß der Transfer einer Resistenz aus genetisch angepaßten Resistenzträgern, die von einem Faktor kontrolliert wird, etwa drei bis fünf Generationen nach der Einkreuzung realisiert ist. Wird dagegen eine Resistenz aus einer Wildform in *Nicotiana tabacum* übertragen, die monogen kontrolliert wird, so sind zwischen sieben und zehn Generationen nötig, um Resistente mit Sortencharakter zu erhalten. LEGG et al. (1982) zeigten dieses für *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* Rasse 0 aus *N. longiflora*. Zeitlich und materiell aufwendiger ist der Transfer einer Läuse- (*Myzus persicae*) und Raupenresistenz (*Spodoptera litura*) aus *Nicotiana gossei* (RAO et al. 1980). Die bereits in der F₁-Generation auftretenden resistenten Pflanzen „spalten“ in nachfolgenden Generationen stark auf. Wie die cytologische Analyse ergab, besitzen alle resistenten Pflanzen neben den *N. tabacum*-Chromosomen zusätzlich eine unregelmäßige Anzahl von *N. gossei*-Chromosomen. Eine stabile, auf die Nachkommen übertragbare Resistenz ist erst dann zu erwarten, wenn die Resistenzeigenschaft durch Translokation auf eines der *N. tabacum*-Chromosomen übertragen ist. Dieser

Vorgang kann durch Mutationsinduktion beschleunigt werden.

Eine Resistenz ist nicht dauerhaft. Kurze Reproduktionszyklen und Vermehrungsraten, die um Zehnerpotenzen über der von *N. tabacum* liegen, ermöglichen vor allem den Krankheitserregern, innerhalb kürzester Zeit, neue und auch aggressivere Genotypen auszubilden. Diese können die Resistenz überwinden — die Tabakpflanze ist wieder anfällig. Dieser Prozeß wird durch Anbauausweitung, die Verwendung weniger Sorten auf großen Anbauflächen und veränderte Kulturtechniken noch beschleunigt. Die Züchtung und Kultur hochgradig resistenter Sorten und der Einsatz von äußerst wirksamen Pflanzenschutzmitteln tragen zusätzlich zur Selektion aggressiver Erreger bei.

Ein „modernes“ Resistenzzüchtungskonzept strebt Sorten mit einer mittleren Resistenz an. Dringend ist zu empfehlen, diese Sorten nach dem Prinzip der wirtschaftlichen Schadschwelle mit Pflanzenschutzmitteln zu behandeln und auch Sortenmischungen zu erproben. Diese Mischungen enthalten Genotypen mit unterschiedlichen, schwachen Resistenzen und haben zum Beispiel im Gerstenanbau bereits große praktische Bedeutung erlangt (WOLFE et al. 1981). Die Resistenzmischungen verlängern die Reproduktionsdauer und verringern die Reproduktionsrate von Erregern. Der Züchter kann so den Erfolg seiner Resistenzbemühungen verlängern und dadurch wirtschaftlicher gestalten.

3.3.4. Qualitätszüchtung

Qualitätsmerkmale unterliegen ebenso wie andere Merkmale einer genetischen Kontrolle. Sie sind deshalb durch züchterische Maßnahmen veränderbar. Zuchtmethodisch wird dabei wie für die Resistenzzüchtung beschrieben vorgegangen. Die verwendeten Selektionskriterien beziehen sich auf die Qualität des Erntegutes und dessen technologische Weiterverarbeitung. Auf Qualitätskriterien wird in dieser Darstellung nicht eingegangen.

3.3.5. Haploidzüchtung

Haploide können in der Sortenzüchtung ganz allgemein zur Abkürzung von Aufspaltungen und damit zur Verkürzung eines Zuchtanges eingesetzt werden.

Wie in Abschnitt 3.2.5.3. dargestellt, wird über die Haploidstufe aus allotetraploidem *N. tabacum* eine Pflanze entwickelt, die ein *N. sylvestris*- und ein *N. tomentosiformis*-Genom besitzt. Beim Zurückkehren auf die tetraploide Stufe werden beide Chromosomensätze verdoppelt. Die neu entstandene allotetraploide Pflanze enthält, im Gegensatz zu „natürlichem“ allotetraploidem *N. tabacum*, je zwei identische Chromosomensätze. Daraus resultiert völlige Homozygotie und Konstanz in den generativ entstehenden Nachkommen.

Werden aus Leistungstypen, etwa Zuchtstämmen oder Sorten, verdoppelte Haploide hergestellt, so zeigen diese in der Mehrzahl einen Leistungsabfall gegenüber

Tabelle 8. Resistenzquellen für wichtige Krankheiten und Schaderreger sowie Resistenzausprägung (Forts.).

Resistenzquelle	Resistenz	Autor(en)
<i>N. debneyi</i>	Volle Resistenz, ein Gen	} OHASHI U. IMOTO 1983
'Burley 49', 'Riwaka 5', 'Virginia Gold', 'Harrison Special'	Volle Resistenz	
'Burley B15', 'Burley B49', 'Burley 77', 'Burley 4977' u.a.	Resistenz	IVANCHEVA-GABROVSKA U. KUTOVA 1981
'Topolovgrad 1', 'Krumovgrad 213' u.a.	Hohe Resistenz	KUTOVA U. GABROVSKA 1980
4. TIERE		
4.1. <i>Myzus persicae</i>		
'Talgar 28', 'Immuniy 580'	Hohe Feldresistenz in Material mit hellen Blättern	VINOGRADOV et al. 1981
Diverses Material	Resistenz mit Estern und Ölen gekoppelt	JOHNSON U. SEVERSON 1982
'Burley 21', 'Kentucky 14', 'LA Burley 21'	Eiablagepräferenz	BELCHER U. THURSTON 1983
<i>N. gossei</i>	Toxisch für <i>M. persicae</i>	RAO et al. 1980
4.2. <i>Meloidogyne incognita</i>		
'Coker 254', 'Coker 258', 'Coker 347', 'Speight G28', 'Speight G33', 'Speight G41', 'Virginia 770' u.a.	Resistenz	CHÁVEZ U. FRANCO 1981
<i>N. otophora</i> , 'La Quinta'	Hohe Resistenz	} ARCIA U. WERNSMAN 1983
'Jujuy'	Toleranz	
<i>N. tomentosa</i> , 'NC 95', Monosome	Volle Resistenz	SLANA U. STAVELY 1981
Speight G28	Feldresistenz	HUSSAINI U. MOSES 1981
<i>N. tomentosa</i>	Ein dominantes Gen, gekoppelt mit PVY-Resistenz	RUFTY 1982
'NC 2514' (Virginia)	Resistenz	KARTONO 1980
<i>N. repanda</i>	Partielle Resistenz	SHEPHERD U. COOMBS 1981
4.3. <i>Manduca sexta</i> [tobacco hornworm]		
T.I. 1112 × 'Splight G 33'	Resistenz	MILES et al. 1980
T.I. 1112 × T.I. 7, T.I. 1112 × 'McNair'	Feldresistenz	JOHNSON 1979
4.4. <i>Heliothis virescens</i> [tobacco budworm]		
T.I. 1112	Nonpräferenz	JACKSON et al. 1983
T.I. 165	Feldresistenz	GWYNN et al. 1983
5. ABIOTISCHE FAKTOREN		
5.1. Weather fleck		
'Stam T66'	Feldresistenz	QUINTERO U. SANTIESTEBAN 1981
'Md. 872'	Feldresistenz	AYCOCK 1982
Maryland-Sorten × 'Bel W 3'	Additive und epistatische Geneffekte	AYCOCK 1983

den Ausgangsformen (IOANNIDIS und SYMEONIDOU 1982; ROWE und GWYNN 1983; BROWN 1982; REED und WERNSMAN 1983; KASPERBAUER et al. 1983). Als Erklärung dafür kann angenommen werden, daß „natürliche“ Allotetraploide, auch nach Inzucht (vergl. 3.3.2.2.), noch genügend Restheterozygotie und dadurch eine höhere Leistungspotenz besitzen als absolut homozygote verdoppelte Genotypen. In Experimenten konnte diese Annahme bisher nicht bestätigt werden (BROWN und WERNSMAN 1982), sie steht auch im Widerspruch zu routinemäßigem Einsatz in der Gerstenzüchtung in Kanada und auch in der Tabakzüchtung (Tabelle 7). Es ist auch nicht zu erwarten, daß aus jeder verdoppelten haploiden Pflanze ein Leistungstyp entwickelt werden kann, ebensowenig wie aus jeder selektierten Linie einer Kreuzung eine Sorte entsteht. ROWE und GWYNN (1983) schließen aus ihren Untersuchungen, daß aus etwa 900 Haploiden zehn mit einer gegenüber der Ausgangsform erhöhten Leistung selektiert werden können.

Außer strenger Homozygotie ergibt sich ein Unterschied zwischen androgenetisch gewonnenem und natürlichem tetraploiden *N. tabacum* auch auf dem DNA-Niveau (DHILLON et al. 1983). PAEPE et al. (1982) ermittelten eine Zunahme der Menge an Gesamt-DNA und eine Zunahme von besonders häufig repetitiven Sequenzen. Daraus kann geschlossen werden, daß veränderte kerngenetische Information die Leistungsfähigkeit der Pollen-Derivate herabsetzt. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, daß androgenetisch entstandene verdoppelte Haploide eine stärkere Leistungsdepression zeigten als maternale Haploide (BROWN 1982).

