

**Erstellung und Charakterisierung
polyploider Genotypen von
Calluna vulgaris (L.) Hull**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Annett Przybyla, M.Sc.

geboren am 06.12.1986 in Suhl

2016

Referentin: Prof. Dr. rer. hort. Annette Hohe
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Debener
Korreferentin: Prof. Dr. rer. hort. Traud Winkelmann
Tag der Promotion: 13.10.2016

Zusammenfassung

Die Besenheide *Calluna vulgaris* (L.) Hull gehört zur Gruppe der umsatzstärksten Beet- und Balkonpflanzen in Deutschland. Da es sich um eine monophyletische Gattung handelt, steht den Züchtern nur eine geringe genetische Variabilität zur Verfügung. Der enge Genpool von *C. vulgaris* führte in der Vergangenheit zu Konflikten bezüglich Sortenschutzrechten zwischen den Züchtern. Um die große wirtschaftliche Bedeutung der Pflanze in Zukunft zu sichern, sollen trotz des engen genetischen Pools neue Erscheinungsformen hervorgebracht und ein System zur Differenzierung des Sortenspektrums entwickelt werden. Eine Möglichkeit zur Neuheitenzüchtung ist die Polyploidisierung, welche eine Vervielfachung des Chromosomensatzes ist und bei *C. vulgaris* in einer Vergrößerung der Pflanzenorgane resultiert. Ziel der Arbeit war daher, Möglichkeiten zur Züchtung polyploider Sorten von *C. vulgaris* zu prüfen. Zusätzlich sollte ein verbessertes System zur Genotypenidentifizierung auf Basis von SSR-Markern etabliert werden, da durch somatische Polyploidisierung entstandene Polyploide potentiell abgeleitete Sorten darstellen.

Es wurde untersucht, inwieweit bei *C. vulgaris* eine hohe Anzahl stabiler polyploider Pflanzen durch Mitosehemmung *in vitro* erstellt werden kann. Dafür wurden keimendes Saatgut und Sprossspitzen mit den Mitosehemmern Colchizin, Trifluralin, Oryzalin und Amiprofos-methyl behandelt. Durch mehrfaktorielle Versuche konnten mit Colchizin 45 mixoploide Pflanzen, mit Trifluralin 70 mixoploide Pflanzen und mit Oryzalin eine mixoploide Pflanze erzeugt werden. Am effektivsten war die Verwendung einer 1,8 % Gelrite-Lösung mit Colchizin bzw. Trifluralin auf Keimlingen, bei denen die Kotyledonen austraten. Allerdings entwickelten sich alle somatisch induzierten Mixoploiden auf das diploide Niveau zurück oder starben ab.

Erfolgreicher war die Erstellung neuer polyploider Genotypen über unreduzierte Gameten. Polyploide traten bereits spontan in Kreuzungsnachkommenschaften auf und entstanden des Weiteren durch freie Abblüten der Polyploiden. Um neue polyploide Genotypen zu erzeugen, wurden gezielte interploide Kreuzungen durchgeführt. Vor allem wurden tetraploide und diploide Genotypen miteinander gekreuzt, um Triploide zu erstellen. Mit der Kreuzungsrichtung $4x \times 2x$ wurden Triploide erzeugt, mit der reziproken Kreuzung $2x \times 4x$ jedoch nicht. Bei der Züchtung von *C. vulgaris* wird insbesondere auf das Merkmal „Knospenblütigkeit“ geachtet, da dieses wirtschaftlich sehr wichtig ist. Auf der Grundlage einer freien Abblüte einer tetraploiden Pflanze konnte die rezessive polysome Vererbung des Blütentyps „Knospenblütigkeit“ auf polyploidem Niveau nachgewiesen und die Abstammung der Nachkommenschaft mittels AFLP untersucht werden.

Zur Analyse der Abstammung Polyploider wurden zudem elf SSR-Marker für *C. vulgaris* etabliert. Ein EST-SSR-Marker wurde auf der Grundlage von EST-Daten von *C. vulgaris* erstellt und zehn genomische SSR-Marker wurden gattungsübergreifend innerhalb der Pflanzenfamilie Ericaceae übertragen. Die Allelfrequenzen von sechs der elf polymorphen Marker waren innerhalb und zwischen den einzelnen Markern unabhängig. Auf Grundlage der etablierten SSR-Marker konnte ein System zur Identifikation abgeleiteter Sorten für *C. vulgaris* übertragen werden, das auch für polyploide Sorten genutzt werden kann.

Die Züchtung von *C. vulgaris* auf polyploidem Niveau ist daher möglich. Für die Erzeugung triploider Knospenblüher wird empfohlen, knospenblühende tetraploide Mutterpflanzen mit dem Pollen heterozygoter diploider Einfachblüher zu bestäuben.

Schlagwörter: Polyploidie, Heide, Knospenblütigkeit, Simple Sequence Repeats, Durchflusscytometrie

Abstract

Calluna vulgaris (L.) Hull (heather) is an important bedding and landscaping plant in Germany. It is the only species within the genus, so there is only a low genetic variability available for breeding new varieties. Because of the narrow genetic pool, several conflicts between breeders arose in the past regarding the ownership of breeders' rights. In order to ensure the great economic importance of this plant in the future, despite the narrow genetic pool new phenotypes should be produced and a system for variety identification based on molecular markers should be developed. Within the species *C. vulgaris*, new phenotypes could be generated through polyploidization – a multiplication of the chromosome set. Polyploidy usually results in an attractive increase of plant organ sizes. Therefore, the aim of the study was to examine possibilities for breeding polyploid varieties of *C. vulgaris*. In addition, an improved system for genotype identification based on SSR markers should be established, as polyploids originating from somatic polyploidization represent essentially derived varieties.

Various methods for the creation of stable polyploid plants using antimitotic agents *in vitro* were compared for *C. vulgaris*. Germinating seeds and shoot tips were treated with the antimitotic agents colchicine, trifluralin, oryzalin and amiprophosmethyl. By multifactorial experiments, 45 mixoploids were generated with colchicine, 70 mixoploids with trifluralin and one mixoploid plant with oryzalin. The most effective method for the induction of polyploidy was the treatment of seedlings during the breakthrough of the cotyledons by a 1.8 % gelrite-solution with colchicine and trifluralin. However, all somatically induced mixoploids developed back to the diploid level or died.

More successful was the production of new polyploid genotypes by spontaneously arising unreduced gametes. Polyploid genotypes occurred spontaneously in the progenies of diploid crossings and after open pollination of polyploids. In order to produce new polyploid genotypes, systematic interploid crossings were made. Especially tetraploid and diploid genotypes were crossed with each other to create triploids. By crossing tetraploid seed parents with diploid pollinizers, triploids were produced, but not through the reciprocal crossing. In breeding of *C. vulgaris*, the so-called "bud-blooming" flower type is of special interest because of its prolonged flowering period. On the basis of open pollination of a tetraploid genotype in a field of diploid plants, the recessive and polysomic inheritance of the "bud-blooming" trait on tetraploid level was proven. Moreover, the origin of the progeny of this tetraploid genotype was investigated using molecular markers.

To analyse the derivation of polyploids eleven SSR markers were established for *C. vulgaris*. One EST-SSR marker was detected in an EST data of *C. vulgaris* and ten genomic SSR markers were transferred by cross-genera amplification within the plant family Ericaceae. The allele frequencies of six out of the eleven polymorphic loci were independent within and between the individual loci. On the basis of the established SSR markers a system for identifying essentially derived varieties of *C. vulgaris* could be transferred, which can also be used for polyploid varieties.

Therefore, breeding of *C. vulgaris* on polyploid level is possible. For the production of triploid bud-bloomers, the pollination of tetraploid bud-bloomers with the pollen from diploid heterozygous wildtypes is recommended.

Keywords: Polyploidy, Heather, Bud-bloomers, Simple Sequence Repeats, Flow Cytometry

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
III	Abbildungsverzeichnis	VII
IV	Tabellenverzeichnis	VIII
1	Einleitung	1
1.1	<i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull	1
1.1.1	Allgemeine Charakterisierung der Pflanzenart.....	1
1.1.2	Kultur und Züchtung	2
1.2	Polyploide Genotypen im Pflanzenreich.....	2
1.2.1	Rolle der Polyploidie in der Evolution	2
1.2.2	Reproduktive Eigenschaften auto- und allopolyploider Pflanzen.....	4
1.2.3	Bedeutung in der Pflanzenzüchtung	5
1.2.4	Ermittlung von Genomgröße und Ploidiestufe.....	6
1.3	Verfahren der Polyploidisierung	7
1.3.1	Mitosehemmung	7
1.3.2	Unreduzierte Gameten	8
1.4	Interploide Kreuzungen.....	9
1.4.1	Reproduktive Barrieren.....	9
1.4.2	Wege zur Triploidie	10
1.5	Molekularbiologische Methoden zur Genotypenidentifikation	10
1.5.1	Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	10
1.5.2	Simple Sequence Repeats (SSR)	11
1.6	Ziele der Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Pflanzenmaterial.....	13
2.1.1	Pflanzenkultur	13
2.1.2	Kreuzungen	13
2.1.3	<i>In vitro</i> -Kultur	15
2.2	Morphologische Analysen	17
2.3	Durchflusscytometrie.....	18
2.3.1	Bestimmung des DNA-Gehalts.....	18
2.3.2	Nachweis von Aneuploidie.....	19

2.4	Cytogenetische Analysen	20
2.4.1	Mitotische Zellteilung	20
2.4.2	Meiotische Zellteilung	20
2.5	Untersuchungen zur Pollenfertilität.....	21
2.5.1	Pollenvitalität.....	21
2.5.2	Pollenkeimung <i>in vitro</i>	21
2.5.3	Pollenkeimung <i>in vivo</i>	21
2.6	Molekularbiologische Markeranalysen.....	22
2.6.1	Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	22
2.6.2	Simple Sequence Repeats (SSR)	24
2.7	Polyploidisierung von Pflanzenmaterial <i>in vitro</i>	29
2.7.1	Behandlung von Saatgut und Sämlingen.....	29
2.7.2	Behandlung von Sprossspitzen.....	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Charakterisierung von Pflanzen unterschiedlicher Ploidiestufen	33
3.1.1	Morphologische Unterschiede	33
3.1.2	Chromosomenzählung.....	36
3.1.3	Optimierung der Durchflusscytometrie	37
3.2	Etablierung von SSR-Markern.....	39
3.2.1	Suche nach SSR-Sequenzen in einer Blüten-EST-Datenbank von <i>Calluna vulgaris</i>	39
3.2.2	Übertragbarkeit von SSR-Markern innerhalb der Pflanzenfamilie Ericaceae 41	
3.2.3	Charakterisierung von elf ausgewählten SSR-Markern.....	43
3.3	Erstellung polyploider Pflanzen durch Mitosehemmung <i>in vitro</i>	46
3.3.1	Induktion von Polyploidie an keimendem Saatgut.....	46
3.3.2	Induktion von Polyploidie an Sprossspitzen	54
3.4	Erstellung neuer polyploider Genotypen durch Kreuzungen.....	57
3.4.1	Analyse der Nachkommenschaft einer freien Abblüte eines tetraploiden Genotyps.....	58
3.4.2	Interploide Kreuzungen	64
3.5	Fertilität Triploider	71
3.5.1	Mikroskopische Analyse der Pollenmeiose.....	71
3.5.2	Analyse der Nachkommenschaft einer freien Abblüte von triploiden Genotypen.....	75
3.6	Genotypenidentifikation anhand von SSR-Markern	77
4	Diskussion	80

4.1	Charakterisierung von Pflanzen unterschiedlicher Ploidiestufen	80
4.1.1	Morphologische Unterschiede	80
4.1.2	Chromosomenzählung.....	81
4.1.3	Optimierung der Durchflusscytometrie	82
4.2	Induktion von Polyploidie durch Mitosehemmung <i>in vitro</i>	84
4.2.1	Mitosehemmung an keimendem Saatgut.....	84
4.2.2	Mitosehemmung an Sprossspitzen.....	85
4.3	Erzeugung neuer polyploider Genotypen durch Kreuzungen.....	86
4.3.1	Ploidiestufen der Kreuzungsnachkommen	86
4.3.2	Untersuchung des Pollens und des Saatguts im Rahmen der Kreuzungsversuche.....	88
4.4	Problematik der Triploidie	90
4.4.1	Erzeugung von Triploiden.....	90
4.4.2	Fertilität von Triploiden.....	91
4.5	Genotypenidentifikation mittels molekularer Marker	93
4.5.1	Nutzung von AFLP und SSR-Markern zur Analyse einer Nachkommenschaft aus freier Abblüte einer tetraploiden Pflanze.....	93
4.5.2	Nutzung von SSR-Markern zur Identifikation abgeleiteter Sorten	95
4.6	Züchtung von <i>Calluna vulgaris</i> auf polyploidem Niveau.....	98
5	Literaturverzeichnis	101
6	Anhang.....	116
	Lebenslauf	123
	Veröffentlichungen	124
	Danksagung	125

II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AE	Ethanol-Eisessig-Gemisch
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AgNO ₃	Silbernitrat
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
APM	Amiprofos-methyl
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CaCl ₂	Calciumchlorid
cm	Zentimeter
CoCl ₂	Cobalt(II)-chlorid
CPVO	Community Plant Variety Office
C-Wert	Chromatinwert
CuSO ₄	Kupfer(II)-sulfat
CV	Variationskoeffizient
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonucleid Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Essentially Derived Variety (im Wesentlichen abgeleitete Sorte)
EST	Expressed Sequence Tag (Exprimierte Sequenzabschnitte)
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
etc.	et cetera (und so weiter)
Fa.	Firma
FCM	Durchflusscytometrie
FDA	Fluoresceindiazetat
FDR	First Division Restitution
FE	Fluorescent Emission (Fluoreszenzintensität)
FeNaEDTA	Eisenchelate-Dünger
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H _E	Erwartete Heterozygotie
H _O	Beobachtete Heterozygotie
HSD	Honestly Significant Difference
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht)
H ₂ O	Wasser

H ₃ BO ₃	Borsäure
Inc.	Incorporated
IRD	Infrared Dye
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
k	kilo
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Kaliumiodid
klx	kilolux
KNO ₃	Kaliumnitrat
K ₃ PO ₄	Kaliumphosphat
KSA	Kolmogorow-Smirnow-Anpassungstest
LE	Linkage Equilibrium (Kopplungsgleichgewicht)
LD	Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
m	Meter
M	molar
mA	Milliampere
MANOVA	Multivariate Analysis of Variance (mehrfaktorielle Varianzanalyse)
max.	maximal
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MnSO ₄	Mangan(II)-sulfat
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS-Medium	Murashige-Skoog-Medium
MW	Mittelwert
n	nano
N	Anzahl
N _a	Anzahl Allele
NaMoO ₄	Natriummolybdat
NaOCl	Natriumhypochlorit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH ₄ NO ₃	Ammoniumnitrat
nm	Einheit Wellenlänge
N ₂	Stickstoff
p	pico
Pa	Pascal
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pg	Pikogramm
PI	Propidiumiodid
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

s	Standardabweichung
SE	Standardfehler
sec	Sekunde
SDR	Second Division Restitution
SSR	Simple Sequence Repeats
T _a	Annealing-Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
U	Unit
u. a.	unter anderem
UPOV	International Union For The Protection Of New Varieties Of Plants
V	Volt
v. a.	vor allem
var.	Varietät
W	Watt
x	Basischromosomensatz
χ ² -Test	Chi-Quadrat-Test
z. B.	zum Beispiel
ZnSO ₄	Zink(II)-sulfat
μ	mikro
μl	Mikroliter
α	Alpha
β	Beta
λ	Lambda, Wellenlänge
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Σ	Summe
2x	Diploid
3x	Triploid
4x	Tetraploid

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sorte 'Maria', Sorte 'Perestrojka', Genotyp '7705'	13
Abbildung 2: <i>In vitro</i> -Keimlinge.....	16
Abbildung 3: Sichtbarmachung der Stomata durch Betrachtung der Epidermis	17
Abbildung 4: Präparation einer Blütenknospe.	20
Abbildung 5: Drei verschiedene Entwicklungsstadien von Keimlingen.....	30
Abbildung 6: Entwicklungsreihe von Sämlingen.	31
Abbildung 7: Kultivierung und Vermehrung der behandelten Sprossspitzen.....	32
Abbildung 8: Behandlung von Sprossspitzen mit 1,8 % Gelrite-Lösung.	32
Abbildung 9: Blüten, Laubblatt und Sprossspitze Diploider und Tetraploider.....	36
Abbildung 10: Sichtbarmachung der Chromosomen (1000-fache Vergrößerung).....	36
Abbildung 11: Unterschiedliche Laub- und Blütenfarben von <i>C. vulgaris</i>	37
Abbildung 12: Mittelwerte der Intensität der Fluoreszenzsignale [FE] der FCM-Messungen.....	38
Abbildung 13: Fluoreszenzsignale [FE] im Durchflusscytometer (DAPI-Färbung).....	39
Abbildung 14: Allelfrequenzen der elf SSR-Marker in 40 heterogenen Genotypen.	45
Abbildung 15: Pflanzen aus dem ersten Colchizin-Versuch (A1).	47
Abbildung 16: Tägliche Tropfenbehandlung (Dauer: 9 d) von Saatgut mit Colchizin.	47
Abbildung 17: Behandlung von Saatgut 48 h mit Colchizin nach 24 h bzw. 48 h Vorquellung.....	48
Abbildung 18: Keimrate 25 Tage nach Versuchsbeginn auf Festmedium.	50
Abbildung 19: Saatgut 48 h Inkubation.	51
Abbildung 20: Polyploidisierungsraten (Versuch D2) durch zweimalige Betropfung.....	54
Abbildung 21: Mit 3 % freiem Chlor (NaOCl) sterilisierte Sprossspitzen.....	55
Abbildung 22: Zusammenfassung der Vitalitätsraten der Sprossspitzen.....	56
Abbildung 23: FCM-Messung des relativen DNA-Gehalts.....	58
Abbildung 24: Untersuchung einer möglichen Einkreuzung von 'Hammondii rubrifolia'.....	63
Abbildung 25: Durchschnitt der Größe von 20 einzelnen Pollenkörnern pro Genotyp.	65
Abbildung 26: Färbbarkeit des Pollens mit Fluoresceindiazetat (FDA).	66
Abbildung 27: Keimrate des Pollens <i>in vitro</i>	66
Abbildung 28: Mikroskopische Analyse der Pollentetraden der staminierten Eltern.....	67
Abbildung 29: Quetschpräparate eines Gynözeums von Genotyp 'Maria'.....	68
Abbildung 30: Untersuchung des Pollenschlauchwachstums.....	68
Abbildung 31: Samenernte pro Ploidie-Kombination.	69
Abbildung 32: Durchschnitt der Samengröße. Messung der Fläche.....	70
Abbildung 33: Keimraten des Saatguts.....	70
Abbildung 34: Ploidiestufen der Nachkommenschaften.	71
Abbildung 35: Meiosephasen diploider Genotypen.....	73
Abbildung 36: Meiosephasen des triploiden Genotyps 2008.177/451.	73
Abbildung 37: Meiosephasen tetraploider Genotypen.....	74
Abbildung 38: Färbbarkeit des Pollens von fünf Diploiden, fünf Triploiden, fünf Tetraploiden.	75
Abbildung 39: Box-Plot-Darstellung (Vertex42 LLC, 2009) der Verhältnisse der Peakpositionen.....	77

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kreuzungsliste von Genotypen unterschiedlicher Ploidiestufen.....	14
Tabelle 2: Komponenten des Master-Mixes für die Ligation.....	22
Tabelle 3: PCR-Ansatz für die Prä-Amplifikation mit unspezifischen Primern.....	23
Tabelle 4: PCR-Ansatz für die finale Amplifikation mit spezifischen Primern.....	23
Tabelle 5: Test publizierter SSRs der nah verwandten Pflanzenarten.....	25
Tabelle 6: Test von elf EST-SSR-Markern von <i>C. vulgaris</i> und acht genomischen SSR-Markern.	25
Tabelle 7: Test von 27 genomischen SSR-Markern aus <i>D. multiflora</i> (Zhang et al. 2013).	26
Tabelle 8: Test von 20 SSR-Markern bei <i>C. vulgaris</i> , die für <i>Rhododendron</i> entwickelt wurden.	27
Tabelle 9: 23 SSR-Marker von <i>Vaccinium corymbosum</i> (Boches et al. 2005), die getestet wurden..	27
Tabelle 10: Test von 23 SSR-Markern von <i>V. corymbosum</i> (Boches et al. 2005).	28
Tabelle 11: Etabliertes PCR-Protokoll für die Anwendung der SSR-Marker bei <i>C. vulgaris</i>	29
Tabelle 12: Genotypen von <i>C. vulgaris</i> für morphologische Untersuchungen.....	33
Tabelle 13: Länge und Breite der Laubblätter [μm] von jeweils drei Organen pro Pflanze.....	34
Tabelle 14: Länge und Breite der Sepalen [μm] von jeweils drei Organen pro Pflanze.....	34
Tabelle 15: Stomatalänge der Ploidiestufen diploid ($n = 10$) und tetraploid ($n = 10$).....	35
Tabelle 16: Pollenkorngröße [μm^2].....	35
Tabelle 17: Repetitive Sequenzen.....	40
Tabelle 18: Flankierenden Sequenzen der 17 dargestellten EST-SSR-Motive (Dinukleotide).	40
Tabelle 19: Diploide SSR-Charakterisierungspopulation von 40 Genotypen.	41
Tabelle 20: 23 publizierte genomische SSR-Marker angewendet im Vorversuch.....	42
Tabelle 21: Zehn publizierte genomische SSR-Marker naher Verwandter innerhalb der Ericaceae.	42
Tabelle 22: Phylogenetische Einordnung der Pflanzen (Gillespie & Kron 2010)	43
Tabelle 23: Charakterisierung der polymorphen SSR-Marker anhand von 40 Genotypen.....	44
Tabelle 24: Höchste Allelfrequenz für die elf charakterisierten SSR-Marker in 40 Genotypen.....	44
Tabelle 25: Allelzahl (N_a), beobachtete Heterozygotie (H_0) und erwartete Heterozygotie (H_E).	46
Tabelle 26: Test der Mitosehemmer an keimendem Saatgut.....	49
Tabelle 27: Zusammenfassung der Behandlungsarten	49
Tabelle 28: Zusammenfassung der Tropfenbehandlungen.....	52
Tabelle 29: Polyploidisierungsraten (Versuch D2).....	53
Tabelle 30: Versuche zur Behandlung von Sprossspitzen mit Mitosehemmern	55
Tabelle 31: Zusammenfassung der Versuche zur <i>in vitro</i> -Etablierung von Sprossmaterial.....	55
Tabelle 32: Kreuzungsversuche (Heidepflanzen de Winkel) mit diploiden Genotypen.....	57
Tabelle 33: Freie Abblüte des tetraploiden Genotyps 2008.177/76.....	59
Tabelle 34: Blütenmorphologie von polyploiden Genotypen von <i>C. vulgaris</i>	60
Tabelle 35: 83 Genotypen, die mittels AFLP analysiert wurden.	60
Tabelle 36: Durchschnittliche AFLP-Banden, die im Genotyp '7705' nicht vorhanden waren.	61
Tabelle 37: SSR-Banden, die in der tetraploiden Mutterpflanze '7705' nicht vorhanden waren	62
Tabelle 38: Durchschnittliche AFLP-Banden spezifisch in 'Hammondii rubrifolia'.	63
Tabelle 39: Meiosephasen an Pollenmutterzellen.....	72
Tabelle 40: Freie Abblüten der triploiden Genotypen 5, 108, 204, 299 und 374.	76
Tabelle 41: Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mittels <i>Arlequin</i> und <i>Genepop</i>	78
Tabelle 42: Test auf Kopplungsgleichgewicht (LE) mittels <i>Arlequin</i>	78

Tabelle 43: Identifizierung von „Essentially Derived Varieties“ in <i>C. vulgaris</i>.	79
Tabelle 44: Nährmedium für <i>in vitro</i>-Kulturen (Murashige & Skoog 1962).	116
Tabelle 45: Zuordnung der Verhältnisse der Peakpositionen „<i>C. vulgaris</i> / <i>P. hybrida</i>“.	117
Tabelle 46: Ermittelte DNA-Gehalte von elf Sorten mittels Durchflusscytometrie.	117
Tabelle 47: Durchführung von 54 interploiden Kreuzungsvarianten.	118
Tabelle 48: Gewählte Sequenzen der Primer-Paare (Behrend et al. 2013) für die AFLP-Analyse. ...	118
Tabelle 49: 17 EST-SSR-Primerpaare auf der Grundlage der Blüten-EST-Daten von <i>C. vulgaris</i>.	119
Tabelle 50: Allelzahl (N_a), beobachtete Heterozygotie (H_o) und erwartete Heterozygotie (H_e). ...	120
Tabelle 51: Wahrscheinlichkeiten (Genotypfrequenzen) – berechnet aus den Allelfrequenzen. ...	121
Tabelle 52: Wahrscheinlichkeiten nach Multiplikation der Genotypfrequenzen der SSR-Loci.	122

1 Einleitung

1.1 *Calluna vulgaris* (L.) Hull

1.1.1 Allgemeine Charakterisierung der Pflanzenart

Die Pflanzenart *Calluna vulgaris* (L.) Hull (Besenheide, Sommerheide) gehört zur Klasse der bedecktsamigen Pflanzen (Magnoliopsida) und zur Ordnung der Heidekrautartigen (Ericales), welche 25 Pflanzenfamilien mit 346 Gattungen und mehr als 11.500 Arten umfasst (Stevens 2007). *C. vulgaris* ist die einzige Art der Gattung und gehört zur Familie der Ericaceae. Diese Pflanzenfamilie umfasst über 100 Gattungen und ungefähr 3850 Arten (Mabberley 2008). Zu den Ericaceae zählen auch andere kultivierte Gattungen wie *Rhododendron* (Alpenrose), *Vaccinium* (Heidelbeere), *Enkianthus* (Prachtglocke) und *Daboecia* (Irische Heide, Glanz-Heide). Kron et al. (2002) sowie Gillespie und Kron (2010) haben *Calluna* neben den Gattungen *Erica* und *Daboecia* phylogenetisch in die Tribus Ericaceae eingeordnet.

C. vulgaris ist auf der Nordhalbkugel verbreitet, von den Azoren bis zum Ural und vom nördlichen Kleinasien bis Marokko (Roloff & Bärtels 2006). In Deutschland kommt sie im Flachland und im Bergland an hellen Standorten mit saurem, stickstoffarmen Boden und in den Hochheiden (Baltisberger 2009) vor. Die Besenheide ist ein immergrünes Gehölz. Ältere Exemplare verlieren jedoch im unteren Bereich ihre Blätter. Aus diesem Grund werden Kulturpflanzen regelmäßig zurückgeschnitten. *C. vulgaris* besitzt schuppenförmige Laubblätter, die gegenständig angeordnet sind, dem Spross anliegen und sich dachziegelartig überdecken (Dörken & Jagel 2012). Diploide Genotypen von *C. vulgaris* haben 16 Chromosomen pro somatischer Zelle: $2n = 2x = 16$ (Wcislo 1990; Uhríkova & Dubravkova 1997).

Die Wildtypen von *C. vulgaris* blühen von August bis Oktober. Die Blüten befinden sich am Ende des Zweigs in langen traubigen Blütenständen (Dörken & Jagel 2012). Der Wildtyp besitzt synözische Blüten von radiärer Symmetrie mit doppelter Blütenhülle (Jacquemart 2003). Das Perianth besteht aus je vier bunten Organen (Kelch- und Kronblätter) in zwei Kreisen. Den Zierwert besitzen die Kelchblätter, welche deutlich größer sind. Die Blüte eines Wildtyps besteht weiterhin aus zwei Kreisen mit je vier Stamina und vier verwachsenen, oberständigen Fruchtblättern. Daraus ergibt sich folgende Blütenformel: $* K_4 C_{(4)} A_{4+4} \underline{G}_{(4)}$.

Die Bestäubung erfolgt größtenteils durch Insekten. Die Frucht wird zu Beginn des Folgejahres reif und ist von Kelchblättern umhüllt (Dörken & Jagel 2012). Bei den Früchten handelt es sich um rundliche Kapseln, die sich mit Klappen öffnen. Diese enthalten vier bis sechs kleine Samen von ca. 1,5 mm Länge (Baltisberger 2009). Durch Wind werden die Samen aus der reifen Frucht geschüttelt. Zur Keimung benötigt das Saatgut von *C. vulgaris* Licht (Sitte et al. 1991).

1.1.2 Kultur und Züchtung

Calluna vulgaris wird in der Pflanzenproduktion vegetativ vermehrt, entsprechend wird hier die Zuchtmethode der Klonzüchtung angewandt (Schnell 1982). Da *Calluna* eine monophyletische Gattung ist, steht den Züchtern nur ein relativ enger Genpool zur Verfügung. Bei der Züchtung von *C. vulgaris* wird auf die Farbe der Blüten (weiß über rosa bis dunkel-violett) und der Laubblätter (grün bis gelb) geachtet. Im Jahr 2014 wurden Pflanzen produziert, die zu 48 % rot, 15 % weiß und jeweils zwischen 10 % und 11 % violett und rosa blühten (Behr & Tröster 2014). Bei der Züchtung von neuen Sorten wird der Fokus beinahe ausschließlich auf Knospenblüher gelegt.

Das Merkmal „Knospenblütigkeit“ ist dadurch gekennzeichnet, dass die Blüten keine Stamina besitzen und sich während der gesamten Blütezeit nicht öffnen. Das heißt, sie verbleiben im Knospenstadium, welken später, weil sie nicht befruchtet werden, und behalten infolgedessen längere Zeit ihren Zierwert (Borchert et al. 2009; Borchert et al. 2012). Die Knospenblüten besitzen zwei Kreise Kelchblätter und keine Blütenblätter. Natürliche Vorkommen von Knospenblühern wurden im 20. Jahrhundert in Brandenburg, in Südengland und in den Niederlanden entdeckt (Ehsen 2011). 1991 wurde mit 'Melanie' (Züchter Kurt Kramer) der erste Knospenblüher als Sorte angemeldet. In der Folgezeit wurden zahlreiche weitere Knospenblüher als Sorten geschützt.

C. vulgaris gehört zur Gruppe der umsatzstärksten Beet- und Balkonpflanzen in Deutschland (Borchert et al. 2009; Behr & Tröster 2014). In der Frühjahrserhebung der Agrarmarkt Informations-Gesellschaft (2014) wurde der Anbau von ca. 21 Mio. Pflanzen von *C. vulgaris* durch mehr als 60 Betriebe für 2013 gemeldet. 15 % der teilnehmenden Betriebe berichteten von einer Umsatzsteigerung der Knospenblüher im Vergleich zu 2012 und 61 % konnten den Umsatz im Jahr 2013 stabil halten. Es ist eine deutliche Produktionsverschiebung zu Knospenblühern vorhanden (Behr & Tröster 2014). Ursachen dafür sind die attraktiven später welkenden Blütenknospen und gut im Markt etablierte Lizenzsorten, die eine breite Außenwirkung zeigen.

In der Vergangenheit gab es öfter Streitigkeiten in Bezug auf Sortenschutzrechte der Besenheide. Auf der Grundlage von Eeuwijk und Law (2004) wurde mittels „Randomly Amplified Polymorphic DNA“ (RAPD) ein System entwickelt, um eine Sorte als „Essentially Derived Variety“ (EDV; im Wesentlichen abgeleitete Sorte) einer anderen Sorte zu identifizieren (Borchert et al. 2008). Das Konzept von „Essential Derivation“ wurde durch die UPOV (International Union For The Protection Of New Varieties Of Plants) 1991 eingeführt, um den Handlungsspielraum von Züchtern neu zu definieren und ihre Rechte in Bezug auf eine geschützte Erstsorte geltend zu machen (Eeuwijk & Law 2004).

1.2 Polyploide Genotypen im Pflanzenreich

1.2.1 Rolle der Polyploidie in der Evolution

Polyploidie bedeutet eine teilweise oder vollständige Aufdopplung des Chromosomensatzes. Der Basischromosomensatz wird mit „x“ gekennzeichnet (Langlet 1927). Die vollständige Vervielfachung eines Chromosomensatzes ist die Eupolyploidie. Sind nur wenige Chromosomen mehr oder weniger vorhanden, wird dies als Aneuploidie bezeichnet (Iizuka & Ikeda 1968). Polyploidie wurde erstmals von

Lutz (1907) bei *Oenothera* beschrieben. Ca. 70 % aller Angiospermen haben eine oder mehrere Polyploidisierungen in der Evolution erfahren (Stebbins 1971; Grant 1981).

Nach Ramsey und Schemske (1998) können Polyploide durch die Fusion von zwei unreduzierten Gameten entstehen (bilaterale Polyploidisierung) oder durch die Fusion von einer reduzierten und einer unreduzierten Keimzelle, was zu Triploiden ($2n = 3x$) führt (unilaterale Polyploidisierung). Die Bildung von Tetraploiden ($2n = 4x$) ist daher einerseits direkt durch die Fusion zweier unreduzierter Gameten möglich („one step formation“) oder indirekt über eine unreduzierte Keimzelle mit einem triploiden Genotyp als Zwischenprodukt („two step formation“). Die Triploiden können dann im nächsten Schritt durch Selbstung oder Rückkreuzung tetraploide Nachkommen generieren (Parisod et al. 2010). Das Auftreten unreduzierter Gameten wird durch Umweltstress gefördert. Frost, Verletzungen, Herbivorie, Wasserdefizit und Nährstoffmangel erhöhen die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung unreduzierter Gameten. Polyploide kommen daher häufig in Gebieten vor, die durch hohe klimatische und edaphische Schwankungen gekennzeichnet sind (Stebbins 1971). Sie sind oftmals in ehemals vergletscherten Arealen zu finden (Ehrendorfer 1980).

Eine völlig andere Form der Polyploidisierung ist die Aufdopplung einer diploiden Zygote auf die tetraploide Stufe. Extreme Umweltfaktoren unterstützen diese Art von Polyploidisierung. Randolph (1932) induzierte beispielsweise Polyploidie in Mais durch eine Temperaturerhöhung auf 38 °C und 45 °C zum Zeitpunkt der ersten Teilung der Zygote. Dorsey (1936) hat dieses Experiment mit Weizen und Roggen wiederholt, indem er sein Versuchsmaterial zwischen Bestäubung und Befruchtung auf konstanter Temperatur von 25 °C hielt und anschließend die Temperatur auf 42 °C und 43 °C erhöhte. Zwischen Befruchtung und erster zygotischer Teilung lagen etwa 20 Stunden. Bei 3,3 % der Pflanzen war eine Chromosomenverdopplung festzustellen. Unter natürlichen Bedingungen im Feld werden weitaus höhere Temperaturen als 43 °C erreicht und trotzdem keine Polyploiden beobachtet. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Temperaturen unter natürlichen Bedingungen langsam steigen und sinken, während die Temperatur im Experiment innerhalb von 5 min um 18 °C erhöht wurde (Dorsey 1936).

Die Bildung und Aufrechterhaltung der polyploiden Stufe verändert die Organisation und Funktion des Genoms auf dem genetischen und epigenetischen Niveau (Comai 2005). Morphologische und physiologische Veränderungen können sich auf die Anforderungen an den Lebensraum und die geographische Verbreitung (Bowden 1940) auswirken. Genotypische Effekte der Polyploidie sind Chromosomenumbauten und Genomveränderungen (Song et al. 1995). Die Genredundanz bei Polyploiden führt zu einer Vergrößerung der Zellkerne und erhöht die Komplexität bei Anordnung und Aufteilung der Chromosomen während der Zellteilung. Vorteil der Genredundanz ist der Schutz vor schädlichen Effekten von Mutationen (Haldane 1933). Neben der Genredundanz durch Genverdopplung stellt Heterosis einen Vorteil dar (Comai 2005), welche dazu führt, dass Polyploide vitaler sind als Diploide. Die angepassten Polyploiden treten letztendlich in den evolutionären Prozess der Diploidisierung ein, währenddessen die Genredundanz wieder reduziert wird (Paterson et al. 2004).

Ein selektiver Vorteil bei der Reproduktion ist, dass durch Polyploidie die Mechanismen einer Selbstinkompatibilität aufgehoben werden können und Selbstbefruchtung polyploider Pflanzen möglich sein kann (Stebbins 1950) – möglicherweise durch interallelische Interaktionen des diploiden Pollens (Comai 2005). Polyploidie kann jedoch einen normalen Ablauf der Zellteilung durch mehr als zwei homologe Chromosomen sowie durch Störungen des Spindelapparates erschweren. Nachteil der

Polyploidie ist daher eine Neigung zur Produktion aneuploider Zellen bei Mitose und Meiose (Mayer & Aguilera 1990; Comai 2005). Die Häufigkeit von Aneuploidie ist von Pflanzenart und Ploidiestufe abhängig.

1.2.2 Reproduktive Eigenschaften auto- und allopolyploider Pflanzen

Polyploide können innerhalb einer Pflanzenart (Autopolyploidie) oder zwischen zwei Pflanzenarten durch Hybridisierung (Allopolyploidie) entstehen (Stebbins 1947). Bei der Autopolyploidie kommt es innerhalb einer Pflanzenart zur Aufdopplung strukturell gleicher, homologer Genome (AAAA), während Allopolyploide durch interspezifische Hybridisierung mit anschließender Aufdopplung nicht-homologer (homöologer) Genome (AABB) entstehen (Parisod et al. 2010). Autopolyploide zeigen daher eine Bildung von Multivalenten während der Meiose, während Allopolyploide vorwiegend Bivalente bilden, da nicht-homologe Chromosomen nicht paaren („präferentielle Paarung“ innerhalb des Subgenoms) (Ramsey & Schemske 2002). Zwischen den elterlichen Subgenomen finden weder intergenomische Rekombination noch freie Kombination aller Allele statt (disome Vererbung). Wenn polyploide Hybriden trotzdem Multivalente während der Meiose bilden (polysome Vererbung), dann werden sie als „Segment-Allopolyploide“ bezeichnet, um die Verdopplung von nur teilweise unterschiedlichen Genomen (AAA'A') zu verdeutlichen (Stebbins 1971).

Bei polysomer Vererbung wird die Bildung von Multivalenten regelmäßig in natürlichen Populationen beobachtet (Stift et al. 2008) und kann als Merkmal zur Unterscheidung zwischen Auto- und Allopolyploidie verwendet werden. Die Paarung von homologen Chromosomen wird durch einen genetischen Mechanismus gesteuert (Comai 2005). In allohexaploidem Weizen ist das Gen *pairing homeologous 1* für die Vermeidung einer homöologen Paarung notwendig und möglicherweise durch Anpassung an Polyploidie entstanden (Sears 1976). Ein ähnliches System soll in allotetraploiden *Brassica*-Arten existieren, was zu einer disomen Vererbung führt (Jenczewski et al. 2003).

Die tetrasome Vererbung in autotetraploiden Populationen resultiert in einem hohen Heterozygotiegrad (Parisod et al. 2010). Polysome Vererbung bedeutet darüber hinaus, dass autopolyploide Populationen das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht kontinuierlich, über mehrere Generationen hinweg, erreichen (Bever & Felber 1992). Im Gegensatz dazu benötigen diploide Populationen nur eine Generation von uneingeschränkter Paarung. Die Wahrscheinlichkeit für Inzucht ist in polyploiden Populationen geringer als in diploiden, weil bei ihnen der Grad an Heterozygotie langsamer sinkt (Moody et al. 1993). Die polysome Vererbung hat damit einen wichtigen Einfluss auf mikroevolutionäre Prozesse, wie beispielsweise die Verteilung genetischer Variabilität und das Ausmaß einer Inzuchtdepression.

Insbesondere bei Pflanzen, die in arktischen Regionen wachsen, zeigt sich eine schnelle Anpassungsfähigkeit von Allopolyploiden (Stebbins 1985). In der Arktis entstehen Polyploide sehr häufig und erweisen sich teilweise erfolgreich bei der Eroberung ehemals vergletschelter Gebiete, möglicherweise, weil ihre Genome die Hybrid-Vitalität übertragen und sich gegen die Auswirkungen von Inzucht puffern (Brochmann et al. 2004). Stebbins (1985) stellte eine „secondary contact“-Hypothese zur Entstehung von Allopolyploiden auf. Klimatisch erzwungene Arealverlagerungen förderten den sekundären Kontakt und die Durchmischung zwischen vorher allopatrischen Taxa. Bei den entstandenen interspezifischen Hybriden kam es zur Verdopplung von Chromosomen, welche die

Fertilität wiederherstellte. Nach Stebbins (1985) sind so auch Autopolyploide entstanden, indem sich in diploiden Populationen einer Art genomische Unterschiede in isolierten vergletscherten Refugien anreicherten. Diese intraspezifischen Hybriden konnten sich genetisch durch Verdopplung der Chromosomen stabilisieren. Der Ursprung der Polyploidie könnte also auch in der Wiederherstellung der Fertilität von intraspezifischen Hybriden liegen (Fawcett et al. 2009).

1.2.3 Bedeutung in der Pflanzenzüchtung

Zahlreiche Zierpflanzen sind polyploid, beispielsweise Arten der Gattungen *Rosa* (Khosravi et al. 2008), *Pelargonium* (Zimmer 1991), *Begonia*, *Calibrachoa*, *Cyclamen*, *Gerbera*, *Hosta*, *Lagerstroemia*, *Lilium*, *Phalaenopsis*, *Schlumbergera*, *Spathiphyllum* und *Tibouchina* (Gürtler et al. 2013). Darüber hinaus wird polyploides Obst und Gemüse, wie triploide Melonen, tetraploide Kartoffeln, hexaploider Weizen, hexaploide Kiwis und oktoploide Kulturerdbeeren, als Nahrung bei Mensch und Tier verwendet (Bolat & Pirlak 1999; Park et al. 1999; Kuleung et al. 2004). Triploidie und Aneuploidie spielen in der Pflanzenzüchtung in Hinblick auf samenlose Früchte eine Rolle. In *Vitis* werden aneuploide Genotypen gezielt gezüchtet, damit ihre Früchte keine Samen aufweisen, weil sie für Kunden schmackhafter sind (Park et al. 1999). Polyploide zeigen oftmals einen Riesenwuchs (Hypersomie, Gigantismus), der wegen einer höheren Ausbeute an Inhaltsstoffen ökonomisch wertvoll sein kann (Joshi & Verma 2004).

Polyploide weisen zwar häufig vergrößerte Zellen und größere Pflanzenorgane auf (Blakslee & Avery 1937; Clausen et al. 1945; Straub 1950), aber die Zunahme der Pflanzenorgangröße mit erhöhter Ploidiestufe ist in der Regel weder linear noch konstant (Tsukaya 2013). Bei *Arabidopsis thaliana* ist das „high-ploidy syndrome“ zu beobachten, denn Oktoploide sind deutlich kleiner als Tetraploide und sogar als Diploide (Tsukaya 2008). Laubblätter polyploider Pflanzen sind meist dicker, länger und breiter als die diploider (Blakslee & Avery 1937). Weitere Merkmale Polyploider sind ein dunkleres Blattgrün durch einen höheren Chlorophyllgehalt, Verstärkung von Wellungen des Blattrandes, Vergrößerung von Blättzähnen, breitere Kelch- und Kronblätter, verdickter Stängel, stärkere Behaarung und größere Haare (Straub 1950). Pflanzen höherer Ploidiestufe bilden in der Regel größere Pollenkörner (Blakslee & Avery 1937), die vitaler sein können als die Pollenkörner von Diploiden (Muller 1979). Weitere Bedeutungen von Polyploidie für die Pflanzenzüchtung zeigen sich durch eine gesteigerte Standfestigkeit der Pflanzen, Verbesserung der Krankheitsresistenz und erhöhte Umweltadaptation (Gürtler et al. 2013).

Mit erhöhter Ploidiestufe ist gewöhnlich die Merkmalskombination größerer Zellen in geringerer Zahl pro Fläche bzw. größerer Pflanzenorgane in geringerer Dichte zu erkennen (Ilarslan 1990). Daher weisen Polyploide in der Regel größere, aber weniger Blüten am Blütenstand auf als Diploide (Straub 1950; Husband 2000; Anderson 2007; Tulay & Unal 2010; Percival 2013). Die Stomata der Polyploiden sind meist länger als die der Diploiden, dagegen ist die Zahl der Stomata pro mm² gewöhnlich geringer (Speckmann et al. 1965; Boaventura et al. 1981; Chavez & Lyrene 2009; Tulay & Unal 2010). Polyploide wachsen meist langsamer als die zugehörigen Diploiden (Eigsti 1957) und blühen oftmals später (Müntzing 1936). Nachteil für die Pflanzenzüchtung stellt daher eine zeitliche Verzögerung bei Vermehrung, Regeneration und Sprosswachstum dar.

1.2.4 Ermittlung von Genomgröße und Ploidiestufe

Traditionell wurde Polyploidie eines Organismus über morphologische Merkmale (größere Zell- und Organgröße) nachgewiesen (Blakslee & Avery 1937; Clausen et al. 1945). Morphologische Merkmale sind in der Regel einfach zu untersuchen, allerdings ist diese Nachweismethode nicht sehr verlässlich (Norrman et al. 1997). Als effektivstes morphologisches Merkmal hat sich die Größe der Stomata erwiesen (Speckmann et al. 1965; Boaventura et al. 1981; Chavez & Lyrene 2009; Tulay & Unal 2010). Weil sie einfach und kostengünstig durchzuführen ist, wurde die Bestimmung der Stomatalänge jahrelang zum Nachweis von Polyploidie genutzt (Cohen & Yao 1996; Carvalho et al. 1999). Bei der mit *C. vulgaris* nah verwandten Pflanzenart *Vaccinium darrowii* konnte mit Hilfe der Stomatalänge die Ploidiestufe eindeutig zugeordnet werden (Chavez & Lyrene 2009). Die einzig direkte Methode, um Ploidiestufen zu bestimmen, ist jedoch die Zählung von Chromosomen durch ihre Sichtbarmachung während der mitotischen Zellteilung in Wurzelspitzen (Grant 1981).