Der Einsatz Haploider in der Sortenzüchtung erfolgt entweder in sehr frühen Generationen des Zuchtmaterials oder wenn bereits eine leistungsfähige Population vorliegt.

Im ersten Einsatzbereich werden beispielsweise nach Einkreuzen einer Resistenz aus genetisch entferntem Material die Resistenten in der F₁- oder F₂-Generation selektiert und über die Haploidstufe zu nicht weiter spaltenden Homozygoten entwickelt. Diese können als Tetraploide zur Rückkreuzung mit Sorten verwendet werden.

Im zweiten Einsatzbereich können aus einer leistungsfähigen Kreuzungspopulation von etwa der F₆-Generation an über die Haploidstufe einheitliche Linien entwickelt werden. Die Prüfung dieser Linien (vergl. 3.4.) ergibt sicherere Beurteilungsmöglichkeiten als die Prüfung von spaltenden Populationen.

3.4. PRÜFUNG DES ZUCHTERFOLGES

Die Leistungsfähigkeit einer als „fertig“ eingekreuzten Neuzüchtung muß im Anbauversuch geprüft werden. Der begrenzende Faktor ist die geringe Anzahl Pflanzen, die je Flächeneinheit kultiviert werden kann. Der Einfluß der Umwelt auf qualitätsbestimmende Merkmale wie Blattertrag, Inhaltsstoffzusammenset-

zung, getrocknete Blattmasse etc. ist hoch. Zuverlässige Aussagen über die Leistungsfähigkeit eines Zuchtstammes können daher nur aus Anbauversuchen mit eingestreuten Vergleichssorten in mehrfachen Wiederholungen, an mehreren Orten in mehreren Jahren gemacht werden. Als praktikabel hat sich für erste Vergleichsprüfungen mit bestehenden Sorten eine Pflanzenanzahl von 50 bis 70 in zwei Wiederholungen an zwei Orten erwiesen. Die nächstjährige Prüfung kann nach Eliminierung nicht geeigneter Genotypen in drei- bis vierreihigen Parzellen von je zehn bis fünfzehn Metern Länge in drei bis vier Wiederholungen an zwei Standorten durchgeführt werden. Die Anlage erfolgt zum Beispiel als randomisierte komplette Blockanlage, bei der alle Prüfglieder einschließlich der Bezugsstandards in einem Block enthalten sind.

Mit der Versuchsauswertung können weitere Prüfglieder eliminiert werden, so daß mit den wenigen verbleibenden ein Feldversuch mit Parzellengrößen von etwa 100 m² in vier bis sechs Wiederholungen an möglichst verschiedenen, für den Sortenanbau vorgesehenen Standorten durchgeführt werden kann. Die erzielten Ernteergebnisse geben eine relativ sichere Auskunft über die Ertragsleistung und erlauben auch eine Aufbereitung des Erntegutes nach halbindustriellem Maßstab.

Um nicht wertvolle Zeit zu versäumen, wird der Züchter bei vorgeschriebener Sortenzulassung parallel abschließende eigene Leistungsprüfungen durchführen und offizielle Zulassungsprüfungen beantragen.

Literatur

1. Ahl, P., A. Benjama, R. Samson, S. Gianinazzi: Induction chez le tabac par *Pseudomonas syringae* de nouvelles protéines (protéines b) associées au développement d'une résistance non spécifique à une deuxième infection; *Phytopathol. Z.* 102 (1981) 201.
2. Ahl, P., A. Cornu, S. Gianinazzi: Soluble proteins as genetic markers in studies of resistance and phylogeny in *Nicotiana*; *Phytopathology* 72 (1982) 80.
3. Ahl, P., S. Gianinazzi: b-Protein as a constitutive component in highly (TMV) resistant interspecific hybrids of *Nicotiana glutinosa* × *Nicotiana debneyi*; *Plant Sci. Lett.* 26 (1982) 173.
4. Ahl, P., S. Gianinazzi, D. Maizonnier, A. Cornu: Les protéines b et la résistance au TMV chez les *Nicotiana* — Nouvelle approche génétique; *Agronomie (Paris)* 3 (1983) 95.
5. Anderson, T. R., T. W. Welackey: Tolerance of five Burley tobacco varieties of black root rot; *Lighter* 52 (1982) 19.
6. Anon.: Breeding line developed; *Res. Farming (N.C. Agric. Res. Serv.)* 39 (1980a) 10.
7. Anon.: ZZ 100; *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 46 (1980b) 268.

8. Anon.: Hybrid tobacco plants produced by interspecific somatic hybridization; *Sci. Agric. Sin.* Nr. 1, 1981a, S. 1.
9. Anon.: Tobacco; *Crops Soils Mag.* 33 (1981b) 22.
10. Antoniv, J. F., R. F. White: The effects of aspirin and polyacrylic acid on soluble leaf proteins and resistance to virus infection in five cultivars of tobacco; *Phytopathol. Z.* 98 (1980) 331.
11. Arcia, M. A., E. A. Wernsman: Reaccion de algunas introducciones de *Nicotiana otophora* a dos razas del nematodo *Meloidogyne incognita*; *Nematropica* 13 (1983) 221.
12. Aycock, M. K.: Hybridization among Maryland, Burley and flue-cured type tobaccos; *Tob. Sci.* 24 (1980) 109.
13. Aycock, M. K.: Environmental influence on weather fleck ratings for Maryland tobacco cultivars; *Crop Sci.* 22 (1982) 131.
14. Aycock, M. K.: Genetics of weather fleck in *Nicotiana tabacum*; *Can. J. Genet. Cytol.* 25 (1983) 97.
15. Banks, M. S., P. K. Evans: A comparison of the isolation and culture of mesophyll protoplasts from several *Nicotiana* species and their hybrids; *Plant Sci. Lett.* 7 (1976) 409.
16. Barbier, M., H. Dulieu: Early occurrence of genetic variants in protoplast cultures; *Plant Sci. Lett.* 29 (1983) 201.
17. Barroso, F., P. Alfonso, G. Torrecilla: Origin and characteristics of the black tobacco variety Cabaiguán 72; *Cienc. Téc. Agric., Tabaco* 3 (1980) 93.
18. Bayubay, S. J., M. V. Lopez: Performance test of cigar leaf F₁ hybrids and their parents; Vortrag anlässlich 7th Int. Tob. Sci. Congr. (CORESTA), Manila, Philippinen, CORESTA Information Bulletin 1980, Special Issue, S. 98.
19. Beatson, R. A., E. A. Wernsman, I. C. Long: Divergent mass selection for carotenoids in a flue-cured tobacco population; *Crop Sci.* 24 (1984) 67.
20. Belcher, D., R. Thurston: Effects of various tobacco cultivars on coccinellid oviposition and survival; *Tob. Int. (N.Y.)* 185, Nr. 3 (1983) 37.
21. Beljo, J., M. Odić, K. Popović, N. Sekulović: Improvement of semi-Oriental tobacco in Yugoslavia; Vortrag anlässlich des CORESTA Symposiums 1982, Winston-Salem, N.C., U.S.A., CORESTA Information Bulletin 1982, Special Issue, S. 39.
22. Bolsunov, I.: Die Tabakzüchtung für europäische Verhältnisse; in: *Handbuch der Pflanzenzüchtung*, Band 5: Züchtung der Sonderkulturpflanzen, hrsg. von H. Kappert und W. Rudolf, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 2. Auflage, 1961, S. 152.
23. Bonnett, H. T., K. Glimelius: Somatic hybridization in *Nicotiana* — Behavior of organelles after fusion of protoplasts from male-fertile and male-sterile cultivars; *Theor. Appl. Genet.* 65 (1983) 213.
24. Borkird, C., K. C. Sink: Novel organized growth and somatic variation of *Nicotiana bonariensis* protoplast-derived colonies — Transmission to regenerated plants; *Sci. Hortic. (Amst.)* 21 (1983) 359.
25. Bourgin, J. P., Y. Chupeau, C. Missonier: Plant regeneration from mesophyll protoplasts of several *Nicotiana* species; *Physiol. Plant.* 45 (1979) 288.
26. Bourgin, J. P., C. Missonier: Culture of haploid mesophyll protoplasts from *Nicotiana alata*; *Z. Pflanzenphysiol.* 87 (1978) 55.
27. Bredemeijer, G. M. M., K. S. Ramulu, P. Dijkhuis: Effect of gamma irradiation on peroxidase isoenzymes and pollen tube growth following treatment of styles in self-incompatible *Nicotiana alata*; *Incompatibility Newsletter* Nr. 13, 1981, S. 87.
28. Brown, J. S.: Genetic nature and basis of the agronomic inferiority of anther-derived dihaploids of *Nicotiana tabacum* L.; *Diss. Abstr. Int. B. Sci. Eng.* B43 (1982) 624.
29. Brown, J. S., E. A. Wernsman: Nature of reduced productivity of anther-derived dihaploid lines of flue-cured tobacco; *Crop Sci.* 22 (1982) 1.
30. Burk, L. G.: Male-sterile flower anomalies in interspecific tobacco hybrids; *J. Hered.* 51 (1960) 27.
31. Burk, L. G.: Partial self-fertility in a theoretical amphiploid progenitor of *N. tabacum*; *J. Hered.* 64 (1973) 348.
32. Burk, L. G., R. D. Durbin: The reaction of *Nicotiana* species to tentoxin — A new technique for identifying the cytoplasmic parent; *J. Hered.* 69 (1978) 117.
33. Burk, L. G., G. V. Gooding, J. F. Chaplin: Reaction of *Nicotiana* species and cultivars or breeding lines of *Nicotiana tabacum* to three strains of potato virus Y; *Tob. Int. (N.Y.)* 184, Nr. 15 (1982) 181.
34. Burns, J. A., D. U. Gerstel: Role of nucleolar chromosomes in anther-restoration of male-sterile tobacco; *J. Hered.* 72 (1981) 413.
35. Cameron, R. D.: The monosomics of *Nicotiana tabacum*; *Tob. Sci.* 3 (1959) 164.
36. Cameron, D. R.: Cytoplasmic effects in *Nicotiana*; *Proc. Int. Congr. Genet. (Int. Genet. Fed.)* 1 (1965) 203.
37. Carlson, P. S.: Methionine-sulfoximine resistant mutants of tobacco; *Science (Wash., D.C.)* 180 (1973) 1366.
38. Carlson, P. S., H. H. Smith, R. D. Deering: Parasexual interspecific plant hybridization; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69 (1972) 2292.
39. Chaleff, R. S., M. F. Parsons: Direct selection *in vitro* for herbicide-resistant mutants of *Nicotiana tabacum*; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (1978) 5104.