Die Durchflusscytometrie (FCM) ist eine zuverlässige Methode für die Bestimmung von DNA-Gehalten, die Erkennung von Endopolyploidie, Mixopolyploidie, und bedingt auch Aneuploidie, sowie Analysen von Zellzyklen (Doležel 1991; Galbraith et al. 1991; Doležel 1997). Der DNA-Gehalt von Zellkernen kann durch FCM-Messung der Fluoreszenzintensität von DNA-bindenden UV angeregten Farbstoffen wie 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) oder dem DNA interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (PI) bestimmt werden. Diese Messungen reflektieren die DNA-Menge oder die Genomgröße „C“ anstelle der Chromosomenzahl „n“ (Marie & Brown 1993). DAPI bindet spezifisch an die Basen Adenin und Thymin in den Chromosomen, daher sind exakte Messungen der Genomgrößen nicht möglich, wenn sich die Basenzusammensetzung der untersuchten Genotypen unterscheidet (Doležel & Bartos 2005). Deswegen ist PI für die Bestimmung absoluter DNA-Gehalte besser geeignet. Ein interner Standard mit bekanntem DNA-Gehalt, der für die FCM-Messungen verwendet wird, sollte ähnliche DNA-Gehalte wie das Studienobjekt haben, aber auch nicht mit den resultierenden diploiden oder tetraploiden Peaks im Histogramm überlappen (Price & Johnston 1996). Bleibt die DNA-Menge pro Chromosom konstant, bilden DNA-Gehalt und Chromosomenzahl eine einfach arithmetische Reihe und die Ploidiestufe kann leicht bestimmt werden (Sgorbati et al. 1989; Baird et al. 1994; Brummer et al. 1999).

Eine Störung der direkten Proportionalität zwischen der nukleären DNA-Färbung und der DNA-Menge kann zu einer fehlerhaften Bestimmung der Genomgröße per FCM führen (Bennett et al. 2008). Diese Störungen generieren bei der Ermittlung von Genomgrößen Variationen, die fälschlicherweise als intraspezifische Variationen interpretiert werden. Schon Greilhuber (1988) beschäftigte sich mit der dem Nachweis der Existenz und der Ausprägung dieser pseudo-intraspezifischen Variation der Genomgröße. Er demonstrierte, dass Komponenten wie endogenes Tannin die DNA-Färbung hemmen können. Er wies nach, dass Sekundärmetaboliten wie Polyphenole und andere phenolische Substanzen die Intensität der Feulgen-Färbung in Pflanzen reduzieren können. Diese Sekundärmetaboliten und viele andere cytosolische Komponenten interferieren mit der DNA-Färbung (Walker et al. 2006). Für *Euphorbia pulcherrima* verglichen Bennett et al. (2008) die FCM-Messergebnisse der roten Brakteen und der grünen Blätter miteinander. Die resultierenden Fluoreszenzintensitäten unterschieden sich deutlich. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität für die grünen Blätter war 28,1 % höher als die durchschnittliche Fluoreszenz für die roten Brakteen. Unterschiede in geographischen und topologischen Faktoren, wie Breitengrad, Höhe und die damit assoziierten abiotischen Umweltfaktoren, wie Temperatur, Licht, Nährstoffe, Wasser, sind verantwortlich für die Erhöhung des

Anthocyanin-Gehaltes in Pflanzen. Erhöhtes cytosolisches Anthocyanin führt bei der Ermittlung von Genomgrößen zu ökologisch-korrelierten pseudo-intraspezifischen Variationen (Dold 2013).

1.3 Verfahren der Polyploidisierung

1.3.1 Mitosehemmung

Aktiv wachsendes Pflanzengewebe kann polyploidisiert werden, indem Mitosehemmer auf das Pflanzenmaterial gegeben werden, welche die Zellteilung stören. Dies kann im Freiland, im Gewächshaus oder *in vitro* stattfinden. Murashige und Nakano (1966) berichteten als erste von Polyploidisierungsexperimenten *in vitro* mit *Nicotiana*. Vorteil von *in vitro*-Kulturen sind die kontrollierten und standardisierten Bedingungen, sowie Umweltschutz.

Ein Zellzyklus besteht aus der Mitose-Phase und einer darauf folgenden Interphase, die in eine G1-Phase (post-mitotische Interphase), S-Phase (DNA-Synthese) und G2-Phase (prä-mitotische Phase) eingeteilt wird (Francis 2007). Zwischen der S-Phase und dem Ende der Mitose besitzt eine Zelle den doppelten Chromosomensatz. Polyploidisierung ist durch solche Chemikalien möglich, die den Zellzyklus am Ende der S-Phase und vor der Cytokinese beeinflussen. Die Mitosehemmer Colchizin, Trifluralin, Oryzalin und Amiprofos-methyl (APM) stören die Metaphase während der Mitose, indem sie an die α - und β -Tubulin-Dimere binden und damit die Anhaftung neuer Dimere an die Bindungsseite des Mikrotubulins verhindern, ohne den Abbau von Mikrotubulin am anderen Ende zu hemmen (Vaughn 2000). Der Abbau geschieht schneller als der Aufbau und daher wird das Mikrotubulin depolymerisiert.

Der Mitosehemmer Colchizin ist ein Alkaloid von *Colchicum autumnale* und wird aus dem Samen oder der Zwiebel extrahiert (Eigsti & Dustin 1955). Weitere Effekte des Colchizins auf Pflanzen sind Sterilität, ungewöhnliches Wachstum und Chromosomenverlust oder -umordnung (Luckett 1989). Die Affinität des Colchizins zum Mikrotubulin pflanzlicher Zellen ist gering (Morejohn et al. 1984), es muss daher in hohen Konzentrationen verwendet werden. Die Herbizide Trifluralin, Oryzalin und APM haben dagegen eine höhere Affinität zum Pflanzentubulin (Morejohn et al. 1987). Sie können bei der Behandlung von Pflanzen in einer hundertfach geringeren Konzentration (μM) als Colchizin eingesetzt werden (Dhooge et al. 2011). Bei Oryzalin und Trifluralin handelt es sich um Dinitroaniline. APM ist ein Phosphoamid, welches an die gleiche Seite des Tubulins wie Dinitroaniline bindet.

Die Effektivität eines Mitosehemmers ist von Pflanzenart, Pflanzenmaterial, eingesetzter Konzentration und Einwirkdauer abhängig (Dermen 1940). Dabei spielen Einwirkzeit und Konzentration des Mitosehemmers bei der Polyploidisierung die entscheidendste Rolle. Erforderliche Behandlungszeit und Konzentration hängen von der Wachstumsphase ab, in der die Pflanze sich befindet, und davon, welche Pflanzenteile behandelt werden (Kermani et al. 2003; Tulay & Unal 2010; Dhooge et al. 2011). Es können Sprosse, Sprossspitzen, Nodien, Knospen, Keimlinge und Saatgut behandelt werden. Eine erfolgreiche Induktion von Polyploidie ist immer ein Kompromiss zwischen Toxizität des Mitosehemmers und effektiver Aufdopplung der Chromosomen (Schwanitz 1949).

Die Chromosomenaufdopplung durch Mitosehemmung führt zu Mixoploiden mit verschiedenen Ploidiestufen der Zellen einer Pflanze (Allum et al. 2007). Mixoploide Genotypen entstehen, weil nur die aktiv wachsenden Zellen polyploidisiert werden können und der Rest des Pflanzengewebes auf der

diploiden Stufe bleibt. Je nachdem, ob bei *Vaccinium* die epidermale oder die innere Gewebeschicht polyploidiert wurde, konnten bei Mixoploiden vergrößerte Spaltöffnungen oder größere Pollenkörner auftreten und so als Nachweis dienen (Chavez & Lyrene 2009). Die FCM-Methode ist für den Nachweis von Mixoploidie besser geeignet als die morphologische Untersuchung, weil schnell große Mengen an Zellkernen und alle Zellschichten analysiert werden können (Roberts 2007). Durch fortgesetzte Stecklingsentnahme potentiell polyploider Sprossspitzen wird die anfänglich mixoploide Chimäre entmischt. Die Kontrolle der Chimärenentmischung erfolgt ebenfalls mittels FCM.

1.3.2 Unreduzierte Gameten

Eine weitere Möglichkeit zur Züchtung polyploider Pflanzen ist die Durchführung gezielter Kreuzungen, denn Polyploide können durch unreduzierte Gameten entstehen (Belling & Blakeslee 1924). Unreduzierte Gameten sind die Hauptursache für die natürliche Entstehung polyploider Pflanzen (Bretagnolle & Thompson 1995), zu deren Bildung Genotypen unterschiedlich stark neigen können (Dewitte et al. 2010). Unreduzierte Gameten entstehen bei einer Störung der Meiose (Belling & Blakeslee 1924) und sind Keimzellen mit einer Chromosomenzahl, wie sie die somatischen Zellen des gleichen Organismus aufweisen. Unreduzierte Gameten sind für die Pflanzenzüchtung von Bedeutung (Ramanna & Jacobsen 2003; Dewitte et al. 2010), weil die meiotische Chromosomenverdopplung durch Rekombination zu größerer genetischer Variabilität, Fitness und Heterozygotie führt als die mitotische Aufdopplung (Carputo et al. 2003). Letztendlich lässt sich so auch die phänotypische Variabilität innerhalb einer Pflanzenart erweitern.

Das reproduktive Entwicklungsstadium ist bei Pflanzen empfindlicher gegenüber abiotischen Stress als das vegetative (Fuzinatto et al. 2008) und wird von genetischen und ökologischen Faktoren beeinflusst (Erickson & Markhart 2002). Auswirkungen auf das Verhalten der Chromosomen während der Meiose haben hohe Temperaturen (Bajpai & Singh 2006), Nährstoffgehalt des Substrats, Ernährungszustand der Pflanzen, Salinität des Bodens (Sun et al. 2004), Einstrahlung (Vicini & Carvalho 2002) und Chemikalien wie Herbizide (Bajpai & Singh 2006) und Fungizide (Fairbanks et al. 2002). Daher können solche Bedingungen in der Züchtung gezielt angewendet werden, um die Bildung von unreduzierten Gameten hervorzurufen.

Während der Meiose können verschiedene cytologische Störungen auftreten (Myers & Hill 1940), was sich in unterschiedlichen genetischen Konstitutionen der unreduzierten Gameten widerspiegelt (Matsuoka & Nasuda 2004). Es kann die erste oder die zweite Reduktionssteilung gestört sein. Kommt es zu Störungen während der ersten Reduktionsteilung (FDR: first division restitution), können die homologen Chromatiden-Abschnitte zwischen den gepaarten Chromosomen nicht ausgetauscht werden. Der Ablauf gleicht einer Mitose und die Gameten weisen den gleichen Genotyp auf wie der Genotyp, dessen Gameten gebildet werden. Ist die zweite Reduktionsteilung gestört (SDR: second division restitution), ist keine Unterscheidung zur Aufdopplung einer Zygote möglich, weil eine Rekombination der Chromosomen stattfand. Aus den genetischen Konstitutionen der Nachkommen kann darauf geschlossen werden, ob die unreduzierten Gameten durch FDR entstanden sind oder nicht. FDR ist viel häufiger als SDR (Ortiz et al. 1992b).

1.4 Interploide Kreuzungen

1.4.1 Reproduktive Barrieren

Bei interploiden Kreuzungen weisen die Kreuzungspartner bzw. die fusionierenden Gameten unterschiedliche Ploidiestufen auf. Dies kann zu Störungen des Pollenschlauchwachstums, zu Unregelmäßigkeiten bei der Befruchtung und zu postzygotischen Entwicklungsproblemen führen (Johnston et al. 1980; Lin 1984). Die Entwicklung schlägt fehl und nicht lebensfähige Samen sind die Folge. Die Anteile des maternalen (m) und paternalen (p) Genoms im Endosperm der Angiospermen sollten möglichst wenig von $2m : 1p$ abweichen, was der Normalfall bei Diploiden ist. Bei der doppelten Befruchtung fusioniert ein generativer Kern des Pollenkorns mit der Eizelle zur diploiden Zygote und der zweite generative Kern fusioniert mit dem sekundären Embryosackkern und bildet das triploide Endosperm. In Polyploiden funktioniert dies analog, aber die Ploidiestufen aller Gewebe sind proportional erhöht. Durch interploide Kreuzungen kommt es zu einer Abweichung des Verhältnisses $2m : 1p$ im Endosperm (Köhler et al. 2010). Diese Problematik von interploiden Kreuzungen wird als „parental conflict theory“ oder „kinship theory“ bezeichnet.

Die maternalen und paternalen Genomanteile im Endosperm bestimmen demzufolge die Entwicklungsfähigkeit eines Samens. Das effektive Verhältnis des Genoms von $2m : 1p$ ist nach homoploiden Kreuzungen vorhanden. Trotzdem kann sich Saatgut auch entwickeln, wenn kein $2m : 1p$ Genomverhältnis vorliegt. Die dies erklärende „Endosperm Balance Number“-Hypothese (EBN) besagt, dass die Samenentwicklung durch das effektive Genomverhältnis im Endosperm gesteuert wird und nicht durch die Ploidiestufen der Kreuzungspartner (Johnston et al. 1980; Lin 1984). Die EBN-Hypothese erklärt die normale Samenentwicklung nach sowohl homoploiden als auch interploiden Kreuzungen. Jede Art hat eine Genom-spezifische effektive Ploidiestufe, EBN, was in einem annähernd $2m : 1p$ Verhältnis der Genome im Endosperm resultieren sollte.

Genetische Mechanismen sind verantwortlich für interploide Kreuzungsbarrieren. Durch veränderte Anteile des maternalen und paternalen Genoms im Endosperm kann es zu Entwicklungsstörungen kommen, aufgrund von Abweichungen vom normalen Verhältnis der Expression maternal und paternal geprägter Gene. Genomische Prägung bedeutet, dass die Genexpression davon abhängt, von welchem individuellen Elternteil ein Allel stammt. Mutationen in den geprägten Polycomb-Group-Genen (PcG-Genen) *MEDEA (MEA)* (Grossniklaus et al. 1998; Kiyosue et al. 1999) und *FERTILIZATION INDEPENDENT SEED2 (FIS2)* (Chaudhury et al. 1997) verursachen bei *Arabidopsis* phänotypische Abnormalitäten, die triploidem Saatgut mit einem erhöhtem paternalem Genomanteil sehr ähneln. Anomalien zeigen sich in einer verlängerten mitotischen Aktivität im Endosperm, in einer verzögerten Cytokinese und in einem Abbruch der Samenentwicklung (Scott et al. 1998). *MEA* wird ausschließlich maternal im Endosperm exprimiert (Kinoshita et al. 1999). Eine erhöhte *MEA*-Expression kann die PcG-Zielgene reprimieren und infolgedessen die Entwicklung von triploidem Saatgut normalisieren. Daher ist eine geringere *MEA*-Expression, durch einen geringeren maternalen Genomanteil, für Fehlentwicklungen von triploidem Saatgut verantwortlich (Erilova et al. 2009). Die geprägte Expression von *MEA* scheint die Hauptursache von Fehlfunktionen im Endosperm von triploidem *Arabidopsis*-Saatgut zu sein, welches einen erhöhten paternalen Genomanteil aufweist (Erilova et al. 2009).

Eine weitere reproduktive Barriere stellt eine häufige Sterilität triploider Genotypen dar (Ramsey & Schemske 1998). Störungen bei der Chromosomenpaarung und anschließenden Trennung während der

Meiose führen zu Gameten mit unterschiedlichen Chromosomenzahlen (Darlington 1937). Meiotische Reduktionsteilungen bei Triploiden können wegen der drei Chromosomensätze in haploiden, aneuploiden und diploiden Gameten resultieren. Während der Chromosomenpaarung werden neben Bivalenten Multi- und Univalente gebildet (Ramsey & Schemske 1998). In den Nachkommenschaften treten dann oft diploide, aneuploide und tetraploide Genotypen auf. Die Anteile der Ploidiestufen der Pollenkörner muss nicht der Ploidieverteilung in den Nachkommen entsprechen, da euploider Pollen meist lebensfähiger ist als aneuploider Pollen, und aneuploide Nachkommen dann in geringerer Anzahl auftreten können (Ramsey & Schemske 1998).

1.4.2 Wege zur Triploidie

Triploide sind in der Pflanzenzüchtung von großer Bedeutung, da eine Störung der Meiose aufgrund von drei homologen Äquivalenten wahrscheinlich ist und die Pflanzen oftmals samenlose Früchte bilden. Dies kann ein wichtiges Zuchtziel in der Obstzüchtung sein: Banane, Melone, aber auch Zitrusfrüchte und Trauben. Die häufige Sterilität von triploiden Pflanzen kann auch zum Züchterschutz verwendet werden. Triploide entstehen gemeinhin aus der Fusion von reduzierten und unreduzierten Gameten – eine interploide Kreuzung (Ramsey & Schemske 1998). Die Schwierigkeit, auf diese Weise lebensfähiges triploides Saatgut zu erzeugen, wird als „triploider Block“ bezeichnet (Marks 1966). Infolge des „triploiden Blocks“ entstehen hauptsächlich Diploide und Tetraploide. Da ein geringerer maternaler Genomanteil (Kap. 1.4.1) den „triploiden Block“ verursacht, ist es effektiver, Triploide durch unreduzierte Eizellen als durch unreduzierten Pollen zu generieren (Lin 1984; Ramsey & Schemske 1998). Dies stimmt mit der Untersuchung an spontan entstandenen Triploiden von *Populus* und *Ananas* über eine nicht vorhandene Reduktion weiblicher Gameten überein (Collins 1933; Bradshaw et al. 1993). Der „triploide Block“ verhindert also die Erzeugung von Triploiden nicht komplett.

Ein weiterer Weg zur Triploidie ist die Kreuzung autotetraploider Genotypen miteinander. Aufgrund von vier strukturell gleichen homologen Chromosomen kann die Meiose Autotetraploider zu Störungen, zur Bildung haploider Gameten (Myers & Hill 1940) und letztendlich zur Erzeugung triploider Nachkommen führen.

1.5 Molekularbiologische Methoden zur Genotypenidentifikation

1.5.1 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Die Methode „Amplified Fragment Length Polymorphism“ (AFLP) eignet sich für molekulare Analysen von Pflanzen, Tieren, Pilzen und Bakterien (Vos et al. 1995). Mittels AFLP lassen sich genetische, evolutionäre und ökologische Fragestellungen beantworten. Die Methode wird für Elternschaftsanalysen, Messung genetischer Diversität, Identifikation von Hybriden und Sorten, sowie populationsgenetische Analysen eingesetzt (Krauss 1999; Nybom 2004; Woodhead et al. 2005). AFLPs werden durch einen kompletten Restriktion-Endonuklease-Verdau genomischer DNA, nachfolgender selektiver PCR-Amplifikation (Polymerase-Kettenreaktion) und der Elektrophorese einiger Fragmente

generiert. So kann von einem Genotyp ein einzigartiges und reproduzierbares Profil erstellt werden (Mueller & Wolfenbarger 1999; Meudt & Clarke 2007). Die Marker sind über das gesamte Genom verteilt (Saliba-Colombani et al. 2000) und basieren weitgehend auf nicht-codierender DNA (Wong et al. 2001). Wie bei den Methoden „Random Amplified Polymorphic DNA“ (RAPD) und „Inter-Simple Sequence Repeats“ (ISSR) handelt es sich um eine Multilocus-Fingerprinting-Technik und um ein dominantes Markersystem. Die AFLP-Technik ist eine schnelle und kostengünstige Methode für die Genotypenidentifikation zahlreicher Individuen, ohne dass Sequenzinformationen notwendig sind.

1.5.2 Simple Sequence Repeats (SSR)

„Simple Sequence Repeats“ (SSR) sind hochinformativ polymorphe DNA-Marker (Tautz & Schlötterer 1994; Powell et al. 1996; Kashi et al. 1997). SSRs bestehen aus Motiven von ein bis sechs Nukleotiden (Mono-, Di-, Tri-, Tetra-, Penta- und Hexanukleotide), die sich mehrmals wiederholen (Weber & May 1989). SSRs unterliegen hohen Mutationsraten, was zu einem hohen Polymorphismus führt. Verschiedene Individuen zeigen unterschiedliche Wiederholungszahlen der Motive (Powell et al. 1996). Seit Ende der 1980er Jahre werden SSRs vermehrt für die Analyse von genetischer Variabilität sowie für Fingerprinting, Elternschaftsanalysen, genetische Kartierungen oder Analysen von Gen- und Populationsstrukturen verwendet (Weber & May 1989). SSRs werden wegen ihres häufigen Vorkommens im Genom, ihrer Codominanz, ihres hohen Polymorphismus und der Einfachheit ihrer Testung mittels PCR oft genutzt (Kashi et al. 1997). Mit SSRs können nah verwandte Pflanzenarten und sogar Subpopulationen innerhalb einer Art abgegrenzt werden (Bowcock et al. 1994). Auch in der Pflanzenzüchtung finden SSR-Marker Verwendung (De Riek & Debener 2010). Sie dienen der Identifizierung gewünschter Eigenschaften (markergestützte Selektion) sowie der Sortenidentifikation. Eine Kolinearität gemeinsamer Marker bedeutet, dass ein Marker einer Gattung oder Art sich auch in einer verwandten Gattung oder Art wiederfinden könnte (Tikhonov et al. 1999). Existiert eine ausreichende Homologie zwischen Genomen in den flankierenden Regionen der SSR-Loci, können Primerpaare einer bestimmten Pflanzenart auch genutzt werden, um SSRs in einer verwandten Art zu ermitteln. Diese Übertragbarkeit eines Markers von einer Art zur anderen wurde bereits in vielen Pflanzengattungen nachgewiesen, beispielsweise für Arten der Gattungen *Glycine* (Peakall et al. 1998), *Lycopersicon* (Alvarez et al. 2001) und *Prunus* (Dirlewanger et al. 2002). Sogar zwischen den Gattungen *Aegilops* und *Triticum* (Sourdille et al. 2001) sowie *Zea mays* und *Saccharum officinarum* (Hernandez et al. 2001) konnten SSR-Marker übertragen werden.

Der Nachteil von SSR-Markern ist, dass ihre Entwicklung kostenintensiv und zeitaufwendig ist (Keleung et al. 2004). „Expressed Sequence Tags“ (EST; exprimierte Sequenzabschnitte) sind eine wertvolle Quelle für die Entwicklung von SSR-Markern (Li et al. 2011). EST-Datenbanken müssen dafür mittels Software nach den repetitiven Sequenzen untersucht werden. Suchkriterien sind Länge des Motivs und Anzahl der Wiederholungen.

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, eine Methode zur erfolgreichen somatischen Polyploidisierung von *C. vulgaris* zu etablieren, um eine hohe Anzahl stabiler polyploider Pflanzen durch Mitosehemmung *in vitro* für diese Pflanzenart zu erstellen und so trotz des engen Genpools neue Erscheinungsformen zu kreieren. Dies ist wünschenswert, weil den Züchtern nur eine geringe genetische Variabilität zur Verfügung steht.

Als weitere Möglichkeit zur Züchtung polyploider Sorten von *C. vulgaris* sollten Kreuzungen durchgeführt werden. Durch unreduzierte Gameten entstandene polyploide Genotypen waren bereits vorhanden. Anhand der Nachkommenschaft einer freien Abblüte eines tetraploiden Genotyps sollten Rückschlüsse auf den Vererbungsmodus des Merkmals „Knospenblütigkeit“ auf polyploidem Niveau gezogen werden. Außerdem sollte die genetische Ähnlichkeit der Nachkommen zur tetraploiden Mutterpflanze mittels Fingerprinting analysiert werden, um so Informationen über die Abstammung der Nachkommenschaft zu erhalten. Des Weiteren sollten gezielte interploide Kreuzungen durchgeführt werden, um Triploide zu erzeugen und somit reproduktive Barrieren bei *C. vulgaris* zu prüfen.

Da durch somatische Polyploidisierung entstandene Polyploide potentiell abgeleitete Sorten darstellen, sollte ein System zur Genotypenidentifizierung auf Basis von SSR-Markern etabliert werden. Dadurch kann die Abstammung Polyploider analysiert werden. Hierfür wurde eine EST-Datenbank von *C. vulgaris* nach repetitiven Sequenzen gescreent. Zusätzlich wurden für andere Gattungen der Pflanzenfamilie Ericaceae publizierte SSR-Marker bei *C. vulgaris* getestet.

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden in der Bachelorarbeit von Andreas Liehr (2012, Universität Jena), in der Projektarbeit von Aileen Gluschak (2013, Universität Jena), in Przybyla et al. (2014), Behrend et al. (2015) und Gluschak et al. (2015) publiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Pflanzenkultur

Die verwendeten Pflanzen von *C. vulgaris* standen von April bis Oktober auf einer Freifläche und waren daher natürlichen Licht- und Temperatur-Bedingungen ausgesetzt. Von Oktober bis April wurden die Pflanzen im Gewächshaus kultiviert. Die Pflanzen wurden regelmäßig und pro Genotyp auch zu unterschiedlichen Zeiten zurückgeschnitten, um den Blütezeitpunkt zu beeinflussen. Wenn Blüten außerhalb der Blütezeit von August bis Oktober für Analysen benötigt wurden, wurden die Pflanzen im „Bio Line Pflanzenwuchsschrank VB 1514“ (Fa. Vötsch Industrietechnik) kultiviert, um Blüten zu induzieren. Die Klimabedingungen wurden nach den Angaben von Eckardt (2009) eingestellt, die in ihrer Arbeit die optimalen Bedingungen ermittelte, um *C. vulgaris* zur Blüte zu bringen. Der Tag mit 5,2 klx Licht, 18 °C Temperatur und 40 % Luftfeuchtigkeit dauerte von 6 Uhr bis 18 Uhr. Die Nacht war gekennzeichnet durch 13 °C Temperatur und 60 % Luftfeuchtigkeit (Eckardt 2009).

2.1.2 Kreuzungen

Neben zahlreichen diploiden Sorten standen für die Kreuzungen bereits triploide und tetraploide Genotypen von *C. vulgaris* zur Verfügung. Im Zuchtgarten des Kooperationspartners Heidepflanzen de Winkel (Goch, Niederrhein, Deutschland) trat bei der Kreuzung von zwei diploiden Sorten (‘Maria’ × ‘Perestroijka’) der tetraploide Genotyp ‘7705’ spontan auf (Abb. 1). Dieser blühte in einem Feld diploider Pflanzen frei ab. Die Nachkommenschaft der freien Abblüte wird als Population 2008.177 bezeichnet und bestand aus vier diploiden, 31 triploiden und 431 tetraploiden Genotypen. Des Weiteren entstand ein triploider Genotyp ‘Anke’ spontan aus der Bestäubung der diploiden Sorte ‘Maria’ mit dem Pollen des diploiden Genotyps F1, welcher aus der Kreuzung ‘Maria’ × ‘Boskoop’ hervorging.

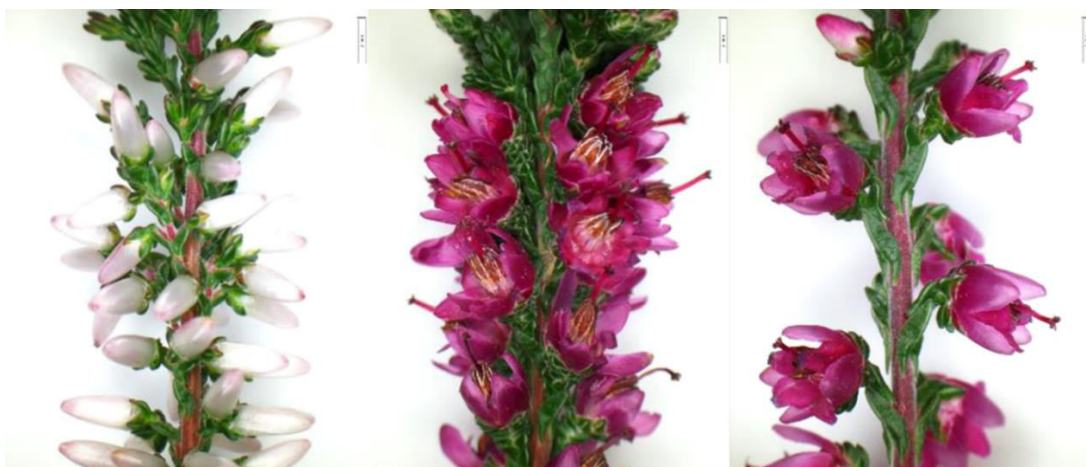


Abbildung 1: Links diploider Knospenblüher Sorte ‘Maria’, Mitte diploider Einfachblüher Sorte ‘Perestroijka’ und rechts der tetraploide Einfachblüher Genotyp ‘7705’ (spontan entstanden aus ‘Maria’ × ‘Perestroijka’). Maßstabsbalken: 2 cm. Binokular-Mikroskop: *Olympus SZX10*, Kamera: *Olympus DP26*, Software: *Olympus cellSens*.

Kreuzungen wurden mit Wildtypen (Einfachblühern) und Knospenblühern auf diploidem, triploidem und tetraploidem Niveau durchgeführt (Tab. 1).

Tabelle 1: Liste von Genotypen unterschiedlicher Ploidiestufen (2x: diploid, 3x: triploid, 4x: tetraploid) und Blütentypen (Knospenblüher, Einfachblüher), mit denen Kreuzungen durchgeführt wurden.

Genotyp	Ploidiestufe	Blütentyp
´Maria´	2x	Knospenblüher
´Perestrojka´	2x	Einfachblüher
´Maria´ × ´Boskoop´ → F1	2x	Einfachblüher
´Ginkels Glorie´	2x	Knospenblüher
´Wink 1-2006´	2x	Knospenblüher
´Wink 4-2006´	2x	Knospenblüher
´David Eason´	2x	Knospenblüher
´Long White´	2x	Einfachblüher
´Marleen´	2x	Knospenblüher
2005.63/23	2x	Einfachblüher
´Josephine´	2x	Einfachblüher
´Aphrodite´	2x	Knospenblüher
´Arabella´	2x	Einfachblüher
´Elegantissima´	2x	Einfachblüher
´Mariella´	2x	Knospenblüher
´Marlies´	2x	Knospenblüher
´Moulin Rouge´	2x	Knospenblüher
´Roter Oktober´	2x	Einfachblüher
´Sandy´	2x	Knospenblüher
´Venetia´	2x	Knospenblüher
´Anke´	3x	Knospenblüher
2008.177/25	3x	Einfachblüher
2008.177/330	3x	Knospenblüher
2008.177/382	3x	Knospenblüher
2008.177/451	3x	Einfachblüher
´7705´	4x	Einfachblüher
2008.177/1	4x	Einfachblüher
2008.177/2	4x	Einfachblüher
2008.177/7	4x	Einfachblüher
2008.177/33	4x	Knospenblüher
2008.177/36	4x	Einfachblüher
2008.177/70	4x	Einfachblüher
2008.177/76	4x	Einfachblüher
2008.177/86	4x	Knospenblüher
2008.177/119	4x	Knospenblüher
2008.177/123	4x	Knospenblüher
2008.177/244	4x	Knospenblüher

Die Kreuzungen wurden von August bis Oktober durchgeführt. In der Regel wurden Knospenblüher (Samenträger) bestäubt, daher war eine Selbstung ausgeschlossen und keine Kastration notwendig. Der Pollen der Einfachblüher (Pollenspender) wurde mit Hilfe einer Pinzette in kleine Petrischalen geschüttelt und frisch oder nach einer Lagerung von bis zu zwei Tagen im Kühlschrank bei 4 °C verwendet. Die Knospen wurden mit einer Pinzette geöffnet, die Pinzettenspitze in den Pollen getaucht und dieser auf die Narbe gegeben. Anschließend wurden Teebeutel um die bestäubten Blüten angebracht und das Saatgut Ende Dezember gesammelt. In allen Kreuzungsversuchen wurden pro Genotyp drei Pflanzen verwendet und pro Pflanze mindestens 20 Blüten bestäubt. Die verschiedenen Pflanzen eines Genotyps wurden an unterschiedlichen Tagen bestäubt, weil die Wetterlage einen Einfluss auf den Befruchtungserfolg haben kann.

2.1.3 *In vitro*-Kultur

2.1.3.1 Aussaat

In vitro wurde mit einem MS-Medium (Murashige & Skoog 1962) in halber Konzentration gearbeitet (Zusammensetzung der Nährstoffe und Vitamine siehe Tab. 44 im Anhang). Zur Herstellung des ½ MS-Mediums wurden Haushaltszucker (30 g/l) und MS-Konzentrat (2,2 g/l; Fa. Duchefa) in destilliertem Wasser gelöst und auf pH = 6 (Digital-pH-Meter pH 525; Fa. Mettler Toledo) eingestellt. Bei der Herstellung von Festmedium wurde zusätzlich Gelrite (3,7 g/l; Fa. Duchefa) zugegeben. Das fertige Medium wurde in Flaschen oder Gläser gefüllt, und bei 121 °C sowie 210 kPa für 20 min autoklaviert (Systec VX-120; Fa. Biomedis Laborservice GmbH).

Für das Aussäen von Saatgut *in vitro* wurden sterile Petrischalen (5 cm Durchmesser, 500 ml; Fa. Eppendorf) mit Festmedium vorbereitet. Das Saatgut wurde in einem Reaktionsgefäß (2 ml; Fa. Eppendorf; 30 bis 100 Samenkörner jeweils) mit 70 % Ethanol (500–700 µl) für 30 sec sterilisiert. Anschließend wurde das Ethanol mit Hilfe einer Pipette entfernt und 500–700 µl Natriumhypochlorit (NaOCl, 2 % freies Chlor; Fa. VWR) mit 0,02 % Polysorbat 20 (Fa. Merck), welches für eine Solubilisierung von Membranproteinen und Lyse von Zellen sorgt, für 10 min auf das Saatgut gegeben. Die Samenschale wurde weißlich-durchscheinend. Das NaOCl wurde entfernt und das Saatgut fünfmal für 5 min mit autoklaviertem Leitungswasser gewaschen. Daraufhin wurde das Saatgut mit 700 µl Flüssigmedium auf die Petrischalen mit Festmedium gebracht. Die Petrischalen wurden mit Parafilm (Fa. Eppendorf) verschlossen und im Klima-Licht-Schrank (Fa. RUMED Rubarth Apparate GmbH) kultiviert. Die Bedingungen entsprachen denen der *C. vulgaris*-Kultur von Poschlod (1990) und Krüger et al. (2013). Der Klima-Licht-Schrank bot der *in vitro*-Kultur 16 h Tag bei 25 °C und 8 h Nacht bei 10 °C. Die Lichtmenge betrug zwischen 20 µmol/q² sec und 50 µmol/q² sec, je nach Standort im Schrank. Die Keimung begann nach zehn Tagen bis drei Wochen. Die Keimraten wurden durch Auszählung bestimmt. Die gekeimten Sämlinge (Abb. 2A) wurden auf gefaltetes Filterpapier, welches im flüssigen Nährmedium stand und vollgesaugt war, umgesetzt (Abb. 2C). Eine Kultivierung von Pflanzen fand auch auf Festmedium statt (Abb. 2B). Die Brücken aus Filterpapier ermöglichten einen guten Luft- und Stoffaustausch. Auf Filterpapier war eine starke Wurzelbildung zu beobachten (Abb. 2C). Je nach Versuchsaufbau wurden die Pflanzen auf einzelnen oder gesammelten Brücken aus Filterpapier kultiviert (Abb. 2D).

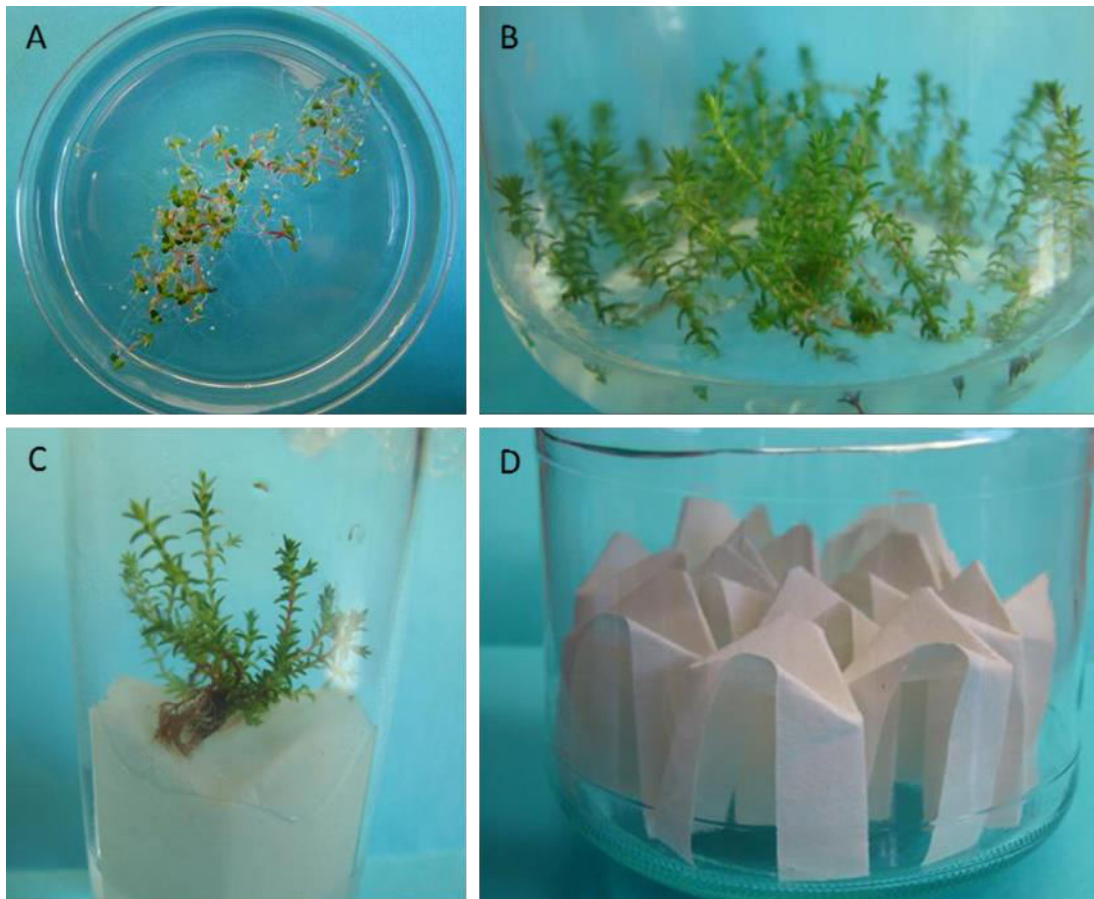


Abbildung 2: *In vitro*-Keimlinge. A: gekeimte Samen auf Festmedium in einer Petrischale, B: Sprossspitzen kultiviert auf Festmedium *in vitro* ($\frac{1}{2}$ MS-Medium), C: Kultivierung einer Pflanze auf einer Filterbrücke *in vitro*, D: 15 Filterbrücken in einem Glas gesammelt und autoklaviert. Das sterile Flüssigmedium wird in das Glas gegeben, sobald die Pflanzen auf das Filterpapier gesetzt werden. Kamera: Sony DSC H7.

2.1.3.2 Sprossvermehrung

Mit Sprossmaterial wurden Versuche zur Etablierung genetisch definierten Materials *in vitro* durchgeführt. Es wurden jeweils Sprossspitzen von 1 cm bis 2 cm Länge 30 sec in 70 % Ethanol sterilisiert. Daraufhin erfolgte eine weitere Sterilisation einerseits mit NaOCl mit 2 % oder 3 % freiem Chlor (Fa. VWR) und 0,02 % Polysorbat 20 bzw. andererseits mit 0,8 % Silbernitrat (AgNO_3 , Fa. VEB Feinchemie Sebnitz) für 10 min. Die Sprossspitzen wurden zum Schluss fünfmal mit autoklavierten Leitungswasser für 5 min gewaschen und dann auf mit $\frac{1}{2}$ MS-Medium getränktes Filterpapier gesetzt und im Klima-Licht-Schrank kultiviert.

Letztendlich wurde für die Etablierung von genetisch definiertem Pflanzenmaterial *in vitro* stets eine zehnmünütige Sterilisation mit 3 % freiem Chlor (NaOCl, Fa. VWR) – im Frühjahr – angewendet.

2.2 Morphologische Analysen

Pflanzen verschiedener Züchter, Herkünfte und Ploidiestufen wurden morphologisch untersucht. Die Messungen wurden an Laubblättern, Sepalen, Stomata und Pollenkörner von ausgewählten diploiden, triploiden und tetraploiden Genotypen vorgenommen. Die Vervielfachung des Chromosomensatzes kann sich in einer Vergrößerung der Pflanzenorgane widerspiegeln.

Die Messung der Größe der Laubblätter erfolgte an den ersten drei Blättern eines Kurzsprosses von drei Pflanzen pro Genotyp. Die Größe der Sepalen wurde an den ersten drei Blüten eines Kurzsprosses von jeweils drei Pflanzen pro Genotyp bestimmt. Als Hilfsmittel kamen ein Binokular-Mikroskop (Olympus SZX10), eine Kamera (Olympus DP26) und ein Bildverarbeitungsprogramm (Olympus cellSens) zum Einsatz.

Darüber hinaus wurden die Blüten der triploiden und tetraploiden Pflanzen der Population 2008.177 makroskopisch untersucht. Für die Bonitur wurden Vergleichspflanzen ausgewählt. Die Blütengröße der Einfachblüher wurde anhand des tetraploiden Genotyps '7705' („große“ Blüten) und der diploiden Sorte 'Arabella' („kleine“ Blüten) bestimmt. Die Blütengröße wurde als „mittel“ eingestuft, wenn sie zwischen den beiden Genotypen lag. Bei den Knospenblühern wurde als Vergleichspflanze für große Blüten der Genotyp 2008.177/119 und für kleine Blüten die Sorte 'Annegret' verwendet. In Bezug auf die Blütendichte wurde Genotyp '7705' zum Vergleich herangezogen und selbst als „mittel“ eingestuft. Alle Genotypen, die deutlich mehr Blüten hatten, wurden als „kompakt“ eingestuft und, bei denen die Blütenzahl deutlich geringer war, als „locker“.

Bei der Untersuchung der Stomatalänge wurden jeweils 20 Spaltöffnungen pro Genotyp vermessen. Die Stomata wurden unter einem Durchlichtmikroskop (AXIO Imager.A1, Fa. Zeiss) sichtbar gemacht, die Messung erfolgte mittels entsprechender Software (AxioCam MRc, Stemi 2000, Fa. Zeiss). Es wurden ausschließlich solche Stomata vermessen, die sich in der Einstülpung der Blattrückseite befanden. Von jeder Spaltöffnung wurde die Länge entlang des Spaltes zwischen den Schließzellen vermessen (Abb. 3).

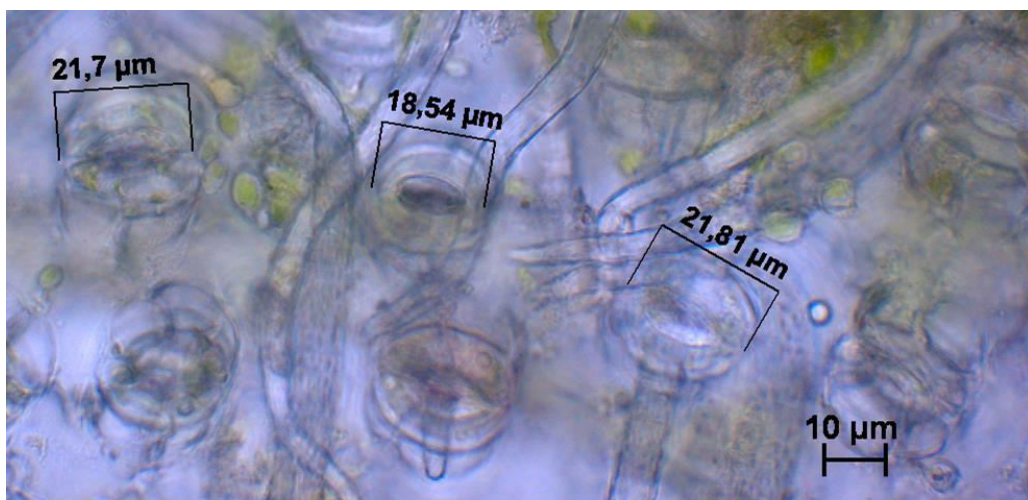


Abbildung 3: Sichtbarmachung der Stomata durch Betrachtung der Epidermis auf der Blattunterseite mit einem Durchlichtmikroskop (AXIO Imager.A1, Fa. Zeiss). Bestimmung der Stomatalänge des tetraploiden Genotyps '7705'.

Die Größe des Pollens wurde an jeweils 20 Pollenkörnern pro Genotyp untersucht. Bestimmt wurde die Fläche der Pollenkörner unter Verwendung eines Durchlichtmikroskops (Olympus BX53), einer Kamera (Olympus DP26) und zugehöriger Software (Olympus cellSens).

Zusätzlich wurde Saatgut aus Kreuzungen mit Pflanzen unterschiedlicher Ploidiestufen vermessen. Die Größe des Saatguts wurde ebenfalls als Fläche mit Hilfe eines Binokular-Mikroskops (Olympus SZX10), einer Kamera (Olympus DP26) und entsprechender Software (Olympus cellSens) bestimmt.

Für die Merkmale Laubblätter, Sepalen, Stomata und Pollenkörner wurde mit dem Programm *Statistika* (StatSoft, Inc. Version 10) im Modul „Basic Statistics“ mittels Kolmogorow-Smirnow-Anpassungstest (KSA-Test) die Normalverteilung der Daten untersucht. Bei Vorliegen einer Normalverteilung war die Voraussetzung für die Durchführung einer Varianzanalyse im Modul „ANOVA/MANOVA“ (einfaktorielle/mehrfaktorielle Varianzanalyse) erfüllt. Mittels einfaktorieller Varianzanalyse wurde der Einfluss der Ploidiestufe als Prüffaktor mit drei Faktorstufen auf die Prüfmerkmale der Organgrößen untersucht. Ob die Ploidiestufe eine signifikante Varianzursache darstellt, wurde anhand der Werte für die Testgröße F mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 5\%$ ermittelt. Um zu prüfen, ob und welche Mittelwerte der drei Ploidiestufen sich signifikant voneinander unterscheiden, wurde als Post-hoc-Test der Tukey-HSD-Test (HSD: Honestly Significant Difference) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ angewendet.

2.3 Durchflusscytometrie

2.3.1 Bestimmung des DNA-Gehalts

Die Methode der Durchflusscytometrie (FCM) wurde verwendet, um den DNA-Gehalt von Pflanzen zu ermitteln und polyploide Pflanzen zu identifizieren. Mittels FCM kann der DNA-Gehalt von Zellkernen durch eine Fluoreszenzmessung des von UV angeregten Fluorochroms 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) oder des DNA interkalierenden Farbstoffs Propidiumiodid (PI) bestimmt werden. DAPI bindet spezifisch an die Basen Adenin und Thymin in den Chromosomen. Die Helligkeit der Fluoreszenzsignale entspricht dem DNA-Gehalt der Zelle. Die Fluoreszenzintensität wird in Form einer Peakposition auf der x-Achse eines Histogramms dargestellt. Die Untersuchungen an *C. vulgaris* erfolgten im „CyFlow space“ (Fa. Partec) unter Verwendung des internen Standards *Petunia hybrida* ('Mitchell', Genotyp W115).

Bei der Bestimmung von DNA-Gehalten mittels des interkalierenden Farbstoffs PI wurde das „CyStain PI absolute P reagent kit“ (Fluoreszenzfarbstoff PI, Fa. Partec) mit dem Protokoll des Herstellers verwendet. Ca. 0,5 cm² frisches Blattmaterial von *Calluna* und *Petunia* (Referenzgröße für interne Standardisierung) wurde mit einer Rasierklinge in 500 µl Extraktionspuffer für 30 sec bis 60 sec zerkleinert. Nach einer Inkubation von 30 sec bis 90 sec wurden die Proben durch Partec 50 µm CellTrics (Fa. Partec) gefiltert. 2,0 ml Färbelösung mit 12 µl PI und 6 µl RNase-StammLösung wurden zugefügt. Die Proben inkubierten 30 min bis 60 min geschützt vor Licht und wurden anschließend mit Hilfe eines Lasers analysiert (mindestens 3000 Partikel). Die resultierenden Histogramme wurden mit der Software *FloMax* (Fa. Quantum Analysis GmbH, Version 2.70, 2009) analysiert.

Die Bestimmung der DNA-Gehalte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, „CyStain UV precise P reagent kit“ (Fa. Partec), wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. 0,5 cm² Blattmaterial von

Calluna und *Petunia* wurde in einer Plastikpetrischale mit 400 µl Extraktionspuffer mit einer Rasierklinge zerkleinert. Nach 30 sec bis 5 min Inkubation wurde die Probe gefiltert und 1,6 ml DNA-Färbelösung (DAPI, Fa. Partec) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 sec bis 60 sec wurde die Probe mit UV-Licht angeregt und das Fluoreszenzsignal im blauen Fluoreszenzkanal ($\lambda = 435\text{--}500$ nm) des Durchflusscytometers analysiert (mindestens 2000 Partikel). Als UV-Quelle wurden LED (Licht Emittierende Dioden) verwendet und die Fluoreszenzintensität gemessen. Die Histogramme wurden mit der Software *FloMax* untersucht.

Als Referenzpflanze für die Messungen wurde die diploide *P. hybrida* ($2C = 3,35$ pg) verwendet (Kew, Plant DNA C-values Database: Bennett & Smith 1976). Im Histogramm der Mischprobe zeigen sich ein Peak von *Calluna* und ein Peak von *Petunia* (Fluoreszenz-Peak: 230–270 nm) mit den entsprechenden Kanalzahlen bzw. Peakpositionen auf der x-Achse. Des Weiteren zeigt sich im Histogramm einen CV-Wert („coefficient of variation“) für jeden Peak, welcher ein Indikator für die Histogrammqualität ist.

Die Division des Wertes der Peakposition von der getesteten *C. vulgaris* mit DAPI durch den Wert der Peakposition von *P. hybrida* informierte über die Ploidiestufe von *C. vulgaris*. Das Verhältnis der idealen Peakpositionen war 0,37 für diploide Genotypen ($2C_{Calluna} = 1,2$ pg [Borchert et al. 2009], $2C_{Petunia} = 3,35$ pg), 0,555 für triploide Genotypen ($3C_{Calluna} = 1,8$ pg, $2C_{Petunia} = 3,35$ pg) und 0,74 ($4C_{Calluna} = 2,4$ pg, $2C_{Petunia} = 3,35$ pg) für tetraploide Genotypen.

Der Nachweis eines mixoploiden Genotyps erfolgte durch einen gleichzeitig auftretenden diploiden und tetraploiden Peak im Histogramm. Die G2-Phase des Zellzyklus eines diploiden Genotyps wurde ausgeschlossen, wenn der tetraploide Peak auf der vertikalen Achse des Histogramms (Größenachse) mindestens halb so viele gemessene Zellkerne wie der diploide Peak aufwies.

2.3.2 Nachweis von Aneuploidie

Es wurde eine Methode mittels DAPI-Färbung etabliert, um aneuploide Genotypen zu bestimmen, die zusätzliche oder fehlende Chromosomen im Vergleich zur euploiden Stufe aufweisen. Diploide von *C. vulgaris* haben $2n = 2x = 16$ Chromosomen (Wcislo 1990; Uhríkova & Dubravkova 1997), Triploide $2n = 3x = 24$ und Tetraploide $2n = 4x = 32$. Mit dem Wert von 16 Chromosomen eines diploiden Genotyps und dem zugehörigen Peakverhältnis von 0,37 konnten für alle anderen Peakverhältnisse die entsprechenden Chromosomenzahlen ermittelt werden (Tab. 45 im Anhang). Da Abweichungen von den idealen Peakverhältnissen auftraten, wurden Peakverhältnisse im Bereich von 0,32 bis 0,42 der diploiden Stufe, von 0,51 bis 0,60 der triploiden Stufe und von 0,69 bis 0,79 der tetraploiden Stufe zugeordnet. Diese Bereiche entsprachen einer Abweichung von ein und zwei Chromosomen von den jeweiligen euploiden Stufen.

In der vorliegenden Arbeit wurde von einer sichtbaren Aneuploidie im Histogramm ausgegangen, wenn mehr als zwei Chromosomen von der euploiden Stufe abwichen. Dies entsprach einer Abweichung von mehr als 0,5 im Verhältnis der Peakpositionen, so dass diese als Nachweismethode etabliert wurde. Die Grenze zwischen den Ploidiestufen wurde mit den Werten der idealen Peakverhältnisse (0,37; 0,555; 0,74) in der Formel „(höhere Ploidiestufe - niedrigere Ploidiestufe) / 2“ berechnet. Der daraus resultierende Wert von 0,0925 wurde für die Zuordnung der Aneuploiden zu den Ploidiestufen genutzt. Die Grenze zwischen hyperdiploid und hypotriploid war demzufolge das

Peakverhältnis „0,37 + 0,0925“, und zwischen hypertriploid und hypotetraploid das Peakverhältnis „0,555 + 0,0925“.

2.4 Cytogenetische Analysen

2.4.1 Mitotische Zellteilung

Für die Untersuchung der Mitose wurden weiße junge Wurzelspitzen von getopften Pflanzen aus dem Gewächshaus am Morgen in einem mit Leitungswasser gefüllten 2 ml Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) gesammelt. Die Mitosehäufigkeit ist morgens am größten. Die Wurzelspitzen wurden mit einer Pinzette auf einen Objektträger gelegt, mit 50 µl 4 % Karminessigsäure (Fa. Morphisto) bedeckt, auf einem Heizblock (RH Basic 2, Fa. IKA) 3 sec erhitzt, mit Hilfe eines Deckgläschens gequetscht und mit einem Durchlichtmikroskop (Fa. Olympus, BX53) untersucht.

2.4.2 Meiotische Zellteilung

Die Untersuchung der Meiose in Pollenmutterzellen erfolgte mit einigen Abwandlungen nach Cramer (1999). Eine Blütenknospe dieser Größe (Abb. 4) hat bereits Antheren entwickelt, in denen Pollenmutterzellen gebildet werden können. Sie ist leicht zwischen den Hüllblättern erkennbar.

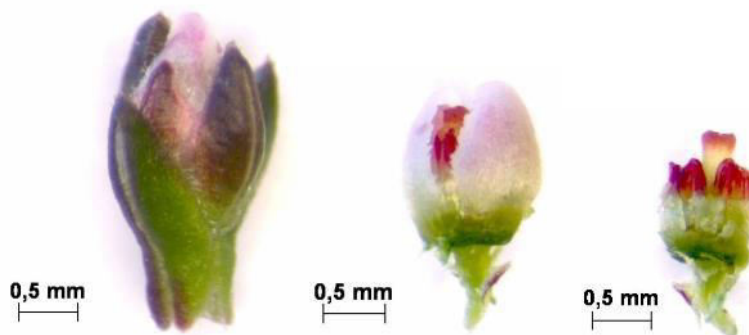


Abbildung 4: Präparation einer Blütenknospe (Wildform 'Ruhla') von der Größe, in der die Antheren entwickelt sind und die meiotische Bildung des Pollens beginnt. Pollenmutterzellen sind in diesem Entwicklungsstadium sichtbar. Binokular-Mikroskop: *Olympus SZX10*, Kamera: *Olympus DP26*, Software: *Olympus cellSens*.

Die Blütenknospen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) mindestens 24 h in einem Ethanol-Eisessig-Gemisch (AE, 3 : 1) fixiert. Mit einer Pipette wurde das AE entfernt und die Blütenknospen wurden dreimal für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Daraufhin wurden die Antheren unter einem Binokular-Mikroskop (Olympus SZX10) mit Hilfe von zwei Pinzetten herauspräpariert. Sie wurden auf einen Objektträger gelegt und mit den Pinzetten quer halbiert. Nach Zugabe von 50 µl 4 % Karminessigsäure (Fa. Morphisto) wurde der Objektträger für 3 sec auf einem Heizblock (RH Basic 2, Fa. IKA) erhitzt. Ein Deckgläschen wurde aufgelegt und die Antheren gequetscht. Daraufhin wurden sie unter einem Durchlichtmikroskop (Fa. Olympus, BX53) untersucht.

2.5 Untersuchungen zur Pollenfertilität

2.5.1 Pollenvitalität

Die Untersuchung der Pollenvitalität erfolgte nach der Methode von Heslop-Harrison und Heslop-Harrison (1970) und von Reinhardt (2006) über die Färbbarkeit vitaler Pollenkörner mit Fluoresceindiazetat (FDA) durch eine intrazelluläre Esterase-Aktivität und die daraus resultierende Fluoreszenz. Es wurden drei verschiedene Lösungen vorbereitet. Für die Lösung A wurden 2 mg FDA (Fa. Sigma-Aldrich) in 1 ml Aceton (Fa. Roth) gelöst. Für die Lösung B wurde 1 g Zucker in 20 ml H₂O (0,5 % Saccharoselösung) gelöst. Lösung C bestand aus 0,3 ml Lösung B und 8 µl Lösung A sowie den Pollenkörnern – und wurde auf Objektträger gegeben. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte unter Blaulicht ($\lambda = 400\text{--}450$ nm, Leica DM RM). In vitalen Pollenkörnern wird FDA durch eine intrazelluläre Esterase-Aktivität in Fluorescein und das entsprechende Salz gespalten. Fluorescein emittiert grünes Licht und so können grün erscheinende, vitale Pollenkörner detektiert werden. Pro Objektträger wurden 100 Pollenkörner ausgezählt.

2.5.2 Pollenkeimung *in vitro*

Für die Untersuchung der Pollenkeimung *in vitro* wurden 100 ml einer Nährlösung hergestellt, die aus 1 % Agar und 10 % Saccharoselösung bestand. Entfettete Objektträger wurden mit 0,5 ml der heißen Nährlösung versetzt und danach abgekühlt. Der zu untersuchende reife Pollen wurde darauf ausgebracht. Die Präparate wurden in eine mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Petrischale gelegt und im Dunkeln bei 20 °C gelagert. Nach 16 h bis 18 h wurden die Objektträger unter dem Durchlichtmikroskop (AXIO Imager.A1, Fa. Zeiss) ausgewertet, indem der Prozentsatz der keimenden Pollenkörner und die Länge der Pollenschläuche bestimmt wurden. Es wurden 100 Pollenkörner pro Probe ausgezählt.

2.5.3 Pollenkeimung *in vivo*

Für die Untersuchung des Pollenschlauchwachstums wurden Blüten 48 h nach der Bestäubung in AE (3 : 1) fixiert. Daraufhin wurde eine Färbelösung mit 0,1 g Anilinblau (Fa. Roth), 3,73 g Kaliumphosphat (K₃PO₄ × 3 H₂O, Fa. Sigma-Aldrich) und 50 ml destilliertem Wasser angesetzt (Mahy & Jacquemart 1999). Mit Salzsäure (Fa. Roth) wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 9,00 eingestellt (Digital-pH-Meter pH 525, Fa. Mettler Toledo). Zum Schluss wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Das Gynözeum wurde aus den Blüten herauspräpariert und der Fruchtknoten mit einer Rasierklinge abgeschnitten. 1 ml Färbelösung wurde in ein Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) gegeben und jeweils zehn Griffel wurden in der erhitzten Färbelösung mindestens 10 min bei 80 °C gefärbt. Die Griffel wurden auf einen Objektträger gelegt, mit einer Rasierklinge angeritzt, ein bis zwei Tropfen der erhitzten Färbelösung aufgebracht und unter einem weiteren Objektträger gequetscht. Die Quetschpräparate wurden unter einem UV-Lichtmikroskop (Leica DM RM) ausgewertet. Der Griffel und der Pollen leuchteten unter UV-Licht blau, das Narbengewebe rot und die Pollenschläuche hellblau. Die Glucoseeinheiten des Polysaccharids Kallose der Pollenschläuche sind über β -1,3-

glykosidische Bindungen miteinander verknüpft. Dieser Bindungstyp führt zu einer helikalen Struktur des Polymers. In dieser Konformation wird Anilinblau gebunden und der dabei entstehende Komplex führt zu einer hellen Fluoreszenz (Verma & Hong 2001).

2.6 Molekularbiologische Markeranalysen

2.6.1 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Die AFLP-Analyse (Vos et al. 1995) wurde durchgeführt und nach Borchert und Gawenda (2010) die Reproduzierbarkeit mit Adaptern (Tab. 2) und Primersequenzen (Tab. 48 im Anhang) von Behrend et al. (2013) getestet. Die genomische DNA wurde mit DNeasy Plant Mini Kit (Fa. Qiagen) isoliert. 150 ng genomische DNA wurden mit 2,5 µl 10x NEBuffer 2, 0,25 µl 100x BSA („Bovine Serum Albumin“; Fa. NEB [New England Biolabs]), 0,5 µl 10 U/µl HindIII (Fa. NEB), 10 U/µl MseI (Fa. NEB) und einer variablen Menge an H₂O (Endvolumen von 25 µl) 12 h bei 37 °C im Thermocycler (Fa. Peqlab) verdaut. Daraufhin wurden die Adapter 4 h bei 37 °C im Thermocycler ligiert. Für die Ligation wurden 5 µl eines Master-Mixes zu jeder Probe der verdauten DNA (Endvolumen von 30 µl) gegeben (Tab. 2).

Tabelle 2: Komponenten des Master-Mixes für die Ligation. Verwendete Adaptersequenzen (nach Behrend et al. 2013) für die AFLP-Analyse. F: Forward-Primer, R: Reverse-Primer.

Master-Mix für Ligation: 37 °C, 4 h	Volumen (Σ = 5 µl)
HindIII Adapter Mix	0,5 µl
MseI Adapter Mix	0,5 µl
10x Ligationspuffer inkl. ATP (Fa. NEB)	0,5 µl
20 U/µl T4-DNA-Ligase (Fa. NEB)	0,05 µl
H ₂ O	3,45 µl
MseI Adapter	F: 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3' R: 5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'
HindIII Adapter	F: 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3' R: 5'-AGC TGG TAC GCA GTC TAC-3'

Für die Prä-Amplifikation wurden verschiedene Komponenten einem PCR-Ansatz (PCR: Polymerase-Kettenreaktion) zugefügt und anschließend eine PCR (Denaturierung, Hybridisierung, Verlängerung) im Thermocycler (Fa. Peqlab) durchgeführt (Tab. 3).

Tabelle 3: PCR-Ansatz für die Prä-Amplifikation mit unspezifischen Primern sowie PCR-Bedingungen.

Komponenten PCR-Ansatz Prä-Amplifikation	Volumen ($\Sigma = 50 \mu\text{l}$)
DigLig DNA (verdaut und ligiert)	5,0 μl
50 ng/ μl HindIII+0	1,5 μl
50 ng/ μl Msel+0	1,5 μl
2 mM dNTP-mix (Fa. GeneOn)	5,0 μl
10x Puffer (Fa. Metabion)	5,0 μl
5 U/ μl Taq-Polymerase (Fa. Metabion)	1,0 μl
H ₂ O	31,0 μl
PCR-Bedingungen	Temperatur, Zeit
Denaturierung	94 °C, 5 min
20 Zyklen: Denaturierung	94 °C, 30 sec
Annealing	60 °C, 30 sec
Elongation	72 °C, 1 min
Finale Elongation	72 °C, 10 min

Daraufhin wurde die DigLig-Prä-DNA (verdaut, ligiert, prä-amplifiziert) 1 : 20 in H₂O verdünnt. In die AFLP-Analyse wurden zehn Primerpaare einbezogen (Tab. 48 im Anhang). Für die finale Amplifikation wurde ein PCR-Ansatz vorbereitet und eine PCR im Thermocycler (Fa. Peqlab) durchgeführt (Tab. 4).

Tabelle 4: PCR-Ansatz für die finale Amplifikation mit spezifischen Primern (IRDye: Infrared Fluorescent Dye) sowie PCR-Bedingungen.

Komponenten PCR-Ansatz Finale Amplifikation	Volumen ($\Sigma = 10 \mu\text{l}$)
DigLig-Prä DNA (verdaut, ligiert, prä-amplifiziert)	2,5 μl
2 ng/ μl HindIII+XY IRDye-Primer 1	2,0 μl
2 ng/ μl HindIII+XY IRDye-Primer 2	2,0 μl
50 ng/ μl Msel+XY Primer	0,3 μl
2 mM dNTP-Mix (Fa. GeneOn)	1,0 μl
10x Puffer (Metabion)	1,0 μl
5 U/ μl Taq-Polymerase (Metabion)	0,05 μl
H ₂ O	1,15 μl
Touchdown PCR-Bedingungen	Temperatur, Zeit
Denaturierung	94 °C, 5 min
1 Zyklus: Denaturierung	94 °C, 30 sec
Annealing	65 °C, 30 sec
Elongation	72 °C, 1 min
11 Touchdown-Zyklen: Denaturierung	94 °C, 30 sec
Annealing	64,3 -0,7 °C, 30 sec
Elongation	72 °C, 1 min
24 Zyklen: Denaturierung	94 °C, 30 sec
Annealing	56 °C, 30 sec
Elongation	72 °C, 1 min
Finale Elongation	72 °C, 10 min

Ein Polyacrylamidgel (LI-COR KB+ 6,5 % Gel Matrix, 150 µl 10 % APS [Ammoniumperoxodisulfat], 15 µl TEMED [Tetramethylethyldiamin]; Fa. Licor) wurde verwendet, um die PCR-Fragmente aufzutrennen. Die Proben wurden 1:11 mit Ladepuffer (98 % Formamid, 10 mM EDTA [Ethylendiamintetraessigsäure], 0,05 % Pararosanilin) verdünnt und für 3 min bei 94 °C denaturiert. 0,5 µl jeder Probe wurden zwischen die Zähne eines Kunststoffkamms (Fa. Licor) für 64 Proben pipettiert sowie rechts und links der Proben ein Größenstandard (50–700 bp IRDye700/800 Sizing Standard, Fa. Licor). Nach dem Testlauf „Pre-Run“ (750 V, 20 mA, 15 W, 45 °C, 20 min) wurde die eigentliche Gelelektrophorese gestartet (1500 V, 35 mA, 35 W, 45 °C, 3 h). Daraufhin konnten die Banden im Gel mit dem Programm SAGA (SAGA Generation 2, Version 3.3.0, Fa. Licor) ausgewertet werden.

2.6.2 Simple Sequence Repeats (SSR)

Für den Test von SSR-Markern wurde genomische DNA mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Fa. Qiagen) isoliert. DNA wurde über PCR im Thermocycler (Fa. Peqlab) vervielfältigt. Den Proben wurden jeweils 2 µl 6x Ladepuffer (Fa. Roth) zugegeben und 20 µl jeder Probe wurden auf ein 2 % Agarosegel (300 ml 1 % TAE-Puffer [TRIS-Acetat-EDTA-Puffer] von pH = 8,0; 6 g Agarose [Fa. Roth], 6 µl Midori-Green [Fa. Roth]) aufgetragen, um die Amplifikationsprodukte aufzutrennen. Rechts und links der Proben wurden jeweils 5 µl der 100 bp Quick-Load-DNA-Ladder (Fa. BioLabs) aufgetragen. Die Spannung des Gelelektrophoreseapparats (Fa. Consort) wurde auf 200 V eingestellt. Das Ergebnis wurde unter UV-Licht in einer dunklen Kammer (DH-30/32, Fa. Biostep) sichtbar gemacht. Fotos wurden mit einer Kamera (Fa. Olympus) aufgenommen und mit dem Programm *Argus X1* (Fa. Olympus) bearbeitet.

Eine am IGZ vorhandene Sequenzdatenbank mit Blütenexpressionsdaten von *C. vulgaris* (NCBI [National Center for Biotechnology Information], Accession Number: GBSW00000000, Rohdaten NCBI Gene Expression Omnibus, Accession Number GSE60105), erzeugt mit den Genotypen 'Maria' und 'Boskoop', wurde mit dem Programm *MicrofinderLITE* (Microsatellite finder in 454 data, Dice Holdings, Inc.) nach repetitiven Sequenzen untersucht. Daraufhin wurden die flankierenden Bereiche dieser repetitiven Sequenzen in Hinblick auf eine Länge von mindestens 50 Basenpaaren selektiert. Auf der Basis der spezifischen DNA-Sequenzen wurden mittels der Software *Primer 3* (Rozen & Skaletsky 2000; Untergrasser et al. 2012) Primerpaare erstellt. Diese Primerpaare wurden miteinander verglichen und solche aussortiert, die identische Sequenzabschnitte zeigten. Die PCR für den EST-SSR-Marker-Test wurde nach Segarra-Moragues et al. (2009) durchgeführt (Tab. 6).

Geprüft wurden darüber hinaus acht SSR-Marker aus dem Genom von *Erica coccinea* (Segarra-Moragues et al. 2009) und 16 SSR-Marker aus dem Genom von *Menziesia goyozanensis* (Abe et al. 2011) für eine mögliche Übertragung auf *C. vulgaris* (Tab. 5).

Tabelle 5: Test publizierter SSRs der nah verwandten Pflanzenarten *Erica coccinea* (Ecoc) und *Menziesia goyozanensis* (Mg). Die Gattungen *Erica* und *Menziesia* gehören zur selben Unterfamilie wie *Calluna*: Ericoideae (Gillespie & Kron 2010).

SSR-Marker mit dem jeweiligen SSR-Motiv: Ecoc (Segarra-Moragues et al. 2009) und Mg (Abe et al. 2011)			
Ecoc108	(CT) ₆ T(CT) ₄	Mg125	(CA) ₄ CTCG(CA) ₂ TG(CA) ₆
Ecoc115	(CA) ₈	Mg140	(CT) ₈ AGAT(CT) _{3...3} (CT) ₂ CC (CT) ₃ CA(CT) ₉
Ecoc117	(GA) ₅ G(GA) ₅	Mg142	(GA) ₃ GG(GA) ₁₅
Ecoc122	(GA) ₁₁	Mg205	(GA) ₈
Ecoc132	(CT) ₇	Mg213	(TC) _{8...8} (TC) _{5...5} (TC) ₁₀
Ecoc142	(GA) ₁₆	Mg214	(GA) ₆ G(GA) ₁₃
Ecoc431	(CT) ₁₄	Mg218	(TC) ₁₈
Ecoc446	(GA) ₁₀ TA(GA) ₂ (GT) ₁₁	Mg220	(GT) ₉
Mg15	(TC) ₁₅	Mg233	(GA) ₁₃
Mg17	(CT) ₄ CC(CT) ₁₅	Mg240	(TC) _{16...16} (TC) ₇
Mg26	(CT) ₉	Mg247	(GT) ₉ (GA) ₁₈
Mg59	(TC) ₅ CC(TC) ₁₄ C(TC)	Mg286	(GA) ₂₃

Die PCR der genomischen SSR-Marker von *E. coccinea* bzw. von *M. goyozanensis* wurde nach den jeweiligen ursprünglichen Protokollen von Segarra-Moragues et al. (2009) bzw. Abe et al. (2011) durchgeführt (Tab. 6).

Tabelle 6: Test von elf EST-SSR-Markern von *C. vulgaris* und acht genomischen SSR-Markern von *E. coccinea* (Segarra-Moragues et al. 2009) und 16 genomischen SSR-Markern von *M. goyozanensis* (Abe et al. 2011) für *C. vulgaris*. Durchführung nach publizierten PCR-Protokollen.

Komponenten PCR-Ansatz <i>E. coccinea</i> (Segarra-Moragues et al. 2009)	Volumen ($\Sigma = 20 \mu\text{l}$)
gDNA	Variabel (20 ng)
H ₂ O	Variabel
Master-Mix	PCR-Bedingungen
1x Puffer (Fa. Metabion)	Denaturierung 94 °C, 4 min
2 mM MgCl ₂ (Fa. Invitrogen)	35 Zyklen: Denaturierung 94 °C, 1 min
0,4 mM dNTPs (Fa. GeneOn)	Annealing 56 °C, 1 min
5 pmol von jedem Primer (Fa. Metabion)	Elongation 72 °C, 1 min
1 U/ μl Taq-Polymerase (Fa. Metabion)	Finale Elongation 72 °C, 7 min
Komponenten PCR-Ansatz <i>M. goyozanensis</i> (Abe et al. 2011)	Volumen ($\Sigma = 20 \mu\text{l}$)
gDNA	Variabel (5 ng)
H ₂ O	Variabel
Master-Mix	PCR-Bedingungen
1x Puffer (Fa. Metabion)	Denaturierung 95 °C, 15 min
2 mM MgCl ₂ (Fa. Invitrogen)	35 Zyklen: Denaturierung 95 °C, 30 sec
40 μM dNTPs (Fa. GeneOn)	Annealing 56 °C, 90 sec
0,2 μM von jedem Primer (Fa. Metabion)	Elongation 72 °C, 90 sec
1 U/ μl Taq-Polymerase (Fa. Metabion)	Finale Elongation 72 °C, 10 min

Auf der Basis von SSR-Sequenzen aus *Diplarche multiflora* (NCBI: Zhang et al. 2009, unpubl.) wurden neun Primerpaare mittels *Primer 3* (Rozen & Skaletsky 2000; Untergrasser et al. 2012) erstellt. Diese wurden mit dem PCR-Protokoll von Segarra-Moragues et al. (2009) geprüft. Daraufhin veröffentlichten Zhang et al. (2013) auf der Grundlage dieser Sequenzen (NCBI) von *D. multiflora* 27 etablierte Primersequenzen. Die publizierten SSR-Marker aus dem Genom von *D. multiflora* wurden nach dem entsprechenden Protokoll von Zhang et al. (2013) für *C. vulgaris* getestet (Tab. 7).

Tabelle 7: Test von 27 genomischen SSR-Markern aus *D. multiflora* (Zhang et al. 2013) bei *C. vulgaris*. Durchführung nach Zhang et al. (2013).

Komponenten PCR-Ansatz <i>D. multiflora</i> (Zhang et al. 2013)	Volumen ($\Sigma = 20 \mu\text{l}$)
gDNA	Variabel (40 ng)
H ₂ O	Variabel
Master-Mix	PCR-Bedingungen
20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl (Fa. Metabion)	Denaturierung 95 °C, 3 min
3 mM MgCl ₂ (Fa. Invitrogen)	35 Zyklen: Denaturierung 94 °C, 30 sec
0,5 mM dNTPs (Fa. GeneOn)	Annealing 46–58 °C, 45 sec
2 pmol von jedem Primer (Fa. Metabion)	Elongation 72 °C, 1 min
0,1 U/ μl Taq-Polymerase (Fa. Metabion)	Finale Elongation 72 °C, 7 min

Die Suche nach geeigneten SSR-Markern nah verwandter Gattungen führte des Weiteren zu 20 Primerkombinationen (Tab. 8, auf genomischer DNA basierend) von *Rhododendron* (Naito et al. 1998; Dunemann et al. 1999; Dendauw et al. 2001; Wang et al. 2010). Nach De Keyser et al. (2010) wurde ein 20 μl PCR-Ansatz vorbereitet, der aus 15 ng DNA, einer variablen H₂O-Menge und 9,45 μl Master-Mix bestand. Der Master-Mix beinhaltete jeweils 0,5 μmol Forward- und Reverse-Primer, 20 μM dNTP, 10 ng BSA, 1x Puffer und 1,25 U/ μl Taq-Polymerase. Die Amplifizierung erfolgte unter folgenden Bedingungen: 94 °C für 3 min, 35 Zyklen (94 °C 30 sec, Primerhybridisierung für 30 sec, 72 °C 1 min), und 72 °C für 10 min.

Tabelle 8: Test von 20 SSR-Markern bei *C. vulgaris*, die für *Rhododendron* entwickelt wurden. Für die SSR-Marker von Dunemann et al. (1999) waren trotz Nachfrage keine Motivinformationen mehr bekannt. T_a: Annealing-Temperatur.

Referenz	Pflanzenart	SSR-Marker	T _a [°C]	SSR-Motiv
Naito et al. (1998)	<i>R. metternichii</i> var. <i>hondoense</i>	RM2D2	50	(CT) ₁₆
		RM3D1	52	(CT) ₂₁ (AT) ₉ (GT) ₉
		Rm3D2	46	(GA) ₁₈
		Rm9D1	49	(CT) ₂₃
		RM9D6	55	(GA) ₁₆
Dunemann et al. (1999)	<i>Rhododendron</i>	DC027	60	–
		DC045	57	–
		DC046	60	–
		GA102	57	–
		GA111	60	–
		GA211	60	–
		GA758	60	–
Dendauw et al. (2001)	<i>R. simsii</i>	Aza-002	57	(AC) ₁₀ (TC) ₈ (AC) ₁₇
		Aza-003	60	(TG) ₁₅
Wang et al. (2010)	<i>R. delavayi</i>	R112	58	(AG) ₁₅
		R163	58	(TG) ₈
		R166	59	(AG) ₇
		R172	59	(CT) ₆ /(CT) ₇
		R210	60	(AG) ₂₁
		R432	64	(CT) ₁₄

Anschließend wurden 23 SSR-Marker von *Vaccinium corymbosum* (Boches et al. 2005) für *C. vulgaris* getestet (Tab. 9). Die Sequenzen basierten einerseits auf zwei EST-Datenbanken (CA, NA) und andererseits auf genomischer DNA (VCC).

Tabelle 9: 23 SSR-Marker von *Vaccinium corymbosum* (Boches et al. 2005), die getestet wurden.

23 SSR-Primer von <i>V. corymbosum</i> mit ihren jeweiligen SSR-Motiven					
CA23F	(AGA) ₆	CA94F	(AG) ₇	CA112F	(AG) ₇
CA169F	(GAT) ₄	CA190R	(TGC) ₅	CA344F	(GCG) ₆
CA421F	(CT) ₂₅	CA483F	(TC) ₈	CA642F	(CT) ₁₇
CA787F	(GAA) ₇	CA794F	(GA) ₁₂	NA41	(CT) ₁₀ (CT) ₇
NA800	(TC) ₁₃	NA824	(AG) ₁₇	NA961	(TAC) ₅
NA1040	(TC) ₁₁	VCC_B3	(AG) ₉	VCC_H9	(CT) ₁₃
VCC_I2	(CT) ₁₄	VCC_I8	(TG) ₈	VCC_J9	(TG) ₉ (GA) ₂₃
VCC_K4	(TC) ₁₆ (TC) ₁₂	VCC_S10	(CT) ₂₂	–	–

Nach Boches et al. (2005) wurde ein PCR-Ansatz von 10 µl vorbereitet und anschließend eine PCR im Thermocycler (Fa. Peqlab) durchgeführt (Tab. 10).

Tabelle 10: Test von 23 SSR-Markern von *V. corymbosum* (Boches et al. 2005) bei *C. vulgaris*. Durchführung nach dem PCR-Protokoll von Boches et al. (2005).

Komponenten des PCR-Ansatzes	Volumen ($\Sigma = 10 \mu\text{l}$)
gDNA	Variabel (2,5 ng)
H ₂ O	Variabel
Master-Mix	PCR-Bedingungen
1x Puffer (Fa. Metabion)	Denaturierung 94 °C, 3 min
2 mM MgCl ₂ (Fa. Invitrogen)	35 Zyklen: Denaturierung 94 °C, 40 sec
0,2 mM dNTPs (Fa. GeneOn)	Annealing 60 °C/62 °C, 40 sec
0,3 µM von jedem Primer (Fa. Metabion)	Elongation 72 °C, 40 sec
0,25 U/µl Taq-Polymerase (Fa. Metabion)	Finale Elongation 72 °C, 30 min
Annealing-Temperatur 60 °C: CA94F, CA344F, CA421F, CA642F, CA787F, CA794F, NA800, NA824, NA961, NA1040, VCC_S10	
Annealing-Temperatur 62 °C: CA23F, CA112F, CA169F, CA190R, CA483F, NA41, VCC_B3, VCC_H9, VCC_I2, VCC_I8, VCC_J9, VCC_K4	

Nach dem Test aller SSR-Marker auf Agarosegelen wurden diejenigen, die für *C. vulgaris* amplifizierte Produkte ergaben, auf Polyacrylamidgelen (LI-COR KB+ 6,5 % Gel Matrix, 150 µl 10 % APS, 15 µl TEMED; Fa. Licor) mit einem fluoreszenzmarkierten M13-Tail (Schuelke 2000) nach den gleichen Protokollen getestet. Die Verwendung des M13-Tails ist sehr ökonomisch, weil direkt markierte Primer fünf- bis zehnmal teurer sind als nicht markierte Primer (Hayden et al. 2008). Der universelle Primer als Fluoreszenzmarkierung kann für verschiedene Primersequenzen verwendet werden.

Der Primer-Mix bestand aus einem Forward-Primer mit einer spezifischen Sequenz am 5'-Ende (M13-Tail: Sequenz „Cagtcggcgtcatca“), einem Reverse-Primer und dem universellen fluoreszenzmarkierten M13-Tail. Der universelle Primer wurde in der Konzentration 8 pmol, der selektive Forward-Primer in 2 pmol und der Reverse-Primer in 8 pmol eingesetzt. Diese Primerkonzentrationen wurden für jeden SSR-Marker verwendet.

Im Anschluss an die beschriebenen Untersuchungen wurde ein PCR-Protokoll für die Anwendung aller etablierten SSR-Marker bei *C. vulgaris* unter Gebrauch von direkt fluoreszenzmarkierten Forward-Primern bezüglich Menge und Konzentration der PCR-Komponenten inklusive Primer-Konzentration, außerdem PCR-Bedingungen einschließlich Annealing-Temperaturen, optimiert und etabliert (Tab. 11).

Tabelle 11: Etabliertes PCR-Protokoll für die Anwendung der SSR-Marker bei *C. vulgaris* mit direkt fluoreszenzmarkierten Primern.

Komponenten des PCR-Ansatzes	Volumen ($\Sigma = 20 \mu\text{l}$)
gDNA	Variabel (15 ng)
H ₂ O	Variabel
Master-Mix	PCR-Bedingungen
1x PCR-Puffer (Fa. Metabion)	Denaturierung 94 °C, 4 min
2 mM MgCl ₂ (Fa. Invitrogen)	35 Zyklen: Denaturierung 94 °C, 1 min
0,4 mM dNTPs (Fa. GeneOn)	Annealing 47/51/55 °C, 1 min
2 pmol von jedem Primer (Fa. Metabion)	Elongation 72 °C, 1 min
1 U/ μl Taq-Polymerase (Fa. Metabion)	Finale Elongation 72 °C, 7 min
Annealing-Temperatur 47 °C: DA6, DC109, DG2, DG105, Mg59	
Annealing-Temperatur 51 °C: DG 70, DG71, DC114	
Annealing-Temperatur 55 °C: Cv29, Ecoc108, Ecoc142	

2.7 Polyploidisierung von Pflanzenmaterial *in vitro*

2.7.1 Behandlung von Saatgut und Sämlingen

2.7.1.1 Inkubation des Pflanzenmaterials im gelösten Mitosehemmer

Für die Versuche mit keimendem Saatgut wurde mit einer Saatgutmischung aus dem Zuchtgarten des Betriebes Heidepflanzen de Winkel gearbeitet. Die genauen Genotypen aus den unterschiedlichen Kreuzungen des Zuchtgartens waren unbekannt. Für die *in vitro*-Versuche wurde das Saatgut im ersten Schritt immer, wie in Kapitel 2.1.3.1 beschrieben, sterilisiert. Dies erfolgte 30 sec mit 70 % Ethanol und 10 min mit NaOCl (2 % freies Chlor), dann wurde das Sterilisationsmittel durch dreimaliges Spülen mit autoklaviertem Leitungswasser entfernt. Zum Einsatz kamen die vier Mitosehemmer Colchizin (Fa. Serva), Trifluralin (Fa. Sigma-Aldrich), Oryzalin (Fa. Duchefa) und Amiprofos-methyl (APM) (Fa. Sigma-Aldrich). Colchizin wurde in Flüssigmedium und die drei weiteren Mitosehemmer in 100 % Aceton (Fa. Roth) gelöst (Dhooge et al. 2009a).

Für die Inkubation von Saatgut in Mitosehemmer-Lösungen wurden jeweils 100 Samen in Reaktionsgefäßen (1,5 ml, Fa. Eppendorf) gesammelt. Nach der Sterilisation wurden 700 μl der Mitosehemmer-Lösung auf das Saatgut gegeben. Nach der jeweiligen Inkubationszeit von 6 h, 24 h bzw. 48 h wurden die Mitosehemmer entfernt und das Saatgut dreimal für 5 min mit autoklaviertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde 700 μl ½ MS-Medium auf das Saatgut gegeben. Mit Hilfe einer Pipette wurde das Flüssigmedium mit dem Saatgut auf Festmedium in einer Petrischale gebracht. Das Saatgut keimte nach ca. zehn Tagen, die Keimlinge wurden vier Wochen nach der Aussaat auf mit ½ MS-Medium getränkte sterile Brücken aus Filterpapier gesetzt, und nach insgesamt acht bis zwölf Wochen konnten die Ploidiestufen im Durchflusscytometer (FCM) bestimmt werden.

In einem Teil der Versuche wurde eine Vorquellung des Saatguts über 24 h oder 48 h getestet, da vermutet wurde, dass durch Aufweichung der Samenschale die Mitosehemmer anschließend besser

in das Saatgut eindringen können. Nach der jeweiligen Quellzeit wurde das Medium entfernt und das Saatgut in Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf) mit 700 µl Mitosehemmer-Lösung behandelt.

2.7.1.2 Mitosehemmer im Festmedium

Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf) mit jeweils 100 Samen wurden vorbereitet. Die Mitosehemmer wurden im gelösten Zustand in entsprechender Menge für die gewünschten Konzentrationen zu dem handwarmen Medium mit Gelrite (3,7 g/l; Fa. Duchefa) gegeben und in Petrischalen gegossen. Einen Tag darauf wurde das Saatgut sterilisiert und mit 700 µl flüssigem ½ MS-Medium auf die vorbereiteten Petrischalen ausgebracht. Zwei Wochen später wurden die Sämlinge auf mit ½ MS-Medium getränkte sterile Filterbrücken gesetzt und nach zehn bis zwölf Wochen mittels FCM untersucht.

2.7.1.3 Tropfenbehandlung

Es wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf) mit jeweils 100 Samen vorbereitet. Das Saatgut wurde sterilisiert und auf Petrischalen mit ½ MS-Medium ausgesät. Eine Woche später fing es an zu keimen. Die Keimlinge wurden ab dem Zeitpunkt des Austritts der Keimwurzel innerhalb von zwei Wochen achtmal (Colchizin) bzw. neunmal (Trifluralin, Oryzalin, APM) unter Verwendung einer Multipipette (Fa. Eppendorf) mit jeweils 2 µl Mitosehemmer-Lösung betropft. Die Keimlinge wuchsen, wurden zwei Wochen nach der Behandlung auf Filterbrücken überführt und die Ploidiestufen konnten acht bis zwölf Wochen nach der Aussaat mittels FCM bestimmt werden.

Des Weiteren wurden die Keimlinge drei Wochen nach der Aussaat nach drei Entwicklungsstadien sortiert: Austritt der Radicula, und Austritt sowie Entfaltung der Kotyledonen (Abb. 5). Diese Keimlinge wurden innerhalb von zwei Wochen fünfmal mit jeweils 2 µl Mitosehemmer-Lösung betropft.

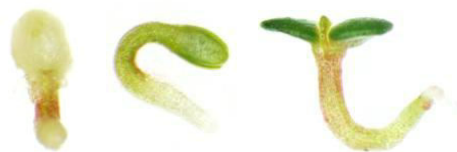


Abbildung 5: Drei verschiedene Entwicklungsstadien von Keimlingen. Links: Austritt der Radicula, Mitte: Austritt der Kotyledonen, rechts: Entfaltung der Kotyledonen. Binokular-Mikroskop: *Olympus SZX10*, Kamera: *Olympus DP26*, Software: *Olympus cellSens*.

2.7.1.4 Gelrite-Lösung

Jeweils 100 Samen wurden in Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf) gesammelt. Das Saatgut wurde sterilisiert und auf Festmedium in Petrischalen ausgebracht. Drei Wochen später wurden die Keimlinge nach vier Entwicklungsstadien sortiert: ungekeimtes Saatgut, Austritt Radicula, Austritt Kotyledonen und Entfaltung Kotyledonen (Abb. 6).



Abbildung 6: Entwicklungsreihe von Sämlingen (von links nach rechts): ungekeimter Samen, Austritt der Radicula, Austritt der Kotyledonen, Entfaltung der Kotyledonen. Binokular-Mikroskop: *Olympus SZX10*, Kamera: *Olympus DP26*, Software: *Olympus cellSens*.

Dieses Pflanzenmaterial wurde mit einer 1,8 % Gelrite-Lösung betropft. Die Methode basiert auf der Arbeit von Schwanitz (1949), der mit einer viskosen Lösung gearbeitet hatte, welche auf dem Pflanzenmaterial haften bleibt und nicht verdunstet. Die Gelrite-Lösung wurde aus 30 g Zucker, 2,2 g MS-Konzentrat (Fa. Duchefa), 1,8 g Gelrite (Fa. Duchefa) und 1 l destilliertem Wasser hergestellt. Die Lösung wurde auf pH = 6 (Digital-pH-Meter pH 525, Fa. Mettler Toledo) eingestellt und autoklaviert (121 °C, 210 kPa, 20 min). Das Antimitotikum wurde in 1 ml ½-MS-Medium bzw. Aceton in einem Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) gelöst. 20 ml der auf ca. 60 °C abgekühlten Gelrite-Lösung wurden zusammen mit 1 ml Mitosehemmer-Lösung in ein Zentrifugenröhrchen gegeben (Mischungsverhältnis 1 : 20). 20 µl der Mitosehemmer enthaltenden handwarmen Gelrite-Lösung wurden mit einer Pipette (Fa. Eppendorf) auf das zu polyploidisierende Pflanzengewebe appliziert. Die Gelrite-Lösung blieb nach Erkalten am Pflanzenmaterial haften. Die sterile Gelrite-Lösung wurde in Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur gelagert und konnte (nach Verflüssigung in einer Mikrowelle) weiterverwendet werden.