40. Chaplin, J. F.: Use of male-sterile tobaccos in the production of hybrid seed; *Tob. Sci.* 8 (1964) 105.
41. Chaudhary, G. A., M. Fareed: Heterosis studies in intervarietal crosses of *Nicotiana tabacum*; *J. Agric. Res. Pakistan* 16 (1978) 211.
42. Chávez, J., J. Franco: Resistance to *Meloidogyne incognita* in flue-cured tobacco cultivars; *Nematropica* 11 (1981) 137.
43. Chen, J. G., S. H. Cheng, Y. H. Li: Preliminary studies on obtaining regenerated plants from tobacco leaf protoplasts by applying frozen and concentrated enzyme fluids; *Hubei Nongye Kexue* Nr. 7, 1981a, S. 39.
44. Chen, C. H., J. K. Wu, C. S. Chang, D. K. Wu, F. Y. Chen, T. C. Chia, M. C. Huang: Breeding tobacco resistant to cucumber mosaic virus, II. Yield and CMV tolerance tests of broadleaf type resistant lines; *Bull. Tob. Res. Inst. Taiwan Tob. Wine Monop. Bur.* Nr. 15, 1981b, S. 1.
45. Chen, S. Y., C. C. Hung, C. C. Hsu: Growth performance, maturing and curing properties of some early maturing tobacco breeding lines carrying pale yellow gene (*Py*); *Bull. Tob. Res. Inst. Taiwan Tob. Wine Monop. Bur.* Nr. 14, 1981c, S. 1.
46. Chen, J. Y., P. T. Wang, S. M. Zao, J. X. Xu, L. Q. Wang: Research on interspecific somatic hybrids of tobacco and their progenies; *Acta Genet. Sin.* 10 (1983a) 123.
47. Chen, C. H., J. K. Wu, C. S. Chang, D. K. Wu, F. Y. Chen, M. C. Huang: TT6 and TT7 — Two new tobacco varieties resistant to cucumber mosaic virus; *Bull. Tob. Res. Inst. Taiwan Tob. Wine Monop. Bur.* Nr. 18, 1983b, S. 1.
48. Chen, J. Y., S. M. Zhao, J. X. Xu, P. T. Wang: Observations on the pollen, fruits, seeds and stomata of somatic hybrids between *Nicotiana tabacum* and *N. rustica*; *Hereditas (China)* 4 (1982) 31.
49. Chung, Y. H., S. C. Lee, J. K. Hwang: Studies on resistance to tobacco mosaic virus (TMV) in introductions of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.); *J. Korean Soc. Tob. Sci.* 2 (1980) 51.
50. Clausen, R. E.: Interspecific hybridization in *Nicotiana*, XII. Further data as to the origin of *N. tabacum*; *Sven. Bot. Tidskr.* 26 (1932) 123.
51. Clausen, R. E., D. R. Cameron: Inheritance of *Nicotiana tabacum*, XVIII. Monosomic analysis; *Genetics* 29 (1944) 447.
52. Clayton, E. E.: Male sterile tobacco; *J. Hered.* 41 (1950) 171.
53. Cocking, E. C.: A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles; *Nature (Lond.)* 187 (1960) 962.
54. Cohen, Y.: Cultivar resistance and species immunity in *Nicotiana* spp. against tobacco powdery mildew; *Phytoparasitica* 10 (1982) 131.
55. Cohen, Y., H. Eyal, Z. Goldschmidt, B. Sklarz: A performed chemical inhibitor of tobacco powdery mildew on leaves of *Nicotiana glutinosa*; *Physiol. Plant Pathol.* 22 (1983) 143.
56. Collins, G. B., P. D. Legg, M. J. Kasperbauer: Chromosome numbers in anther derived haploids of two *Nicotiana* species; *J. Hered.* 63 (1972) 113.
57. Collins, G. B., N. Sunderland: Pollen derived haploids of *Nicotiana knightiana*, *N. raimondii*, and *N. attenuata*; *J. Exp. Bot.* 25 (1974) 1030.
58. Currin, R. E., III, J. B. Pitner, W. M. Parrott: Registration of Clemenson PD4 flue-cured tobacco (Reg. No. 85); *Crop Sci.* 21 (1981) 988.
59. Darlington, C. D., A. P. Wylie: Chromosome atlas of flowering plants; G. Allen & U. Unwin Ltd., London, 1955, 519 S.
60. Davey, M. R., E. M. Frearson, L. A. Withers, J. B. Power: Observations on the morphology, ultrastructure and regeneration of tobacco leaf epidermal protoplasts; *Plant Sci. Lett.* 2 (1974) 23.
61. Deaton, W. R.: Vigor and variation expressed by anther-derived doubled haploids of *Nicotiana tabacum* L.; *Diss. Abstr. Int. B. Sci. Eng.* B44 (1983) 1661.
62. Deaton, W. R., G. J. Keyes, G. B. Collins: Expressed resistance to black shank among tobacco callus cultures; *Theor. Appl. Genet.* 63 (1982) 65.
63. Delon, R., P. Schiltz: Emploi d'une technique rapide de laboratoire pour l'étude de la résistance à *Poïdium (E. cichoracearum)* chez *N. tabacum* et des effets de quelques substances chimiques sur le développement du parasite; in: La sélection des plantes pour la résistance aux maladies, Colloque franco-israélien, Bordeaux, Frankreich, 1982, Inst. Nat. Rech. Agron., Paris, Frankreich, 1982, S. 157.
64. Dhillon, S. S., E. A. Wernsman, J. P. Miksche: Evaluation of nuclear DNA content and heterochromatin changes in anther-derived dihaploids of tobacco (*Nicotiana tabacum*) cv. Coker 139; *Can. J. Genet. Cytol.* 25 (1983) 169.
65. Diallo, I., C. L. Mulchi, M. K. Corbett: Effects of tobacco mosaic and tobacco etch viruses on the growth dynamics of Maryland tobacco cultivars (*Nicotiana tabacum* L.); *Tob. Int. (N.Y.)* 183, Nr. 7 (1981) 26.
66. Dix, P. J., R. S. Pearce: Proline accumulation in NaCl resistant and sensitive cell lines of *Nicotiana sylvestris*; *Z. Pflanzenphysiol.* 102 (1981) 243.
67. Douglas, G. C., L. R. Wetter, W. A. Keller, G. Setterfield: Production of sexual hybrids of *Nicotiana rustica* × *N. tabacum* and *N. rustica* × *N. glutinosa* via *in vitro* culture of fertilized ovules; *Z. Pflanzenzücht.* 90 (1983) 116.
68. Dulieu, H. L.: Pollination of excised ovaries and culture of ovules of *Nicotiana tabacum* L.; *Phytomorphology* 26 (1976) 69.