In einem ersten Versuch wurde die Gelrite-Lösung mit den Mitosehemmern von den Sämlingen nicht entfernt und so nur der Beginn der Behandlung in einem Entwicklungsstadium bestimmt. Die Applikation der Gelrite-Lösung erfolgte fünfmal innerhalb von zwei Wochen. In einem zweiten Versuch wurde das Pflanzenmaterial innerhalb von fünf Tagen zweimal behandelt (Tag 1, Tag 3). An Tag 5 wurde die anhaftende Gelrite-Lösung mit Hilfe einer sterilen Pinzette entfernt und die Sämlinge in autoklaviertem Leitungswasser für 1 min gewaschen, um die Behandlung auf das jeweilige Entwicklungsstadium zu beschränken. Die Keimlinge wurden nach vier Wochen weiteren Wachstums auf mit ½ MS-Medium getränkte sterile Filterbrücken gesetzt und die Ploidiestufen bestimmt.

2.7.2 Behandlung von Sprossspitzen

Analoge Versuche wurden mit Sprossspitzen durchgeführt. Im ersten Versuch wurden Sprossspitzen in Petrischalen (8 cm Durchmesser) gelegt und mit 15 ml Mitosehemmer-Lösung bedeckt. Anschließend wurden die Petrischalen im Klima-Licht-Raum bei 23 °C Temperatur für 48 h auf einen Schüttler (Schüttelapparat Modell 3020 GFL, Kreisschüttler, Fa. Gesellschaft für Labortechnik mbH) gestellt. Nach Inkubation wurden die Sprossspitzen in autoklaviertes Leitungswasser getaucht, um die Mitosehemmer zu entfernen. Daraufhin wurden die oberen Hälften der Sprossspitzen abgeschnitten, auf Festmedium überführt und die unteren Hälften auf Filterpapier gesetzt (Abb. 7). Im Sprossapikalmeristem können Mitosehemmer die Zellteilung stören. Nachdem das Meristem auf

Festmedium vier Wochen kultiviert wurde, konnte Pflanzenmaterial für FCM-Messungen verwendet werden.

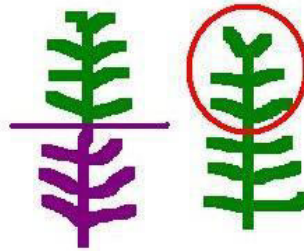


Abbildung 7: Kultivierung und Vermehrung der behandelten Sprossspitzen. Wachstum des behandelten Pflanzengewebes (grün) und Abschneiden sowie Umsetzen auf frisches Nährmedium, weiteres Wachstum. Ein Teil des rot umkreisten Pflanzenmaterials wurde letztendlich für die FCM-Messung verwendet.

Im zweiten Versuch wurden Sprossspitzen auf Festmedium in Gläsern kultiviert (Kap. 2.1.3.1) und innerhalb von zwei Wochen achtmal (Colchizin) bzw. neunmal (Trifluralin, Oryzalin, APM) unter Verwendung einer Multipipette (Fa. Eppendorf) mit jeweils 2 µl Mitosehemmer-Lösung betropft. Nach der Behandlung wurden die oberen Hälften der Sprossspitzen abgeschnitten, vier Wochen weiter kultiviert (Abb. 7), und letztendlich die Ploidiestufen mittels FCM ermittelt.

In einem dritten Versuch wurden Sprossspitzen auf Festmedium in Gläsern mit Mitosehemmern in einer 1,8 % Gelrite-Lösung (Herstellung siehe Kap. 2.7.1.4) behandelt (Abb. 8). Sprossspitzen wurden innerhalb von zehn Tagen siebenmal mit je 20 µl Gelrite-Lösung unter Gebrauch einer Pipette (Fa. Eppendorf) betropft. Nach Entfernung der Gelrite-Lösung (Kap. 2.7.1.4) wurden die oberen Hälften der Sprossspitzen abgeschnitten, vier Wochen kultiviert (Abb. 7) und daraufhin mittels FCM untersucht.



Abbildung 8: Behandlung von Sprossspitzen der Genotypen 2005.49/29 (links) und 2005.49/127 (rechts) mit 1,8 % Gelrite-Lösung. Sie bleibt nach Erkalten an dem Pflanzenmaterial haften und sorgt für eine anhaltende und effektive Wirkung des enthaltenen Mitosehemmers. Kamera: Sony DSC H7.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Pflanzen unterschiedlicher Ploidiestufen

3.1.1 Morphologische Unterschiede

Um zu untersuchen, inwieweit sich diploide, triploide und tetraploide Pflanzen von *C. vulgaris* morphologisch unterscheiden, wurden die Größenunterschiede zwischen Organen von Pflanzen dieser drei Ploidiestufen bestimmt.

Ein Zusammenhang zwischen Blattgröße und Ploidiestufe wurde bei 14 diploiden, zehn triploiden und zehn tetraploiden Genotypen geprüft (Tab. 12). Die 14 diploiden Genotypen beinhalteten vier Diploide der Population 2008.177 und zehn weitere diploide Sorten und Wildtypen. Die Blattgröße wurde des Weiteren an neun Triploiden und neun Tetraploiden der Population 2008.177 sowie an dem triploiden Genotyp 'Anke' und dem tetraploiden Genotyp '7705' bestimmt (Tab. 12). Die Sepalengröße wurde an denselben Genotypen untersucht wie die Blattgröße. Ausgeschlossen werden musste der diploide Genotyp 2008.177/15, weil er keine Blüten bildete.

Tabelle 12: Genotypen von *C. vulgaris*, die beim morphologischen Vergleich der Blatt- und Sepalengröße von Pflanzen unterschiedlicher Ploidiestufen Verwendung fanden. Sepalen-Untersuchung mit Ausnahme des diploiden Genotyps 2008.177/15.

Diploid		Triploid	Tetraploid
'Alicia'	2008.177/15	2008.177/142	2008.177/1
'Athene'	2008.177/251	2008.177/200	2008.177/2
'Maria'	2008.177/360	2008.177/328	2008.177/4
'Mariella'	2008.177/455	2008.177/330	2008.177/14
'Perestrojka'	–	2008.177/359	2008.177/21
'Venetia'	–	2008.177/382	2008.177/27
'Wink 2-2006'	–	2008.177/392	2008.177/55
'Wink 3-2006'	–	2008.177/464	2008.177/64
'San Remo'	–	2008.177/466	2008.177/70
'Löhnstein'	–	'Anke'	'7705'

Eine positive Korrelation zwischen dem morphologischen Merkmal Laubblattgröße und Ploidiestufe war vorhanden (Tab. 13). Die durchschnittliche Länge der Laubblätter betrug 2006 µm für Diploide, 2415 µm für Triploide und 2660 µm für Tetraploide. Ermittelt wurden für die Blattbreite Werte von 500 µm, 560 µm und 580 µm mit erhöhter diskreter Ploidiestufe. Die Daten waren für die zwei Merkmale normalverteilt. Nach ANOVA unterschieden sich in der untersuchten Stichprobe (n = 34) die Daten der Blattlänge der Diploiden, Triploiden und Tetraploiden signifikant voneinander (Tab. 13). Zwischen den Diploiden, Triploiden und Tetraploiden war in Bezug auf die Blattbreite kein signifikanter Unterschied vorhanden.

Das Längen-Breiten-Verhältnis der Laubblätter war mit vervielfachtem Chromosomensatz größer – 4,01 für Diploide, 4,31 für Triploide und 4,59 für Tetraploide.

Tabelle 13: Länge und Breite der Laubblätter [μm] von jeweils drei Organen pro Pflanze und drei Pflanzen pro Genotyp. Diploid: n = 14, triploid: n = 10, tetraploid: n = 10; SE: Standardfehler; Buchstaben a, b, c für Signifikanz in aufsteigender Reihenfolge der Mittelwerte im Ergebnis des Tukey-Test's ($\alpha = 0,05$); k: Anzahl der Gruppen (Ploidiestufen); n: Anzahl der Messwerte.

Organgröße Laubblätter			
Ploidiestufe	Länge\pmSE [μm]	Normal-Verteilung KSA - Test	Einfaktorielle ANOVA F (k-1, n-k)
Diploid	2006 \pm 48 a	d = 0,06656 p < 0,15	F(2, 31) = 29,00 p = 0,000
Triploid	2415 \pm 75 b		
Tetraploid	2660 \pm 73 c		
	Breite\pmSE [μm]		
Diploid	500 \pm 41 a	d = 0,04174 p > 0,20	F(2, 31) = 3,32 p = 0,059
Triploid	560 \pm 60 a		
Tetraploid	580 \pm 62 a		

Mit erhöhter Ploidiestufe der Pflanzen wurden höhere Werte für die Sepalenlänge sowie –breite ermittelt (Tab. 14). Bei der Analyse der Daten der Sepalenlänge war die Normalverteilung für die gesamte Stichprobe (n = 33) nicht gegeben, wurde aber separat für folgende Gruppen festgestellt: Diploide (p < 0,10; n = 13) und Polyploide (p > 0,20, n = 20), weshalb von einer Normalverteilung der Messwerte in der Grundgesamtheit auszugehen ist. In der untersuchten Stichprobe (n = 33) war ein signifikanter Unterschied der Daten der Sepalen der Diploiden und Polyploiden vorhanden, jedoch nicht zwischen Tri- und Tetraploiden.

Im Gegensatz zur Laubblattuntersuchung zeigte sich mit erhöhter diskreter Ploidiestufe ein verringertes Längen-Breiten-Verhältnis der Sepalen – 2,03 für diploide Genotypen, 2,00 für triploide und 1,93 für tetraploide.

Tabelle 14: Länge und Breite der Sepalen [μm] von jeweils drei Organen pro Pflanze und drei Pflanzen pro Genotyp. Diploid: n = 13, triploid: n = 10, tetraploid: n = 10; SE: Standardfehler; Buchstaben a und b für Signifikanz in aufsteigender Reihenfolge der Mittelwerte im Ergebnis des Tukey-Test's ($\alpha = 0,05$); k: Anzahl der Gruppen (Ploidiestufen); n: Anzahl der Messwerte. * keine Normalverteilung.

Organgröße Sepalen			
Ploidiestufe	Länge\pmSE [μm]	Normal-Verteilung KSA - Test	Einfaktorielle ANOVA F (k-1, n-k)
Diploid	2956 \pm 173 a	d = 0,08955 p < 0,05*	F(2, 30) = 18,82 p = 0,000
Triploid	3827 \pm 138 b		
Tetraploid	4078 \pm 83 b		
	Breite\pmSE [μm]		
Diploid	1457 \pm 63 a	d = 0,04106 p > 0,20	F(2, 30) = 26,29 p = 0,000
Triploid	1914 \pm 74 b		
Tetraploid	2113 \pm 67 b		

Die Stomatagröße wurde an zehn diploiden Sorten und Wildtypen (Tab. 15) und an neun tetraploiden Genotypen 2, 4, 6, 7, 14, 20, 30, 55, 70 der Population 2008.177 sowie an dem tetraploiden Genotyp '7705' gemessen (Bachelorarbeit von Andreas Liehr, 2012, Universität Jena).

Für die Stichproben bei der Stomata-Untersuchung für das Merkmal Stomatalänge ($n = 20$) lag eine Normalverteilung vor. Die Stomatalänge betrug $22 \mu\text{m}$ für Diploide und $24 \mu\text{m}$ für Tetraploide. Mittels einfaktorieller ANOVA wurde der Einfluss der Ploidiestufe als Prüffaktor mit zwei Faktorstufen untersucht. Die Daten unterschieden sich signifikant voneinander für das Merkmal Stomatalänge.

Tabelle 15: Stomatalänge der Ploidiestufen diploid ($n = 10$) und tetraploid ($n = 10$); Jeweils 20 Stomata pro Genotyp. SE: Standardfehler; Buchstaben a, b für Signifikanz in aufsteigender Reihenfolge der Mittelwerte im Ergebnis des Tukey-Test's ($\alpha = 0,05$); k: Anzahl der Gruppen (Ploidiestufen); n: Anzahl der Messwerte.

Länge Stomata			
Ploidiestufe	Länge \pm SE [μm]	Normal-Verteilung KSA - Test	Einfaktorielle ANOVA F (k-1, n-k)
Diploid	22 \pm 0,62 a	d = 0,03315 $p > 0,20$	F(1, 18) = 5,37 $p = 0,03$
Tetraploid	24 \pm 0,37 b		

Die Pollenfläche wurde mittels Software *Olympus cellSens* von jeweils zwei diploiden ('Josephine', 'Long White'), triploiden (2008.177/25, 2008.177/451) und tetraploiden Genotypen (2008.177/2, '7705') bestimmt, die als Pollenspenderpflanzen im interploiden Kreuzungsexperiment (Kap. 3.4.2) verwendet wurden (Projektarbeit von Aileen Gluschak, 2013, Universität Jena).

Bei der Pollenkornuntersuchung war Normalverteilung für die Stichprobe ($n = 6$) gegeben (Tab. 16). Eine positive Korrelation zwischen Pollenkornfläche und Ploidiestufe wurde nachgewiesen. Die Daten der diploiden, triploiden und tetraploiden Genotypen unterschieden sich signifikant voneinander.

Tabelle 16: Pollenkorngröße [μm^2] von jeweils zwei Genotypen ($n = 2$) der Ploidiestufen diploid ('Josephine', 'Long White'), triploid (2008.177/25, 2008.177/451) und tetraploid (2008.177/2, '7705'). SE: Standardfehler; Buchstaben a, b, c für Signifikanz in aufsteigender Reihenfolge der Mittelwerte im Ergebnis des Tukey-Test's ($\alpha = 0,05$); k: Anzahl der Gruppen (Ploidiestufen); n: Anzahl der Messwerte.

Fläche Pollenkörner			
Ploidiestufe	Fläche \pm SE [μm^2]	Normal-Verteilung KSA - Test	Einfaktorielle ANOVA F (k-1, n-k)
Diploid	631 \pm 65 a	d = 0,10119 $p < 0,20$	F(2, 3) = 45,47 $p = 0,006$
Triploid	943 \pm 18 b		
Tetraploid	1242 \pm 40 c		

Vergrößerte Pflanzenorgane der Tetraploiden im Vergleich zu den Diploiden waren makroskopisch deutlich zu erkennen. Ein Größenunterschied von Blüten, Sprossspitzen und Laubblättern wird beispielhaft für die diploide Sorte 'Carmen' und den tetraploiden Genotyp '7705' gezeigt (Abb. 9).

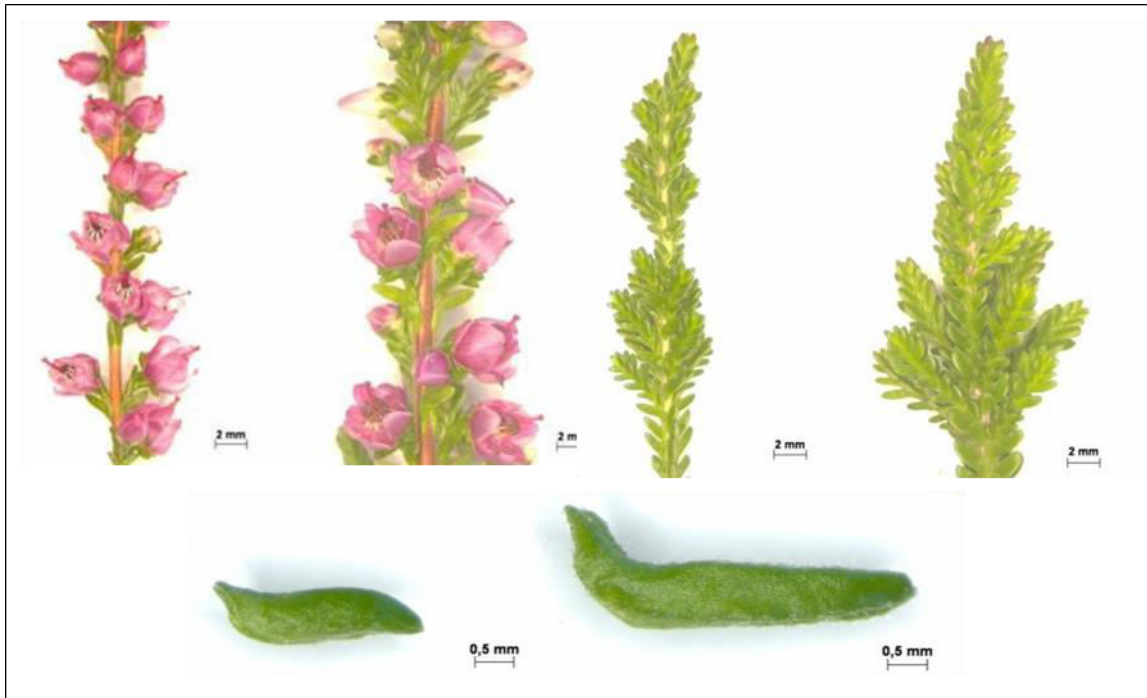


Abbildung 9: Blüten, Laubblatt und Sprossspitze der diploiden Sorte 'Carmen' (jeweils links) und des tetraploiden Genotyps '7705' (jeweils rechts).

3.1.2 Chromosomenzählung

Zur Validierung des Ploidiegrades der nachfolgenden routinemäßig durchgeführten durchflusscytometrischen Messungen wurde jeweils ein Genotyp pro Ploidiestufe exemplarisch durch Bestimmung der Chromosomenzahl analysiert. In mitoseaktiven Zellen der Wurzelspitzen wurden die Chromosomen des diploiden Genotyps 2005.49/52, des triploiden Genotyps 2008.177/66 und des tetraploiden Genotyps 2008.177/188 so sichtbar gemacht, dass sie am Mikroskop bei Anpassung der Fokussierung zu zählen waren. Auf der diploiden Stufe wurden $2n = 2x = 16$ Chromosomen, auf der triploiden Stufe $2n = 3x = 24$ Chromosomen und auf der tetraploiden Stufe $2n = 4x = 32$ Chromosomen nachgewiesen (Abb. 10). *C. vulgaris* hat eine Basis-Chromosomenzahl von $x = 8$.

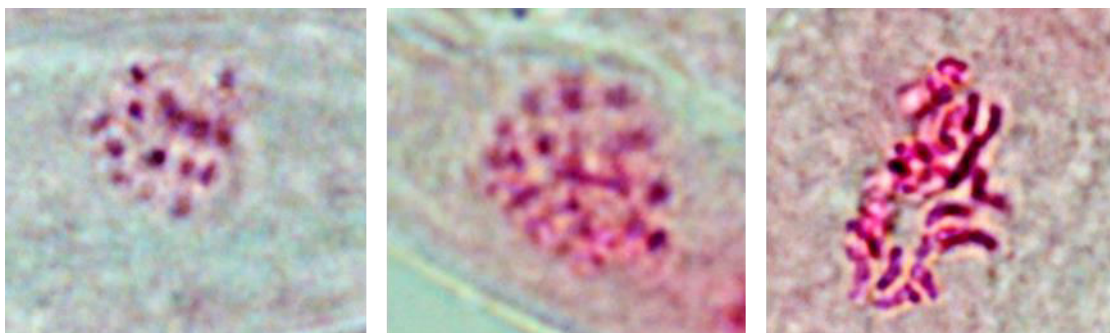


Abbildung 10: Sichtbarmachung der Chromosomen (1000-fache Vergrößerung) während der Mitose an Wurzelspitzen des diploiden Genotyps 2005.49/52 ($2n = 2x = 16$) links, des triploiden Genotyps 2008.177/66 ($2n = 3x = 24$) in der Mitte und des tetraploiden Genotyps 2008.177/32 ($2n = 4x = 32$) rechts. Die konkrete Zählung war nicht in der Aufnahme, sondern nur am Mikroskop bei Anpassung der Fokussierung möglich.

3.1.3 Optimierung der Durchflusszytometrie

Da der CV-Wert („coefficient of variation“) ein Indikator für die Histogrammqualität bei einer durchflusszytometrischen Messung (FCM) ist, wurden die CV-Werte in Abhängigkeit von den Fluoreszenzfarbstoffen 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Propidiumiodid (PI) sowie der Anzahl gemessener Zellkerne verglichen. Weil die DAPI-Messungen stets kleinere CV-Werte lieferten und die Zellkernfärbung in ihrer Handhabung einfacher ist als die Messung mit PI, wurden die Bestimmungen der DNA-Gehalte vorwiegend mit dem Fluorochrom DAPI durchgeführt. Mit Hilfe des UV-Lichts wurde die Fluoreszenzintensität (FE) gemessen, die sich aus dem DNA-Gehalt der Zelle ergibt. Die höchsten Histogrammqualitäten ergaben sich durch Messung von 5000 Zellkernen im Vergleich zu 1000, 3000 und 10.000 Zellkernen.

Da sekundäre Pflanzenstoffe wie Phenole, Chlorophyll und Anthocyane die Fluoreszenzmessung beeinträchtigen können, wurden im Rahmen der Methodenetablierung Pflanzenorgane einzelner diploider Genotypen von *C. vulgaris* mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI im Jahresverlauf charakterisiert. Die Messungen von jeweils 5000 Zellkernen erfolgten stets mit der Referenzpflanze *P. hybrida* für eine interne Standardisierung.

Im Mai und Juni wurden Sprossspitzen der sechs Genotypen 'Adrie', 'Alicia', F1(2), 'Melanie', 'Silver Knight' und 'Wickwar Flame' (Abb. 11) gemessen, im September zusätzlich Laub der Sorte 'Dark Beauty' und im Oktober Sprossspitzen der drei Sorten 'Adrie', 'Dark Beauty' und 'Silver Knight'. Die verwendeten Sorten unterschieden sich in ihrer Laubfärbung (Abb. 11).

Darüber hinaus wurden im Juni Wurzeln der sechs Genotypen 'Adrie', 'Alicia', F1(2), 'Melanie', 'Silver Knight' und 'Wickwar Flame' untersucht. Im September wurden Sepalen der sieben Genotypen 'Adrie', 'Alicia', F1(2), 'Melanie', 'Silver Knight', 'Wickwar Flame' und 'Dark Beauty' mittels FCM gemessen (Abb. 11) und im Oktober Sepalen der Sorten 'Adrie', 'Dark Beauty' und 'Silver Knight'.



Abbildung 11: Oben von links nach rechts: unterschiedliche Laubfarben von *C. vulgaris*: F1(2) (gelb), 'Wickwar Flame' (gelbgrün), 'Melanie' (hellgrün), 'Alicia' (mittelgrün), 'Adrie' (dunkelgrün), 'Silver Knight' (graugrün). Unten von links nach rechts: unterschiedliche Blütenfarben von *C. vulgaris*: F1(2), 'Wickwar Flame', 'Melanie', 'Alicia', 'Adrie', 'Silver Knight', 'Dark Beauty'.

Von Mai bis Oktober war die Fluoreszenzintensität von durchschnittlich 87 FE für die dunklen Laubfarben der Sorten 'Adrie' (dunkelgrün) und 'Silver Knight' (graugrün) geringer als für die Sorten mit den helleren Laubfarben von mittleren 89–104 FE.

Im Jahresverlauf waren Schwankungen in der Intensität der Fluoreszenzsignale durch die FCM-Messungen mit DAPI zu erkennen. Die Fluoreszenzintensität zeigte auch eine Abhängigkeit von gemessenem Pflanzenorgan.

Die Messung der farblosen Wurzeln ergab die stärkste Intensität des Fluoreszenzsignals DAPI im FCM von 103 FE (Abb. 12). Die Fluoreszenz für das Laub war geringer und nahm im Jahresverlauf ab, so erzielten die Messungen im Mai eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität von 99 FE, im Juni 97 FE, im September 97 FE und im Oktober 82 FE. Die Fluoreszenzintensität für die Sepalen war am geringsten im Vergleich zu Wurzeln und Laub. Bei FCM-Messungen des Pflanzenorgans Sepalum zeigte sich eine Verringerung der Fluoreszenzintensitäten von September auf Oktober mit 90 FE und 81 FE. Trotzdem wurde in jedem Monat aus diesen Daten dieselbe Ploidiestufe errechnet. Das Verhältnis der Peakpositionen von *Calluna* und *Petunia* blieb immer konstant bei durchschnittlich 0,37.

Im Oktober wurden darüber hinaus einzelne Messungen durchgeführt, bei denen sich entweder *Calluna* oder *Petunia* in der Probe befand (Abb. 13). Bei den Mischproben, bei denen *Calluna* und *Petunia* gleichzeitig gemessen wurden, waren die Fluoreszenzintensitäten für die *Calluna*-DNA geringer (Laub: 82 FE, Sepalen: 81 FE) als für die *Calluna*-DNA bei den Einzelmessungen (Laub: 94 FE, Sepalen: 84 FE). Wurde *Petunia* mit den Sepalen von *C. vulgaris* gemessen, ergab sich eine geringere Fluoreszenzintensität von 207 FE als bei der Messung mit *C. vulgaris*-Laub bzw. bei der Einzelmessung von jeweils 213 FE.

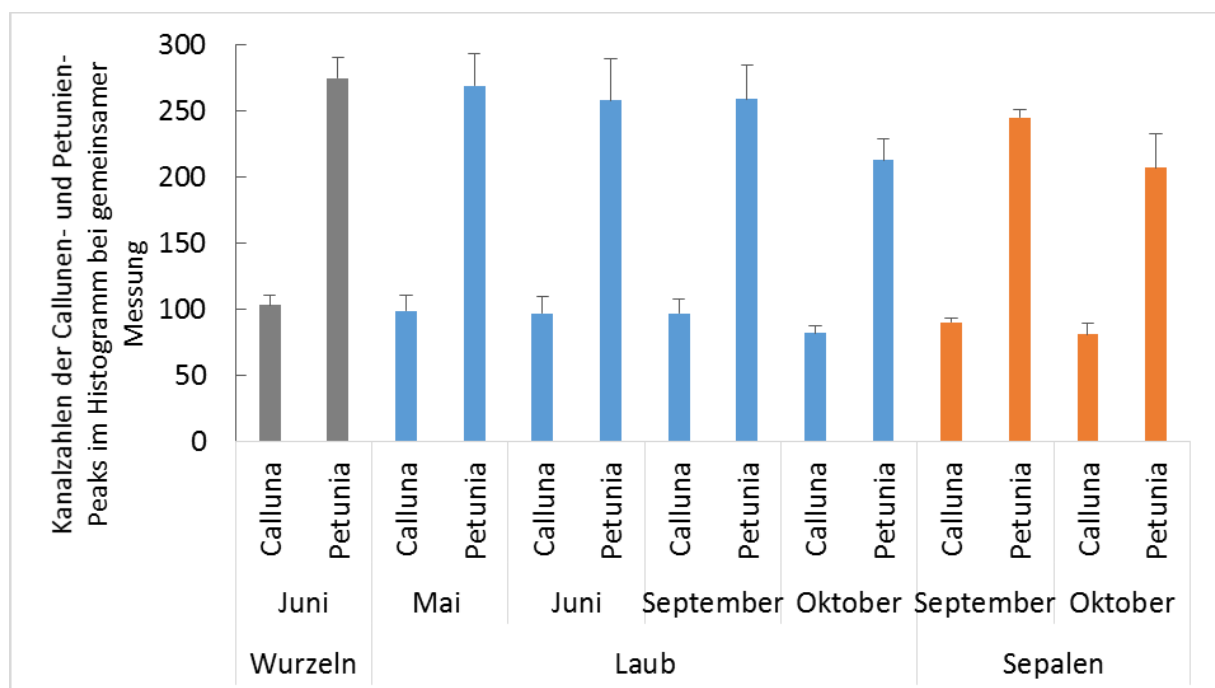


Abbildung 12: Mittelwerte der Intensität der Fluoreszenzsignale [FE] der FCM-Messungen mit DAPI bei den einzelnen Genotypen von *C. vulgaris*. Jeweils drei Messungen pro Genotyp (Ausnahme Oktober: zwei Messungen pro Genotyp), Zeitpunkt und Pflanzenorgan. Interne Standardisierung mit *P. hybrida*. Jeweils Messung von 5000 Zellkernen.

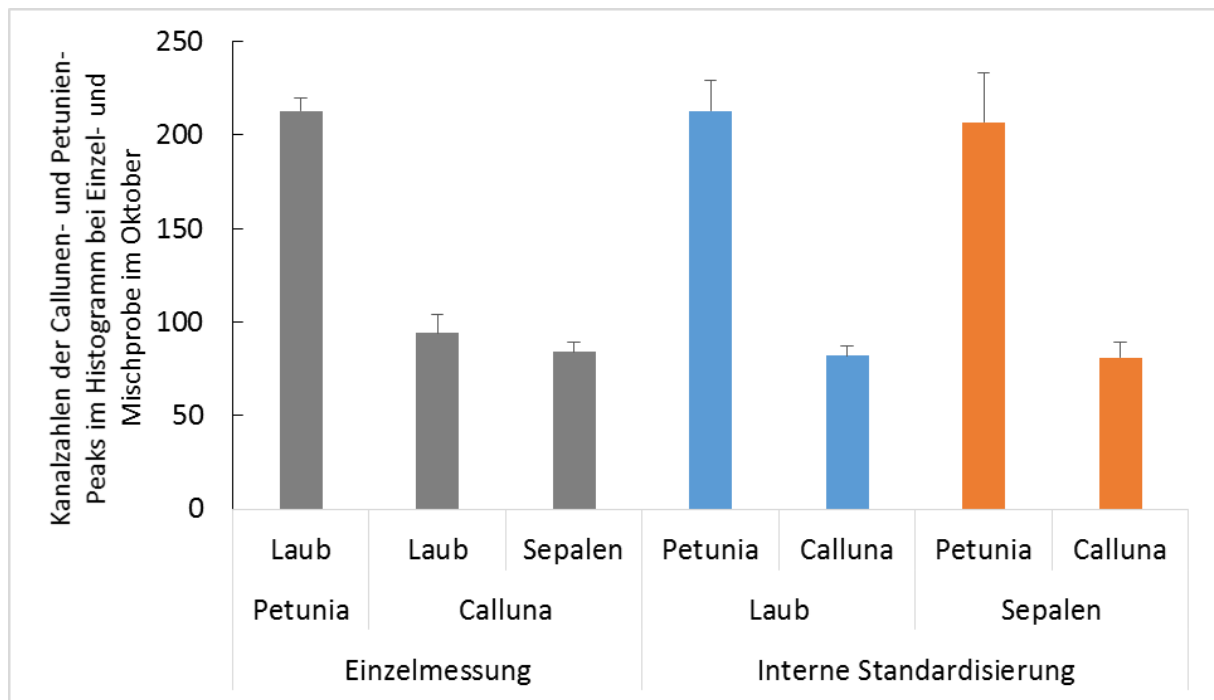


Abbildung 13: Fluoreszenzsignale [FE] im Durchflusscytometer (DAPI-Färbung für Laub und Sepalen) der Sorten 'Adrie', 'Dark Beauty' und 'Silver Knight' mit und ohne Standard *Petunia*-Laub in der Probe. Jeweils zwei Messungen pro Sorte und Pflanzenorgan (n = 6). Messung von jeweils 5000 Zellkernen.

3.2 Etablierung von SSR-Markern

Um Sorten molekular sicher identifizieren und die Abstammung Polyploider analysieren zu können, wurden SSR-Marker für *C. vulgaris* etabliert. Da durch somatische Polyploidisierung entstandene Polyploide abgeleitete Sorten darstellen, war die Entwicklung eines verbesserten Systems zur Genotypenidentifikation wünschenswert.

3.2.1 Suche nach SSR-Sequenzen in einer Blüten-EST-Datenbank von *Calluna vulgaris*

Für die Etablierung von SSR-Markern für *C. vulgaris* stand eine Sequenzdatenbank der Blütenexpressionsdaten von *C. vulgaris* (NCBI, Accession Number: GBSW00000000, Rohdaten NCBI Gene Expression Omnibus, Accession Number GSE60105) zur Verfügung. In dieser EST-Datenbank („Expressed Sequence Tags“; exprimierte Sequenzabschnitte) wurden bei der Suche nach repetitiven Sequenzen Di-, Tri-, Tetra- und Pentanukleotide gefunden (Tab. 17).

Tabelle 17: Repetitive Sequenzen, die durch das Programm *MicrofinderLITE* (Microsatellite finder in 454 data, Dice Holdings, Inc.) in der Sequenzdatenbank von *C. vulgaris* (Blütenexpressionsdaten) gefunden wurden. Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C).

Länge des SSR-Motivs	SSR-Motiv mit Wiederholungszahl
Dinukleotide	(AG) ₁₅ , (AG) ₁₇ , (AG) ₁₈ , (AG) ₁₉ , (AG) ₄₉ (CA) ₁₅ ; (CT) ₁₇ , (CT) ₂₀ ; (GA) ₁₅ , (GA) ₁₆ , (GA) ₁₇ (GT) ₁₅ , (GT) ₁₆ ; (TC) ₁₈ , (TC) ₁₉ , (TC) ₂₆
Trinukleotide	(ACA) ₂₃ ; (ACG) ₁₈ ; (ATT) ₁₅ ; (CAA) ₁₆
Tetranukleotide	(TACG) ₂₃
Pentanukleotide	(TACCG) ₁₆

Auf Basis der spezifischen EST-Sequenz der an die SSR angrenzenden Bereiche konnten 17 Primersequenzen (Tab. 49 im Anhang) erstellt werden, welche mittels PCR getestet und auf Agarosegel aufgetragen wurden. Elf EST-SSR-Marker ergaben Amplifikationsprodukte für die getesteten Genotypen 'Athene', 'Venetia' und 'San Remo' (Tab. 18).

Tabelle 18: Die flankierenden Sequenzen der 17 dargestellten EST-SSR-Motive (Dinukleotide) konnten als Primersequenzen verwendet werden. Die elf fett markierten EST-SSR-Marker ergaben Amplifikationsprodukte auf Agarosegel.

EST-SSR-Marker mit jeweiligem Sequenz-Motiv		
Cv1 (AG) ₁₉	Cv2 (AG)₁₇	Cv3 (AG)₁₇
Cv5 (AG)₁₅	Cv6 (GA)₁₅	Cv7 (GA)₁₆
Cv9 (GA)₁₆	Cv11 (GA)₁₆	Cv18 (GA)₁₄
Cv22 (GA)₁₅	Cv23 (GT) ₁₆	Cv24 (GT) ₁₅
Cv25 (GT) ₁₅	Cv26 (GT) ₁₅	Cv27 (AG)₁₅
Cv28 (AG) ₁₅	Cv29 (AG)₁₅	–

Die elf EST-SSR-Marker wurden mittels M13-Tail auf Polyacrylamidgelen für die heterogene Testpopulation der zwölf Genotypen 'Maria', F1(2), 'Boskoop', 'Perestrojka', 'Venetia', 'Wink 2-2006', 'Multicolor', 'Johnson's Variety', 'Hammondii', 'San Remo', 'Löhnstein' und 'Russland' geprüft. DNA-Fragmente konnten durch Anwendung von zwei der elf potentiellen SSR-Marker amplifiziert werden, durch die anderen neun Marker nicht. Der SSR-Marker Cv22 ergab einen Monomorphismus von 330 bp (Basenpaare) und der SSR-Marker Cv29 einen Monomorphismus von 120 bp.

Um die zwei Marker auf Polymorphie hin zu untersuchen, wurden sie anhand von direkt fluoreszenzmarkierten Primern im Genotypen-Pool des diploiden Sortenspektrums der SSR-Charakterisierungspopulation von 40 Genotypen (Tab. 19) auf Variabilität gescreent. Anhand von 40 Genotypen wurden auch sieben SSR-Marker der nah verwandten Pflanzenart *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* charakterisiert (Naito et al. 1998). Für die Charakterisierung der SSR-Marker von *R. delavayi* wurden 42 Genotypen verwendet (Wang et al. 2010). Auf der Grundlage dieser zwei Publikationen wurde sich in der vorliegenden Arbeit für eine Charakterisierungspopulation von 40 Genotypen entschieden.

Die Anwendung des SSR-Markers Cv22 resultierte in schwachen monomorphen Banden. Der SSR-Marker Cv29 ergab zehn Allele im Bereich von 63 bp bis 125 bp, daher konnte er in die Charakterisierung und spätere Anwendung integriert werden.

Tabelle 19: Diploide SSR-Charakterisierungspopulation von 40 Genotypen, die genetisch, züchterisch und geographisch möglichst heterogen ist. Schwarz: Genotyp F1(2) und fünf Genotypen der Population 2005.49. Blau: 26 Sorten aus dem Handel. Blau und fett: zwölf nachweislich durch Kreuzungen entstandene Sorten. Rot: acht gesammelte Wildformen.

SSR- Charakterisierungspopulation von 40 Genotypen			
F1 (2)	'Boskoop'	'Mariella'	'Wink 2-2006'
2005.49/18	'Dark Beauty'	'Multicolor'	'Wink 3-2006'
2005.49/23	'David Eason'	'Perestrojka'	'Dun Carloway'
2005.49/24	'Findling'	'Radnor'	'Kvan Helga'
2005.49/28	'Ginkels Glorie'	'Roter Oktober'	'Löhnstein'
2005.49/32	'Hammondii'	'Sandhammeren'	'Niederohé'
'Adrie'	'Johnsons Variety'	'Silver Knight'	'Ruhla'
'Alicia'	'Long White'	'Underwoodii'	'Russland'
'Athene'	'Madonna'	'Venetia'	'San Remo'
'Beauty Lady'	'Maria'	'Wickwar Flame'	'Tasmanien'

3.2.2 Übertragbarkeit von SSR-Markern innerhalb der Pflanzenfamilie Ericaceae

Da auf der Grundlage der EST-Datenbank von *C. vulgaris* nur ein SSR-Marker etabliert werden konnte, wurden 103 publizierte SSR-Marker aus den Genomen nah verwandter Arten (Ericaceae) für die drei Genotypen 'Athene', 'Venetia' und 'San Remo' auf Agarosegelen getestet und 25 dieser Marker ergaben Amplifikationsprodukte. Mit Hilfe des Primerpaares GA758 aus *Rhododendron* (Dunemann et al. 1999) wurde ein PCR-Produkt von 220 bp für den Genotyp 'San Remo' erzeugt. Auf der Basis von SSR-Sequenzen aus *Diplarche multiflora* (NCBI: Zhang et al. 2009, unpubl. & Zhang et al. 2013) wurden mit 17 Primerkombinationen amplifizierte Fragmente produziert. Die SSR-Marker Ecoc108, Ecoc117, Ecoc142, Ecoc431 und Ecoc446 aus *Erica coccinea* (Segarra-Moragues et al. 2009) resultierten in Amplifikaten von 50 bp bis 200 bp. Durch die SSR-Marker Mg59 und Mg214 aus *Menziesia goyozanensis* (Abe et al. 2011) wurden Amplifikate von 100 bp bis 200 bp erzeugt.

Für die zwölf Genotypen der Testpopulation ('Maria', F1(2), 'Boskoop', 'Perestrojka', 'Venetia', 'Wink 2-2006', 'Multicolor', 'Johnson's Variety', 'Hammondii', 'San Remo', 'Löhnstein', 'Russland') ergaben 23 der 25 mittels M13-Tail auf Polyacrylamidgelen getesteten genomischen SSR-Marker amplifizierte Produkte (Tab. 20). Davon waren 15 SSRs polymorph und acht SSRs monomorph.

Tabelle 20: 23 publizierte genomische SSR-Marker, durch deren Anwendung bei Testpopulation von zwölf Genotypen von *C. vulgaris* auf einem Polyacrylamidgel mittels M13-Tail amplifizierte Fragmente erzeugt werden konnten.

SSR-Marker	polymorph	SSR-Motiv	monomorph	SSR-Motiv
<i>E. coccinea</i>	Ecoc 108	(CT) ₆ T(CT) ₄		
	Ecoc 117	(GA) ₅ G(GA) ₅		
	Ecoc 142	(GA) ₁₆		
	Ecoc 431	(CT) ₁₄		
	Ecoc 446	(GA) ₁₀ TA(GA) ₂ (GT) ₁₁		
<i>D. multiflora</i>	Dm 4	(TC) ₉	Dm 5	(CT) ₁₃
	Dm 9	(TC) ₁₆	DA 13	(TC) ₈
	DA 6	(TC) ₁₃	DC 36	(AC) ₅
	DC 17	(AC) ₅	DC 114	(AC) ₆
	DC 109	(TC) ₇ (CA) ₇	DG 70	(AG) ₆
	DG 2	(TC) ₆	DG 98	(TC) ₁₁
	DG 71	(TC) ₁₉		
	DG 97	(TC) ₈		
	DG 105	(TG) ₆		
	DG 116	(TC) ₁₆		
<i>M. goyozanensis</i>			Mg 59	(TC) ₅ CC(TC) ₁₄ C(TC)
			Mg 214	(GA) ₆ G(GA) ₁₃

Bei dem darauffolgenden Test auf Polymorphie ergaben insgesamt zehn genomische SSR-Marker mittels direkt fluoreszenzmarkierten Primern reproduzierbare polymorphe Amplifikate für die SSR-Charakterisierungspopulation (Kap. 3.2.1, Tab. 19) von *C. vulgaris* (Tab. 21). Die sieben Marker DA6, DC109, DC114, DG2, DG70, DG71 und DG105 stammten aus dem Genom von *D. multiflora* (Zhang et al. 2013), die zwei Marker Ecoc108 und Ecoc142 von *E. coccinea* (Segarra-Moragues et al. 2009) und der Marker Mg59 von *M. goyozanensis* (Abe et al. 2011).

Tabelle 21: Zehn publizierte genomische SSR-Marker naher Verwandter innerhalb der Ericaceae, die für *C. vulgaris* etabliert werden konnten. *E. coccinea* (Segarra-Moragues et al. 2009); *D. multiflora* (Zhang et al. 2013); *M. goyozanensis* (Abe et al. 2011).

Pflanzenart	SSR-Marker	SSR-Motiv
<i>Erica coccinea</i>	Ecoc108	(CT) ₆ T(CT) ₄
	Ecoc142	(GA) ₁₆
<i>Diplarche multiflora</i>	DA6	(TC) ₁₃
	DC109	(TC) ₇ (CA) ₇
	DC114	(AC) ₆
	DG2	(TC) ₆
	DG70	(AG) ₆
	DG71	(TC) ₁₉
	DG105	(TG) ₆
<i>Menziesia goyozanensis</i>	DG97	(TC) ₈
	DG105	(TG) ₆
	DG116	(TC) ₁₆
	Mg59	(TC) ₅ CC(TC) ₁₄ C(TC)

Mit phylogenetisch zunehmender Entfernung (Gillespie & Kron 2010) waren prozentual weniger publizierte SSR-Marker auf *C. vulgaris* übertragbar (Tab. 22). Die Besenheide *C. vulgaris* gehört wie *E. coccinea* zur Tribus der Ericaceae (Gillespie & Kron 2010).

Tabelle 22: Phylogenetische Einordnung der Pflanzenarten (Gillespie & Kron 2010), von denen die getesteten publizierten SSR-Marker stammten. Einordnung innerhalb der Pflanzenfamilie Ericaceae und die prozentuale Übertragbarkeit der polymorphen SSR-Marker auf *C. vulgaris*.

Unterfamilie	Tribus	Spezies	Anzahl Primer	polymorph	kein Produkt	PCR-Produkt
Ericoideae	Ericaceae	<i>E. coccinea</i>	8	2	6	25 %
Ericoideae	Empetreae	<i>D. multiflora</i>	36	7	29	19 %
Ericoideae	Rhodoreae	<i>M. goyozanensis</i>	16	1	15	6 %
Ericoideae	Rhodoreae	<i>Rhododendron</i>	20	–	20	0 %
Vaccinioideae	Vaccinieae	<i>V. corymbosum</i>	23	–	23	0 %
		Summe	103	10	93	
		Prozent	100 %	10 %	90 %	

3.2.3 Charakterisierung von elf ausgewählten SSR-Markern

Die insgesamt elf etablierten polymorphen SSR-Marker wurden mit Hilfe der SSR-Charakterisierungspopulation (Kap. 3.2.1, Tab. 19) beschrieben. Bei den Loci DC109 und DC114 war die gefundene Amplifikatgröße deutlich kleiner als die erwartete, bei den anderen neun Loci entsprachen sich erwartete und gefundene Produktgröße (Tab. 23). Die elf SSR-Marker zeigten insgesamt 87 Allele und wiesen durchschnittlich acht Allele pro Locus auf. Der Locus DG105 zeigte die geringste Anzahl an Allelen ($N_a = 4$), die Loci DG2, DG71 und Ecoc108 die höchste ($N_a = 11$, Tab. 23). Die beobachtete Heterozygotie (H_o), welche sich aus dem Anteil Heterozygoter in der SSR-Charakterisierungspopulation ergibt, bewegte sich zwischen 35 % und 90 % und betrug im Durchschnitt 62 % (Tab. 23). Der Heterozygotiegrad gibt einen Hinweis auf die genetische Variabilität. Die erwartete Heterozygotie (H_e) ergibt sich aus der Summe der quadrierten Allelfrequenzen subtrahiert von 1 ($1 - [p_i^2 + p_j^2 + \dots]$).

Tabelle 23: Charakterisierung der polymorphen SSR-Marker anhand von 40 Genotypen der SSR-Charakterisierungspopulation. SSR-Marker, putatives SSR-Motiv, erwartete Produktgröße, gefundene Produktgröße, N_a (Allel-Anzahl), H_o (beobachtete Heterozygotie), H_e (erwartete Heterozygotie).

SSR-Marker	Putatives SSR-Motiv	Erwartete Größe [bp]	Gefundene Größe [bp]	N_a	H_o	H_e
Cv29	(AG) ₁₅	110	63–125	10	0,450	0,865
DA6	(TC) ₁₃	154	122–174	7	0,575	0,508
DC109	(TC) ₇ (CA) ₇	148	238–259	7	0,350	0,351
DC114	(AC) ₆	179	236–260	5	0,870	0,623
DG2	(TC) ₆	109	106–136	11	0,425	0,480
DG70	(AG) ₆	121	122–144	6	0,500	0,604
DG71	(TC) ₁₉	243–251	205–243	11	0,625	0,795
DG105	(TG) ₆	171	162–198	4	0,700	0,581
Ecoc108	(CT) ₆ T(CT) ₄	157–175	161–191	11	0,875	0,893
Ecoc142	(GA) ₁₆	223–267	206–238	10	0,550	0,759
Mg59	(TC) ₅ CC(TC) ₁₄ C(TC)	134	108–126	5	0,900	0,723

Tab. 24 zeigt die Frequenz des am häufigsten vorkommenden Allels jeweils für die einzelnen SSR-Loci in den 40 Genotypen. Die höchsten Allelfrequenzen von SSR-Marker Cv29 (20 %) und Ecoc108 (15 %) waren im Vergleich zu den Frequenzen der anderen neun SSR-Marker (36 % – 80 %) deutlich geringer. Die Werte vermitteln eine Vorstellung, inwieweit mit einem einzelnen SSR-Marker Genotypen differenziert werden können (Ibañez & Eeuwijk 2003). Unter dieser Annahme eignen sich die SSR-Loci Cv29 und Ecoc108 am besten für eine molekulare Differenzierung der Genotypen.

Tabelle 24: Höchste Allelfrequenz für die elf charakterisierten SSR-Marker in 40 Genotypen. Die fett markierten Frequenzen der Marker Cv29 und Ecoc108 lagen deutlich unter den Frequenzen der neun anderen Marker.

Frequenz des am häufigsten vorkommenden Allels für die etablierten SSR-Marker										
Cv29	DA6	DC109	DC114	DG2	DG70	DG71	DG105	Ecoc108	Eco142	Mg59
0,200	0,675	0,800	0,500	0,713	0,588	0,363	0,575	0,150	0,375	0,363

Im Zusammenhang mit den Allelfrequenzen steht die Allelverteilung im genetischen Pool. Eine besonders gleichmäßige Verteilung der Allele im Genpool von *C. vulgaris* zeigten die SSR-Loci Cv29 (Abb. 14A) und Ecoc108 (Abb. 14I).

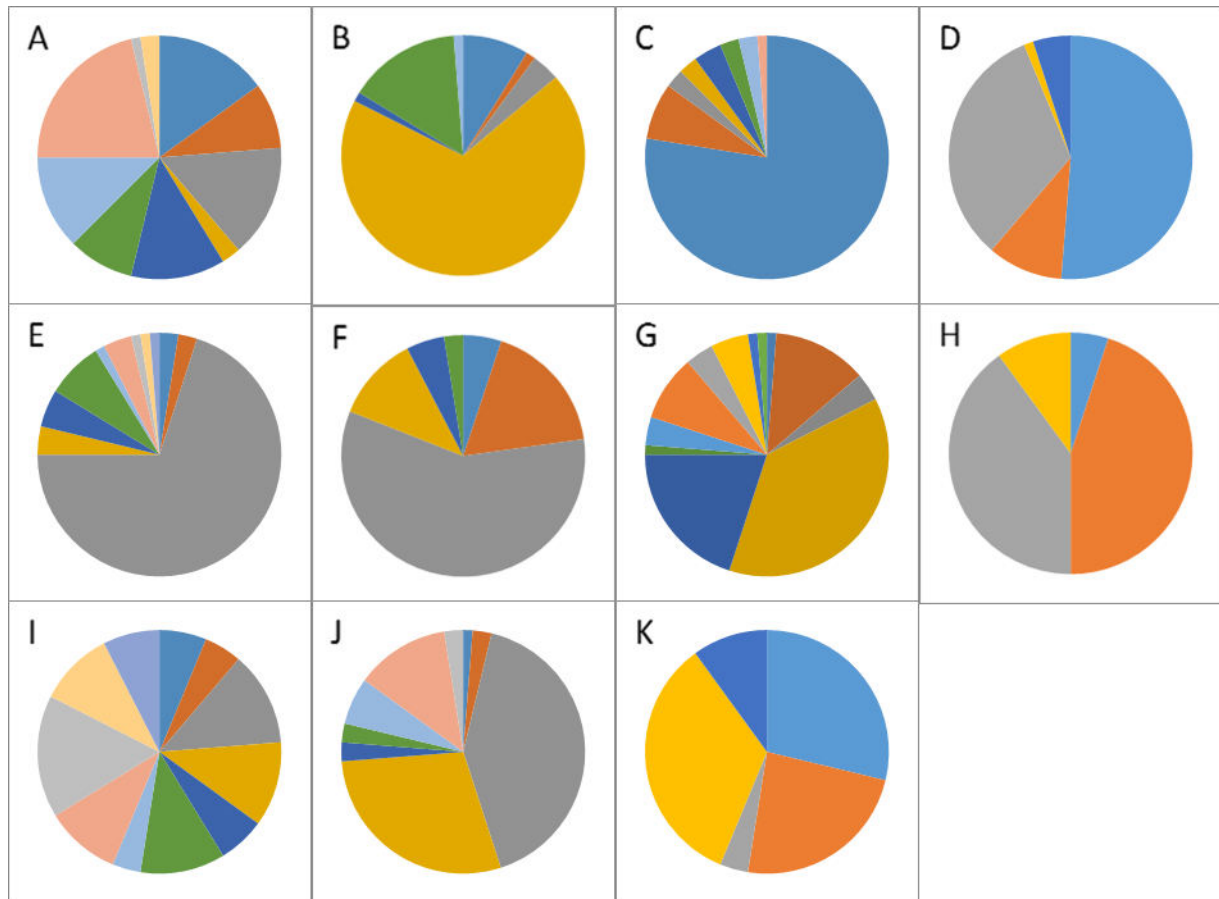


Abbildung 14: Allelfrequenzen der elf SSR-Marker in den 40 Genotypen der Charakterisierungspopulation. Die verschiedenen Allele sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. (A) Cv29, (B) DA6, (C) DC109, (D) DC114, (E) DG2, (F) DG70, (G) DG71, (H) DG105, (I) Ecoc108, (J) Ecoc142 und (K) Mg 59.

Bei EST-SSR-Marker Cv29, der auf der Grundlage von *C. vulgaris*-EST-Sequenzen erstellt wurde, ist von dem Sequenz-Motiv (AG) auszugehen, da die SSR-Sequenzen aus der EST-Datenbank bekannt waren und mit den flankierenden Bereichen Primer erstellt wurden. Darüber hinaus konnte die Übereinstimmung des SSR-Motivs $(TC)_5CC(TC)_{14}C(TC)$ des genomischen SSR-Markers Mg59 der Pflanzenart *M. goyozanensis* bestätigt werden. Die Motiv-Übereinstimmung der weiteren gattungsübergreifend etablierten genomischen SSR-Marker mit *C. vulgaris*-SSR wurde nicht geprüft.

Die 40 Genotypen der Charakterisierungspopulation wurden in vier verschiedene Subpopulationen eingeteilt, um die Anwendbarkeit der SSR-Marker zu prüfen (Kap. 3.2.1, Tab. 19): Genotypen ohne F1(2) und ohne Nachkommenschaft aus der Kreuzung 'Maria' × F1(2) (Population 2005.49) (n = 34), Sorten im Handel (n = 26), nachweislich durch Kreuzungen entstandene Sorten (n = 12) und gesammelte Wildformen (n = 8).

Anhand dieser vier Subpopulationen wurden die ermittelte Allelzahl sowie die beobachtete und erwartete Heterozygotie durch die elf SSR-Marker verglichen (Tab. 25; Werte für die einzelnen SSR-Marker siehe Tab. 50 im Anhang). Die Anzahl der Allele ist in Wildformen größer ($N_a = 6$) als in den nachweislich durch Kreuzungen entstandenen Sorten ($N_a = 4$). Die zwei Subpopulationen mit deutlich mehr Genotypen ($n = 34$, $n = 26$) wiesen eine höhere Allelzahl von $N_a = 8$ bzw. $N_a = 7$ auf. Die beobachtete Heterozygotie ist in den Wildformen höher ($H_o = 71,6\%$) als in den drei anderen Subpopulationen ($H_o = 51,5\text{--}63,9\%$) (Tab. 25) und liegt in allen vier Subpopulationen geringfügig unter der erwarteten.

Tabelle 25: Allelzahl (N_a), beobachtete Heterozygotie (H_o) und erwartete Heterozygotie (H_E) von vier Subpopulationen der SSR-Charakterisierungspopulation: (1) der Genotypen ohne F1(2) und ohne Nachkommenschaft (NKS) aus der Kreuzung 'Maria' x F1(2) (Population 2005.49), (2) Sorten im Handel, (3) Gezüchtete Sorten (nachweislich durch Kreuzungen entstandene Sorten), (4) gesammelte Wildformen; s: Standardabweichung.

(1) Genotypen ohne F1(2) und NKS; n = 34			(2) Sorten im Handel; n = 26		
N_a	H_o	H_E	N_a	H_o	H_E
8	0,639	0,676	7	0,615	0,646
s = 2,737	s = 0,197	s = 0,154	s = 2,119	s = 0,217	s = 0,179
(3) Gezüchtete Sorten; n = 12			(4) Gesammelte Wildformen; n = 8		
N_a	H_o	H_E	N_a	H_o	H_E
4	0,515	0,560	6	0,716	0,750
s = 1,954	s = 0,302	s = 0,247	s = 1,433	s = 0,217	s = 0,117

3.3 Erstellung polyploider Pflanzen durch Mitosehemmung *in vitro*

3.3.1 Induktion von Polyloidie an keimendem Saatgut

Da die Polyploidisierung eine Möglichkeit zur Neuheitenzüchtung ist, wurden Methoden zur erfolgreichen somatischen Polyploidisierung von *C. vulgaris* geprüft. Hierzu wurde Pflanzenmaterial mit Chemikalien behandelt, welche die Zellteilung stören. In mehrfaktoriellen *in vitro*-Versuchen wurden Saatgut, Keimlinge und Sprossspitzen mit den Mitosehemmern Colchizin, Trifluralin, Oryzalin und Amiprofos-methyl (APM) behandelt. Der Einfluss von Mitosehemmer-Konzentration, Behandlungsdauer und Behandlungsart wurde geprüft, um die optimale Kombination der Faktoren zur Erzeugung einer hohen Anzahl stabiler polyploider Pflanzen herauszuarbeiten.

In einem ersten Versuch (**A1**) wurde Saatgut mit Colchizin behandelt. Saatgut inkubierte 6 h, 24 h und 48 h in Flüssigmedium mit Colchizin-Konzentrationen von 0 μM , 100 μM , 300 μM , 1000 μM und 3000 μM . Dabei entstanden aus insgesamt 1500 behandelten Samen (15 Varianten à 100 Samen) neben diploiden Sämlingen drei mixoploide Pflanzen (Tab. 26). Eine mixoploide Pflanze (Abb. 15) wurde nach einer 48-stündigen Behandlung (1000 μM Colchizin) gewonnen. Die anderen zwei mixoploiden Pflanzen entstanden nach 24-stündiger Behandlung (3000 μM Colchizin). Die Mixoploiden waren kleiner als die gleich alten Diploiden und wuchsen langsamer (Abb. 15). Bei einer Einwirkdauer von 6 h traten keine Ploidievarianten auf. Der Nachweis von Mixoploidie im FCM-Histogramm erfolgte

durch einen zweiten Peak an tetraploider Position, welcher auf der y-Achse mindestens halb so viele gemessene Zellkerne wie der diploide Peak aufwies.



Abbildung 15: Pflanzen aus dem ersten Colchizin-Versuch (A1). Links: mixoploid (1000 µM, 48 h); Mitte: mixoploid (3000 µM, 24 h); rechts: Vergleich einer diploiden und einer mixoploiden Pflanze gleichen Alters (sechs Monate) aus *in vitro*-Kultur.

Im zweiten Versuch (A2) wurden Keimlinge mit 0 µM, 1000 µM, 3000 µM Colchizin betroffen (drei Versuchsvarianten à 300 Samen, drei Replikate). Pro Versuchsvariante wurden auf dreimal 100 Samen (100 Samen pro Petrischale) jeweils 2 µl Mitosehemmer-Lösung appliziert. Die Wirksamkeit des Mitosehemmers ist mit der Keimrate negativ assoziiert, daher wurde diese ebenfalls geprüft (Abb. 16). Mit zunehmender Colchizin-Konzentration nahm die Keimrate ab, es konnten allerdings keine Polyploiden erzeugt werden. Die Daten des Prüfmerkmals Keimrate unterschieden sich nach Behandlung des Saatguts mit unterschiedlichen Colchizin-Konzentrationen nicht signifikant voneinander.

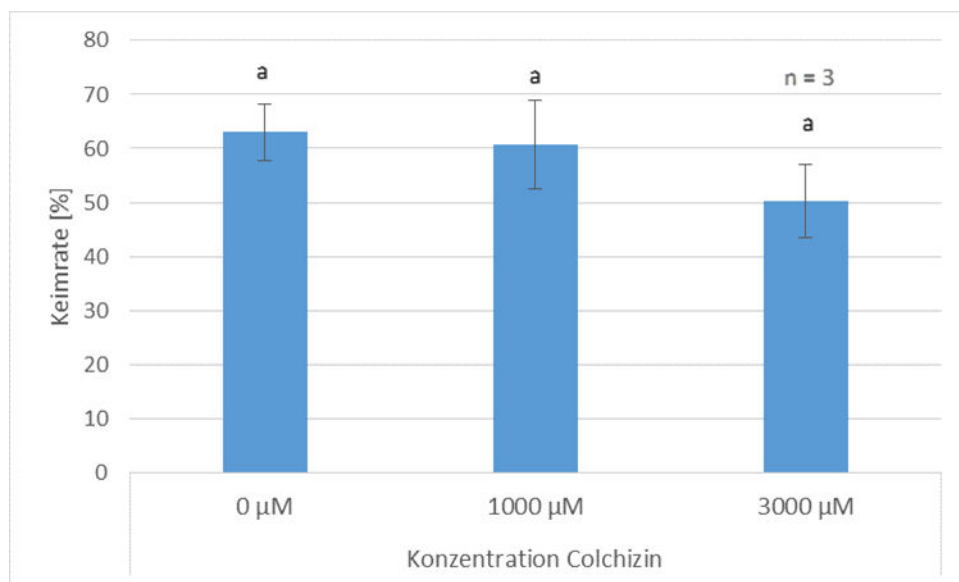


Abbildung 16: Tägliche Tropfenbehandlung (Dauer: 9 d) von Saatgut mit Colchizin ab dem Zeitpunkt der Entwicklung der Keimwurzel (Versuch A2) (drei Versuchsvarianten à 300 Samen, drei Replikate). Daraufhin wachsende Keimlinge wurden acht Wochen lang auf Filterpapiere umgesetzt. Mit zunehmender Colchizin-Konzentration nahm die Keimrate ab. Einfaktorielle Varianzanalyse; F-Wert = 2,91, p = 0,13. Buchstabe a: keine signifikanten Unterschiede zwischen den Daten.

Im dritten Versuch (**A3**) wurde Saatgut erst mit Colchizin (0 μM , 1000 μM , 3000 μM ; 48 h Einwirkdauer) behandelt, nachdem es 24 h oder 48 h in Flüssigmedium gequollen war (sechs Versuchsvarianten à 300 Samen, drei Replikate). Das Saatgut zeigte nach 24 h Vorquellung folgende Keimraten: 0 μM = 50 %; 1000 μM = 43,33 %; 3000 μM = 53,5 % (Abb. 17). Nach 48 h Vorquellung wurden folgende Keimraten beobachtet: 0 μM = 57,67 %; 1000 μM = 50 %; 3000 μM = 46 %. Bei der längeren Vorquellzeit von 48 h war eine Korrelation zwischen zunehmender Colchizin-Konzentration und sinkender Keimrate erkennbar, was auf eine Wirkung des Mitosehemmers hindeutet.

Mit den Prüffaktoren Colchizin-Konzentration und Vorquellung unterscheiden sich die Daten der Keimraten nicht signifikant voneinander. Es konnten keine Polyploiden erzeugt werden.

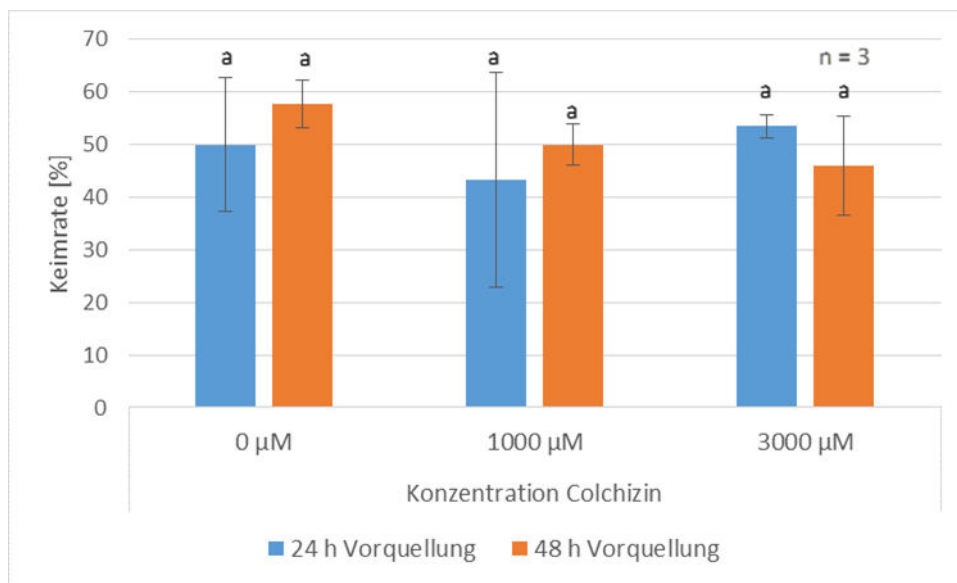


Abbildung 17: Behandlung von Saatgut 48 h mit Colchizin nach 24 h bzw. 48 h Vorquellung (Versuch A3) (sechs Versuchsvarianten à 300 Samen, drei Replikate). Keimrate des Saatguts acht Wochen nach Behandlung in Abhängigkeit von zwei unterschiedlichen Vorquellzeiten und zunehmender Colchizin-Konzentration. Zweifaktorielle Varianzanalyse; F-Wert = 0,71, p = 0,51. Buchstabe a: keine signifikanten Unterschiede zwischen den Daten.

Nach den Versuchen mit Colchizin wurde die Induktion von Polyloidie mit Hilfe der Herbizide APM, Oryzalin und Trifluralin getestet (Bachelorarbeit von Andreas Liehr, 2012, Universität Jena).

In Versuch (**B1**) inkubierte das Saatgut nach 0 h oder 24 h Vorquellung für 24 h oder 48 h in Flüssigmedium mit den Konzentrationen 0 μM , 30 μM , 100 μM und 300 μM der drei Chemikalien (48 Versuchsvarianten à 100 Samen). Ohne Vorquellung und bei einer Inkubation von 24 h in 300 μM Trifluralin konnte eine mixoploide Pflanze (Polyplodisierungsrate: 4 %) erzeugt werden (Tab. 26). Die Polyplodisierungsrate wurde anhand der Anzahl der überlebenden Jungpflanzen bestimmt.

In Versuch (**B2**) wurden Keimlinge mit APM, Oryzalin und Trifluralin (0 μM , 30 μM , 100 μM und 300 μM) achtmal betropft (zwölf Versuchsvarianten à 200 Samen, zwei Replikate). Durch die Tropfenbehandlung konnte mit Hilfe von 100 μM Oryzalin eine mixoploide Pflanze (Polyplodisierungsrate: 10 %) generiert werden (Tab. 26).

Im dritten Versuch (**B3**) wurde Saatgut auf Festmedium zum Keimen gebracht, das die Mitosehemmer APM, Oryzalin und Trifluralin (0 µM, 30 µM, 100 µM und 300 µM) enthielt (zwölf Versuchsvarianten à 200 Samen, zwei Replikate). Mit 30 µM Trifluralin entstand eine mixoploide Pflanze (Polyploidisierungsrate: 3 %), mit 100 µM Trifluralin waren es sechs (46 %, Tab. 26).

Tabelle 26: Test der Mitosehemmer, mit denen an keimendem Saatgut Polyploidie induziert werden konnte. Pro Versuchsvariante und Wiederholung wurden 100 Samen behandelt.

Behandlungsart	Mitosehemmer	Anzahl Mixoploider	Polyploidisierung
Colchizin			
A1: Saatgut; Flüssigmedium (ohne Vorquellung) (n = 1)	1000 µM, 48 h	1	2 %
	3000 µM, 24 h	2	4 %
Oryzalin			
B2: Tropfenbehandlung (n = 2)	100 µM	1	10 %
Trifluralin			
B1: Saatgut; Flüssigmedium (ohne Vorquellung) (n = 1)	300 µM, 24 h	1	4 %
B3: Saatgut; Festmedium (n = 2)	30 µM	1	3 %
	100 µM	6	46 %

Colchizin und Trifluralin erwiesen sich als geeignet. Daher wurden mit diesen beiden Chemikalien zwei weitere Versuche durchgeführt, bei denen sie in höheren Konzentrationen eingesetzt wurden.

Im ersten Versuch (**C1**) wurde das Saatgut auf Festmedium mit Colchizin (0 µM, 30 µM, 100 µM, 300 µM) und Trifluralin (0 µM, 30 µM, 60 µM, 100 µM) zum Keimen gebracht (acht Versuchsvarianten à 90 Samen, drei Replikate). Mit 300 µM Colchizin wurde eine Polyploidisierungsrate von 9 % erzielt (Tab. 27).

Im zweiten Versuch (**C2**) inkubierte Saatgut 48 h in Flüssigmedium mit den Chemikalien in folgenden Konzentrationen: Colchizin 0 µM, 3000 µM, 4500 µM, 6000 µM, und Trifluralin 0 µM, 400 µM, 500 µM, 750 µM (acht Versuchsvarianten à 90 Samen, drei Replikate). Mit 400 µM Trifluralin konnte eine mixoploide Pflanze (6 %), mit 500 µM Trifluralin ebenfalls eine mixoploide Pflanze (7 %) und mit 750 µM Trifluralin drei mixoploide Pflanzen (14 %) generiert werden (Tab. 27).

Tabelle 27: Zusammenfassung der durch die Behandlungsarten „Inkubation von Saatgut in Flüssigmedium“ (C1) und „Zugabe der Mitosehemmer in Festmedium“ (C2) mit Colchizin und Trifluralin erzeugten polyploiden Pflanzen. Pro Versuchsvariante und Wiederholung wurden 30 Samen behandelt.

Behandlungsart	Mitosehemmer	Anzahl Mixoploider	Polyploidisierung
Colchizin			
C1: Festmedium (n = 3)	300 µM	1	9 %
Trifluralin			
C2: Flüssigmedium (n = 3)	400 µM	1	6 %
	500 µM	1	7 %
	750 µM	3	14 %

In beiden Versuchen wurden die Keimraten untersucht. Die Zugabe von Colchizin zum Festmedium bewirkte keine Verringerung der Keimrate, allerdings starb bei einer Konzentration von 300 μM ein großer Anteil der Sämlinge nach der Keimung ab (Abb. 18). Auf Festmedium, welches Trifluralin enthielt, war die Keimrate etwas geringer als bei der Zugabe von Colchizin. Die Daten der zwei Prüfmerkmale Anzahl lebender sowie abgestorbener Keimlinge unterscheiden sich nach Behandlung mit unterschiedlichen Mitosehemmer-Konzentrationen nicht signifikant voneinander (Abb. 18).

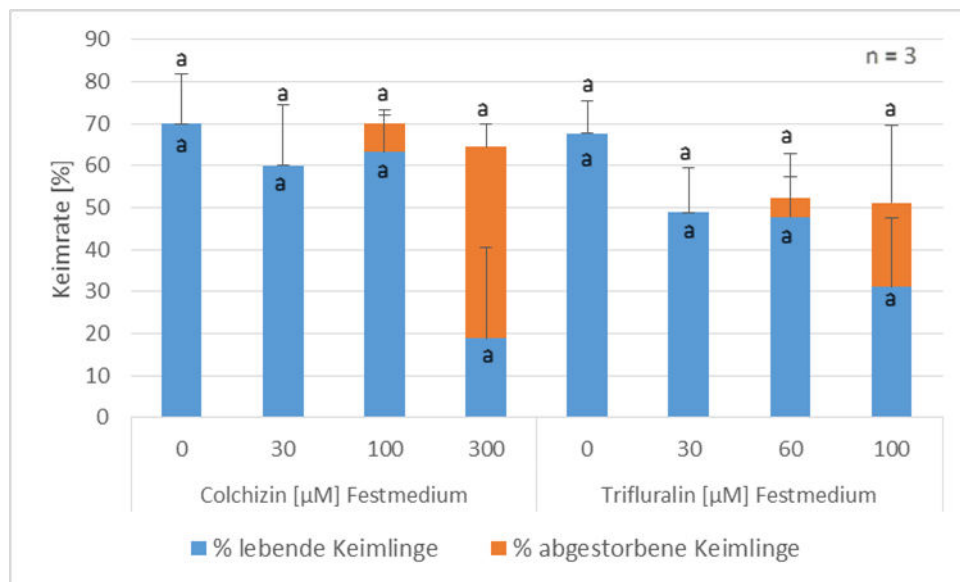


Abbildung 18: Keimrate 25 Tage nach Versuchsbeginn. Saatgut wurde auf Festmedium, das Colchizin oder Trifluralin enthielt, zum Keimen gebracht (Versuch C1). Einfaktorielle Varianzanalyse für Prüfmerkmal „lebende Keimlinge“: F-Wert = 2,51; $p = 0,12$. Einfaktorielle Varianzanalyse für Prüfmerkmal „abgestorbene Keimlinge“: $F = 3,33$; $p = 0,06$. Buchstabe a: keine signifikanten Unterschiede.

Wurde das Saatgut zu Beginn der Keimung in Flüssigmedium mit Zusatz von Trifluralin inkubiert, so sanken sowohl Keimrate als auch die Anzahl der überlebenden Sämlinge mit zunehmender Konzentration des Mitosehemmers deutlich ab (Abb. 19). Die Zahlen überlebender Keimlinge unterscheiden sich jedoch nicht signifikant nach Inkubation des Saatguts in unterschiedlichen Mitosehemmer-Konzentrationen. Zwischen den Daten des Prüfmerkmals Anzahl abgestorbener Keimlinge gab es jedoch signifikante Unterschiede. Die Zahlen abgestorbener Keimlinge in den Versuchsvarianten 500 μM sowie 750 μM Trifluralin unterschieden sich signifikant von den Daten der Nullkontrollen, in denen keine Keimlinge abstarben.

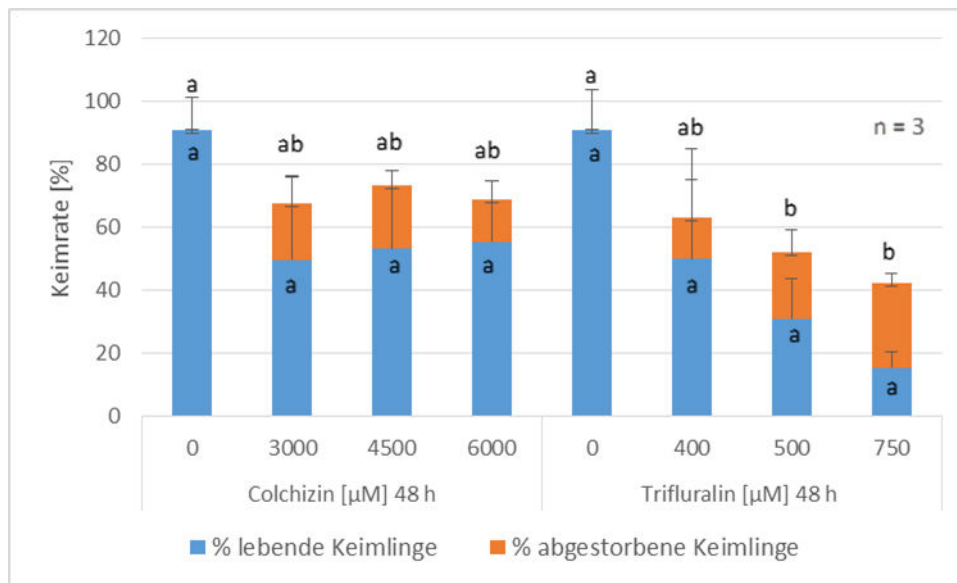


Abbildung 19: Saatgut inkubiert 48 h zu Beginn der Keimung in einer hochkonzentrierten Lösung der Mitosehemmer und wurde anschließend auf Medium ohne Zusatz von Mitosehemmer ausgesät (Versuch C2). Einfaktorielle Varianzanalyse für Prüfmerkmal „lebende Keimlinge“: F-Wert = 2,21; p = 0,09. Einfaktorielle Varianzanalyse für Prüfmerkmal „abgestorbene Keimlinge“: F-Wert = 6,45; p = 0,001. Verschiedene Buchstaben a, b markieren signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten im Ergebnis des Tukey-Test's ($\alpha = 0,05$).

In Versuch (**D1**) wurden Keimlinge fünfmal in regelmäßigen Abständen innerhalb von zwei Wochen mit Flüssigmedium betropft oder mit Tropfen einer 1,8 % Gelrite-Lösung (geringere Verdunstung und längere Einwirkung durch eine dickflüssige Konsistenz) behandelt (36 Versuchsvarianten à 20 Keimlinge, zwei Replikate). Da vermutet wurde, dass die Störung der Zellteilung und die weiteren Überlebenschancen von der Entwicklungsstufe des Keimlings während der Behandlung abhängen, wurde in drei aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien der Sämlinge mit der Betropfung begonnen: **(b)** Austritt der Radicula, **(c)** Austritt der Kotyledonen und **(d)** Entfaltung der Kotyledonen. Die Keimlinge wurden mit 0 µM, 3000 µM, 6000 µM Colchizin und mit 0 µM, 500 µM, 1000 µM Trifluralin betropft, jeweils in Form von Flüssigmedium oder Gelrite-Lösung. Der unterschiedliche Behandlungsbeginn hatte keinen Einfluss auf die Polyploidisierungsrate. Es fiel aber auf, dass die Behandlung der Keimlinge mit der Gelrite-Lösung und Trifluralin die meisten Polyploiden generierte (Tab. 28). Die Pflanzen überlebten allerdings nicht.

Tabelle 28: Zusammenfassung der in Versuch D1 durch eine Tropfenbehandlung (Flüssigmedium, 1,8 % Gelrite-Lösung) von Keimlingen erzeugten polyploiden Pflanzen. Behandlungsbeginn in drei Entwicklungsstadien: Austritt der Radicula (b), Austritt (c) und Entfaltung der Kotyledonen (d). Pro Versuchsvariante und Wiederholung wurden zehn Samen behandelt.

Behandlungsart	Mitosehemmer	Anzahl Mixoploider	Polyplodisierung
Colchizin			
Flüssigmedium			
D1b: Austritt Radicula (n = 2)	6000 µM	1	20 %
D1c: Austritt Kotyledonen (n = 2)	6000 µM	2	33 %
D1d: Entfaltung Kotyledonen (n = 2)	3000 µM	1	10 %
	6000 µM	2	33 %
1,8 % Gelrite-Lösung			
D1b: Austritt Radicula (n = 2)	6000 µM	1	10 %
D1c: Austritt Kotyledonen (n = 2)	6000 µM	1	10 %
Trifluralin			
Flüssigmedium			
D1b: Austritt Radicula (n = 2)	1000 µM	5	50 %
Gelrite-Lösung			
D1b: Austritt Radicula (n = 2)	500 µM	2	20 %
	1000 µM	5	83 %
D1c: Austritt Kotyledonen (n = 2)	1000 µM	5	83 %
D1d: Entfaltung Kotyledonen (n = 2)	1000 µM	3	50 %

In Versuch (D2) wurden die Keimlinge in genau definierten Entwicklungsstufen behandelt: (a) ungekeimter Samen, (b) Austritt der Radicula, (c) Austritt der Kotyledonen und (d) Entfaltung der Kotyledonen (48 Versuchsvarianten à 90 Keimlinge, drei Replikate). Die Keimlinge wurden hierfür zweimal mit Flüssigmedium oder einer 1,8 % Gelrite-Lösung betropft (jeweils 0/4500/6000 µM Colchizin und 0/750/1000 µM Trifluralin, Tab. 29). Nach vier Tagen wurden die Mitosehemmer durch Waschen entfernt. Vitalitätsraten wurden durch die Anzahl überlebender Keimlinge vier Wochen nach der Behandlung bestimmt. Die Vitalitätsraten der Keimlinge betragen bei den Nullkontrollen 60–91 % unabhängig vom Entwicklungsstadium und davon, ob Flüssigmedium oder Gelrite-Lösung verwendet wurde.

Mit Colchizin verringerte sich die Vitalitätsrate auf 32–50 % bei Behandlung mit Flüssigmedium und auf 22–44 % bei Behandlung mit 1,8 % Gelrite-Lösung. Die Anwendung der beiden Konzentrationen 4000 µM und 6000 µM Colchizin führte nicht zu unterschiedlichen Vitalitätsraten. Die Mitosehemmer wirkten am effektivsten bei Austritt der Kotyledonen und bei Applikation der Gelrite-Lösung (Tab. 29). Colchizin in einer Konzentration von 6000 µM konnte bei dieser Variante eine Polyplodisierungsrate von 47 % erzielen. Eine geringere Wirksamkeit war in den Stadien „Austritt der Radicula“ (8 %) und „Entfaltung der Kotyledonen“ (16 %) zu beobachten. Die erzeugten polyploiden Pflanzen waren alle mixoploid und starben nach einer Kulturdauer von acht Wochen ab.

Der letale Einfluss von Trifluralin war höher als der von Colchizin. Mit Trifluralin verringerte sich die Vitalitätsrate auf 18–34 % bei Behandlung mit Flüssigmedium und auf 16–31 % bei Behandlung mit 1,8 % Gelrite-Lösung. Die Anwendung der zwei Konzentrationen 700 µM und 1000 µM Trifluralin führte zu unterschiedlichen Vitalitätsraten. Wie Colchizin wirkte auch Trifluralin bei Austritt der Kotyledonen und bei Applikation der Gelrite-Lösung (Tab. 29) am effektivsten. Trifluralin in einer Konzentration von

10000 μM konnte bei dieser Variante eine Polyploidisierungsrate von 75 % erzielen. Eine geringere Wirksamkeit war in den Stadien „Austritt der Radicula“ (29 %) und „Entfaltung der Kotyledonen“ (33 %) zu beobachten. Die erzeugten mixoploiden Pflanzen starben nach acht Wochen ab.

Tabelle 29: Polyploidisierungsraten (Versuch D2) durch Colchizin (4000 μM , 6000 μM) und Trifluralin (700 μM , 1000 μM); Mitosehemmer in Flüssigmedium oder 1,8 % Gelrite-Lösung. Applikation auf Keimlingen unterschiedlicher Entwicklungsstadien: (a) ungekeimter Samen, (b) Austritt der Radicula, (c) Austritt der Kotyledonen und (d) Entfaltung der Kotyledonen. Versuchsvarianten mit Polyploiden sind fett markiert. Pro Versuchsvariante und Wiederholung wurden 30 Samen behandelt.

Polyploidisierungsraten Colchizin n = 3							
Flüssigmedium				1,8 % Gelrite-Lösung			
<u>a</u> 4000	0 %	<u>a</u> 6000	0 %	<u>a</u> 4000	0 %	<u>a</u> 6000	0 %
<u>b</u> 4000	0 %	<u>b</u> 6000	0 %	<u>b</u> 4000	0 %	<u>b</u> 6000	8 %
<u>c</u> 4000	0 %	<u>c</u> 6000	3 %	<u>c</u> 4000	13 %	<u>c</u> 6000	47 %
<u>d</u> 4000	0 %	<u>d</u> 6000	2 %	<u>d</u> 4000	0 %	<u>d</u> 6000	16 %
Polyploidisierungsraten Trifluralin n = 3							
Flüssigmedium				1,8 % Gelrite-Lösung			
<u>a</u> 700	0 %	<u>a</u> 1000	0 %	<u>a</u> 700	0 %	<u>a</u> 1000	0 %
<u>b</u> 700	0 %	<u>b</u> 1000	0 %	<u>b</u> 700	10 %	<u>b</u> 1000	29 %
<u>c</u> 700	0 %	<u>c</u> 1000	0 %	<u>c</u> 700	33 %	<u>c</u> 1000	75 %
<u>d</u> 700	3 %	<u>d</u> 1000	0 %	<u>d</u> 700	17 %	<u>d</u> 1000	33 %

Mit Trifluralin in der Gelrite-Lösung ließen sich höhere Polyploidisierungsraten erzeugen als mit Colchizin (Abb. 20). Der Einfluss der Mitosehemmer-Konzentration und des Entwicklungsstadiums der Keimlinge als Prüffaktoren wurde untersucht. Mit folgender Behandlungsmethode konnte die durchschnittlich höchste Polyploidisierungsrate von 75 % generiert werden: Auftropfen der 1,8 % Gelrite-Lösung mit 1000 μM Trifluralin auf Keimlinge, bei denen die Kotyledonen austreten. Die Polyploidisierungsrate dieser Versuchsvariante unterschied sich nicht signifikant von 47 % Polyploidisierung durch Behandlung der Keimlinge bei Austritt der Kotyledonen mit 6000 μM Colchizin. Ein signifikanter Unterschied war jedoch im Vergleich zu den Daten der Behandlung von ungekeimtem Saatgut unabhängig von der Mitosehemmer-Konzentration vorhanden. Auch unterschieden sich die Daten signifikant im Vergleich zu den Nullkontrollen unabhängig von der Entwicklungsstufe und im Vergleich zu den Versuchsvarianten mit Polyploidisierungsraten von unter 20 %.

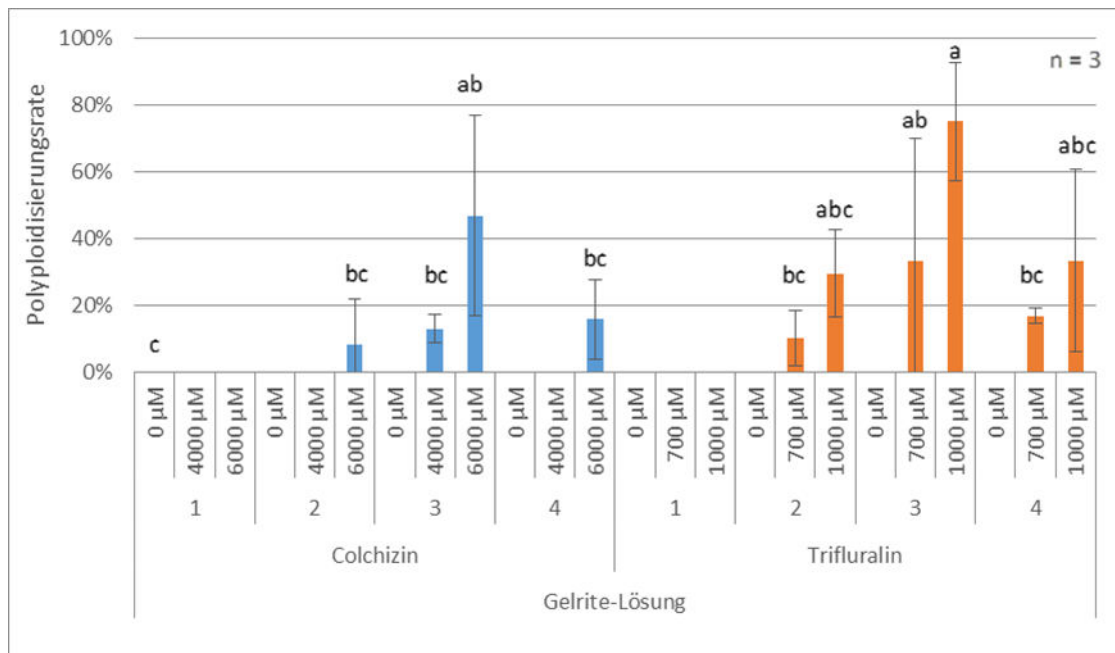


Abbildung 20: Polyploidisierungsraten (Versuch D2) durch zweimalige Betropfung von Keimlingen mit Colchizin oder Trifluralin in einer 1,8 % Gelrite-Lösung innerhalb von fünf Tagen und in verschiedenen Entwicklungsstufen: (1) ungekeimter Samen, (2) Austritt der Radicula, (3) Austritt der Kotyledonen und (4) Entfaltung der Kotyledonen. Zweifaktorielle Varianzanalyse mit den Prüffaktoren Entwicklungsstadium der Keimlinge und Mitosehemmer-Konzentration; F-Wert = 2,54, $p = 0,007$. Verschiedene Buchstaben a, b, c markieren signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten im Ergebnis des Tukey-Test's ($\alpha = 0,05$).

Insgesamt wurden in den Versuchen mit Saatgut und Keimlingen durch Colchizin 41 mixoploide Pflanzen generiert. Mit Oryzalin wurde eine mixoploide Pflanze erzeugt. Trifluralin führte zu 66 mixoploiden Pflanzen. Alle polyploiden Sämlinge starben, mit zwei Ausnahmen, innerhalb weniger Wochen ab. Die mit 1000 µM Colchizin erzeugte mixoploide Pflanze und die mit 3000 µM Colchizin erzeugte mixoploide wurden nach neun Monaten mittels FCM kontrolliert. Der mixoploide Status konnte nicht mehr betätigt werden.

3.3.2 Induktion von Polyploidie an Sprossspitzen

Aus den Versuchen zur Saatgutbehandlung mit Mitosehemmern standen diploide *in vitro*-Sämlinge für die Untersuchungen an *in vitro*-Sprossen mit Mitosehemmern zur Verfügung. Zum Einsatz kamen Colchizin, APM, Oryzalin und Trifluralin (Tab. 30). In den Versuchen **11** und **12** wurden pro Versuchsvariante dreimal 30 Sprossspitzen behandelt. Es wurde neben den Nullkontrollen mit folgenden Konzentrationen gearbeitet: Colchizin 1000 µM, 3000 µM, APM/Oryzalin/Trifluralin 30 µM, 100 µM, 300 µM. Im ersten Versuch (**11**) inkubierten die Sprossspitzen 48 h in der Mitosehemmer-Lösung und wurden dann auf Festmedium umgesetzt (15 Versuchsvarianten à 90 Sprossspitzen, drei Replikate). Mit 3000 µM Colchizin konnten zwei Mixoploide (Polyploidisierungsrate: 2 %) generiert werden. Diese starben vier Wochen nach der FCM-Messung ab. Im zweiten Versuch (**12**) wurde das Meristem der Sprossspitzen acht- bzw. neunmal mit der Mitosehemmer-Lösung betropft (15 Versuchsvarianten à 90 Sprossspitzen, drei Replikate). Dadurch konnten keine Polyploiden erzeugt werden (Tab. 30).

Tabelle 30: Versuche zur Behandlung von Sprossspitzen mit Mitosehemmern unter Angabe der erzeugten Mixoploiden. Inkubation 48 h in Flüssigmedium bzw. tägliches Tropfen der Mitosehemmer auf das Meristem. Durch Inkubation der Sprossspitzen in 3000 µM Colchizin-Lösung konnten zwei Mixoploide erstellt werden. Pro Versuchsvariante wurden dreimal 30 Sprossspitzen behandelt.

	Colchizin [µM]	APM [µM]	Oryzalin [µM]	Trifluralin [µM]
I1: 48 h Inkubation	0; 1000; 3000 2 Mixoploide	0; 30; 100; 300 0 Mixoploide	0; 30; 100; 300 0 Mixoploide	0; 30; 100; 300 0 Mixoploide
I2: Betropfung	0; 1000; 3000 (9 d) 0 Mixoploide	0; 30; 100; 300 (8 d) 0 Mixoploide	0; 30; 100; 300 (8 d) 0 Mixoploide	0; 30; 100; 300 (8 d) 0 Mixoploide

Mit Sprossmaterial wurden Versuche zur Etablierung genetisch definierten Materials *in vitro* durchgeführt. Tab. 31 gibt einen Überblick. Zu unterschiedlichen Jahreszeiten wurden Sprossspitzen von der Sorte 'Wink 2-2006' sowie den Populationen 2005.49 ('Maria' × F1(2)) und 2005.63 ('Mariella' × F1(4)) verwendet.

Tabelle 31: Zusammenfassung der Versuche zur *in vitro*-Etablierung von Sprossmaterial. Vitalitätsraten nach Sterilisation mit Natriumhypochlorit (NaOCl) und Silbernitrat (AgNO₃).

Zeitpunkt	Pflanzenmaterial	Sterilisationsmittel	Anzahl Sprossspitzen	Vitalität
Okt. 2011	Sorte 'Wink 2-2006'	AgNO ₃ 0,8 %	220	0 %
Dez. 2012	Population 2005.63	NaOCl (2 % Chlor)	35	65 %
		NaOCl (3 % Chlor)	55	76 %
Apr. 2013,	2005.49/29; 61; 103	NaOCl (3 % Chlor)	60	100 %
März 2014	2005.49/29; 61; 103	NaOCl (3 % Chlor)	60	100 %
März 2014	2005.49/29; 127	NaOCl (3 % Chlor)	120	100 %

Im Oktober 2011 wurden Sprossspitzen der Sorte 'Wink 2-2006' mit 0,8 % AgNO₃ sterilisiert. Es waren keine aktiv wachsenden Sprossspitzen zu beobachten. Im Dezember 2012 wurden Sprossspitzen von grünlaubigen Knospenblühern der Population 2005.63 mit 2 % und 3 % freiem Chlor sterilisiert, die Vitalitätsrate betrug 65 % bzw. 76 %. Daraufhin wurden im Frühjahr 2014 grünlaubige Genotypen der Population 2005.49 ausschließlich mit 3 % freiem Chlor sterilisiert, das Sprossmaterial zeigte aktives Wachstum (Abb. 21) und somit konnte Pflanzenmaterial erfolgreich *in vitro* etabliert werden.