69. Dunwell, J. M.: Physiological aspects of pollen embryo induction in *Nicotiana tabacum*; in: Proc. Fourth John Innes symposium (The plant genome) and Second international haploid conference, Norwich, U.K., 1979, hrsg. von D. R. Davies, D. A. Hopwood, The John Innes Charity, John Innes Institute, Norwich, U.K., 1980, S. 257.
70. Dunwell, J. M., N. Sunderland: Anther culture of *Solanum tuberosum* L.; Euphytica 22 (1973) 317.
71. Emiroğlu, Ü., F. Incekara, S. Sekin, A. Özcam: Yield, quality and botanical characteristics of some improved lines having the aroma characters of Ege 64 tobacco and resistance to blue mould; Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 16 (1979) 105.
72. Espino, E., E. Capote, J. Santiesteban, A. Barroso: Escambray 70 — New dark tobacco variety for unshaded cultivation; Cienc. Téc. Agric., Tabaco 3 (1980) 29.
73. Evans, D. A.: Chromosome stability of plants regenerated from mesophyll protoplasts of *Nicotiana* species; Z. Pflanzenphysiol. 95 (1979) 459.
74. Evans, D. A.: Protoplast fusion; in: Handbook Plant cell culture, Bd. 1, hrsg. von W. R. Sharp, D. A. Evans, P. V. Ammirato and Y. Yamada, Macmillan Publishing Co., New York, 1984, S. 291.
75. Evans, D. A., O. L. Gamborg, J. P. Shyluk, L. R. Wetter: Somatic hybrid plants from protoplasts of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glauca* with *Lycopersicon*; Int. Assoc. Plant Tissue Culture, Univ. of Calgary, Calgary, Canada, 1978, S. 70.
76. Evans, D. A., L. R. Wetter, O. L. Gamborg: Somatic hybrid plants of *Nicotiana glauca* and *Nicotiana tabacum* obtained by protoplast fusion; Physiol. Plant. 48 (1980) 225.
77. Evans, D. A., C. E. Flick, R. A. Jensen: Disease resistance — Incorporation into sexually incompatible somatic hybrids of the genus *Nicotiana*; Science (Wash., D.C.) 213 (1981) 907.
78. Evans, D. A., C. E. Flick, S. A. Kut, S. M. Reed: Comparison of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana nesophila* hybrids produced by ovule culture and protoplast fusion; Theor. Appl. Genet. 62 (1982) 193.
79. Evans, D. A., J. E. Bravo, S. A. Kut, C. E. Flick: Genetic behavior of somatic hybrids in the genus *Nicotiana* — *N. otophora* + *N. tabacum* and *N. sylvestris* + *N. tabacum*; Theor. Appl. Genet. 65 (1983) 93.
80. Evola, S. V., E. D. Earle, R. S. Chaleff: The use of genetic markers selected *in vitro* for the isolation and genetic verification of intraspecific somatic hybrids of *N. tabacum* L.; Mol. Gen. Genet. 189 (1983) 441.
81. Facciotti, D., P. E. Pilet: Plants and embryoids from haploid *Nicotiana sylvestris* protoplasts; Plant Sci. Lett. 15 (1979) 1.
82. Flick, C. E., D. A. Evans: Isolation, culture and plant regeneration from protoplasts isolated from flower petals of ornamental *Nicotiana* species; Z. Pflanzenphysiol. 109 (1983) 379.
83. Flick, C. E., D. A. Evans: Tobacco; in: Handbook Plant cell culture, Bd. 2, hrsg. von W. R. Sharp, D. A. Evans, P. V. Ammirato and Y. Yamada, Macmillan, New York, 1984, S. 606.
84. Flick, C. E., R. A. Jensen, D. A. Evans: Isolation, protoplast culture, and plant regeneration of PFP-resistant variants of *Nicotiana tabacum* *Su/Su*; Z. Pflanzenphysiol. 103 (1981) 239.
85. Fluhr, R., D. Aviv, M. Edelman, E. Galun: Cybrids containing mixed and sorted-out chloroplasts following interspecific somatic fusions in *Nicotiana*; Theor. Appl. Genet. 65 (1983) 289.
86. Fraser, R. S. S.: Varying effectiveness of the *N^v* gene for resistance to tobacco mosaic virus in tobacco infected with virus strains differing in coat protein properties; Physiol. Plant Pathol. 22 (1983) 109.
87. Gajos, Z.: Inheritance of resistance to tomato spotted wilt virus in interspecies hybrids of *Nicotiana tabacum* L. × *Nicotiana alata* LINK; Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 244 (1981) 117.
88. Galun, E., P. Arzee-Gonen, R. Fluhr, M. Edelman, D. Aviv: Cytoplasmic hybridization in *Nicotiana* — Mitochondrial DNA analysis in progenies resulting from fusion between protoplasts having different organelle constitutions; Mol. Gen. Genet. 186 (1982) 50.
89. Gamborg, O. L., J. P. Shyluk, D. A. Evans, L. R. Wetter: Plant regeneration and hybridization with protoplasts from suspension cultures of the sulfur albino (*Su/Su*) mutant of *N. tabacum*; Int. Assoc. Plant Tissue Culture, Univ. of Calgary, Calgary, Canada, 1978, S. 70.
90. Gamborg, O. L., J. P. Shyluk, L. C. Fowke, L. R. Wetter, D. A. Evans: Plant regeneration from protoplasts and cell cultures of *N. tabacum* sulfur mutant (*Su/Su*); Z. Pflanzenphysiol. 95 (1979) 255.
91. Gerstel, D. U.: Segregation in new allopolyploids of *Nicotiana*, I. Comparison of 6 × (*N. tabacum* × *N. tomentosiformis*) and 6 × (*N. tabacum* × *N. otophora*); Genetics 45 (1960) 1723.
92. Gerstel, D. U.: Cytoplasmic male sterility in *Nicotiana*; North Carolina Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. Nr. 263, 1980.
93. Gianinazzi, S., P. Ahl, A. Cornu, R. Scalla, A. Cassini: First report of host b-protein appearance in response to a fungal infection in tobacco; Physiol. Plant Pathol. 16 (1980) 337.
94. Gianinazzi, S., C. Martin, J. C. Vallee: Hyper-sensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi* n.c. — Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale; C.R. Acad. Sci. (Paris) 270 (1970) 2383.

95. Gianinazzi, S., B. Kassanis: Virus resistance induced in plants by polyacrylic acid; *J. Gen. Virol.* 23 (1974) 1.
96. Gill, R., A. Rashid, S. C. Maheshwari: Isolation of mesophyll protoplasts of *Nicotiana rustica* and their regeneration into plants flowering *in vitro*; *Physiol. Plant.* 47 (1979) 7.
97. Gleba, Y. Y., V. P. Momot, N. N. Cherep, M. V. Skarzynskaya: Intertribal hybrid cell lines of *Atropa belladonna* (×) *Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplast fusion products; *Theor. Appl. Genet.* 62 (1982) 75.
98. Gleddie, S., W. A. Keller, G. Setterfield, L. R. Wetter: Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. sylvestris*; *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2 (1983) 269.
99. Glimelius, K., H. T. Bonnett: Somatic hybridization in *Nicotiana* — Restoration of photoautotrophy to an albino mutant with defective plastids; *Planta (Berl.)* 153 (1981) 497.
100. Glimelius, K., T. Eriksson, R. Grafe, A. J. Muller: Somatic hybridization of nitrate-deficient mutants of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion; *Physiol. Plant.* 44 (1978) 273.
101. Glimelius, K., K. Chen, H. T. Bonnett: Somatic hybridization in *Nicotiana* — Segregation of organellar traits among hybrid and cybrid plants; *Planta (Berl.)* 153 (1981) 504.
102. Goodspeed, T. H.: Cytotaxonomy of *Nicotiana*; *Bot. Rev.* 11 (1945) 533.
103. Goodspeed, T. H.: The genus *Nicotiana*; *Chron. Bot.* 16 (1954) 1.
104. Goodspeed, T. H.: Tabak, I. Systematics of the genus *Nicotiana*; in: *Handbuch der Pflanzenzüchtung, Band 5: Züchtung der Sonderkulturpflanzen*, hrsg. von H. Kappert und W. Rudolf, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 2. Auflage, 1961, S. 115.
105. Grant, C. E., J. J. Reilly: The effects of population levels of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* on the growth and development of greenhouse-grown flue-cured tobacco; *Phytopathology* 72 (1982) 707.
106. Greve, H. de, J. Leemans, J.-P. Hernalsteens, L. Thia-Toong, M. de Beuckeleer, L. Willmitzer, L. Otten, M. van Montagu, J. Schell: Regeneration of normal and fertile plants that express octopine synthase, from tobacco crown galls after deletion of tumour-controlling functions; *Nature (Lond.)* 300 (1982) 752.
107. Gupton, C. L.: Response of race 0 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* to selection pressure exerted by continuous culture of various genotypes of tobacco; *Tob. Int. (N.Y.)* 184, Nr. 26 (1982) 121.
108. Gwynn, G. R., R. F. Severson, D. M. Jackson: Inheritance of leaf surface chemicals in tobacco and relationship to insect resistance; in: *Agronomy Abstracts, Am. Soc. Agron., Madison, Wis., U.S.A., 1983, S. 66.*
109. Harada, H., J. Imamura: Factors that stimulate pollen embryogenesis; in: *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*, Science Press, Beijing, China, 1983, S. 145.
110. Harada, T., T. Yoshida, T. Suzuki: Breeding B106, a new Burley tobacco variety, and its characteristics, II. Agronomic characters and leaf properties; *Bull. Morioka Tob. Exp. Stn. Nr.* 15, 1981, S. 9.
111. Harkins, K. R., D. W. Galbraith: Flow sorting and culture of plant protoplasts; *Physiol. Plant.* 60 (1984) 43.
112. Hartana, I.: Control of mosaic disease in Besuki cigar tobacco through resistance; *Indones. Agric. Res. Dev. J.* 3 (1981) 32.
113. Hartana, I.: Development of mosaic-resistant tobacco varieties in Indonesia; in: *Crop improvement research*, hrsg. von T. C. Yap, K. M. Graham, J. Sukaimi, SABRAO (Universiti Kebangsaan Malaysia), Bangi, Selangor, Malaya, 1983, S. 355.
114. Herberle-Bors, E.: Induction of embryogenic pollen grains *in situ* and subsequent *in vitro* pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* by treatments of the pollen donor plants with feminizing agents; *Physiol. Plant.* 59 (1983) 67.
115. Heberle-Bors, E., J. Reinert: A reliable and efficient system for haploid formation from cultures of isolated tobacco pollen; in: *Proc. Fourth John Innes symposium (The plant genome) and Second international haploid conference*, Norwich, U.K., 1979, hrsg. von D. R. Davies and D. A. Hopwood, The John Innes Charity, John Innes Institute, Norwich, U.K., 1980, S. 246.
116. Horn, M. E., T. Kameya, J. E. Brotherton, J. M. Widholm: The use of amino acid analog resistance and plant regeneration ability to select somatic hybrids between *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa*; *Mol. Gen. Genet.* 192 (1983) 235.
117. Horsch, R. B., R. T. Fraley, S. G. Rogers, P. R. Sanders, A. Lloyd, N. Hoffmann: Inheritance of functional foreign genes in plants; *Science (Wash., D.C.)* 223 (1984) 496.
118. Hussaini, S. S., J. S. L. Moses: Evaluation of tobacco germplasm for resistance to root-knot nematode; *Tob. Res.* 7 (1981) 176.
119. Imamura, J., E. Okabe, M. Kyo, H. Harada: Embryogenesis and plantlet formation through direct culture of isolated pollen of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun and *Nicotiana rustica* cv. *Rustica*; *Plant Cell Physiol.* 23 (1982) 713.
120. Incekara, F., Ü. Emiroğlu: The breeding of Turkish tobacco cultivars for resistance to blue mould (*Peronospora tabacina*); *Doga Nr.* 5, 1982, Special Issue, S. 95.
121. Ioannidis, N., G. Symeonidou: Diploidized haploids from anther culture in Oriental tobacco in Greece; *CORESTA Information Bulletin* 1982—1, S. 6.