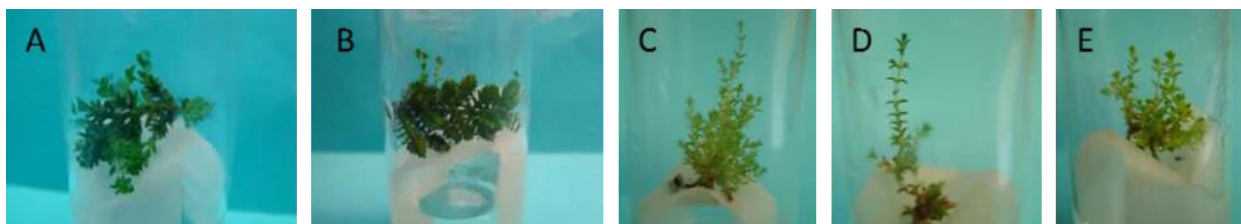


Abbildung 21: Mit 3 % freiem Chlor (NaOCl) sterilisierte Sprossspitzen des Genotyps 2005.49/29. Aktives Wachstum (A, B) und Vermehrung (C-E) *in vitro* war möglich.

Im dritten Versuch zur Polyploidisierung von Sprossmaterial (**I3**) wurden die *in vitro* etablierten Genotypen 2005.49/29 (n = 300) und 2005.49/127 (n = 150) mit Colchizin (0 μ M, 1000 μ M, 3000 μ M) und Trifluralin (0 μ M, 100 μ M, 300 μ M) behandelt (sechs Versuchsvarianten à 75 Sprossspitzen). Pro Behandlungsvariante wurden zweimal 25 Sprossspitzen des Genotyps 2005.49/29 und einmal 25 Sprossspitzen des Genotyps 2005.49/127 verwendet. Innerhalb von zehn Tagen wurden die Meristeme der Sprossspitzen jeweils siebenmal mit 20 μ l Gelrite-Lösung betropft, in welcher der Mitosehemmer in der entsprechenden Konzentration gelöst war. Nach sechs Wochen weiteren Wachstums konnten die Sprossspitzen auf neues Medium überführt werden. Die Behandlung mit Mitosehemmern zeigte keine letale Wirkung (Abb. 22). Die durchschnittliche Vitalitätsrate von 51 % der Nullkontrollen beim Colchizin-Versuch waren ebenso gering wie die Vitalitätsraten von 48 % nach Behandlung mit 1000 μ M Colchizin und 51 % bei 3000 μ M Colchizin. Die durchschnittliche Vitalitätsrate der Nullkontrollen beim Trifluralin-Versuch (79 %) war etwas höher als die Vitalitätsraten nach Behandlung mit 100 μ M Trifluralin (75 %) und 300 μ M Trifluralin (75 %). Die Daten des Prüfmerkmals Vitalitätsrate unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Unabhängig von Genotyp und Behandlung überlebten einige Sprosse auf dem Festmedium nicht.

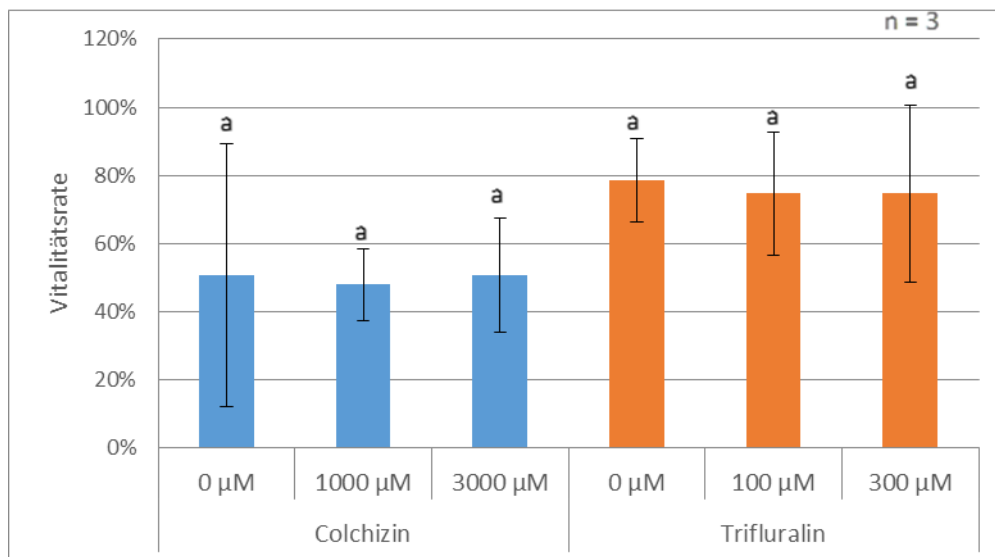


Abbildung 22: Zusammenfassung der Vitalitätsraten der Sprossspitzen der Genotypen 2005.49/29 (n = 2) und 2005.49/127 (n = 1), nach Betropfung der Sprossspitzen mit Colchizin (blau) und Trifluralin (orange) mit einer 1,8 % Gelrite-Lösung (Versuch I3). Einfaktorielle Varianzanalyse; F-Wert = 1,25, p = 0,35. Buchstabe a: keine signifikanten Unterschiede.

Nach vier Wochen und Gewebezunahme wurden die Ploidiestufen mittels FCM bestimmt. Sprossspitzen des Genotyps 2005.49/29 konnten fünfmal polyploidisiert werden – zweimal mit 3000 μ M Colchizin, einmal mit 100 μ M Trifluralin und zweimal mit 300 μ M Trifluralin. Sprossspitzen des Genotyps 2005.49/127 konnten einmal mit 300 μ M Trifluralin polyploidisiert werden. Unabhängig vom Genotyp konnten mit 3000 μ M Colchizin zwei mixoploide Pflanzen (6,55 %), mit 100 μ M Trifluralin eine mixoploide (1,45 %) und mit 300 μ M Trifluralin drei mixoploide (5,44 %) generiert werden.

Insgesamt wurden durch die Versuche **I1**, **I2** und **I3** vier mixoploide Pflanzen mit Colchizin und vier mixoploide Pflanzen mit Trifluralin erstellt. Sie überlebten allerdings nicht.

3.4 Erstellung neuer polyploider Genotypen durch Kreuzungen

Um Möglichkeiten zur Züchtung polyploider Sorten von *C. vulgaris* zu prüfen, wurden neben der Behandlung mit Mitosehemmern gezielte Kreuzungen durchgeführt. Dafür wurden Kreuzungen wiederholt, bei denen bereits spontan polyploide Genotypen in den Nachkommenschaften auftraten, mit dem Ziel der Erzeugung weiterer polyploider Genotypen (Arbeiten von Heidepflanzen de Winkel). In der Kreuzung 'Maria' × 'Perestroijka' trat spontan der tetraploide Genotyp '7705' und in der Kreuzung 'Maria' × F1(2) spontan der triploide Genotyp 'Anke' auf. Die Nachkommen der wiederholten Kreuzungen waren jedoch ausschließlich diploid (Tab. 32).

Zur Erstellung neuer Polyploider wurden darüber hinaus Kreuzungen mit Genotypen durchgeführt (Tab. 32), die nach FCM-Messungen nicht den gleichen relativen DNA-Gehalt aufwiesen (Tab. 46 im Anhang) und nach Verwandtschaftsanalyse mittels RAPD-Marker (Borchert et al. 2008) nicht nah miteinander verwandt sind (Arbeiten von Heidepflanzen de Winkel). Die Nachkommen waren mit einer Ausnahme diploid (Tab. 32). Nur in der Nachkommenschaft der Kreuzung 'Mariella' × 'Arabella' trat ein neuer triploider Genotyp auf.

Tabelle 32: Kreuzungsversuche (Heidepflanzen de Winkel) mit diploiden Genotypen zur Erstellung polyploider Genotypen. Blau markiert sind die Wiederholungen von Kreuzungen ('Maria' × 'Perestroijka'; 'Maria' × F1(2)). Bei den übrigen handelt es sich um Kreuzungsversuche mit Genotypen, die einerseits genetisch weit entfernt voneinander sind (Borchert et al. 2008) und andererseits leichte Unterschiede im relativen DNA-Gehalt aufweisen.

Kreuzungspartner	Anzahl Bestäubungen	Anzahl Samen	Anzahl Sämlinge	Ploidiestufen Nachkommen
'Maria' × 'Perestroijka'	500	45	10	alle diploid
'Maria' × F1(2)	500	1478	256	alle diploid
'Marlies' × 'Roter Oktober'	500	323	59	alle diploid
'Aphrodite' × 'Arabella'	500	405	22	alle diploid
'Moulin Rouge' × 'Arabella'	500	2187	112	alle diploid
'Mariella' × 'Arabella'	500	104	35	34 diploid, 1 triploid
'Venetia' × 'Elegantissima'	300	1127	71	alle diploid
'Sandy' × 'Elegantissima'	300	1122	28	alle diploid
'Marleen' × 'Arabella'	150	45	1	diploid
'Wink 1-2006' × 'Elegantissima'	300	267	68	alle diploid
'Wink 1-2006' × '2005.63/23'	50	29	10	alle diploid
'Wink 4-2006' × '2005.63/23'	50	13	2	alle diploid

3.4.1 Analyse der Nachkommenschaft einer freien Abblüte eines tetraploiden Genotyps

3.4.1.1 Ploidiestufen der Nachkommen

Der tetraploide Genotyp '7705' trat spontan in der Kreuzung von diploiden Kreuzungspartnern auf und blühte daraufhin in einem Feld diploider Pflanzen frei ab. Die Nachkommenschaft dieser freien Abblüte umfasste 466 Pflanzen (Population 2008.177), welche mittels FCM untersucht wurden (Abb. 23). Es handelte sich um vier diploide (0,9 %), 31 triploide (6,7 %) und 431 tetraploide (92,5 %) Genotypen.

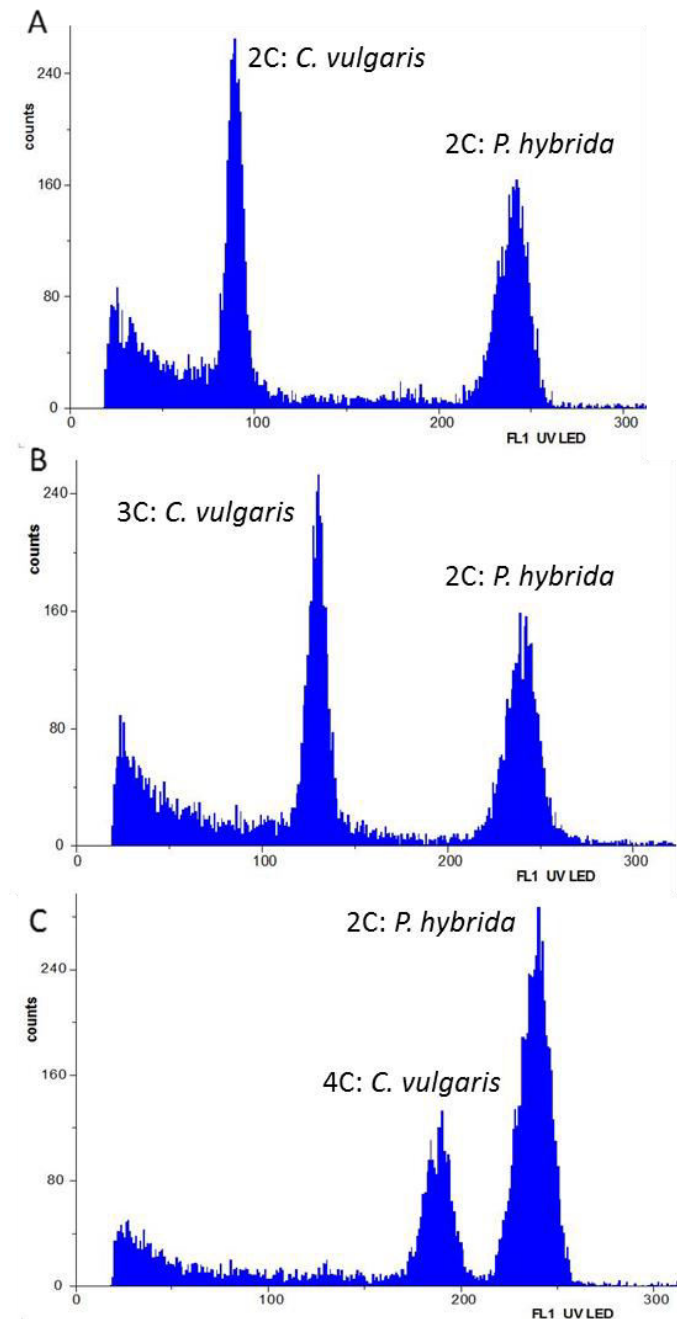


Abbildung 23: FCM-Messung des relativen DNA-Gehalts eines diploiden (2008.177/251), triploiden (2008.177/142) und tetraploiden Genotyps (2008.177/14) mittels DAPI. (A) Peak von diploiden *C. vulgaris*-Zellen ($DNA_{2C} = 1,2$ pg) mit dem Peak der Referenzpflanze *Petunia hybrida* ($DNA_{2C} = 3,35$ pg); (B) Peak von triploiden *C. vulgaris*-Zellen ($DNA_{3C} = 1,8$ pg); (C) Peak von tetraploiden *C. vulgaris*-Zellen ($DNA_{4C} = 2,4$ pg) mit dem Peak der Referenzpflanze *P. hybrida*.

Um neue polyploide Genotypen zu erzeugen, wurden Genotyp '7705' und seine Nachkommen für weitere Kreuzungen verwendet (Arbeiten von Heidepflanzen de Winkel). Die beiden tetraploiden Genotypen 2008.177/244 und 2008.177/86 wurden mit dem Pollen des Genotyps '7705' bestäubt. Die Nachkommen waren allesamt tetraploid (Tab. 33). Zur Erweiterung der phänotypischen Variabilität wurden Geschwisterkreuzungen durchgeführt. Bei der Kreuzung dieser tetraploiden Genotypen entstanden triploide und tetraploide Genotypen (Tab. 33). Der tetraploide Genotyp 2008.177/76 blühte frei ab, was bei der FCM-Messung von 100 Pflanzen in triploiden und tetraploiden Nachkommen resultierte (Tab. 33).

Tabelle 33: Freie Abblüte des tetraploiden Genotyps 2008.177/76 und Ploidiestufen der Nachkommen. Durchführung von Kreuzungen tetraploider Genotypen der Population 2008.177. Zusätzliche Bestäubungen Tetraploider mit Pollen des tetraploiden Genotyps '7705'. Arbeiten von Heidepflanzen de Winkel.

Kreuzungspartner	Anzahl Bestäubungen	Anzahl Samen	Anzahl Sämlinge	Ploidiestufen Nachkommen
2008.177/2 × 2008.177/1	100	56	13	5 triploid, 8 tetraploid
2008.177/7 × 2008.177/1	100	20	4	1 triploid, 3 tetraploid
2008.177/7 × 2008.177/2	100	56	11	3 triploid, 8 tetraploid
2008.177/33 × 2008.177/36	100	8	3	1 triploid, 2 tetraploid
2008.177/33 × 2008.177/70	100	20	6	1 triploid, 5 tetraploid
2008.177/86 × '7705'	100	60	13	alle tetraploid
2008.177/244 × '7705'	100	300	48	alle tetraploid
2008.177/76 freie Abblüte	–	1343	441	13 triploid, 87 tetraploid

3.4.1.2 Züchterisch relevante Merkmale der Nachkommen

Für die Züchtung von *C. vulgaris* relevante Merkmale sind u. a. das Merkmal „Knospenblütigkeit“ sowie die Größe und die Dichte von Blüten. Fünf der blühenden Triploiden der Population 2008.177 waren Knospenblüher (17,2 %) und 16 der blühenden Tetraploiden waren Knospenblüher (4,5 %).

Größe und Dichte der Blüten wurden von 29 triploiden und 355 tetraploiden Genotypen der Nachkommen von Genotyp '7705' untersucht (Tab. 34, Arbeiten von Heidepflanzen de Winkel). Bei den Triploiden zeigten die meisten Genotypen (31,0 %) kleine Blüten in hoher Dichte. Züchterisch am wertvollsten sind große Blüten in hoher Dichte. Dieses Merkmal war bei einem der triploiden Genotypen (3,4 %) und bei zehn der 355 tetraploiden Genotypen (2,8 %) zu finden. Am häufigsten waren bei den Tetraploiden Blüten mittlerer Größe in geringer (25,1 %), mittlerer (23,1 %) und hoher Dichte (22,5 %).

Tabelle 34: Blütenmorphologie von polyploiden Genotypen von *C. vulgaris* der Nachkommenschaft 2008.177 des tetraploiden Genotyps '7705' (absolute Zahl der Pflanzen und Prozentsatz in Bezug auf die Ploidiestufe). Die Kombination von großen Blüten und hoher Blütendichte ist wertvoll in der Züchtung (fette Markierung).

29 triploide Genotypen			
	Blütengröße		
Blütendichte	klein	mittel	groß
locker	0 (0,0 %)	7 (24,1 %)	0 (0,0 %)
mittel	1 (3,4 %)	5 (17,2 %)	0 (0,0 %)
kompakt	9 (31,0 %)	6 (20,7 %)	1 (3,4 %)
355 tetraploide Genotypen			
	Blütengröße		
Blütendichte	klein	mittel	groß
locker	12 (3,4 %)	92 (25,1 %)	19 (5,4 %)
mittel	13 (3,7 %)	82 (23,1 %)	19 (5,4 %)
kompakt	28 (7,9 %)	80 (22,5 %)	10 (2,8 %)

3.4.1.3 Analyse der Abstammung der Nachkommen mittels Fingerprinting

Die Abstammung der Nachkommen der freien Abblüte des tetraploiden Genotyps '7705' wurde mittels AFLP untersucht (Tab. 35), weil der Ursprung der triploiden und vor allem der diploiden Genotypen in der Nachkommenschaft 2008.177 unklar war. Daher wurden der Genotyp '7705', alle überlebenden diploiden und triploiden Genotypen und 45 tetraploide Genotypen der Nachkommenschaft mittels AFLP analysiert (Tab. 35). In die AFLP-Analyse wurden darüber hinaus drei diploide Wildformen und eine diploide Sorte mit einem eindeutig anderen Phänotyp ('Hammondii rubrifolia') als Kontrollgruppe integriert. Für die Verifizierung der AFLP-Ergebnisse des triploiden Genotyps 2008.177/200 und des diploiden Genotyps 2008.177/251 wurden die etablierten SSR-Marker angewendet und zur Kontrolle weitere Genotypen in die Analyse integriert (Tab. 35).

Tabelle 35: 83 Genotypen, die mittels AFLP analysiert wurden. Spontan entstandener tetraploider Einfachblüher '7705', diploide, triploide und tetraploide Nachkommen der freien Abblüte des Genotyps '7705' sowie vier Kontroll-Genotypen. Die 38 blau markierten Genotypen wurden zusätzlich mittels SSR-Marker untersucht.

Mutterpflanze	'7705'
4 Diploide	2008.177 (15, 251, 360, 455)
29 Triploide	2008.177 (5, 23, 25, 66, 108, 118, 124, 131, 142, 149, 200, 204, 229, 248, 286, 289, 299, 308, 328, 330, 353, 359, 374, 382, 392, 449, 451, 464, 466)
45 Tetraploide	2008.177 (1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 42, 44, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 62, 63, 64, 65, 67)
Kontroll-Genotypen	'Hammondii rubrifolia', 'Löhnstein', 'Tasmanien', 'Russland'

Die Verwendung von zehn unterschiedlichen Primerkombinationen resultierte in insgesamt 180 AFLP-Loci und einem Durchschnitt von 104,4 Banden pro Genotyp. Der tetraploide Genotyp '7705' zeigte 106 AFLP-Loci. Für die Analyse der Entstehungsweise der einzelnen Genotypen der Population

2008.177 wurde die Anzahl der AFLP-Loci in der Nachkommenschaft bestimmt, die in der Mutterpflanze '7705' nicht vorhanden waren. Im Durchschnitt war dies bei 8,33 Loci der Fall. Dieses Ergebnis variierte stark in Abhängigkeit von der Ploidiestufe (Tab. 36). 27,34 % Banden der diploiden Kontrollgruppe waren im Genotyp '7705' nicht vorhanden, bei den tetraploiden Genotypen waren es 3,74 %. In den diploiden und triploiden Nachkommen wurden 12,47 % und 10,37 % der Banden nicht von Genotyp '7705' vererbt. Die Anzahl nicht vorhandener AFLP-Loci in Genotyp '7705' variierte bei der diploiden Kontrollgruppe ($s = 7,65\%$) und bei der diploiden Nachkommenschaft ($s = 9,88\%$) von Genotyp '7705' stärker als bei den triploiden ($s = 3,69\%$) und tetraploiden ($s = 4,05\%$) Nachkommen (Tab. 36). Die tetraploide Nachkommenschaft zeigte in der AFLP-Analyse die größte Ähnlichkeit zur tetraploiden Mutterpflanze '7705'.

Tabelle 36: Durchschnittliche AFLP-Banden, die im Genotyp '7705' nicht vorhanden waren; diploide Kontrollgruppe (n = 4) von drei gesammelten Wildformen ('Löhnstein', 'Tasmanien', 'Russland') und der Sorte 'Hammondii rubrifolia'; diploide Nachkommen (n = 4); triploide Nachkommen (n = 29); tetraploide Nachkommen (n = 45).

AFLP-Probe	Loci ungleich zu '7705'	Standardabweichung
Diploide Kontrollgruppe (n = 4)	27,34 %	7,65 %
Diploide Nachkommen (n = 4)	12,47 %	9,88 %
Triploide Nachkommen (n = 29)	10,37 %	3,69 %
Tetraploide Nachkommen (n = 45)	3,74 %	4,05 %

In jeder Ploidiestufe gab es Genotypen, die keine von Genotyp '7705' abweichenden AFLP-Banden aufwiesen. Bei den Triploiden war es der Genotyp 2008.177/200 und bei den Diploiden der Genotyp 2008.177/251. Bei den Tetraploiden handelte es sich um die Genotypen 2008.177/19, 2008.177/29, 2008.177/32 und 2008.177/34.

Die Anwendung der SSR-Marker diente der Analyse der genetischen Ähnlichkeit einzelner Nachkommen zur Mutterpflanze '7705'. Acht der elf etablierten SSR-Marker waren in dieser Untersuchung polymorph. Die sieben Loci DG2, DG105, DG70, DC114, Ecoc108, Cv29 und Mg59 zeigten für die untersuchten diploiden, triploiden und tetraploiden Genotypen ein oder zwei Allele (Tab. 37). Der SSR-Locus Ecoc142 zeigte drei Allele bei den zwei triploiden Genotypen 2008.177/200 und 2008.177/308 sowie bei den drei tetraploiden Genotypen 2008.177/2, 2008.177/4 und 2008.177/7.

Für die tetraploide Mutterpflanze '7705' wiesen die SSR-Loci DG2, DG70, und DC114 jeweils ein Allel auf und die SSR-Loci DG105, Ecoc108, Ecoc142, Mg 59 und Cv29 zwei Allele. Diese heterozygoten Loci in Genotyp '7705' waren zum Großteil auch bei den 34 untersuchten triploiden Nachkommen heterozygot. Bei den Triploiden wird von einer Einstäubung von Diploiden mit unbekanntem genetischem Hintergrund ausgegangen. Heterozygote Loci traten für 20 Triploide bei Marker DG105 auf, für 14 Triploide bei Marker Ecoc108, für 19 Triploide bei Marker Ecoc142, für 20 Triploide bei Marker Mg59 und für drei Triploide bei Marker Cv29. Die in Mutterpflanze '7705' homozygoten Loci DG70 und DC114 waren auch in den zehn untersuchten tetraploiden Nachkommen ausschließlich homozygot. Locus DG2 wies jedoch für zwei Tetraploide zwei unterschiedliche Allele auf.

Der diploide Nachkomme 2008.177/251 zeigte an Locus Ecoc142 ein Allel, welches in Mutterpflanze '7705' nicht auftrat (Tab. 37). Der triploide Nachkomme 2008.177/200 wies insgesamt zwei von Genotyp '7705' differente Allele auf. Die zwei triploiden Nachkommen 2008.177/66 und

2008.177/286 zeigten keine Allele, die nicht in Genotyp '7705' vorhanden waren. Dies war auch der Fall für die drei tetraploiden Nachkommen 2008.177/3, 2008.177/10 und 2008.177/16. Auffällig war im tetraploiden Nachkommen 2008.177/4 das Auftreten von insgesamt sechs Allelen, die Genotyp '7705' nicht aufwies.

Tabelle 37: SSR-Banden, die in der tetraploiden Mutterpflanze '7705' nicht vorhanden waren (blau markiert). Blau: diploide Nachkommen (n = 4); rot: triploide Nachkommen (n = 23); grau: tetraploide Nachkommen (n = 10). Fett markierte Genotypen 2008.177/251 und 2008.177/200 wiesen keine von Mutterpflanze '7705' abweichenden AFLP-Banden auf.

SSR-Marker	DG2		DG105		DG70		DC114		Ecoc108		Cv29		Mg59		Ecoc142			Anzahl
Genotyp	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 3	der Allele
7705	113	113	169	199	134	134	109	109	170	180	107	92	110	120	217	213		ungleich 7705
2x 15	113	113	169	199	134	134	109	109	170	180	107	92	110	120	217	231		1
2x 251	113	113	169	199	134	134	109	109	170	170	107	107	110	120	217	231		1
2x 360	113	119	169	169	134	134	109	109	170	190	107	107	110	110	213	231		3
2x 455	113	113	169	169	134	134	113	109	180	185	107	107	110	120	217	217		2
3x 5	113	113	169	199	134	134	113	109	170	165	107	107	110	120	217	202		3
3x 23	113	113	169	199	134	128	113	109	170	170	107	107	110	120	217	231		3
3x 25	113	119	169	199	134	134	109	109	160	170	107	92	110	120	217	217		2
3x 66	113	113	169	199	134	134	109	109	170	170	107	107	110	120	217	217		0
3x 108	113	113	169	199	134	128	113	109	170	170	107	107	110	120	217	231		3
3x 118	113	119	169	199	134	128	113	109	170	170	107	107	120	120	213	231		4
3x 124	113	119	169	199	134	134	113	109	170	170	107	107	110	120	217	231		3
3x 142	113	119	169	199	134	134	109	109	170	165	107	107	110	120	217	213		2
3x 149	113	113	169	169	134	134	109	109	170	165	107	107	110	120	213	231		2
3x 200	113	113	169	199	134	134	109	109	170	170	107	107	110	120	217	231	202	2
3x 204	113	113	169	199	134	134	109	109	170	173	113	113	110	120	213	231		4
3x 229	113	116	169	199	134	134	113	109	170	190	107	92	110	120	217	227		4
3x 248	113	113	169	199	134	134	113	109	170	165	107	107	110	110	213	213		2
3x 286	113	113	169	199	134	134	109	109	170	180	107	107	110	120	217	217		0
3x 289	113	119	169	199	134	128	113	109	170	185	107	107	110	120	213	231		5
3x 299	113	119	169	199	134	134	109	109	170	185	107	107	110	120	217	213		2
3x 308	113	116	169	169	134	134	109	109	170	180	107	107	110	120	217	227	202	3
3x 328	113	113	169	199	134	134	113	109	170	180	107	92	110	120	217	231		2
3x 330	113	116	169	199	134	128	113	109	170	170	107	107	110	120	213	231		4
3x 353	113	119	169	169	134	134	109	109	170	180	107	107	120	120	217	231		2
3x 359	113	119	169	199	134	134	113	109	170	165	107	107	110	120	217	217		3
3x 374	113	119	169	199	134	128	109	109	170	170	107	107	110	120	217	231		3
3x 392	113	119	169	199	134	128	113	109	170	170	107	107	110	120	217	231		4
4x 1	113	116	169	199	134	134	109	109	180	165	107	92	110	120	217	231		3
4x 2	113	113	169	199	134	134	109	109	170	170	107	107	110	120	217	231	202	2
4x 3	113	113	169	169	134	134	109	109	170	170	107	107	120	120	217	217		0
4x 4	113	116	169	199	134	134	109	109	170	190	113	113	110	120	217	231	202	6
4x 7	113	113	169	199	134	134	109	109	170	170	107	107	110	120	217	231	202	2
4x 9	113	113	169	199	134	134	109	109	170	170	107	107	110	120	217	231		1
4x 10	113	113	169	199	134	134	109	109	170	170	107	107	110	120	217	217		0
4x 11	113	113	169	199	134	134	109	109	170	170	107	107	110	120	217	231		1
4x 16	113	113	169	199	134	134	109	109	170	170	107	107	110	120	217	217		0
4x 18	113	113	169	199	134	134	109	109	170	170	107	107	110	120	217	231		1

Phänotypisch glichen der diploide Genotyp 2008.177/455 und die drei tetraploiden Genotypen 2008.177/7, 2008.177/16 und 2008.177/56 mit ihrer weißgelben Laubfärbung im Frühjahr der Sorte 'Hammondii rubrifolia' (Abb. 24). Sie wurden in die AFLP-Untersuchung integriert, um eine mögliche Einkreuzung der Sorte in der Nachkommenschaft der freien Abblüte zu prüfen.



Abbildung 24: Untersuchung einer möglichen Einkreuzung von 'Hammondii rubrifolia' in den diploiden Genotyp 2008.177/455 und in die drei tetraploiden Genotypen 2008.177/7, 2008.177/16, 2008.177/56 aus der Nachkommenschaft der freien Abblüte des tetraploiden Genotyps '7705'. Links: 'Hammondii rubrifolia' (rot umkreist); rechts: 2008.177/455.

Die Einkreuzung dieser Sorte kann bei Genotyp 2008.177/455 nicht ausgeschlossen werden. Es wurden nur 'Hammondii rubrifolia'-spezifische Banden ($n = 43$) ausgewertet, die nicht in Genotyp '7705' (37 spezifische Banden von Genotyp '7705') auftraten. Die spezifischen Banden von 'Hammondii rubrifolia' traten zu 72,09 % in Genotyp 2008.177/455 auf, zu 2,33 % in Genotyp 2008.177/7, zu 2,33 % in Genotyp 2008.177/16 und zu 18,60 % in Genotyp 2008.177/56 (Tab. 38).

Tabelle 38: Durchschnittliche AFLP-Banden, die spezifisch in 'Hammondii rubrifolia' oder im Genotyp '7705' vorhanden waren; diploide Nachkommen ($n = 4$); triploide Nachkommen ($n = 4$); tetraploide Nachkommen ($n = 7$); fett markierte Genotypen mit Verdacht auf Einkreuzung des Genotyps 'Hammondii rubrifolia'.

Genotyp	Spezifische 'Hammondii'-Banden ($n = 43$)		Spezifische '7705'-Banden ($n = 37$)	
	absolut	%	absolut	%
15 ($2n = 2x$)	5	11,63 %	26	70,27 %
251 ($2n = 2x$)	0	0,00 %	34	91,89 %
360 ($2n = 2x$)	5	11,63 %	25	67,57 %
455 ($2n = 2x$)	31	72,09 %	13	35,14 %
5 ($2n = 3x$)	2	4,65 %	29	78,38 %
23 ($2n = 3x$)	3	6,98 %	32	86,49 %
25 ($2n = 3x$)	2	4,65 %	34	91,89 %
66 ($2n = 3x$)	1	2,33 %	30	81,08 %
1 ($2n = 4x$)	7	16,28 %	32	86,49 %
2 ($2n = 4x$)	1	2,33 %	31	83,78 %
3 ($2n = 4x$)	1	2,33 %	31	83,78 %
4 ($2n = 4x$)	3	6,98 %	28	75,68 %
7 ($2n = 4x$)	1	2,33 %	30	81,08 %
16 ($2n = 4x$)	1	2,33 %	32	86,49 %
56 ($2n = 4x$)	8	18,60 %	32	86,49 %

3.4.1.4 Analyse des Vererbungsmodus tetraploider Genotypen anhand des Merkmals „Blütentyp“

Der Blütentyp ist in der Heidezüchtung von größtem Interesse. Das Merkmal „Knospenblütigkeit“ ist wirtschaftlich wertvoll, weil die Blüten länger ihren Zierwert behalten. Für die Analyse des Vererbungsmodus auf polyploidem Niveau wurden die polyploiden Nachkommen der freien Abblüte in „Einfachblüher“ und „Knospenblüher“ eingeteilt. In der Population 2008.177 traten fünf triploide (17,2 %) und 16 tetraploide Knospenblüher (4,5 %) auf. Auf diploidem Niveau wird das Merkmal der Knospenblütigkeit rezessiv vererbt (Borchert & Hohe 2009). Der Knospenblüher 'Maria' hat die genetische Konstitution „aa“ in Bezug auf den Blütentyp. Aufgrund früherer Kreuzungen ist bekannt, dass der Einfachblüher 'Perestroijka' homozygot („AA“) ist. Der einfachblühende tetraploide Genotyp '7705' ist vermutlich über unreduzierte Gameten entstanden und hat die daraus resultierende genetische Konstitution „AA aa“. Es wurde vermutet, dass das Merkmal Knospenblütigkeit auch auf polyploidem Niveau rezessiv vererbt wird.

Die Vererbung kann disom oder tetrasom erfolgen. Tetrasomie bedeutet eine freie Kombination aller homologen und homöologen Chromosomen. Für den Genotyp „AA aa“ resultiert daraus ein Spaltungsverhältnis von 35 : 1. Mit Hilfe des χ^2 -Tests wurde analysiert, ob das Spaltungsverhältnis von 341 : 16 (Einfachblüher : Knospenblüher) der tetraploiden Genotypen mit der 35 : 1-Spaltung einer tetrasomen Vererbung zusammenpasst. Für den Phänotyp Knospenblüher sind vier rezessive Allele notwendig. Der χ^2 -Test ergab mit 3,838 einen Wert, der knapp unter dem kritischen Wert von 3,841 liegt, die Hypothese wurde demzufolge nicht abgelehnt. Auf der anderen Seite wurde die Möglichkeit einer disomen Vererbung getestet. In Abhängigkeit von der genetischen Konstitution des Genotyps '7705' (Aa Aa oder AA aa) würde dies eine Spaltung von 15 : 1 (Aa Aa) oder eine fixierte Heterozygotie (AA aa) bedeuten. Da 16 Knospenblüher in der Nachkommenschaft auftraten, kann die fixierte Heterozygotie ausgeschlossen werden. Eine 15 : 1-Spaltung wurde nicht abgelehnt (χ^2 -Test-Wert: 1,905), ist aber unwahrscheinlich, weil die Elternpflanzen 'Maria' („aa“) und 'Perestroijka' („AA“) Knospenblüher bzw. homozygote Einfachblüher waren.

3.4.2 Interploide Kreuzungen

Um zu untersuchen, auf welche Weise Triploide erzeugt werden können, wurde ein Kreuzungsexperiment mit interploiden Kreuzungen durchgeführt (Projektarbeit von Aileen Gluschak, 2013, Universität Jena). Triploide sind in der Züchtung relevant, weil sie aufgrund einer gestörten Meiose häufig steril sind, was in Bezug auf Konkurrenz zwischen Züchtern als vorteilhaft gewertet werden kann.

Diploide, triploide und tetraploide Genotypen wurden frei miteinander kombiniert, um zu prüfen, ob sich Pflanzen unterschiedlicher Ploidiestufen in ihrer Fertilität unterscheiden und welche Ploidiestufen in den Nachkommenschaften auftreten. Pro Ploidiestufe wurden drei Genotypen als Samenträger (Knospenblüher) und zwei Genotypen als Pollenspender (Einfachblüher) verwendet (Tab. 47 im Anhang). Daraus ergaben sich 18 homoploide und 36 interploide Kreuzungsvarianten. Die Kreuzungen wurden nicht reziprok durchgeführt, weil als Samenträger Knospenblüher ausgewählt wurden. Denn bei Knospenblühern kann Selbstung ausgeschlossen werden und Kastration der Pflanzen ist nicht notwendig.

3.4.2.1 Pollenfertilität von Genotypen unterschiedlicher Ploidiestufen

Im Vorfeld der Kreuzungen wurde der Pollen der diploiden, triploiden und tetraploiden Bestäuberpflanzen analysiert (Projektarbeit von Aileen Gluschak, 2013, Universität Jena). Dabei wurde auch die Fertilität untersucht, die sich möglicherweise auf den Befruchtungserfolg auswirkt. Die Größe von jeweils 20 Pollenkörnern pro Genotyp (Ausnahme Genotyp 2008.177/25: n = 17) wurde gemessen und die Messwerte mittels einfaktorieller Varianzanalyse analysiert. Im Ergebnis zeigte sich, dass die Größe der Pollenkörner mit zunehmender diskreter Ploidiestufe signifikant anstieg (Abb. 25). Die diploiden Genotypen 'Long White' und 'Josephine' hatten durchschnittlich 565,81 μm^2 und 695,67 μm^2 große Pollenkörner. Ausschließlich auf diploider Stufe war ein signifikanter Unterschied auch zwischen den Genotypen von gleicher Ploidie vorhanden. Die Pollenkörner der triploiden Genotypen 2008.177/25 und 2008.177/451 waren im Durchschnitt 923,51 μm^2 und 959,73 μm^2 groß. Die tetraploiden Genotypen '7705' und 2008.177/2 wiesen durchschnittlich 1201,39 μm^2 und 1281,61 μm^2 große Pollenkörner auf.

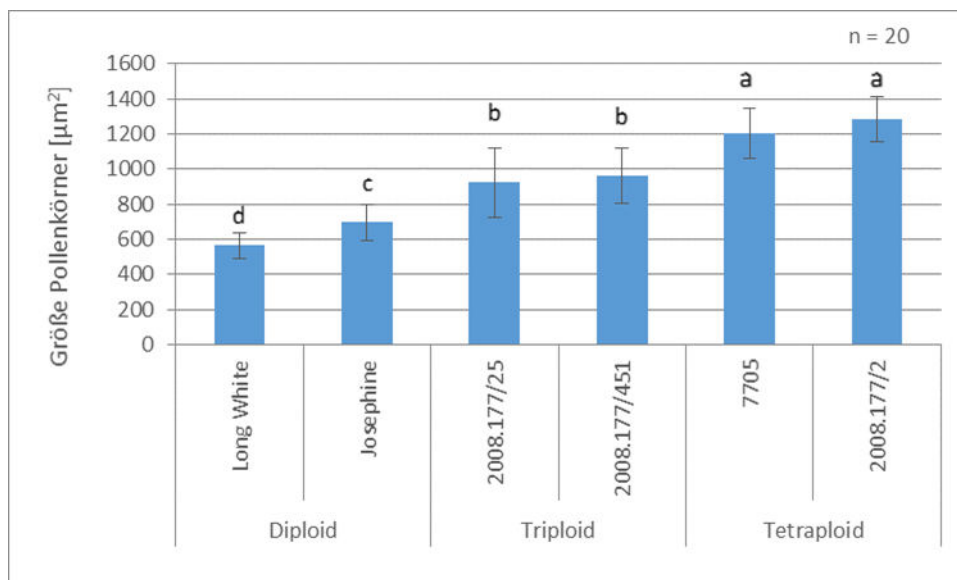


Abbildung 25: Durchschnitt der Größe von 20 einzelnen Pollenkörnern pro Genotyp; Ausnahme triploider Genotyp 2008.177/25: Bestimmung der Größe von 17 Pollenkörnern. Messung der Fläche der Pollenkörner. Einfaktorielle Varianzanalyse; F-Wert = 81,89, p = 0,00. Verschiedene Buchstaben a, b, c, d markieren signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten im Ergebnis des Tukey-Test's ($\alpha = 0,05$).

An jeweils 300 Pollenkörnern der gleichen einfachblühenden Genotypen wurde die Färbbarkeit mittels Fluoresceindiazetat (FDA) und somit die Fluoreszenz unter UV-Licht untersucht (Abb. 26). Je fluoreszierender die Pollenkörner in UV-Licht erscheinen, desto vitaler sind sie. Der Pollen der Diploiden erwies sich als sehr vital. Am geringsten war die Vitalität des Pollens der Triploiden. Die diploiden Genotypen 'Long White' und 'Josephine' zeigten durchschnittlich 79 % und 73 % leuchtende Pollenkörner. Bei den triploiden Genotypen 2008.177/25 und 2008.177/451 fluoreszierten im Durchschnitt 32 % und 21 % der Pollenkörner. Die tetraploiden Genotypen '7705' und 2008.177/2 zeigten durchschnittlich 54 % und 61 % gefärbte Pollenkörner.

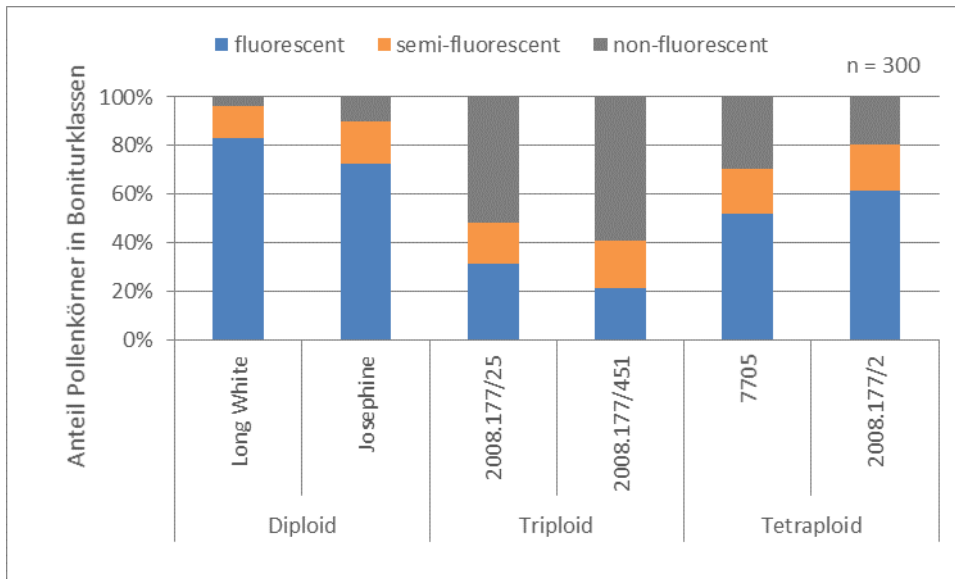


Abbildung 26: Färbbarkeit des Pollens mit Fluoresceindiazetat (FDA).

Bei denselben Genotypen wurde die Pollenkeimung *in vitro* untersucht. Pro Genotyp wurden 300 Pollenkörner studiert (Abb. 27). Die höchste Keimrate wies der Pollen der Tetraploiden auf, bei den Diploiden war sie niedriger, bei den Triploiden am geringsten. Die diploiden Genotypen 'Long White' und 'Josephine' zeigten durchschnittlich 9% und 18% keimende Pollenkörner. Bei den triploiden Genotypen 2008.177/25 und 2008.177/451 keimten im Durchschnitt 9% und 10% der Pollenkörner. Die tetraploiden Genotypen '7705' und 2008.177/2 wiesen durchschnittlich 47% und 28% keimende Pollenkörner auf. Die Diploiden und Tetraploiden bildeten im Gegensatz zu den Triploiden mehr lange (> 100 µm) als kurze (< 100 µm) Pollenschläuche.

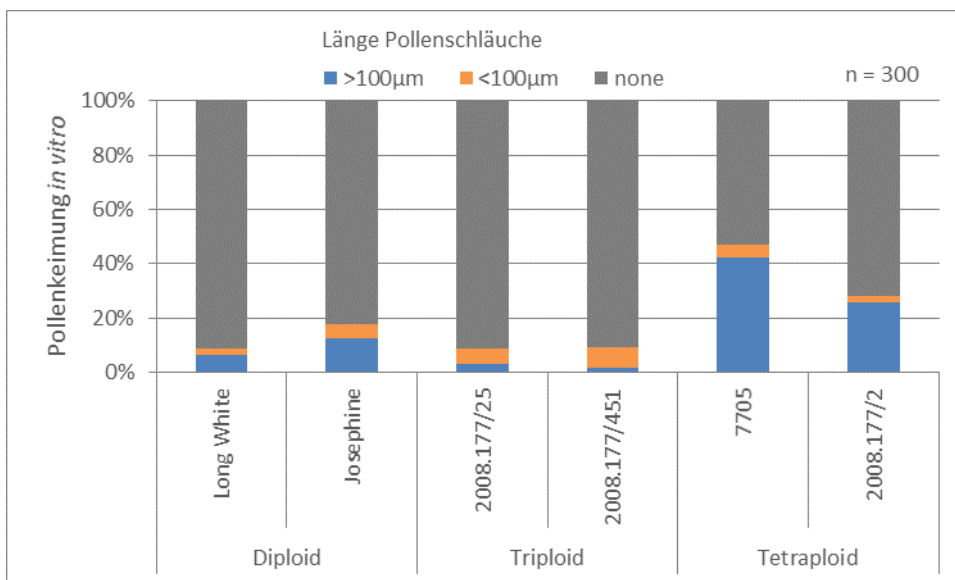


Abbildung 27: Keimrate des Pollens *in vitro*.

Der Unterschied in der Größe der Pollentetraden zwischen den diploiden, triploiden und tetraploiden Genotypen wurde in der mikroskopischen Analyse mit UV-Licht deutlich (Abb. 28). Es war eine positive Korrelation zwischen Ploidiestufe und Pollengröße vorhanden. Darüber hinaus gab es Unterschiede in der Färbbarkeit mit FDA. Die Diploiden zeigten die meisten und die Triploiden die wenigsten färbaren Pollenkörner.

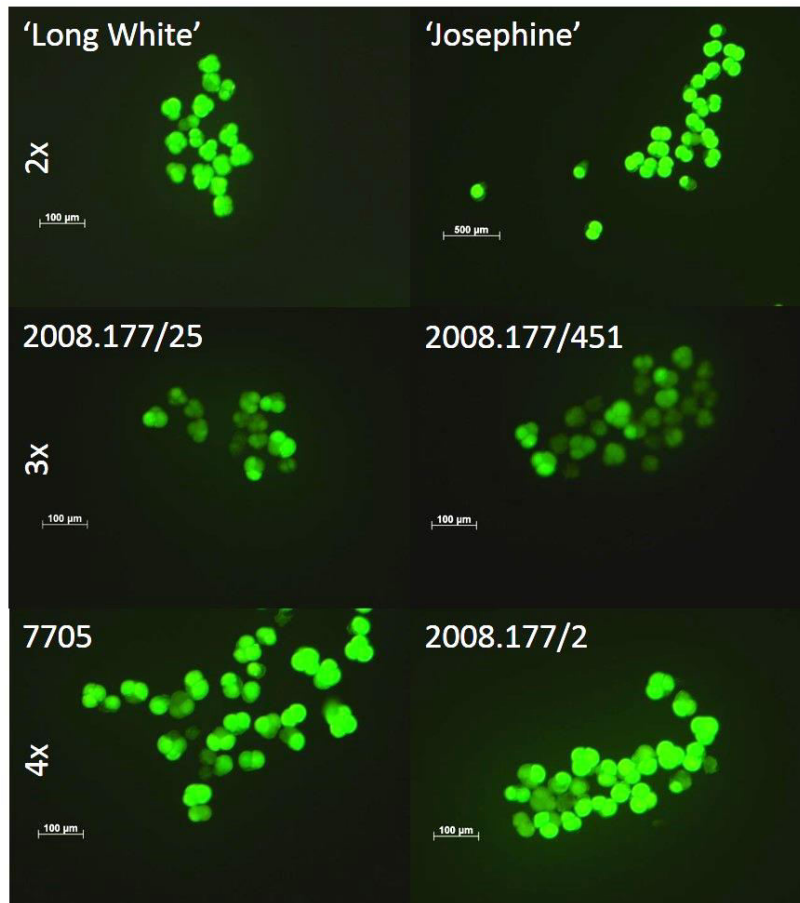


Abbildung 28: Mikroskopische Analyse der Pollentetraden der stamintenen Eltern 'Long White' und 'Josephine' (2x), 2008.177/25 und 2008.177/451 (3x) sowie '7705' und 2008.177/2 (4x). Die Genotypen unterscheiden sich in Größe und Färbbarkeit mittels FDA.

Es wurde außerdem auch die Pollenkeimung *in vivo* analysiert – der Anteil der Pollenschläuche, die 48 h nach der Bestäubung den Fruchtknoten erreichten. Durch eine Färbelösung mit Anilinblau leuchteten die Pollenschläuche unter UV-Licht hellblau. Dies wird beispielhaft für die Kreuzung 'Maria' × '7705' (2x × 4x) in Abb. 29 gezeigt.

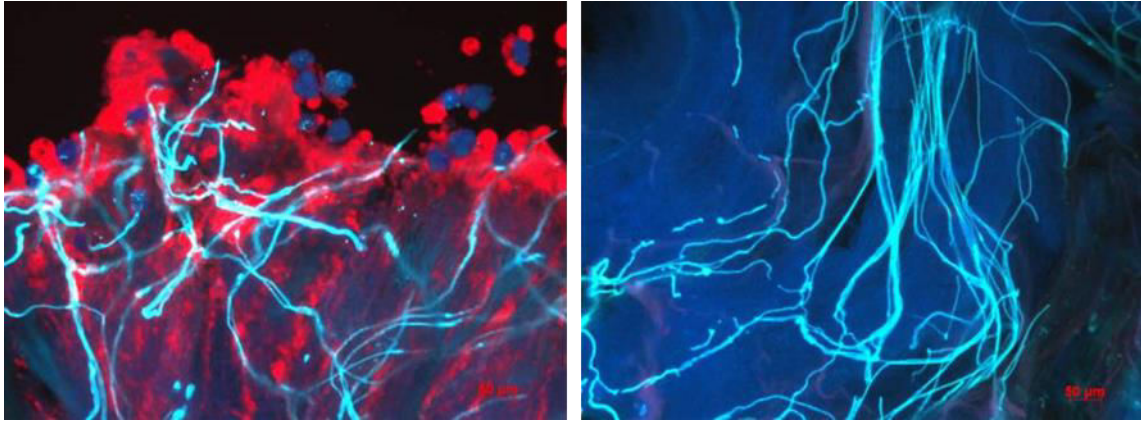


Abbildung 29: Quetschpräparate eines Gynözeums von Genotyp 'Maria' ($2n = 2x$) nach der Bestäubung mit Pollen von Genotyp '7705' ($2n = 4x$). Betrachtung unter UV-Mikroskop (Leica DM RM). Blau: Griffel, Pollen, rot: Narbgewebe, und hellblau: Pollenschläuche. Färbung nach Mahy und Jacquemart (1999).

Für diese Analyse wurden pro Genotyp-Kombination zehn Blüten bestäubt, also 60 pro Ploidie-Kombination. Bei der Bestäubung der diploiden Genotypen ('Ginkels Glorie', 'David Eason', 'Maria') mit dem Pollen der diploiden ('Long White', 'Josephine'), triploiden (2008.177/25, 2008.177/451) und tetraploiden Genotypen ('7705', 2008.177/2) waren 57 %, 63 % und 63 % der Pollenschläuche bis zum Fruchtknoten gewachsen (Abb. 30). Wurden die triploiden Genotypen ('Anke', 2008.177/330, 2008.177/382) mit dem Pollen der diploiden, triploiden und tetraploiden Genotypen bestäubt, ergaben sich Werte von 40 %, 13 % und 55 %. Bei der Bestäubung der tetraploiden Genotypen (2008.177/33, 119, 123) mit dem Pollen der diploiden, triploiden und tetraploiden Genotypen waren 38 %, 8 % und 13 % der Pollenschläuche bis zum Fruchtknoten gewachsen. Das Pollenschlauchwachstum war in den Diploiden am erfolgreichsten – unabhängig von der Ploidiestufe des Pollens.

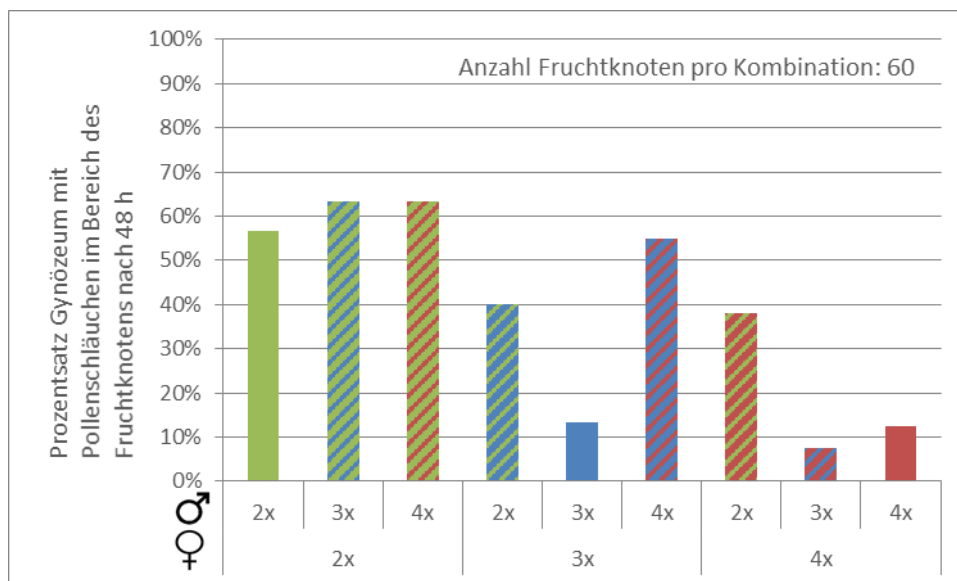


Abbildung 30: Untersuchung des Pollenschlauchwachstums; Prozentsatz an Pollenschläuchen im Bereich des Fruchtknotens 48 h nach Bestäubung.

3.4.2.2 Samenansatz und Keimfähigkeit

Nach den Kreuzungen wurden der Samenansatz, die Größe und die Keimfähigkeit des Saatguts untersucht (Projektarbeit von Aileen Gluschak, 2013, Universität Jena).

Pro Genotyp-Kombination wurden 20 Blüten von jeweils drei unterschiedlichen Pflanzen bestäubt. Aus sechs Genotyp-Kombinationen pro Ploidie-Kombination und neun Ploidie-Kombinationen ($2x \times 2x$, $2x \times 3x$, $2x \times 4x$, $3x \times 2x$, $3x \times 3x$, $3x \times 4x$, $4x \times 2x$, $4x \times 3x$, $4x \times 4x$) resultierten 360 Kreuzungen pro Ploidie-Kombination. Es wurden also insgesamt 3.240 Blüten bestäubt. Von der Kreuzung $2x \times 2x$ konnten 2141 Samen geerntet werden (Abb. 31). Der Samenansatz war bei Kreuzungen dieser Ploidie-Kombination größer als bei allen anderen Ploidie-Kombinationen. Die Kreuzung $2x \times 3x$ erbrachte 165 Samen, $2x \times 4x$ 119 Samen, $3x \times 2x$ null Samen, $3x \times 3x$ sieben Samen, $3x \times 4x$ 19 Samen, $4x \times 2x$ 31 Samen, $4x \times 3x$ 33 Samen und $4x \times 4x$ 91 Samen. Die diploiden weiblichen Eltern wiesen den größten, die triploiden weiblichen Eltern den geringsten Samenansatz auf.

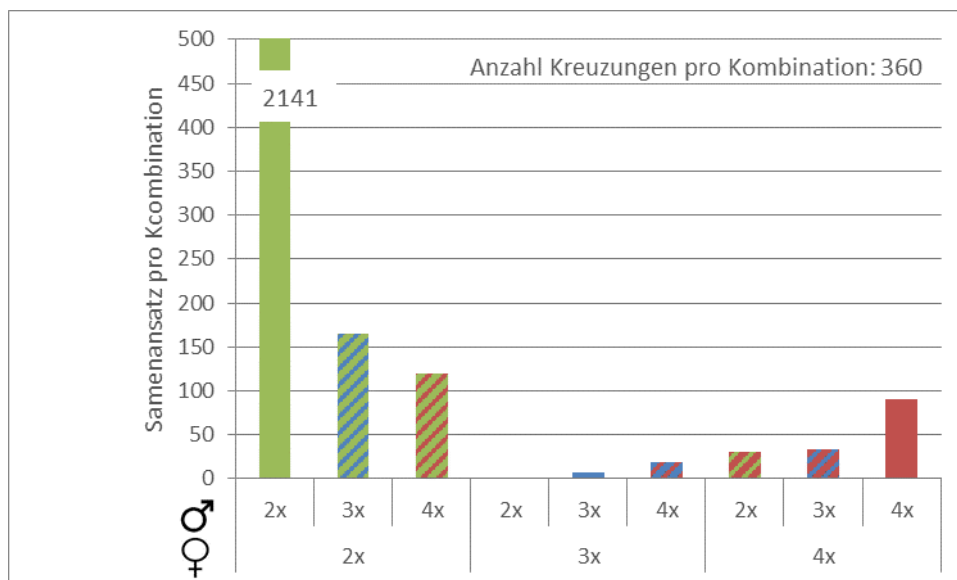


Abbildung 31: Samenernte pro Ploidie-Kombination.

Die Größe des Saatguts der Nachkommenschaften aus den interploiden Kreuzungen wurde gemessen (Abb. 32). Die größten Samen gingen mit $0,5011 \text{ mm}^2$, $0,3636 \text{ mm}^2$ und $0,3966 \text{ mm}^2$ aus den Kreuzungen $4x \times 2x$, $4x \times 3x$ und $4x \times 4x$ hervor. Die Samen aus den Kreuzungen $2x \times 2x$, $2x \times 3x$ und $2x \times 4x$ waren $0,1618 \text{ mm}^2$, $0,2450 \text{ mm}^2$ und $0,2330 \text{ mm}^2$ groß. Die Samen aus den Kreuzungen $3x \times 3x$ und $3x \times 4x$ erreichten $0,2696 \text{ mm}^2$ und $0,2716 \text{ mm}^2$. Mit erhöhter Ploidiestufe des weiblichen Eltern waren die Samen größer.

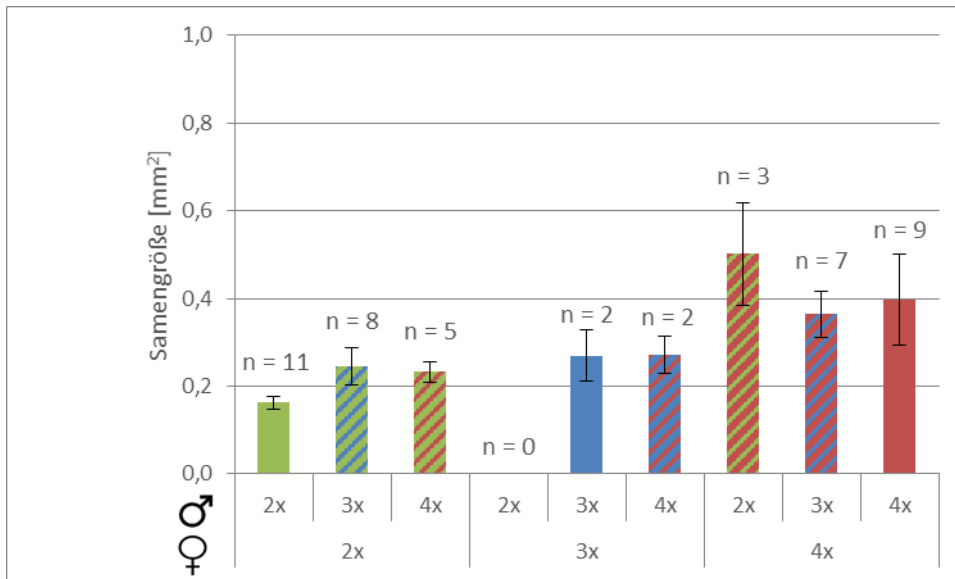


Abbildung 32: Durchschnitt der Samengröße. Messung der Fläche.

Das Saatgut aus den homoploiden und interploiden Kreuzungen von *C. vulgaris* wurde in Bezug auf die Keimrate untersucht (Abb. 33). Die Keimraten des Saatguts aus den homoploiden Kreuzungen waren höher als die aus den interploiden Kreuzungen gleicher weiblicher Eltern: 49,70 % für Diploide, 71,43 % für Triploide und 40,70 % für Tetraploide. Die Keimraten des Saatguts aus den interploiden Kreuzungen lagen niedriger: 24,58 % bei 2x × 3x, 3,39 % bei 2x × 4x, 47,37 % bei 3x × 4x, 22,58 % bei 4x × 2x und 24,00 % bei 4x × 3x.

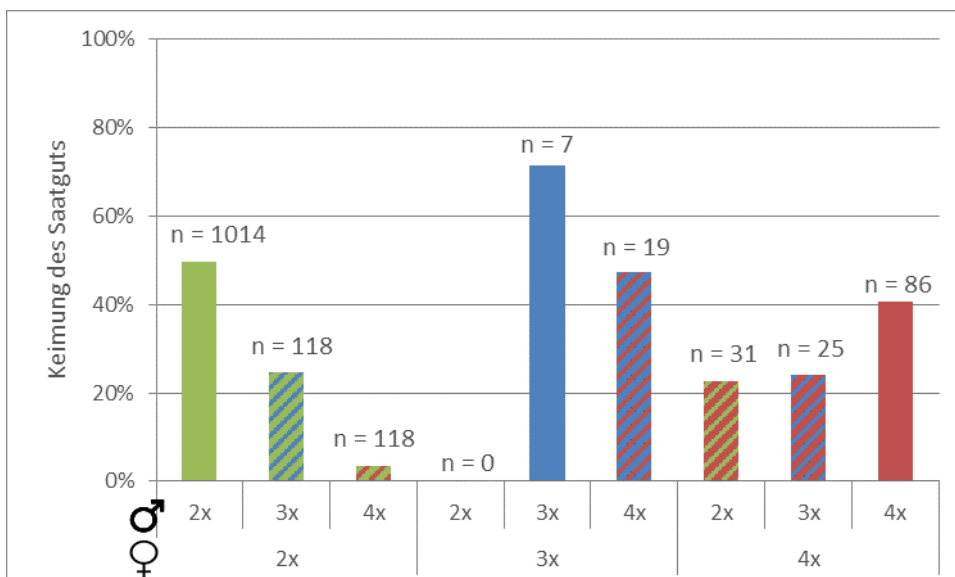


Abbildung 33: Keimraten des Saatguts.

3.4.2.3 Ploidiestufen der Nachkommen

Die Ploidiestufen der Sämlinge wurden durch Messung des DNA-Gehalts mittels FCM bestimmt (Abb. 34). Diploide konnten durch die Kreuzungen $2x \times 2x$, $2x \times 3x$, $2x \times 4x$ und $3x \times 3x$ erzeugt werden, die angestrebten Triploiden durch die Kreuzungen $4x \times 2x$ und $4x \times 4x$, jedoch nicht durch die Kreuzung $2x \times 4x$. Tetraploide konnten durch die Kreuzungen $2x \times 4x$, $3x \times 3x$, $3x \times 4x$ und $4x \times 2x/3x/4x$ generiert werden. Aneuploide Genotypen wurden in folgenden Kreuzungen gefunden: $2x \times 3x$, $3x \times 4x$, $4x \times 2x$ und $4x \times 3x$. Anhand der Verhältnisse der Peakpositionen von *C. vulgaris* und *P. hybrida* im Histogramm konnten bedingt aneuploide Genotypen identifiziert und den Ploidiestufen zugeordnet werden (Tab. 45 im Anhang). Es wurden hypodiploide, hyperdiploide, hypotriploide, hypertriploide und hypotetraploide Genotypen gefunden. Hypertetraploide Genotypen tauchten in den Nachkommenschaften nicht auf. Eine Selektion auf euploide Ploidiestufen war deutlich erkennbar.

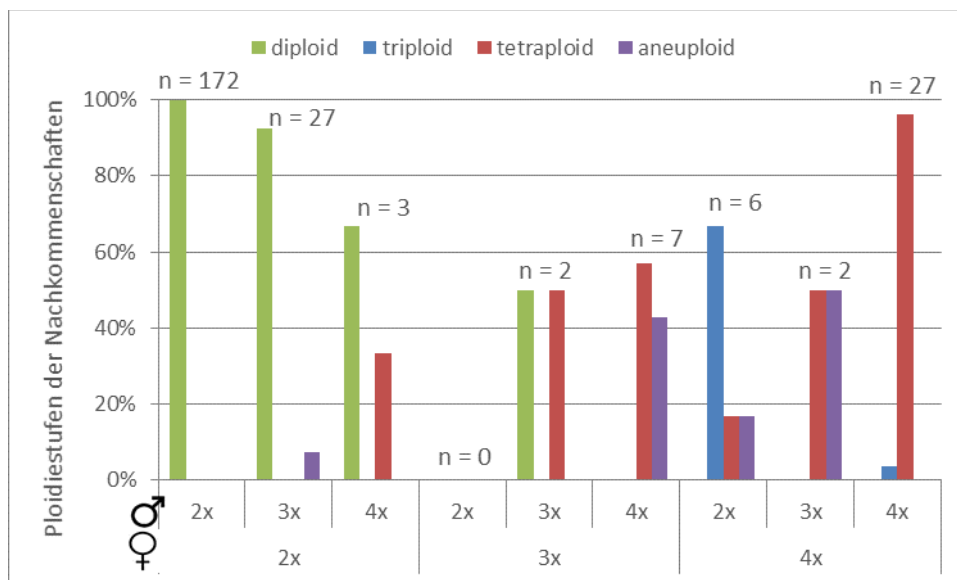


Abbildung 34: Ploidiestufen der Nachkommenschaften.

3.5 Fertilität Triploider

3.5.1 Mikroskopische Analyse der Pollenmeiose

Da bei Triploiden wegen ihres dreifach vorhandenen Chromosomensatzes eine Störung der Meiose wahrscheinlich ist, wurde die Fertilität triploider Genotypen von *C. vulgaris* untersucht. Eine Sterilität kann von züchterischem Interesse sein, weil die Pflanzen dann nicht von Konkurrenten für Züchtungsarbeiten verwendet werden können. Darüber hinaus sind samenlose Früchte wirtschaftlich wertvoll.

Die Antheren aus 60 Blütenknospen von jeweils 15 Genotypen wurden hinsichtlich Pollenmutterzellen während der meiotischen Zellteilung mit sichtbaren Chromosomen untersucht. Pro Ploidiestufe wurden fünf Genotypen (Tab. 39) analysiert und 300 Blütenknospen verwendet. Bei den Genotypen 2008.177/5 ($2n = 3x$) und 2008.177/3 ($2n = 4x$) konnten die Chromosomen in den Pollenmutterzellen nicht sichtbar gemacht werden. Ausschließlich in Genotyp 2008.177/451 ($2n = 3x$) konnten alle Meiosephasen detektiert werden.

Tabelle 39: Meiosephasen, die bei den Untersuchungen an Pollenmutterzellen sichtbar gemacht werden konnten. Pro Genotyp wurden die Antheren aus 60 Blütenknospen analysiert ($n = 60$). LW: Sorte 'Long White', Population 2008.177 und tetraploider Genotyp '7705'. Blau markierte Meiosephasen sind bildhaft in der Arbeit dargestellt.

Ploidie-Stufe	Geno-Typ	Pro-phase I	Meta-phase I	Ana-phase I	Telo-phase I	Inter-phase II	Pro-phase II	Meta-phase II	Ana-phase II	Telo-phase II	Cyto-kinese
Diploid	LW	x	x	x	x	x	x	x	–	–	–
	F1(2)	x	x	x	x	x	x	–	–	–	–
	251	x	x	x	x	–	–	–	–	–	–
	360	x	x	x	x	–	–	–	–	–	–
	455	–	x	x	x	–	–	–	–	–	x
Triploid	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	25	x	x	x	–	x	–	–	–	–	–
	66	–	–	x	x	–	–	–	–	–	x
	118	–	x	–	–	x	–	–	–	–	–
	451	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Tetraploid	'7705'	x	x	–	–	–	x	x	–	x	x
	1	–	–	–	–	x	x	x	x	x	x
	2	–	x	x	–	–	–	–	–	–	x
	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	11	x	x	x	–	–	–	–	–	–	x

In den Pollenmutterzellen der diploiden Genotypen konnten einzelne Meiosephasen sichtbar gemacht und für die Genotypen 'Long White', F1(2) und 2008.177/455 zusammengestellt werden (Abb. 35). Zu Beginn der Meiose ist ein Chromosomenknäuel erkennbar, bei dem sich in der Prophase I die Chromosomen optisch herausdifferenzieren und immer mehr kondensieren (Abb. 35A). In der darauffolgenden Metaphase I ordnen sich die gepaarten Chromosomen in der Äquatorialebene an (Abb. 35B). In der Anaphase I werden die Chromosomen getrennt und zu den Polen gezogen (Abb. 35C). In der Telophase I liegt dann jeweils nur ein Chromosom jeden Typs am entsprechenden Pol (Abb. 35D). Die Wanderung der Chromosomen an die Spindelpole ist abgeschlossen. In der ursprünglichen diploiden Zelle sind zwei haploide Chromosomengruppen vorhanden.

In der Interphase II kondensieren die Chromosomen erneut (Abb. 35E). Nach der Kondensation lösen sich Kernmembran und Nucleolen auf, die Kernspindel bildet sich und die Chromosomen werden deutlicher sichtbar (Prophase II, Abb. 35F). Daraufhin werden die Chromosomen wieder in der Äquatorialebene angeordnet (Abb. 35G). Über den Spindelapparat werden während Anaphase II die Chromatiden polwärts gezogen. In der darauffolgenden Telophase II sind Chromatiden an den Polen angekommen. Während der Cytokinese werden die Zellmembranen ergänzt und die Zellteilung wird vervollständigt (Abb. 35H).

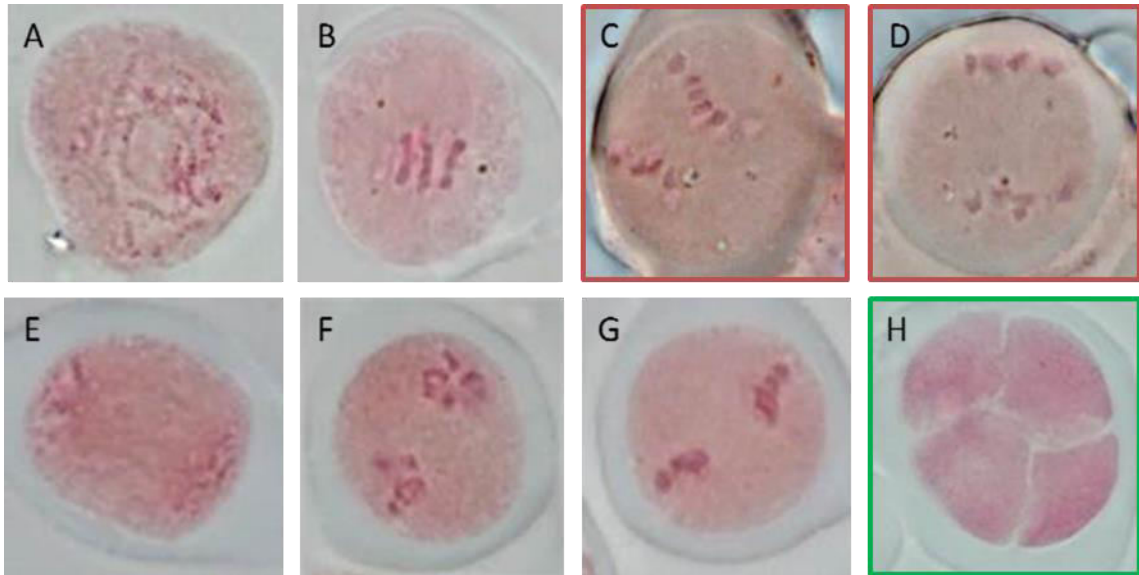


Abbildung 35: Meiosephasen diploider Genotypen: (A) Prophase I ('Long White'), (B) Metaphase I ('Long White'), (C) Anaphase I (F1(2)), (D) Telophase I (F1(2)), (E) Interphase II ('Long White'), (F) Prophase II ('Long White'), (G) Metaphase II ('Long White'), (H) Cytokinese (2008.177/455). 1000-fache Vergrößerung. Unterschiedliche Rahmenfarben markieren verschiedene Genotypen.

In den Pollenmutterzellen des triploiden Genotyps 2008.177/451 konnten alle Meiosephasen sichtbar gemacht werden (Abb. 36A–R). Während der Chromosomentrennung in der ersten Reduktionsteilung waren Störungen erkennbar. Chromosomen, ohne das jeweilige homologe Äquivalent, verblieben in der Mitte der Zelle (Abb. 36F–L).

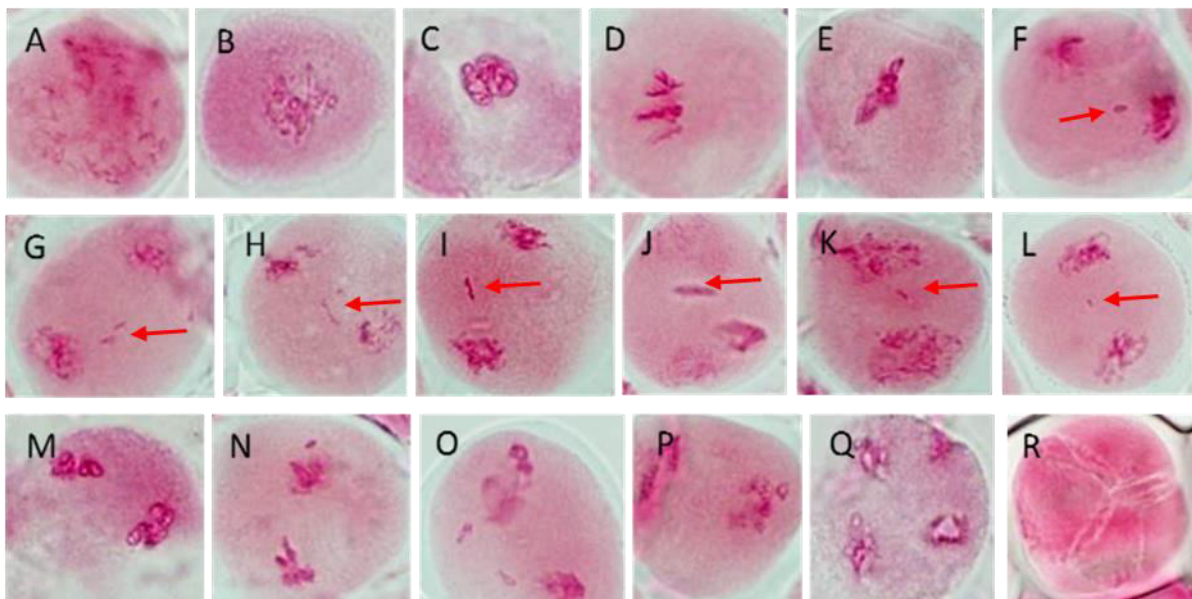


Abbildung 36: Meiosephasen des triploiden Genotyps 2008.177/451: Prophase I (A–C), Metaphase I (D), Anaphase I (E), Telophase I (F–L), Interphase II (M), Prophase II (N), Metaphase II (O), Anaphase II (P), Telophase II (Q), Cytokinese (R). 1000-fache Vergrößerung. Univalente mit rotem Pfeil markiert.

In den Pollenmutterzellen der tetraploiden Genotypen konnte die Meiose während Prophase I (Abb. 37A), Metaphase I (Abb. 37B), Interphase II (Abb. 37C), Prophase II (Abb. 37D), Metaphase II (Abb. 37E), Anaphase II (Abb. 37F), Telophase II (Abb. 37G) und Cytokinese (Abb. 37H) visualisiert und für die Genotypen '7705' und 2008.177/1 zusammengestellt werden. Es waren keine Meiosestörungen zu beobachten.

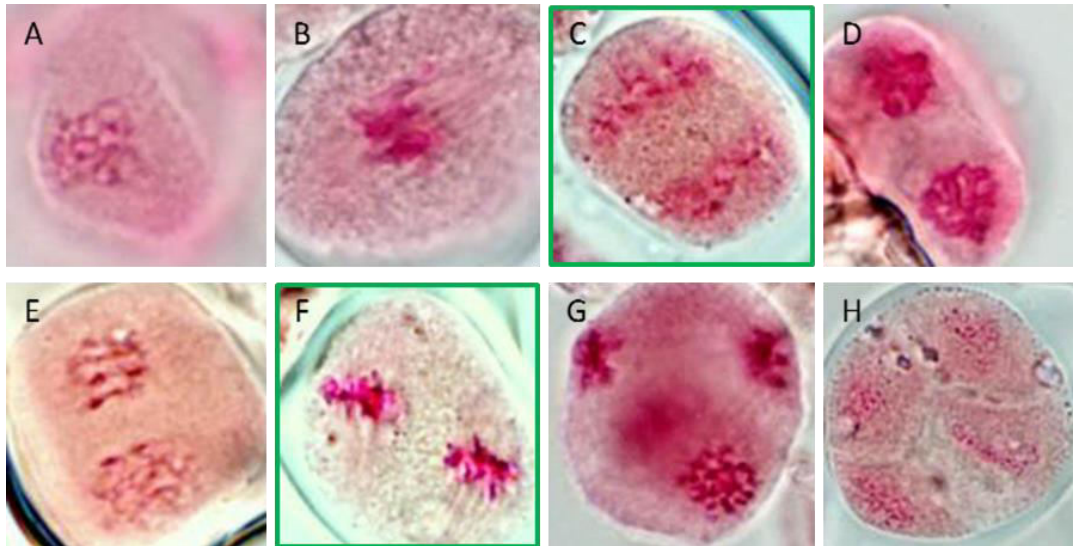


Abbildung 37: Meiosephasen tetraploider Genotypen: (A) Prophase I ('7705'), (B) Metaphase I ('7705'), (C) Interphase II (2008.177/1), (D) Prophase II ('7705'), (E) Metaphase II ('7705'), (F) Anaphase II (2008.177/1), (G) Telophase II ('7705'), (H) Cytokinese ('7705'). 1000-fache Vergrößerung. Unterschiedliche Rahmenfarben markieren verschiedene Genotypen.

Die Vitalität des Pollens (Abb. 38) wurde an den gleichen Genotypen bestimmt, an denen die Meiose mikroskopisch analysiert wurde. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich die Meiosestörung der Triploiden auf die Pollenvitalität auswirkt. Der Pollen wurde mit FDA angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht (200 Pollenkörner pro Genotyp). Die Pollenkörner der diploiden Genotypen zeigten mit 60 % bis 85 % voll fluoreszierender Pollenkörner die höchste Vitalität, etwas weniger vital war der Pollen der tetraploiden Genotypen mit 36 % bis 78 % voll fluoreszierender Pollenkörner. Bei den triploiden Genotypen erreichte der Anteil fluoreszierender Pollenkörner nur Werte von 7 % bis 40 %. Durchschnittlich lag die Pollenvitalität bei 72 % für Diploide, 23 % für Triploide und 57 % für Tetraploide.

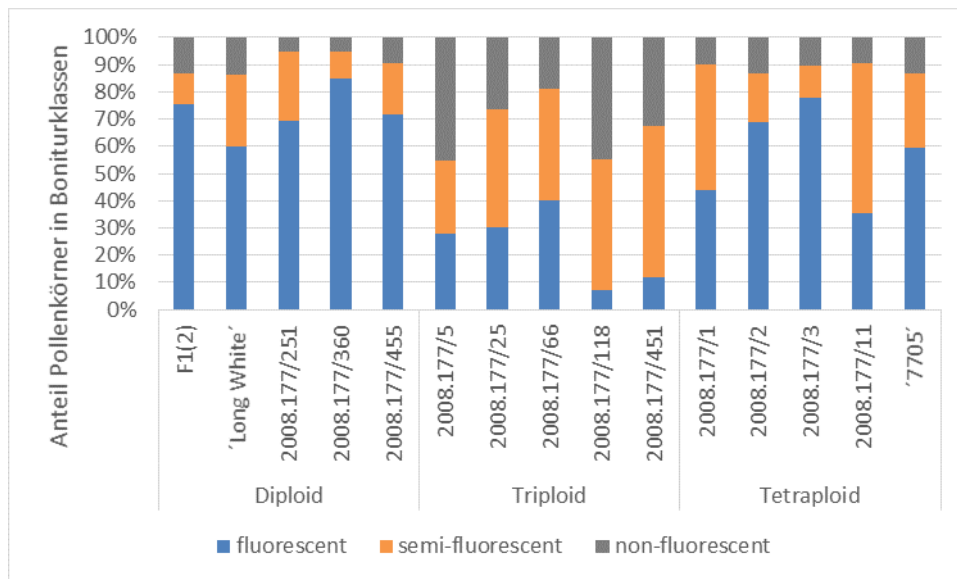


Abbildung 38: Färbbarkeit des Pollens von fünf diploiden, fünf triploiden und fünf tetraploiden Genotypen mit FDA. Pro Genotyp wurden 200 Pollenkörner analysiert (n = 200).

3.5.2 Analyse der Nachkommenschaft einer freien Abblüte von triploiden Genotypen

Um die Fertilität Triploider als Samenträger zu prüfen, wurden die Nachkommenschaften freier Abblüten untersucht. Eine Fertilität zeigte sich durch Samenansatz bei den triploiden Genotypen 2008.177/5, 2008.177/299, 2008.177/374, 2008.177/108 und 2008.177/204. Es wurde Saatgut geerntet, sterilisiert und *in vitro* bzw. im Gewächshaus zum Keimen gebracht (Tab. 40). Bei Triploiden ist die Bildung von haploiden, aneuploiden und diploiden Gameten möglich. Die Polleneltern waren unbekannt. Mittels FCM wurden diploide, triploide, tetraploide und aneuploide Pflanzen in den Nachkommenschaften nachgewiesen (Tab. 40). Die freien Abblüten der fünf Genotypen zusammengefasst ergaben 73 % euploide und 27 % aneuploide Genotypen (Tab. 40). Von den euploiden Nachkommen waren 77,6 % diploid (n = 66), nur 4,7 % triploid (n = 4) und 17,6 % der Nachkommen tetraploid (n = 15). Von den 32 aneuploiden Sämlingen waren 16 hyperdiploid und zehn waren hypertriploid. Nur jeweils zwei Sämlinge waren hypodiploid, hypotriploid und hypotetraploid. Es wurden keine hypertetraploiden Sämlinge gefunden.

Tabelle 40: Freie Abblüten der triploiden Genotypen 5, 108, 204, 299 und 374 der Population 2008.177. Ernte der Samen, Aussaat im Gewächshaus (GWH) bzw. *in vitro*, Keimung des Saatguts und Wachstum der Keimlinge. Analyse der Ploidiestufen mittels FCM (reine Ploidiestufen [Euploidie] sind fett markiert im Gegensatz zur Aneuploidie).

Genotyp	Anzahl Samen	Aussaat	Anzahl Sämlinge	Keimrate	Ploidiestufen
2008.177/005	100	GWH	39	39 %	27 diploid, 1 triploid, 4 tetraploid 6 hyperdiploid, 1 hypotriploid
2008.177/299	70	GWH	26	37 %	8 diploid, 2 triploid, 8 tetraploid 2 hyperdiploid, 1 hypotriploid, 4 hypertriploid, 1 hypotetraploid
2008.177/374	4	GWH	3	75 %	2 hypodiploid, 1 hypotetraploid
2008.177/108	143	<i>in vitro</i>	43	30 %	30 diploid, 1 triploid, 3 tetraploid 6 hyperdiploid, 3 hypertriploid
2008.177/204	29	<i>in vitro</i>	6	21 %	1 diploid 2 hyperdiploid, 3 hypertriploid

Die Ploidiestufen der Nachkommen wurden graphisch dargestellt (Abb. 39). Dabei wurden die Aneuploiden den jeweiligen Euploiden zugeordnet: diploid ($n = 84$), triploid ($n = 16$), tetraploid ($n = 17$). Es wurden 36 Kontrollmessungen mit diploidem Laubmaterial der sechs Genotypen 'Adrie', 'Alicia', F1(2), 'Melanie', 'Silver Knight' und 'Wickwar Flame' durchgeführt. Die Verhältnisse der Peakpositionen von diploiden *C. vulgaris* und der Referenz *P. hybrida* variierten von 0,34 bis 0,42 mit einem mittleren Wert der Verteilung (Median) von 0,37.

Die Diploiden der freien Abblüten zeigten Peakverhältnisse von 0,26 bis 0,47 und einem Median von 0,395, die Triploiden Peakverhältnisse von 0,51 bis 0,64 (Median: 0,63) und die Tetraploiden Peakverhältnisse von 0,67 bis 0,78 (Median: 0,71). Alle 117 Genotypen zusammengefasst ergaben bei den Verhältnissen der Peakpositionen von *C. vulgaris* und *P. hybrida* ein Minimum von 0,26, ein Maximum von 0,78 und einen medianen Wert von 0,41. Damit wurde deutlich, dass die meisten Nachkommen diploid und hyperdiploid waren. Verglichen mit den Kontrollmessungen des diploiden Laubmaterials („Diploide“) zeigte sich eine große Streuung der Daten der freien Abblüten (Abb. 39).

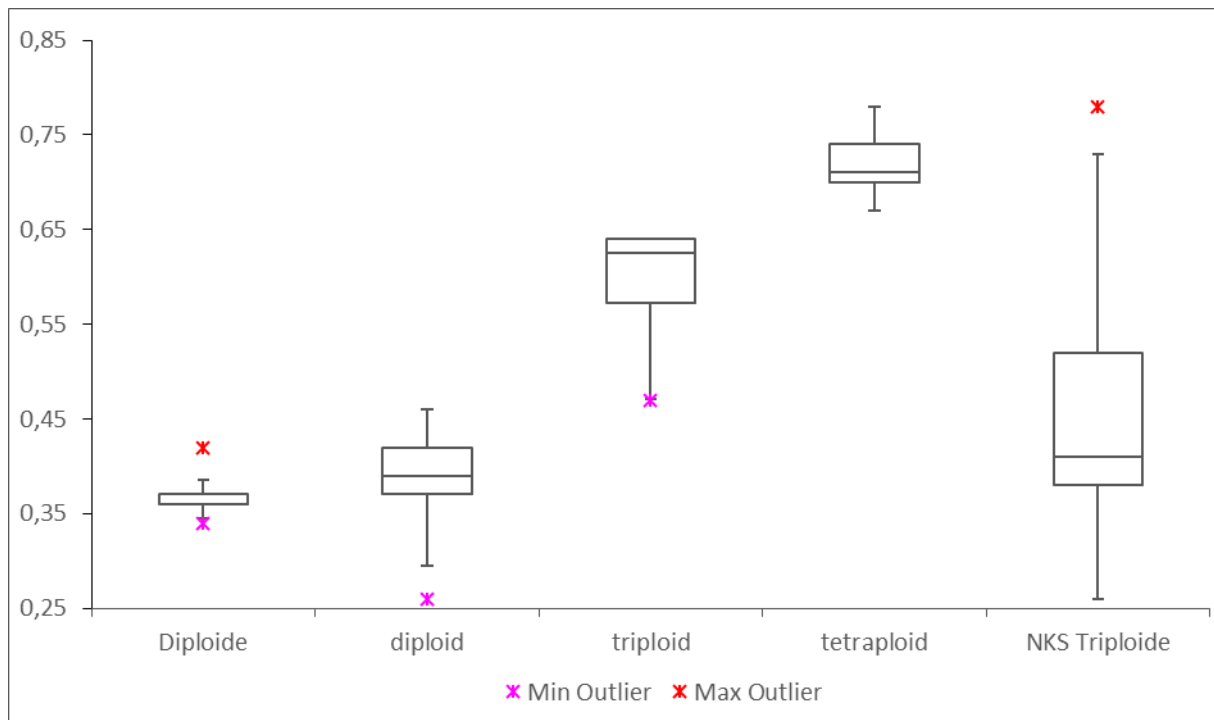


Abbildung 39: Box-Plot-Darstellung (Vertex42 LLC, 2009) der Verhältnisse der Peakpositionen resultierend aus FCM-Messungen von *C. vulgaris* und *P. hybrida* mit DAPI. Kontrolle „Diploide“, in der diploides Laubmaterial (n = 36) von *C. vulgaris* mit der Referenz *P. hybrida* gemessen wurde. 117 Messungen der Nachkommenschaften der freien Abblüten der triploiden Genotypen (NKS Triploide): diploid (n = 84), triploid (n = 16), tetraploid (n = 17). *Ausreißer oberhalb und unterhalb der nicht extremen Werte des Datensatzes.

3.6 Genotypenidentifikation anhand von SSR-Markern

Da Polypleide auf Basis somatischer Polyploidisierung potentiell abgeleitete Sorten (EDV: „Essentially Derived Varieties“) darstellen, wurde ein verbessertes System zur Genotypenidentifikation bei *C. vulgaris* anhand von SSR-Markern etabliert. Die im Folgenden beschriebenen Analysen folgen der Methodik von Ibañez und Eeuwijk (2003), die ein System zur Sortenidentifikation mittels SSR-Markern für Reben (Sorten für Tafeltrauben-Nutzung) erarbeiteten.

Die Allelfrequenzen der elf etablierten SSR-Marker in der Subpopulation „26 Sorten im Handel“ (Kap. 3.2.1, Tab. 19) wurden mittels der populationsgenetischen Computerprogramme *Arlequin* (Excoffier et al. 2005) und *Genepop* (Raymond & Rousset 1995, Rousset 2008) auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) und das Kopplungsgleichgewicht (LE) getestet. Die 26 Sorten repräsentieren den Genpool der europäischen Züchter.

Nach Bonferroni-Korrektur wegen multipler Tests wurde zum Signifikanzniveau von $\alpha = 0,0045$ getestet ($\alpha = 0,05/11 = 0,0045$). Bei $p < 0,0045$ wichen die Allelfrequenzen eines SSR-Markers signifikant vom HWE ab. Durch die beiden Analyseprogramme ergaben sich die gleichen Ergebnisse in Bezug auf die Signifikanz, obwohl sich die p-Werte geringfügig unterschieden (Unterschied in der Anzahl der Umwandlungsschritte im Markov-Reihenalgorithmus [*Arlequin*: 100.000, *Genepop*: 10.000]). Die Allelfrequenzen der SSR-Loci Cv29, DG70, DG71, Ecoc142 und Mg59 zeigten einen signifikanten Unterschied vom HWE (Tab. 41).