122. Itagaki, R., Y. Nakamura: Studies on the resistance to powdery mildew of tobacco, I. Growth of the fungus lesion formation on the leaves in varieties differing in resistance; Bull. Morioka Tob. Exp. Stn. Nr. 15, 1981, S. 91.
123. Itoh, K., Y. Futsuhara: Interspecific transfer of only part of genome by fusion between non-irradiated protoplasts of *Nicotiana glauca* and X-ray irradiated protoplasts of *N. langsdorffii*; Jpn. J. Genet. 58 (1983) 545.
124. Ivancheva-Gabrovska, T., I. Kutova: Reaction of large-leaved varieties and lines of tobacco to *Thielaviopsis basicola* (BERK. & BROOME) FERRARIS; Rasteniev'd. Nauki 18 (1981) 135.
125. Izard, C., H. Hitier: Observations sur un hybride complexe, susceptible to produire des plantes à stérilité mâle; Ann. Inst. Exp. Tabac Bergerac Nr. 2, 1955, 93.
126. Jackson, D. M., J. S. Cheatham, J. M. Pitts, A. H. Baumhover: Ovipositional response of tobacco budworm moths (*Lepidoptera: Noctuidae*) to Tobacco Introduction 1112 and NC 2326 in cage tests; J. Econ. Entomol. 76 (1983) 1303.
127. Javier, E. L.: Variability among non-conventionally derived diploid lines of *Nicotiana tabacum* L.; Diss. Abstr. Int. B Sci. Eng. B43 (1982) 45.
128. Johnson, A. W.: Resistance in tobacco to the tobacco hornworm; J. Econ. Entomol. 72 (1979) 914.
129. Johnson, M. C.: The resistance of T.I. 1406 tobacco to three polyviruses; Diss. Abstr. Int. B Sci. Eng. B41 (1980) 2001.
130. Johnson, A. W., R. F. Severson: Physical and chemical leaf surface characteristics of aphid resistant and susceptible tobacco; Tob. Int. (N.Y.) 184, Nr. 17 (1982) 49.
131. Kao, K. N.: Chromosomal behavior in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana glauca*; Mol. Gen. Genet. 150 (1977) 225.
132. Kao, K. N., M. R. Michayluk: A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts; Planta (Berl.) 115 (1973/1974) 355.
133. Kao, K. N., M. R. Michayluk: Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media; Planta (Berl.) 126 (1975) 105.
134. Kartono, G.: Pengaruh nematisida terhadap penekanan nematoda pada tembakau Virginia F.C.; Pemberitaan (Lembaga Penelitian Tanaman Industri, Bogor) Nr. 37, 1980, S. 81.
135. Kasperbauer, M. J., P. D. Legg, T. G. Sutton: Growth, development and alkaloid content of doubled haploids vs. inbreds of Burley tobacco; Crop Sci. 23 (1983) 965.
136. Kawamata, K., Y. Ohashi, K. Eguchi, T. Tajima: Official variety test of flue-cured tobacco with rich aroma and resistance to bacterial wilt disease, F112 and F113; Bull. Iwata Tob. Exp. Stn. Nr. 15, 1983, S. 45.
137. Kelman, A.: The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*; North Carolina Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. 99 (1953) 194.
138. Keum, W. S., S. Y. Jeh: Correlation coefficients and path analysis of various characteristics of dihaploids derived from tobacco (*Nicotiana tabacum*) anther culture *in vitro*; J. Korean Soc. Tob. Sci. 3 (1981) 41.
139. Khvilkovskaya, B.: Regeneration of plants from mesophyll protoplasts of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv.; Tsitol. Genet. 15 (1981) 19.
140. Konate, G., M. Kopp, B. Fritig: Multiplication du virus de la mosaïque du tabac dans des hôtes à réponse systémique ou nécrotique — Approche biochimique à l'étude de la résistance hypersensible aux virus; Phytopathol. Z. 105 (1982) 214.
141. Kosakovskaya, I. V.: Subunit structure of D-ribulose 1,5-diphosphate carboxylase in *Nicotiana tabacum* + *N. debneyi* parasexual hybrids; Ukr. Bot. Zh. 37 (1980) 86.
142. Kostoff, D.: Studies on polyploid plants, XVIII. Cytogenetic studies on *Nicotiana sylvestris* × *N. tomentosiformis* hybrids and amphidiploids and their bearings on the problem of the origin of *N. tabacum*; C.R. Acad. Sci. U.S.S.R. 18 (1938) 459.
143. Kung, S.: Tobacco Fraction I protein — A unique genetic marker; Science (Wash., D.C.) 191 (1976) 429.
144. Kutova, I., T. Gabrovska: Reaction of some Oriental varieties and lines of tobacco to *Thielaviopsis basicola* (BERK. & BROOME) FERRARIS; Nauchn. Tr. Vyssh. S. Inst. "Vasil Kolarov" 25 (1980) 187.
145. Laat, A. M. M. de, L. C. van Loon: The relationship between stimulated ethylene production and symptom expression in virus-infected tobacco leaves; Physiol. Plant Pathol. 22 (1983) 261.
146. Labroche, P., S. Poirier-Hamon, J. Pernès: Inheritance of leaf peroxidase isoenzymes in *Nicotiana glauca* and linkage with the S-incompatibility locus; Theor. Appl. Genet. 65 (1983) 163.
147. Lamprecht, M. P., J. H. Louw: Genetic and plant breeding aspects of powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum* D.C.) resistance in two Oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars; Agroplanta 13 (1981) 85.
148. Lamprecht, M. P., G. C. Prinsloo, C. J. H. Pretorius, M. C. de Beer, S. M. Sonnenberg, C. Sonnenberg, F. J. Shawe: Release of flue-cured tobacco cultivar 820D9; Agroplanta 14 (1982) 61.
149. Lar'kina, N. I., I. V. Semenova: Use of the interspecific hybrid Immunity 580 × *Nicotiana setchellii* in breeding for disease resistance; Sb. Nauchno-Issled. Rab. Vses. Nauchno-Issled. Inst. Tab. Makhorki Nr. 170, 1981, S. 32.
150. Legg, P. D., C. C. Litton, G. B. Collins: Effects of the *Nicotiana debneyi* black root rot resistance factor on agronomic and chemical traits in Burley tobacco; Theor. Appl. Genet. 60 (1981) 365.

151. Legg, P. D., C. C. Litton, G. B. Collins: Effects of *Nicotiana longiflora* CAV. resistance to race 0 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* on agronomic and chemical traits in Burley tobacco; *Crop Sci.* 22 (1982) 35.
152. Li, W. B., Y. R. Sun, M. J. Huang, X. H. Li: Further observations on somatic hybrids between *Nicotiana glauca* and *Petunia hybrida*; *Acta Genet. Sin.* 10 (1983) 194.
153. Lin, C. M., Z. Q. Liu, S. D. Kung: *Nicotiana* chloroplast genome, X. Correlation between the DNA sequences and the isoelectric focusing patterns of the LS of Rubisco; *Plant Mol. Biol.* 6 (1986) 81.
154. Litton, C. C.: Efficient greenhouse technique for screening small tobacco seedlings for black root rot resistance; *Tob. Int. (N.Y.)* 185, Nr. 1 (1983) 28.
155. Lörz, H., W. R. Scowcroft: Variability among plants and their progeny regenerated from protoplasts of *Su/su* heterozygotes of *Nicotiana tabacum*; *Theor. Appl. Genet.* 66 (1983) 67.
156. Loon, L. C. van, A. van Kammen: Polyacrylamid disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN', II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus; *Virology* 40 (1970) 199.
157. Lucas, G. B., G. V. Gooding, Jr., J. N. Sasser: Reaction of *Nicotiana africana* to black shank, Granville wilt, root knot, tobacco mosaic virus, and potato virus Y; *Tob. Int. (N.Y.)* 182, Nr. 23 (1980) 64.
158. Magnien, E., X. Dalschaert, M. Roumengous, M. Devreux: Improvement of protoplasts isolation and culture technique from axenic plantlets of wild *Nicotiana* species; *Acta Genet. Sin.* 7 (1980) 231.
159. Maliga, P., G. Lázár, F. Joo, A. H. Nagy, L. Menczel: Restoration of morphogenetic potential of *Nicotiana* by somatic hybridization; *Mol. Gen. Genet.* 157 (1977) 291.
160. Maliga, P., A. S. Breznovits, L. Marton: Streptomycin-resistant plant from callus of haploid tobacco; *Nature (Lond.)* 244 (1973) 29.
161. Maliga, P., H. Lörz, G. Lázár, F. Nagy: Cytoplasm-protoplast fusion for interspecific chloroplast transfer in *Nicotiana*; *Mol. Gen. Genet.* 185 (1982) 211.
162. Manun, I., M. Palakarcheva: Inheritance of resistance to common tobacco mosaic (*Nicotiana virus 1*) in intervarietal tobacco hybrids; *Genet. Sel.* 14 (1981) 213.
163. McKee, C. G.: Maryland 341; *Tobacco Views News* Nr. 1, 1982, S. 1.
164. Medgyesy, P., L. Menczel, P. Maliga: The use of cytoplasmic streptomycin resistance — Chloroplast transfer from *Nicotiana tabacum* into *Nicotiana sylvestris*, and isolation of their somatic hybrids; *Mol. Gen. Genet.* 179 (1980) 693.
165. Melchers, G., G. Labib: Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts, I. Selection of light resistant hybrids of "haploid" light sensitive varieties of tobacco; *Mol. Gen. Genet.* 135 (1974) 277.
166. Menczel, L., G. Galiba, F. Nagy, P. Maliga: Effect of radiation dosage on efficiency of chloroplast transfer by protoplast fusion in *Nicotiana*; *Genetics* 100 (1982) 487.
167. Miles, J. D., J. F. Chaplin, L. G. Burk: Tobacco hornworm resistance in *Nicotiana tabacum*; *Tob. Int. (N.Y.)* 182, Nr. 29 (1980) 72.
168. Miller, O. K., K. W. Hughes: Selection of paraquat-resistant variants of tobacco from cell cultures; *In Vitro* 16 (1980) 1085.
169. Misoo, S., H. Takeuchi, K. Fukuhara, M. Matsubayashi: Studies on the mechanisms of pollen embryogenesis, V. Effects of genome constitution, ploidy level and cytoplasm on anther culture in tobacco and its ancestral species; *Sci. Rep. Fac. Agric. Kobe Univ.* 16 (1984) 35.
170. Moore, L. D., D. M. Orcutt: Free sterol and total lipids in stems of susceptible and resistant tobacco cultivars colonized by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*; *Phytopathology* 72 (1982) 1048.
171. Murakishi, H. H., P. S. Carlson: *In vitro* selection of *Nicotiana sylvestris* variant with limited resistance to TMV; *Plant Cell Rep.* 1 (1982) 94.
172. Murashige, T., F. Skoog: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures; *Physiol. Plant.* 15 (1962) 473.
173. Murthy, N. S., C. V. Rao, K. Apparao, K. T. Ramavarma, A. I. Narayanan: Stability analysis for yield of some induced mutants and derived lines in flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.); *Tob. Res.* 8 (1982) 69.
174. Nagao, T.: Somatic hybridization by fusion of protoplasts, I. The combination of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica*; *Jpn. J. Crop Sci.* 47 (1978) 491.
175. Nagao, T.: Somatic hybridization by fusion of protoplasts, III. Somatic hybrids of sexually incompatible combinations *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana repanda* and *Nicotiana tabacum* + *Salpiglossis sinuata*; *Jpn. J. Crop Sci.* 51 (1982) 35.
176. Nagata, T., J. Takebe: Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium; *Planta (Berl.)* 99 (1971) 12.
177. Nagy, F., G. Lázár, L. Menczel, P. Maliga: Recombination of mitochondrial DNA in somatic hybrids of tobacco; *Agrartud. Kozl.* 41 (1982) 215.
178. Nagy, J. I., P. Maliga: Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris*; *Z. Pflanzenphysiol.* 78 (1976) 453.
179. Narayan, R. K. J., H. Rees: Nuclear DNA, heterochromatin and phylogeny of *Nicotiana* amphiploids; *Chromosoma (Berl.)* 47 (1974) 75.
180. Negrutiu, I., J. Mousseau: Culture sur grande échelle de protoplastes de *Nicotiana sylvestris*

- SPEGAZZINI et COMES à partir de plantes cultivées *in vitro*; *Z. Pflanzenphysiol.* 103 (1981) 367.
181. Netzer, W. J.: Agrigenetics researchers express plant genes in tobacco plantlets; *Bio/Technology* 1 (1983) 461.
 182. Niizeki, M., K. Saito, F. Kita: Studies on plant cell tissue culture, XII. Anther culture of various polyploid and aneuploid plants in *Nicotiana sylvestris*; *Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ.* Nr. 37, 1982, S. 20.
 183. Nikova, V.: Morphogenesis and cytological studies of cytoplasmically male-sterile tobacco with the cytoplasm of *Nicotiana repanda* and *N. suaveolens*; *Genet. Sel.* 14 (1981) 430.
 184. Nitsch, C.: Pollen culture — A new technique for mass production of haploid and homozygous plants; in: *Haploids in higher plants — Advances and potential*, hrsg. von K. J. Kasha, Univ. Guelph Press, Guelph, Ontario, Canada, S. 123.
 185. Nitsch, J. P.: La production *in vitro* d'embryons haploïdes — Résultats et perspectives; in: *Colloq. Int. Cent. Nat. Rech. Sci., Paris (Les cultures de tissus de plantes)* 193 (1971) 282.
 186. Nitsch, J. P., C. Nitsch: Haploid plants from pollen grains; *Science (Wash., D.C.)* 163 (1969) 85.
 187. Nitsch, J. P., K. Ohyama: Obtention de plantes à partir de protoplastes haploïdes cultivés *in vitro*; *C.R. Acad. Sci. [D] (Paris)* 273 (1971) 801.
 188. Ohashi, Y., M. Imoto: Susceptibility of certain black root rot resistant tobacco varieties to Suzu and Nanao isolates of the pathogen *Thielaviopsis basicola*; *Bull. Iwata Tob. Exp. Stn.* Nr. 15, 1983, S. 37.
 189. Ohbu, K., H. Maeda, T. Matsuda: The development of tobacco mosaic virus (TMV), brown spot and black shank resistant air-cured tobaccos, N507 and N508, and their agronomic characteristics; *Bull. Utsunomiya Tob. Exp. Stn.* 18 (1981) 1.
 190. Otori, K., T. Nagao, Y. Imade, T. Harada: Breeding B106, a new Burley tobacco variety, and its characteristics, I. The breeding process; *Bull. Morioka Tob. Exp. Stn.* Nr. 15, 1981, S. 1.
 191. Otten, L., H. de Greve, J. P. Hernalsteens, M. van Montagu, O. Schieder, J. Straub, J. Schell: Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*; *Mol. Gen. Genet.* 183 (1981) 209.
 192. Paepe, R. de, D. Prat, T. Huguet: Heritable nuclear DNA changes in doubled haploid plants obtained by pollen culture of *Nicotiana sylvestris*; *Plant Sci. Lett.* 28 (1982) 11.
 193. Paepe, R. de, D. Prat, J. Knight: Effects of consecutive androgeneses on morphology and fertility in *Nicotiana sylvestris*; *Can. J. Bot.* 61 (1983) 2038.
 194. Palakarcheva, M., R. Peeva, D. Krusteva: New tobacco variety obtained as a result of hybridization between the species *Nicotiana goodspeedii* W. and *N. tabacum* L.; *Rasteniev'd. Nauki* 17 (1980) 18.
 195. Pandey, K. R.: Evolution of unilateral incompatibility in flowering plants — Further evidence in favour of twin specificities controlling intra- and interspecific incompatibility; *New Phytol.* 89 (1981) 705.
 196. Pandeya, R. S., F. H. White: Delgold — A new flue-cured tobacco cultivar; *Lighter* 51 (1981) 23.
 197. Pandeya, R. S., W. J. Arsenault, W. D. Rogers: Windel, high yielding, wind tolerant flue-cured tobacco for maritimes; in: *Research Highlights, Delhi Res. Stn., Delhi, Canada, 1981—1982*, S. 57.
 198. Pashchenko, I. N.: Nitrogen exchange in tobacco varieties and hybrids differing in resistance to *Peronospora*; *Tabak (Mosc.)* Nr. 3, 1982, S. 40.
 199. Pashchenko, I. N.: Development of *Peronospora* on tobacco in the Dnestr area of the Ukraine; *Tabak (Mosc.)* Nr. 4, 1983, S. 45.
 200. Passiatore, J. E., K. C. Sink: Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of selected ornamental *Nicotiana* species; *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 106 (1981) 799.
 201. Peasley, E. L., G. B. Collins: An *in vitro* system for disease expression in tobacco; in: *Agronomy Abstracts, Am. Soc. Agron., Madison, Wis., U.S.A., 1983*, S. 75.
 202. Piven', N. M.: Regeneration of whole plants from isolated leaf mesophyll protoplasts of *Nicotiana debneyi* DOMIN; *Tsitol. Genet.* 15 (1981) 35.
 203. Polacco, J. C., M. L. Polacco: Inducing and selecting valuable mutations in plant cell culture — A tobacco mutant resistant to carboxin; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 287 (1977) 385.
 204. Prat, D.: Genetic variability induced in *Nicotiana sylvestris* by protoplast culture; *Theor. Appl. Genet.* 64 (1983) 223.
 205. Quintero, S., J. Santiesteban: Response of twenty Virginia tobacco varieties to infection with TMV; *Cienc. Téc. Agric., Tabaco* 3 (1980) 75.
 206. Quintero, S., J. Santiesteban: Response of different tobacco varieties to weather fleck; *Cienc. Téc. Agric., Tabaco* 4 (1981) 61.
 207. Rao, K. A., K. T. Ramavarma, B. G. Joshi: Interspecific hybridization and breeding for pest resistance in tobacco; *Tob. Sci.* 24 (1980) 46.
 208. Rao, S. V., J. S. L. Moses: Effect of EMS on growth and mutation frequency in F.C.V. tobacco; *Tob. Res.* 8 (1982) 19.
 209. Rashid, A., J. Reinert: *In vitro* differentiation of embryogenic pollen, control by cold treatment and embryo formation in *ab initio* pollen cultures of *Nicotiana tabacum* var. Badischer Burley; *Protoplasma* 109 (1981) 285.
 210. Rashid, A., H. E. Street: The development of haploid embryoids from anther cultures of *Atropa belladonna* L.; *Planta (Berl.)* 113 (1973) 263.
 211. Raveh, D.: True breeding tobacco lines with new morphological phenotypes obtained from X-irradiated protoplasts; *Plant Cell Rep.* 2 (1983) 51.

212. Reed, S. M.: Interspecific hybridization in *Nicotiana* through *in vitro* culture of fertilized ovules; Diss. Abstr. Int. B Sci. Eng. B41 (1980) 424.
213. Reed, S. M., G. B. Collins: Interspecific hybrids in *Nicotiana* through *in vitro* culture of fertilized ovules; J. Hered. 69 (1978) 311.
214. Reed, S. M., G. B. Collins: Histological evaluation of seed failure in three *Nicotiana* interspecific hybrids; Tob. Int. (N.Y.) 182, Nr. 25 (1980) 47.
215. Reed, S. M., E. A. Wernsman: The doubled haploid experience in *Nicotiana*; in: Agronomy Abstracts, Am. Soc. Agron., Madison, Wis., U.S.A., 1983, S. 77.
216. Rosenberg, S. M., H. T. Bonnett: Floral organogenesis in *Nicotiana tabacum* — A comparison of two cytoplasmic male-sterile cultivars with a male fertile cultivar; Am. J. Bot. 70 (1983) 266.
217. Rowe, D. E., G. R. Gwynn: Modeling of genetic effects with divergent selection for yield in tobacco dihaploids; Tob. Int. (N.Y.) 185, Nr. 16 (1983) 26.
218. Rufty, R. C.: Studies of the association between resistance to the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and a necrotic reaction to infection by strain M⁵N⁸ of potato virus Y in *Nicotiana tabacum*; Diss. Abstr. Int. B Sci. Eng. B43 (1982) 578.
219. Sanford, D. A. van, D. F. Matzinger: Mass selection for tobacco seedling weight under two nutrient regimes; Crop. Sci. 23 (1983) 1163.
220. Santiesteban, J., S. Quintero, J. del Sol, H. García: Protoplasts and their prospects in tobacco breeding; Cienc. Téc. Agric., Tabaco 3 (1980) 61.
221. Saragoni, H.: Création de six variétés de tabac brun résistantes à l'oïdium (*Erysiphe cichoracearum*); Annu. Rep. IRAT-Réunion 1980, 83 S. (CORESTA Information Bulletin 1981—4, S. 43).
222. Saragoni, H.: Bilan de sept années (1974—1980) d'une expérimentation internationale sur la résistance de variétés de tabac à l'oïdium; Agro. Trop. (Maracay) 37 (1982) 306.
223. Sastri, A. B., K. V. Krishnamurthy, K. Nagarajan: Performance of tobacco mosaic virus resistant flue-cured tobacco varieties under field conditions; Tob. Res. 7 (1981) 145.
224. Sastri, A. B., K. Nagarajan, N. A. Elias, J. S. L. Moses, T. S. N. Reddy: Performance of mosaic and powdery mildew resistant tobacco varieties in India; Vortrag anlässlich des CORESTA Symposions 1982 (on progress in tobacco research) in Winston-Salem, N.C., U.S.A., CORESTA Information Bulletin 1982, Special Issue, S. 70.
225. Schipfer, L.: Neue Burley-Sorten in Aussicht; Tabakpflanzer Österreichs 33 (1982) 14.
226. Scowcroft, W. R., P. J. Larkin: Isolation, culture and plant regeneration from protoplasts of *Nicotiana debneyi*; Aust. J. Plant Physiol. 7 (1980) 635.
227. Scowcroft, W. R., P. J. Larkin: Chloroplast DNA assortments randomly in intra-specific somatic hybrids of *Nicotiana debneyi*; Theor. Appl. Genet. 60 (1981) 179.
228. Sficas, A. G., N. M. Ioannidis: Performance of Oriental and Burley tobacco hybrids in Greece; Tob. Sci. 24 (1980) 97.
229. Shakurov, M. I.: Aspects of culturing isolated protoplasts of different *Nicotiana* species; Fiziol. Rast. 29 (1982) 150.
230. Sharma, D. P., E. Firoozabady, N. M. Ayres, D. W. Galbraith: Improvement of anther culture in *Nicotiana* — Media, cultural conditions and flow cytometric determination of ploidy levels; Z. Pflanzenphysiol. 111 (1983) 441.
231. Sheen, S. J.: Isozymic evidence bearing on the origin of *Nicotiana tabacum* L.; Evolution 26 (1972) 143.
232. Shepherd, J. A., R. F. Coombs: The effect of four *Meloidogyne* species (Nematoda: Meloidogynidae) on breeding lines of *Nicotiana* resistant to *Meloidogyne javanica*; Zimbabwe J. Agric. Res. 19 (1981) 123.
233. Shew, H. D.: Effect of host resistance level on spread of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* under field conditions; Phytopathology 73 (1983) 505.
234. Shizukuda, N., T. Nakajima: Production of interspecific hybrids between *Nicotiana rustica* L. and *N. tabacum* L. by ovule culture; Jpn. J. Breed. 32 (1982) 371.
235. Shizukuda, N., K. Yamamoto, T. Nakajima: Sexual transfer of an incomplete chromosome complement from *Nicotiana tabacum* L. to *N. rustica* L.; Jpn. J. Breed. 33 (1983) 15.
236. Sidorov, V. A., L. Menczel, F. Nagy, P. Maliga: Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated iodoacetate treated protoplasts; Planta (Berl.) 152 (1981) 341.
237. Skoog, H. A., M. K. Aycock: Maryland 341 — A new variety of Maryland tobacco; Maryland Agric. Exp. Stn. Misc. Publ. Nr. 971, 1981, 12 S.
238. Slana, L. J., J. R. Stavely: Identification of the chromosome carrying the factor for resistance to *Meloidogyne incognita* in tobacco; J. Nematol. 13 (1981) 61.
239. Slogteren, G. M. S. van, J. H. Hoge, P. J. J. Hooykaas, R. A. Schilperoort: Clonal analysis of heterogenous crown gall tumor tissues induced with wild-type and shooter mutant strains of *Agrobacterium tumefaciens* — Expression of T-DNA genes; Plant Mol. Biol. 2 (1983) 321.
240. Ślusarkiewicz-Jarzina, A., M. Zenkteler: Development of hybrid plants from ovules of *Nicotiana tabacum* pollinated *in vitro* with pollen grains of *Nicotiana knightiana*; Experientia (Basel) 39 (1983) 1399.
241. Smith, H. H.: The genus as a genetic resource; in: *Nicotiana* — Procedures for experimental use, hrsg. von R. D. Dubin, U.S. Department of Agriculture Tech. Bull. Nr. 1586, Washington, D.C., 1979, S. 1.

242. Stavely, J. R., G. R. Gwynn, J. F. Chaplin: Brown spot resistance in *Nicotiana tabacum* germplasm; *Tob. Int.* (N.Y.) 183, Nr. 5 (1981) 106.
243. Su, S. J., S. K. Sun: Studies on the tobacco brown spot disease in Taiwan, I. Morphology and pathogenicity of *Alternaria alternata*; *Bull. Taiwan Tob. Res. Inst.* 15 (1981) 99.
244. Sun, Y. R., M. J. Huang, W. B. Li, X. H. Li: Regeneration of somatic hybrid plants of *Nicotiana glauca* and *Petunia hybrida*; *Acta Genet. Sin.* 9 (1982) 284.
245. Sun, Y. R., M. L. Huang, W. B. Li, X. H. Li: Regeneration of somatic hybrid plants; in: *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*, Science Press, Beijing, China, 1983, S. 447.
246. Sunderland, N., F. M. Wicks: Cultivation of haploid plants from tobacco pollen; *Nature* (Lond.) 244 (1969) 1227.
247. Suzuki, I., K. Tomaru, Y. Sawa, M. Araki: Tobacco vein necrosis disease caused by a necrotic strain of potato virus Y in Japan, II. Occurrence in Burley tobacco in Aomori prefecture; *Bull. Morioka Tob. Exp. Stn.* Nr. 17, 1983, S. 97.
248. Terrill, T. R., J. J. Reilly: Registration of VA 182 tobacco; *Crop Sci.* 23 (1983) 1221.
249. Thanutong, P., I. Furusawa, M. Yamamoto: Resistant tobacco plants from protoplast-derived calluses selected for their resistance to *Pseudomonas* and *Alternaria* toxins; *Theor. Appl. Genet.* 66 (1983) 209.
250. Tomes, D. T., G. B. Collins: Factors affecting haploid plant production from *in vitro* anther cultures of *Nicotiana* species; *Crop Sci.* 16 (1976) 837.
251. Trinh, T. H., T. Gaspar, K. Tran Thanh Van, J. L. Marcotte: Genotype, ploidy and physiological state in relation to isoperoxidases in *Nicotiana*; *Physiol. Plant.* 53 (1981) 153.
252. Tsikov, D., I. Popivanov: Tobacco variety M'zhkosterilen Khibrid 17; *Rasteniev'd. Nauki* 18 (1981) 46.
253. Uchimiya, H.: Somatic hybridization between male sterile *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa* through protoplast fusion; *Theor. Appl. Genet.* 61 (1982) 69.
254. Valleau, W. D.: Variability and genetics — Special methods and general breeding methods; in: *Handbuch der Pflanzenzüchtung, Band 5: Züchtung der Sonderkulturpflanzen*, hrsg. von H. Kappert and W. Rudolf, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 2. Auflage, 1961, S. 135.
255. Vasil, V., I. K. Vasil: Regeneration of tobacco and petunia plants from protoplasts and culture of corn protoplasts; *In Vitro* 10 (1974) 83.
256. Verna, J. W. de, M. K. Aycock: Hybridization among Maryland, Burley, fire-cured, sun-cured and flue-cured type tobaccos, I. Genetic diversity; *Tob. Sci.* 27 (1983) 18.
257. Verna, J. W. de, G. B. Collins: *In vitro* facilitated wide hybridization in *Nicotiana*; in: *Agronomy Abstracts, Am. Soc. Agron., Madison, Wis., 1983*, S. 61.
258. Vinogradov, V. A., S. A. Naumenko: Degree of field resistance to *Peronospora* in tobacco varieties and hybrids with R genes; *Sb. Nauchno-Issled. Rab. Vses. Nauchno-Issled. Inst. Tab. Makhorki* Nr. 170, 1981, S. 36.
259. Vinogradov, V. A., E. K. Mironov, Y. F. Sarychev, L. I. Trofimova, V. I. Vlasov, P. P. Nosova, K. I. Ivanitskii: Potential for field resistance to *Myzus persicae* in tobacco varieties and hybrids; *Tabak (Mosc.)* Nr. 3, 1981, S. 61.
260. Vinogradov, V. A., L. I. Trofimova, Y. F. Sarychev: Field resistance of varieties, hybrids and chemical mutants of tobacco to tobacco thrips and tomato spotted wilt virus; *Tabak (Mosc.)* Nr. 3, 1982, S. 43.
261. Vyskot, B., F. J. Novak: Experimental androgenesis *in vitro* in *Nicotiana clevelandii* GRAY and *N. sanderae* HORT; *Theor. Appl. Genet.* 44 (1973) 138.
262. Wan, H., C. H. Chen, J. K. Wu: Breeding tobacco resistant to cucumber mosaic virus in Taiwan; *Euphytica* 33 (1984) 17.
263. Wang, P. T., J. Y. Chen, S. M. Zhao, J. X. Xu, L. Q. Wang: Interspecific hybrid plants by protoplast fusion; in: *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*, Science Press, Beijing, China, 1983, S. 448.
264. Werner, C. P., I. M. Dunkin, M. A. Cornish, G. H. Jones: Gene transfer in *Nicotiana rustica* by means of irradiated pollen, II. Cytogenetical consequences; *Heredity* 52 (1984) 113.
265. White, R. F.: Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco; *Virology* 99 (1979) 410.
266. White, F. H., R. S. Pandeya, W. J. Arsenault: 'Windel', a high yielding, wind tolerant flue-cured tobacco for maritimes; *Lighter* 53 (1983) 31.
267. White, D. W. R., I. K. Vasil: Use of amino acid analogue-resistant cell lines for selection of *Nicotiana sylvestris* somatic cell hybrids; *Theor. Appl. Genet.* 55 (1979) 107.
268. Widoyo, A.: Genetic resources of cigar tobacco in Indonesia; Vortrag anlässlich Fourth International SABRAO congress, 1981, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur.
269. Widoyo, A., I. Hartana: Progress in the breeding of Besuki cigar tobacco; Vortrag anlässlich 7th Int. Tob. Sci. Congr. (CORESTA), Manila, Philippinen, CORESTA Information Bulletin 1980, Special Issue, S. 107.
270. Wolfe, M. S., J. A. Barrett, J. E. E. Jenkins: The use of cultivar mixtures for disease control; in: *Strategies for the control of cereal disease*, hrsg. von J. F. Jenkyn and R. T. Plumb, Blackwell, Oxford, England, 1981.

271. Wu, B. J., K. C. Cheng: Cytological and embryological studies on haploid plant production from cultured unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum*; *Acta Bot. Sin.* 24 (1982) 125.
272. Wullems, G. J., L. Molendijk, G. Ooms, R. A. Schilperoort: Differential expression of crown gall tumor markers in transformants obtained after *in vitro* *Agrobacterium tumefaciens*-induced transformation of cell wall regenerating protoplasts derived from *Nicotiana tabacum*; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (1981) 4344.
273. Yamamoto, Y., M. Miyachi: Effects of genes controlling resistance to potato virus Y on major agronomic characteristics of flue-cured tobacco; *Bull. Iwate Tob. Exp. Stn. Nr. 15*, 1983, S. 25.
274. Yamamoto, Y., M. Sato: Evaluation and genetical analysis of potato virus Y resistance of domestic Japanese tobacco; *SABRAO Journal* 14 (1982) 47.
275. Yang, F., R. B. Simpson: Revertant seedlings from crown gall tumors retain a portion of the bacterial Ti plasmid DNA sequences; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (1981) 4151.
276. Yoshida, T., T. Oinuma, M. Sato, H. Kitano, K. Nakahara: Breeding B104, B105 and KB lines of Burley tobacco resistant to black shank disease, and their characteristics; *Bull. Morioka Tob. Exp. Stn. Nr. 15*, 1981, S. 25.
277. Zelcer, A., D. Aviv, E. Galun: Interspecific transfer of cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts of normal *Nicotiana sylvestris* and X-ray irradiated protoplasts of male-sterile *N. tabacum*; *Z. Pflanzenphysiol.* 90 (1978) 397.
278. Zhang, J. M.: Plantlets regenerated from mesophyll protoplasts of *Nicotiana alata*; *Acta Bot. Sin.* 23 (1981) 496.
279. Zhu, Z. C., H. S. Wu, Z. Y. Liu, Q. K. An: Production of haploid plantlets from unpollinated ovaries; in: *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*, Science Press, Beijing, China, 1983, S. 441.

Anschrift des Verfassers:

*Institut für Angewandte Genetik,
Herrenhäuser Straße 2,
D—3000 Hannover 21.*