Tabelle 41: Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Unabhängigkeit der Allele innerhalb eines Locus) mittels *Arlequin* und *Genepop* anhand von jeweils 26 Genotypen. Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $\alpha = 0,05/11 = 0,0045$; *signifikanter Unterschied. Berechnung bei beiden Methoden mit dem Markov-Reihenalgorithmus. Schritte in Markov-Reihe/Wiederholungen: 1.000.000; Umwandlungsschritte: *Arlequin*: 100.000, *Genepop*: 10.000.

SSR-Locus	p-Wert <i>Arlequin</i>	p-Wert <i>Genepop</i>
Cv29	0,00000*	0,0000*
DA6	0,72622	0,7105
DC109	0,34257	0,3455
DC114	0,05439	0,0567
DG2	0,80287	0,7865
DG70	0,00083*	0,0016*
DG71	0,00293*	0,0044*
DG105	0,04469	0,0457
Ecoc108	0,17276	0,1612
Ecoc142	0,00189*	0,0017*
Mg59	0,00179*	0,0018*

Darüber hinaus wurden die elf SSR-Marker mit *Arlequin* auf Unabhängigkeit der Allele zwischen den Loci getestet, was als Kopplungsgleichgewicht (LE) bezeichnet wird. Ein Kopplungsungleichgewicht (LD) ist dann vorhanden, wenn zwei Allele benachbarter Genloci häufiger oder seltener als Haplotyp erscheinen, als es das Produkt ihrer Allelhäufigkeiten erwarten lässt. Ein signifikantes LD war zwischen den Loci Cv29 und DG2 vorhanden (Tab. 42). Bei allen anderen Loci ergab sich beim paarweisen Vergleich ein LE.

Tabelle 42: Test auf Kopplungsgleichgewicht (LE) mittels *Arlequin*: Unabhängigkeit der Allele zwischen den SSR-Loci. Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $\alpha = 0,05/15 = 0,0033$.

Locus	Cv29	DA6	DC109	DC114	DG2	DG70	DG71	DG105	Ecoc108	Ecoc142	Mg59
Cv29	*	JA	JA	JA	NEIN	JA	JA	JA	JA	JA	JA
DA6	JA	*	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA
DC109	JA	JA	*	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA
DC114	JA	JA	JA	*	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA
DG2	NEIN	JA	JA	JA	*	JA	JA	JA	JA	JA	JA
DG70	JA	JA	JA	JA	JA	*	JA	JA	JA	JA	JA
DG71	JA	JA	JA	JA	JA	JA	*	JA	JA	JA	JA
DG105	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	*	JA	JA	JA
Ecoc108	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	*	JA	JA
Ecoc142	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	*	JA
Mg59	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	*

Wegen des signifikanten LD zwischen den SSR-Loci Cv29 und DG2 und der signifikanten Abweichung der Allelfrequenzen des Locus Cv29 vom HWE, wurde dieser aus der weiteren Analyse herausgenommen. Die Allelfrequenzen der sechs SSR-Marker DA6, DC109, DC114, DG2, DG105 und Ecoc108 erfüllten HWE und LE.

Diese sechs SSR-Marker konnten für die Berechnung der Übereinstimmungs-Wahrscheinlichkeit verwendet werden – die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Sorten des Vergleichssets der 26 Proben bei Untersuchung mit den sechs SSR-Markern ein identisches Bandenmuster zeigen. Diese Wahrscheinlichkeit ist die Genotypfrequenz, die sich aus der Allelfrequenz ergibt. Die Genotypfrequenzen der sechs Loci wurden miteinander multipliziert. Die höchste Wahrscheinlichkeit betrug 0,6 % für die Sorte 'Dark Beauty'. Die Möglichkeit, dass zwei Sorten aus dem Probenstet im SSR-Bandenmuster identisch sind, betrug 1 : 1758 (Tab. 52 im Anhang). Die Verwendung der etablierten SSR-Marker ist durch die geringe Übereinstimmungs-Wahrscheinlichkeit eine solide Grundlage für die Differenzierung von Genotypen.

Die höchste Genotypfrequenz eines einzelnen SSR-Markers ist ein Hinweis auf die Differenzierung des verwendeten Sortenspektrums. Je geringer die Frequenz ist, desto präziser ist die Differenzierung. Für SSR-Locus Ecoc108 ergab sich eine im Vergleich geringste Frequenz von 0,036 für die Sorte 'Dark Beauty' (Tab. 51 im Anhang). D. h. bei Anwendung des SSR-Markers Ecoc108 lag die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Sorten aus dem Vergleichsset ein identisches SSR-Bandenmuster aufweisen, nur bei 3,6 %.

Das aufgrund der besonderen EDV-Problematik bei somatischer Polyploidisierung etablierte System wurde angewendet, um Sorten zu prüfen, die in der Vergangenheit zu Rechtsstreitigkeiten führten. Die Hypothesen lauteten, dass die Sorten 'Anette' und 'Sandy' Sports der Sorte 'Melanie' sind und 'Anneliese' ein Sport von 'Annegret' ist. Es wurde vermutet, dass es sich bei 'Fritz Kircher' und 'CV7', bei 'Karla' und 'Venetia' sowie bei 'Minka' und 'Miranda' jeweils um die gleichen Genotypen handelt. Eine Sorte wurde bei 100 % Ähnlichkeit im SSR-Bandenmuster als EDV beurteilt (aufgrund der berechneten geringen Übereinstimmungs-Wahrscheinlichkeit). Die Sorten 'Annegret' und 'Anneliese' zeigten bei Auswertung der in dieser Analyse neun polymorphen SSR-Marker Cv29, DG2, DG105, DG70, DG71, DC114, Ecoc108, Ecoc142 und Mg59 identische Allele, daher kann 'Anneliese' durchaus eine im Wesentlichen abgeleitete Sorte von 'Annegret' sein (Tab. 43). Eine hohe genetische Ähnlichkeit zeigten auch die Sorten 'Melanie', 'Anette' und 'Sandy'. Bei den Sorten 'Fritz Kircher', 'CV7', 'Karla', 'Venetia', 'Minka' und 'Miranda' erwies sich die Ähnlichkeit als deutlich geringer.

Tabelle 43: Identifizierung von „Essentially Derived Varieties“ in *C. vulgaris* mittels SSR-Markern. EDV-Identifikation bei einer genetischen Ähnlichkeit im SSR-Bandenmuster von 100 % zur vergleichenden Sorte. Fette Markierung bei positivem Test auf EDV: 'Annegret' – 'Anneliese'.

Sorten	Vergleich mittels SSR-Marker
'Melanie' – 'Anette'	94,44 %
'Melanie' – 'Sandy'	88,89 %
'Annegret' – 'Anneliese'	100,00 %
'Fritz Kircher' – 'CV7'	55,56 %
'Karla' – 'Venetia'	61,11 %
'Minka' – 'Miranda'	44,44 %

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung von Pflanzen unterschiedlicher Ploidiestufen

4.1.1 Morphologische Unterschiede

Polyploide weisen häufig vergrößerte Zellen und größere Pflanzenorgane auf (Blakslee & Avery 1937; Clausen et al. 1945; Straub 1950). Die Zunahme der Pflanzenorgangröße mit erhöhter Ploidiestufe ist aber in der Regel weder linear noch konstant. Tsukaya (2013) zeigte für *Arabidopsis*, dass eine Tetraploidisierung von Genotypen nicht in einer Verdopplung des Zellvolumens resultiert. Die Zellgrößen von Laubblättern, Petalen und Pollenkörnern verschiedener Genotypen von *Arabidopsis* wurden vor und nach der Genomverdopplung gemessen und zeigten Unterschiede im Größenverhältnis tetraploid/diploid von 1,22–2,73, 1,28–2,93 und 1,06–2,16. Tsukaya (2013) folgerte daraus, dass Zellgröße, Zellfunktion und Ploidiestufe nicht direkt miteinander assoziiert sind. Genetische Regulierungen, der Genotyp und andere unbekannte Faktoren scheinen Zellgrößen zu beeinflussen, welche nur indirekt von der Ploidiestufe abhängen. Bei *A. thaliana* ist darüber hinaus das „high-ploidy syndrome“ zu beobachten, denn Oktoploide sind deutlich kleiner als Tetraploide und sogar als Diploide (Tsukaya 2008). Um die morphologischen Unterschiede diploider, triploider und tetraploider Pflanzen von *C. vulgaris* zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Größenunterschiede zwischen Pflanzenorganen der drei Ploidiestufen bestimmt. Die Organgrößen korrelierten positiv mit der Ploidiestufe. Da die morphologischen Untersuchungen aber nicht einheitlich mit denselben Genotypen durchgeführt wurden, können die Größenunterschiede zwischen Pflanzenorganen der drei Ploidiestufen nicht nur durch die Ploidie, sondern auch durch Verwendung unterschiedlicher Genotypen zustande kommen.

Die Daten der Blattlänge der Diploiden, Triploiden und Tetraploiden unterschieden sich signifikant voneinander. Zwischen den Diploiden, Triploiden und Tetraploiden war in Bezug auf die Blattbreite aber kein signifikanter Unterschied vorhanden. Das macht sich bei polyploiden Pflanzen von *C. vulgaris* in schlankeren Blättern bemerkbar. Bei der nah verwandten Gattung *Rhododendron* beobachteten Paden et al. (1990) dagegen eine Vergrößerung des Breiten-Längen-Verhältnisses von der diploiden zur tetraploiden Stufe. Auch die Größe der Sepalen von *C. vulgaris* korrelierte positiv mit der Ploidiestufe. Für die Züchtung von *C. vulgaris* sind die größeren Blüten der polyploiden Pflanzen eine attraktive Möglichkeit, weil so ihre Farbwirkung verstärkt wird. Obwohl bei *C. vulgaris* oft makroskopisch zwischen Di- und Polyploiden differenziert werden konnte, wie beispielhafte Bilder von Laubblättern und Blüten der diploiden Sorte 'Carmen' und des tetraploiden Genotyps '7705' erkennen ließen, zeigten die Messwerte in Bezug auf die untersuchten Ploidiestufen große Überlappungen. Daher kann bei *C. vulgaris* die Ploidiestufe anhand der Größe von Laubblättern und Sepalen nicht sicher ermittelt werden.

Die Analyse der Stomatalänge wurde als einfache und kostengünstige Methode in der Vergangenheit zum Nachweis von Polyploidie genutzt (Straub 1950). In der vorliegenden Arbeit korrelierte die Stomatalänge positiv mit der Ploidiestufe von *C. vulgaris*, und der Unterschied zwischen den Daten von Diploiden und Tetraploiden war signifikant. Auch bei der nah verwandten Pflanzenart *Vaccinium darrowii* wiesen die Tetraploiden längere Schließzellen als die Diploiden auf (Chavez &

Lyrene 2009). Mit Hilfe der Schließzellenlänge konnte die Ploidiestufe hier auch eindeutig bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit war dies jedoch nicht möglich, weil sich die Messwerte der unterschiedlichen Ploidiestufen für *C. vulgaris* überlappten. Dass sich die Stomatalänge zum Nachweis von Polyploidie unabhängig von der taxonomischen Einordnung im Pflanzenreich eignet, machten Untersuchungen an Pflanzenarten unterschiedlicher Pflanzenfamilien deutlich. Z. B. bei *Secale cereale* (Speckmann et al. 1965), *Coffea* (Boaventura et al. 1981) und *Manihot esculenta* (Carvalho et al. 1999) zeigte sich in der Tendenz auch eine positive Korrelation zwischen Stomatalänge und Ploidiestufe. Bei *Vicia villosa* erwies sich die Stomatalänge im Vergleich zur Laubblattgröße sogar als das effektivere morphologische Merkmal, um Polyploidie zu identifizieren (Tulay & Unal 2010).

Eine höhere Ploidiestufe ist gewöhnlich positiv mit größeren Pollenkörnern assoziiert (Blakslee & Avery 1937; Muller 1979; Dijkstra & Speckmann 1980). Auch in der vorliegenden Arbeit korrelierte die Pollenkorngröße positiv mit der Ploidiestufe und die Größenunterschiede zwischen Diploiden, Triploiden und Tetraploiden waren signifikant. Durch Überlappungen der Messwerte kann die Ploidiestufe mit Hilfe dieses morphologischen Merkmals jedoch nicht sicher ermittelt werden. Im Gegensatz dazu konnte bei *V. darrowii* anhand des Durchmessers der Pollentetraden die Ploidiestufe eindeutig bestimmt werden (Chavez & Lyrene 2009). In der vorliegenden Arbeit zeigten die Messwerte der Pollenkörner der triploiden Genotypen von *C. vulgaris* die größte Standardabweichung ($s = 172 \mu\text{m}^2$) im Vergleich zu den diploiden ($s = 108 \mu\text{m}^2$) und tetraploiden Genotypen ($s = 139 \mu\text{m}^2$). Die große Variabilität in der Pollenkorngröße bei Triploiden ist ein Hinweis auf Bildung von Gameten unterschiedlicher Ploidiestufen. Die Triploiden können wegen ihrer drei homologen Äquivalente haploide, aneuploide und diploide Gameten bilden – so können starke Variationen in der Pollenkorngröße zustande kommen (Darlington 1937). Aufgrund der hohen Standardabweichung wurde in der vorliegenden Arbeit von der Bildung aneuploiden Pollens ausgegangen. Dieser könnte auch von Tetraploiden gebildet worden sein. Denn die Standardabweichung der Messwerte der Pollenkörner der Tetraploiden war auch größer als die der Diploiden. Da es sich bei *C. vulgaris* um autotetraploide Genotypen handelt, kann die Strukturgleichheit der vier homologen Chromosomen zu Meiosestörungen führen und somit zur Bildung von Gameten mit unterschiedlichen Chromosomenzahlen. Zwei homologe Chromosomen bei Diploiden oder Allotetraploiden legen sich in der Äquatorialebene mit höherer Wahrscheinlichkeit parallel aneinander als vier homologe Chromosomen bei Autotetraploiden (Myers & Hill 1940). Pollenkörner mit unvollständigen Chromosomensätzen wurden ebenso bei autotriploiden Genotypen von *Aquilegia chrysantha* × *flavellata* (Skalinska 1945) und *Zea mays* (Punyasingh 1947) gebildet.

4.1.2 Chromosomenzählung

Die einzige direkte Methode, um Ploidiestufen von Genotypen zu bestimmen, ist die Chromosomenzählung (Grant 1981). Zur Verifizierung des Ploidiegrades wurden Chromosomen in mitoseaktiven Zellen der Wurzelspitzen von jeweils einem diploiden, triploiden und tetraploiden Genotyp von *C. vulgaris* gezählt. Bei Genotyp 2005.49/52 wurden $2n = 2x = 16$ Chromosomen, bei Genotyp 2008.177/66 $2n = 3x = 24$ Chromosomen und bei Genotyp 2008.177/188 $2n = 4x = 32$ Chromosomen ermittelt. Die Anzahl auf der diploiden Stufe stimmt mit den Daten der Studie von Wcislo (1990) und Uhríkova und Dubravkova (1997) überein.

Die Färbung der Zellen mit Karminessigsäure eignete sich bei einer 1000-fachen Vergrößerung für die Zählung der Chromosomen am Mikroskop nur mit Anpassung der Fokussierung, jedoch nicht für eine klare und differenzierbare bildliche Darstellung der Chromosomen. In weiteren Arbeiten könnten Chromosomen besser abgebildet werden, wenn eine 2000-fache Vergrößerung verwendet wird. Darüber hinaus könnten Metaphasen mit Hilfe von Hydroxychinolin angereichert und fixiert werden, wie dies erfolgreich für *Rosa* gezeigt wurde (Ma et al. 1996). Anschließend könnten die Chromosomen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt werden. Mit dieser Färbemethode wurden bei *Beta vulgaris* (DeLaat 1987) und *Dioscorea cayenensis* (Dansi et al. 2000) Chromosomen gezählt und Ploidiestufen sicher bestimmt.

4.1.3 Optimierung der Durchflusscytometrie

Die Durchflusscytometrie (FCM) ist die schnellste Methode für die Bestimmung von DNA-Gehalten sowie für die Erkennung von Mixoploidie und bedingt auch Aneuploidie (Doležel 1991). Routinemäßig wurde daher der DNA-Gehalt bei *C. vulgaris* mit Hilfe der FCM-Methode bestimmt. Mittels DAPI-Färbung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nur zwischen euploiden Genomgrößen differenziert werden, sondern es wurden auch aneuploide Genotypen identifiziert. Das ideale Peakverhältnis zwischen einer diploiden *C. vulgaris* und *Petunia hybrida* betrug 0,37, zwischen einer triploiden *C. vulgaris* und *P. hybrida* 0,555 und zwischen einer tetraploiden *C. vulgaris* und *P. hybrida* 0,74. Bleibt bei Polyploidisierung die DNA-Menge pro Chromosom konstant, bilden DNA-Gehalt und Chromosomenzahl eine einfach arithmetische Reihe und die Ploidiestufe kann leicht bestimmt werden (Galbraith et al. 1991). Die Chromosomengrößen wurden bei *C. vulgaris* nicht untersucht, aber bei gleichzeitiger FCM-Messung von Diploiden, Triploiden und Tetraploiden zeigte sich eine lineare Beziehung anhand der Peakpositionen. Solche linearen Beziehungen wurden z. B. auch in Polyploiden von *Ranunculus occurring* (Sgorbati et al. 1989), von *Prunus persica* (Baird et al. 1994) und in *Medicago sativa* (Brummer et al. 1999) gefunden.

Aneuploide Genotypen konnten in der vorliegenden Arbeit im Histogramm bei einer Abweichung von mehr als zwei Chromosomen von der euploiden Stufe identifiziert werden. Das entsprach einer Abweichung von mehr als 0,5 im Verhältnis der Kanalzahlen, so dass diese als Nachweismethode etabliert wurde. Genotypen mit ein bzw. zwei Chromosomen zusätzlich (oder fehlend) zur euploiden Stufe waren mittels FCM nicht nachweisbar, weil Abweichungen von den idealen Peakverhältnissen auftraten. Daher sind diese Aneuploiden bei *C. vulgaris* nur mit Chromosomenzählung nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnten Pfosser et al. (1995) eine Differenz von einem Chromosom zur euploiden Stufe bei *Triticum aestivum* mittels FCM identifizieren. Bei einem hexaploiden Genotyp mit $2n = 6x = 42$ Chromosomen entspricht ein Chromosom 2,4 % der gesamten DNA-Menge. Bei gleichzeitiger Messung eines euploiden und aneuploiden Genotyps zeigten sich zwei Peaks im Histogramm. Auch bei *Musa* konnte eine Differenz von einem Chromosom zum triploiden Genotyp $2n = 3x = 33$ mittels FCM nachgewiesen werden (Roux et al. 2003).

Sekundäre Pflanzenstoffe können die Fluoreszenzmessung beeinflussen (Bennett et al. 2008). Bei *C. vulgaris* waren Abweichungen von den idealen Peakverhältnissen im FCM-Histogramm zu beobachten. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit an Wurzeln, Laubblättern und Sepalen von unterschiedlicher Färbung im Jahresverlauf genauer untersucht. Bei den farblosen Wurzeln war die

Fluoreszenzintensität am höchsten, bei den Sepalen am geringsten. Bei den Wurzeln können keine Farbstoffe die Messung beeinträchtigen. Die Färbung der Sepalen hingegen hat Einfluss auf die Fluoreszenzintensität. Die Fluoreszenzintensität nahm sowohl bei den Laubblättern als auch bei den Sepalen im Jahresverlauf ab. Dies ist möglicherweise mit einer Zunahme des Gehalts an Chlorophyll und Anthocyanen zwischen Mai und Oktober zu begründen. Denn je intensiver das Pflanzenmaterial gefärbt war, desto geringer waren die im FCM gemessenen Fluoreszenzintensitäten. Im Pflanzengewebe kommen wasserlösliche Anthocyane vor. Das Aglykon des Anthocyanins (Anthocyanidin) ist farbbestimmend. Anthocyane bilden in der Gegenwart von Aluminium- oder Eisensalzen Metallkomplexe, welche die Fluoreszenzmessung beeinflussen können (Dold 2013). Darüber hinaus zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität bei Messung von *C. vulgaris* ohne den internen Standard *P. hybrida* höher war als bei der Messung mit interner Standardisierung. Möglicherweise beeinflussen zusätzlich die Inhaltsstoffe von *P. hybrida* die Messung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit denen der FCM-Analyse von *Euphorbia pulcherrima* (Bennett et al. 2008) überein. Die FCM-Messung des DNA-Gehaltes von *E. pulcherrima* wurde ebenso durch Pflanzeninhaltsstoffe beeinflusst. Die Ergebnisse der FCM-Messungen der roten Brakteen und der grünen Blätter wurden verglichen. Die durchschnittliche Fluoreszenz für die grünen Blätter war um 28,1 % höher als für die roten Brakteen. Diese Ergebnisse scheinen zwar auf klare Unterschiede in der DNA-Menge zwischen den roten und den grünen Blättern von *E. pulcherrima* hinzudeuten, die vom gleichen Zweig stammten. Sie zeigen aber das Vorhandensein von Komponenten in den roten Brakteen, welche die DNA-Färbung und damit die Fluoreszenzmessung hemmen, was zu pseudo-intraspezifischen Variationen führt.

Die Verlässlichkeit der FCM-Messung zur Ploidiebestimmung ist problematisch, weil der DNA-Gehalt immer indirekt in Abhängigkeit von einer Pflanze mit bekanntem DNA-Gehalt bestimmt und so mittelbar auf die Ploidiestufe der Versuchspflanze geschlossen wird. Für Ploidiebestimmungen wurden in der vorliegenden Arbeit die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Mittels FCM und dieser Färbemethode konnten die Ploidiestufen der Versuchspflanzen zuverlässig bestimmt werden, weil durch die einheitliche Verwendung des internen Standards *P. hybrida* das Verhältnis der Peakpositionen konstant blieb. Unterscheidet sich die Basenzusammensetzung der untersuchten Genotypen, sind exakte Messungen der DNA-Gehalte mit DAPI allerdings nicht möglich, weil der Fluoreszenzfarbstoff spezifisch an die Basen Adenin und Thymin in den Chromosomen bindet (Doležel & Bartos 2005). Propidiumiodid (PI) als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff ist deswegen für die Bestimmung des DNA-Gehaltes einer Pflanze optimal (Marie & Brown 1993; Johnston et al. 1999; Doležel et al. 2007). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit PI verwendet, wenn die Ermittlung des absoluten DNA-Gehaltes einer Pflanze von Bedeutung war und nicht die Zuordnung der Ploidiestufe.

4.2 Induktion von Polyploidie durch Mitosehemmung *in vitro*

4.2.1 Mitosehemmung an keimendem Saatgut

Neuheitenzüchtung ist u. a. durch somatische Polyploidisierung möglich. Daher wurde in mehrfaktoriellen *in vitro*-Versuchen geprüft, auf welche Weise eine hohe Anzahl stabiler polyploider Pflanzen von *C. vulgaris* mit Hilfe von Mitosehemmern erzeugt werden kann. Die Mitosehemmer Colchizin, Trifluralin, Oryzalin und Amiprophos-methyl (APM) wurden verwendet, weil diese Chemikalien erfolgreich die Teilung pflanzlicher Zellen stören (Blakeslee & Avery 1937; Eigsti & Dustin 1955; Morejohn et al. 1987; Molin & Khan 1997).

Polyploidie konnte an keimendem Saatgut von *C. vulgaris* induziert werden. Insgesamt wurden 108 mixoploide Pflanzen erzeugt: 66 Mixoploide mit Trifluralin, 41 Mixoploide mit Colchizin und eine mixoploide Pflanze mit Oryzalin. Die Chemikalien Colchizin und Trifluralin konnten die Mitose von *C. vulgaris* erfolgreich stören. Mittels APM konnten keine Mixoploiden generiert werden und mit Oryzalin nur in ungenügender Anzahl. Trifluralin war die Chemikalie, mit der auf Basis von keimendem Saatgut bei *C. vulgaris* die signifikant höchsten Polyploidisierungsraten erzielt werden konnten. Die erfolgreiche Polyploidisierung mit Hilfe von Trifluralin stimmt mit den Resultaten an den Zierpflanzen *Rhododendron simsii* (Eeckhaut et al. 2002), *Spathiphyllum wallisii* (Eeckhaut et al. 2004), *Rosa chinensis* (Zlesak et al. 2005), *Rosa hybrida* (Khosravi et al. 2008), *Ranunculus asiaticus* (Dhooge et al. 2009a) und *Helleborus* ssp. (Dhooge et al. 2009b) überein.

Neben der Auswahl des Mitosehemmers hatte auch die Behandlungsart Einfluss auf den Erfolg der Polyploidisierung. Durch Tropfenbehandlung und Inkubation des Pflanzenmaterials in Mitosehemmerlösungen wurden Mixoploide in geringer Anzahl erzeugt. Bei Untersuchung des Einflusses der Quellung des Saatgutes auf den Polyploidisierungserfolg zeigte sich, dass nicht die Vorquellung für eine erfolgreiche Mitosestörung verantwortlich ist, sondern die Einwirkzeit der Chemikalie. In einer Versuchsvariante wurde Saatgut 48 h in Flüssigmedium vorgequollen und daraufhin inkubierte es 48 h in der Mitosehemmerlösung. Da das Saatgut demzufolge 96 h keine bzw. eine geringe Sauerstoffzufuhr hatte, könnte dies der Grund für eine mangelnde Keimfähigkeit bzw. für eine geringe Vitalität der Keimlinge sein. Wurde Saatgut auf Festmedium mit Mitosehemmern zum Keimen gebracht, resultierte dies auch in viel zu geringen Vitalitätsraten. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die verwendeten Mitosehemmerkonzentrationen für diese Behandlungstechnik zu hoch waren und somit toxisch wirkten. Die Erhöhung der Polyploidisierungsrate ging in der vorliegenden Arbeit stets mit einer geringeren Keim- und Vitalitätsrate einher, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Mitosehemmer haben Einfluss auf Polyploidisierungs- und Vitalitätsrate (Schwanitz 1949; Chakraborti et al. 1998; Allum et al. 2007). Dhooge et al. (2011) führten an zahlreichen Zierpflanzen Versuche zur erfolgreichen Polyploidisierung durch. Eine erfolgreiche Polyploidie-Induktion wurde unabhängig von der Pflanzenart für Polyploidisierungsraten von 15 % bis 55 % definiert – bei gleichzeitiger geringer Toxizität des Mitosehemmers.

In der vorliegenden Arbeit stellte letztendlich die Behandlung von Sämlingen mit einer 1,8 %-igen Gelrite-Lösung eine effektive Methode zur Polyploidisierung dar, weil dadurch Polyploidisierungsraten von bis zu 75 % erzielt werden konnten. Die eingesetzte Gelrite-Lösung hatte eine dickflüssige Konsistenz und wurde auf das Meristem aufgetragen. Die Gelrite-Lösung basiert auf Arbeiten von

Schwanitz (1949), welcher zeigte, dass der Einsatz einer Colchizin-Lösung mit einer dickflüssigen Konsistenz effektiver bei der Erzeugung polyploider Pflanzen war. Der Vorteil gegenüber einer wässrigen Lösung wäre, dass das Gelrite an dem Pflanzenmaterial haften bleibt, nicht verdunstet und das Colchizin daher länger einwirkt. Es bestehe eine langfristige Interaktion zwischen Mitosehemmer und Pflanzenmaterial, welche für Polyploidisierungen erforderlich ist (Dhooge et al. 2011). Die Effektivität der Gelrite-Lösung konnte mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Der Einfluss des Zeitpunktes der Applikation des Mitosehemmers bei der Samenkeimung war bei der Induktion von Polyploidie entscheidend. Mit der 1,8 %-igen Gelrite-Lösung wurde gezeigt, dass Polyploidie am effektivsten induziert werden kann, wenn die Lösung auf Keimlinge gegeben wird, bei denen die Kotyledonen gerade austreten. Colchizin in einer Konzentration von 6000 μM konnte hierbei eine Polyploidisierungsrate von 47 % erzielen und 1000 μM Trifluralin eine Polyploidisierung von 75 %. Bei Austritt der Kotyledonen ist die Zellteilungsrate vermutlich am höchsten und die Polyploidie-Induktion damit am erfolgreichsten. Signifikant weniger erfolgreich war die Behandlung der Keimlinge in den Entwicklungsstadien „Austritt der Radicula“ und „Entfaltung der Kotyledonen“. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in diesen Stadien die Zellteilungsraten der Gewebe verringert sind. Voraussetzung für den Erfolg der Mitosehemmung ist teilungsaktives Gewebe (Dermer 1940; Schwanitz 1949). Dies wurde zusätzlich deutlich, weil bei der Behandlung ungekeimter Samen in diesem Versuch keine Polyploiden erstellt werden konnten. Eine klare Abgrenzung des Zeitfensters bei der Samenkeimung ist relevant, um die Effektivität der Behandlung in einem definierten Entwicklungsstadium mit Sicherheit untersuchen zu können. Wurde in der vorliegenden Arbeit nur der Behandlungsbeginn in einem Entwicklungsstadium kontrolliert, führte dies nicht zu unterschiedlichen Polyploidisierungsraten, weil die Keimlinge während der Behandlung in ein weiteres Entwicklungsstadium übergangen.

Die in dieser Arbeit erzeugten polyploiden Pflanzen waren mixoploid und starben mit zwei Ausnahmen nach einer Kulturdauer von ca. acht Wochen ab. Mixoploide sind durch ein Auftreten verschiedener Ploidiestufen innerhalb einer Pflanze gekennzeichnet, was zu Wachstums- und Entwicklungsstörungen führen kann. Zwei mixoploide Pflanzen hingegen, die durch die Inkubation von Saatgut 24 h in einer 3000 μM Colchizin-Lösung und 48 h in einer 1000 μM Colchizin-Lösung generiert wurden, überlebten, wuchsen weiter und wurden neun Monate später nochmals mittels FCM untersucht und waren wieder vollkommen diploid. Die diploiden Zellen verdrängten vermutlich während des Pflanzenwachstums die polyploiden Zellen. Bei Mixoploiden ist problematisch, dass die Zahl der diploiden Zellen meist höher ist als die der tetraploiden Zellen und sich die diploiden Zellen in der Regel öfter teilen (Avery & Pottorf 1945; Eigsti 1947; Eigsti 1957; Rose et al. 2000a; Joshi & Verma 2004; Tulay & Unal 2010). In der vorliegenden Arbeit sollte mit einer Erhöhung der Probenanzahl die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, vitale und stabile Polyploide zu generieren. Dies ist nicht gelungen.

4.2.2 Mitosehemmung an Sprossspitzen

Auf der Basis von Sprossmaterial wurden insgesamt vier Mixoploide mit Colchizin und vier Mixoploide mit Trifluralin generiert. Diese erzeugten mixoploiden Pflanzen überlebten nicht. Wie bei den Untersuchungen an keimendem Saatgut zeigte sich auch an Sprossspitzen, dass der Einsatz von

Colchizin und Trifluralin für die Polyploidie-Induktion bei *C. vulgaris* geeignet ist, die Verwendung von Oryzalin und APM allerdings nicht.

Der Einfluss der Behandlungstechnik wurde ebenfalls untersucht. Zwei Mixoploide wurden durch die Inkubation von Sprossspitzen über 48 h in einer wässrigen Lösung mit 3000 µM Colchizin erstellt. Mit den Herbiziden Trifluralin, Oryzalin und APM konnte auf diese Weise keine Polyploidie bei *C. vulgaris* induziert werden. Die Wirkung der Mitosehemmer auf die Sprossspitzen war erkennbar, weil viele Sprosse nach der Behandlung abstarben. Die Behandlungszeit von 48 h war aber vermutlich zeitlich zu kurz, um die Zellteilung des Pflanzengewebes erfolgreich zu stören. Mitose vollzieht sich in 2 h bis 4 h (Lüttge et al. 2005). Ein vollständiger Zellzyklus in einem Meristem dauert etwa 24 h. Durch Tropfenbehandlung von Sprossmaterial mit den vier Mitosehemmern in Form einer flüssigen Lösung konnten keine Polyploiden erzeugt werden. Möglicherweise verdunsteten die Tropfen auf dem Pflanzenmaterial relativ schnell und die Wirkung des Mitosehemmers war entsprechend zu gering. Die Mitosehemmer auf das Apikalmeristem zu tropfen, ist die einfachste Methode für die Induktion von Polyploidie (Kehr 1996), aber eine erfolgreiche Polyploidisierung hängt auch von der Durchlässigkeit des Pflanzengewebes und vom Transportvermögen des Mitosehemmers zum Meristem ab (Allum et al. 2007).

Mit Hilfe der Gelrite-Lösung wurden Versuche mit genetisch definiertem und *in vitro* etabliertem Sprossmaterial durchgeführt. Die Gelrite-Lösung wurde auf das Meristem der Sprossspitzen der Genotypen 2005.49/29 und 2005.49/127 appliziert und es wurden mit 3000 µM Colchizin zwei mixoploide Pflanzen, mit 100 µM Trifluralin eine mixoploide und mit 300 µM Trifluralin drei mixoploide generiert. Stanys et al. (2006) haben bei Versuchen zur Polyploidie-Induktion *in vitro* von *Chaenomeles japonica* gezeigt, dass die Chromosomenverdopplung genotypspezifisch ist. Genetisch definiertes Material konnte in der vorliegenden Arbeit mit den Genotypen 2005.49/29 und 2005.49/127 zwar eingesetzt werden, jedoch keine Genotypen-Spezifität nachgewiesen, weil die Anzahl der erzeugten Polyploiden zu niedrig war. Die Wirksamkeit der Mitosehemmer auf die Sprossspitzen scheint daher zu gering gewesen zu sein. Ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die Vitalitätsraten der behandelten Sprossspitzen im Vergleich zu den Nullkontrollen nicht signifikant kleiner waren. Demnach sollten Sprossspitzen in weiteren Arbeiten mit höheren Mitosehemmerkonzentrationen und in längeren Zeiträumen behandelt werden.

4.3 Erzeugung neuer polyploider Genotypen durch Kreuzungen

4.3.1 Ploidiestufen der Kreuzungsnachkommen

Eine weitere Möglichkeit zur Züchtung polyploider Sorten von *C. vulgaris* war die Durchführung gezielter Kreuzungen, denn Polyploide können durch unreduzierte Gameten entstehen (Belling & Blakeslee 1924). Daher wurde geprüft, ob der Aufbau eines Züchtungsprogramms für polyploide *C. vulgaris* auf diese Weise möglich ist.

Zwei polyploide Pflanzen wurden in zwei diploiden Züchtungspopulationen des Kooperationspartners Heidepflanzen de Winkel gefunden. Der tetraploide Genotyp '7705' trat spontan in der Nachkommenschaft der Kreuzung zweier diploider Sorten ('Maria' × 'Perestrojka') auf, der triploide

Genotyp 'Anke' bei der Rückkreuzung der diploiden Sorten 'Maria' und 'Boskoop' mit 'Maria'. Diese beiden Kreuzungen wurden wiederholt, da die Bildung von unreduzierten Gameten oftmals genotypspezifisch ist (Dewitte et al. 2010). Es wurde davon ausgegangen, so weitere polyploide Nachkommen erzeugen zu können, was jedoch nicht gelang. Daher konnte die Genotyp-Spezifität für die jeweiligen Kreuzungspartner 'Maria', 'Perestroijka' und 'Boskoop' nicht nachgewiesen werden. Oftmals begünstigen auch Umweltbedingungen, wie hohe Temperaturen (Bajpai & Singh 2006), Ernährungszustand der Pflanze (Sun et al. 2004), Einstrahlung (Vicini & Carvalho 2002) und Chemikalien (Fairbanks et al. 2002; Bajpai & Singh 2006), die Bildung unreduzierter Gameten und damit die Erzeugung polyploider Nachkommen, weil die Meiose ein sehr empfindliches Stadium im Lebenszyklus einer Pflanze ist (Erickson & Markhart 2002). Daher könnten für die Bildung unreduzierter Gameten und die Entstehung der zwei polyploiden Genotypen in der vorliegenden Arbeit möglicherweise Umwelteinflüsse verantwortlich sein.

Ziel der eigenen Arbeiten war die Erweiterung des polyploiden Genpools durch Kreuzungen. Dafür wurden diploide Genotypen miteinander gekreuzt, deren relativer DNA-Gehalt sich unterschied und die laut Verwandtschaftsanalyse mittels RAPD-Marker (Borchert et al. 2008) nicht nah verwandt waren. Ein neuer triploider einfachblühender Genotyp entstand durch die Kreuzung 'Mariella' (DNA_{2c} : 1,26 pg) \times 'Arabella' (DNA_{2c} : 1,29 pg). Aufgrund der geringen Anzahl lässt sich nicht feststellen, ob der Unterschied im relativen DNA-Gehalt, die entfernte Verwandtschaft der Kreuzungspartner oder zufällige Meiosestörungen zu dem triploiden Nachkommen führten. Durch die geringe Anzahl an polyploiden Nachkommen wird von einem zufälligen Ereignis ausgegangen. Der polyploide Genpool konnte durch diese homoploiden Kreuzungen auf diploidem Niveau nicht erweitert werden.

Der spontan entstandene tetraploide Genotyp '7705' blühte in einem Feld diploider Pflanzen frei ab und resultierte in der Population 2008.177 mit vier diploiden, 31 triploiden und 431 tetraploiden Genotypen. Daraufhin wurden die tetraploiden Nachkommen einerseits mit dem Genotyp '7705' und andererseits untereinander gekreuzt, um die phänotypische Variabilität zu erweitern. Die Bestäubung der tetraploiden Knospenblüher 2008.177/86 und 2008.177/244 mit dem diploiden Pollen von Genotyp '7705' führte zu ausschließlich tetraploiden Nachkommen. Die Geschwisterkreuzungen dieser nah verwandten autotetraploiden Genotypen resultierten in triploiden und tetraploiden Nachkommen. Die triploide Nachkommenschaft ist durch Fremdeinkreuzung nahestehender diploider Pflanzen im Zuchtgarten erklärbar. Bei polyploiden Pflanzen kann die reguläre Verteilung der Erbanlagen während der Zellteilung gestört sein. Weil autotetraploide Pflanzen von jedem Chromosom vier homologe Äquivalente besitzen, neigen sie zu Meiosestörungen (Myers & Hill 1940), welche zur Bildung von haploiden Gameten geführt haben könnten. Auch aus diesem Grund könnten die triploiden Nachkommen entstanden sein. In der vorliegenden Arbeit waren die autotetraploiden Genotypen aufgrund zahlreicher Nachkommen durch eine hohe Fertilität gekennzeichnet, die auch bei Autotetraploiden der nah verwandten Gattung *Vaccinium* zu beobachten war (Lyrene et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit war die Erweiterung der phänotypischen Variabilität auf polyploidem Niveau auf der Grundlage der bereits vorhandenen Polyploiden möglich. Im Gegensatz zu den durch Mitosehemmer erzeugten Polyploiden waren die durch unreduzierte Gameten erzeugten stabil. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass unreduzierte Gameten die Hauptursache für die natürliche Entstehung polyploider Pflanzen sind (Bretagnolle & Thompson 1995). Polyploidie tritt bei 30 % bis 70 % der Angiospermen auf (Stebbins 1971) und kann für ihren evolutionären Erfolg verantwortlich sein (Grant 1981).

4.3.2 Untersuchung des Pollens und des Saatguts im Rahmen der Kreuzungsversuche

Um zu prüfen, ob die Pflanzen unterschiedlicher Ploidiestufen sich in ihrer Fruchtbarkeit unterscheiden und welche Ploidiestufen in den Nachkommen verschiedener Kreuzungskombinationen auftreten, wurden mehrere diploide, triploide und tetraploide Genotypen miteinander gekreuzt. Vor Durchführung dieses interploiden Kreuzungsexperimentes wurden Größe und Fertilität des Pollens der Bestäuberpflanzen untersucht.

Die Größe des Pollens wurde gemessen und die Unterschiede der Messgrößen waren signifikant zwischen den Ploidiestufen. Innerhalb der triploiden sowie tetraploiden Stufe zeigten die Daten der jeweils zwei Genotypen keine signifikanten Unterschiede, vermutlich weil sie durch ihre gemeinsame Abstammung von dem tetraploiden Genotyp '7705' nah miteinander verwandt waren. Die Messgrößen der zwei diploiden Genotypen unterschieden sich jedoch signifikant voneinander. Der Grund für den deutlichen Größenunterschied könnte der unterschiedliche genetische Hintergrund der zwei Sorten 'Long White' und 'Josephine' sein. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Pollengröße einerseits von der Ploidiestufe und andererseits vom Genotyp abhängen könnte.

Pollenvitalität gibt einen Hinweis darauf, ob die Meiose störungsfrei ablief (de Oliveira et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit zeigten die Diploiden den vitalsten Pollen, die Tetraploiden weniger vitalen Pollen, und der Pollen der Triploiden wies die geringste Vitalität auf. Die geringere Pollenvitalität der Tetraploiden im Vergleich zu den Diploiden ist durch Meiosestörungen von Autopolyploiden (Myers & Hill 1940) erklärbar. Die Genredundanz bei Polyploiden erhöht die Komplexität bei Anordnung und Aufteilung der Chromosomen während der Zellteilung. Das Ergebnis dieser Arbeit steht in Einklang mit Untersuchungen bei *Vicia villosa*, denn bei dieser Pflanzenart war der Pollen Diploider auch vitaler als der Pollen Tetraploider (Tulay & Unal 2010). Die reduzierte Pollenvitalität der triploiden Genotypen könnte damit begründet werden, dass Triploide wegen ihrer drei homologen Chromosomen euploide und aneuploide Gameten bilden können (Darlington 1937). Durch die Bildung aneuploider Gameten ist die Pollenvitalität vermutlich reduziert.

Die Ergebnisse der Pollenkeimung *in vitro* korrelierten nicht mit den Ergebnissen zur Pollenvitalität. Der Pollen der tetraploiden Genotypen bildete vergleichsweise die meisten Pollenschläuche aus. Pollenkeimung *in vitro* ist abhängig von Genotyp, Zeitpunkt der Pollenernte, Art und Weise der Ernte, sowie Aufbewahrung des Pollens (Stanley & Linskens 1974). Zusätzlich hängt die *in vitro*-Pollenkeimung von der Pollenkordichte auf der Aussaatsschale sowie von Zusammensetzung und pH-Wert des Aussaatmediums ab (Moore & Janick 1983). Die geringe Keimungsrate des Pollens der Diploiden in der vorliegenden Arbeit könnte auf solche Einflussfaktoren während der Versuchsdurchführung zurückzuführen sein. Auch Beyhan und Serdar (2008) zeigten für *Castanea sativa* eine höhere Pollenvitalität im Vergleich zur *in vitro*-Pollenkeimung und verwiesen auf die Mängel der Methode. Bei Untersuchungen innerhalb der Rosaceae ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse. Oberle und Watson (1953) konnten keine Beziehung zwischen Vitalität und Keimung des Pollens bei *Malus domestica* erkennen. Demgegenüber ermittelten Norton (1966), Werner und Chang (1981), Pearson und Harney (1984) sowie Parfitt und Ganeshan (1989) eine positive Korrelation zwischen Vitalität und Keimungsrate des Pollens bei *Prunus* und *Rosa*. Bei den Triploiden der vorliegenden Arbeit waren sowohl Pollenkeimungsrate als auch Pollenvitalität am geringsten, weil sie vermutlich einen hohen Anteil aneuploider Pollenkörner bildeten. Eine Selektion könnte

möglicherweise bereits auf der Stufe der Pollenkeimung eine Rolle spielen, da Selektion auch während oder nach der Befruchtung Einfluss nehmen kann. Die geringe Pollenkeimung der Triploiden von *C. vulgaris* stimmt z. B. mit den Ergebnissen einer Studie an *Vitis* überein (Park et al. 1999). Hier zeigte sich eine deutlich geringere Pollenkeimung *in vitro* an 187 triploiden *Vitis*-Genotypen im Vergleich zu Diploiden und Tetraploiden.

Da die *in vitro*-Pollenkeimung vielen Versuchsfehlern unterliegen kann, sollte möglichst die Pollenkeimung *in vivo* als Parameter für die Eignung einer Pollenspenderpflanze herangezogen werden (Seilheimer & Stösser 1982). Die Analyse des Pollenschlauchwachstums im Griffel könne Verträglichkeitsverhältnisse zwischen Kreuzungspartnern aufzeigen. Für die Kreuzungskombinationen der vorliegenden Arbeit wurde der Anteil der Pollenschläuche bestimmt, die 48 h nach der Bestäubung den Fruchtknoten erreichten. Pollenkeimung *in vitro* und *in vivo* korrelierten nur teilweise. Auffällig war das gute Pollenschlauchwachstum bei den Kreuzungskombinationen $3x \times 4x$ und $2x \times 4x$, was mit dem guten Ergebnis bei der *in vitro*-Pollenkeimung der Tetraploiden korreliert. Dass beim Pollenschlauchwachstum im Griffel auch die Kompatibilität der Kombinationspartner eine Rolle spielt, wurde bei dem schlechten Wachstum der Pollenschläuche bei der Kreuzungskombination $4x \times 4x$ deutlich, die möglicherweise auf eine zu nahe Verwandtschaft der Geschwisterpflanzen zurückzuführen ist, die von dem tetraploiden Genotyp '7705' abstammen. Infolgedessen könnte eine genetische Hemmung im Pollenschlauchwachstum vorliegen, wie sie oft bei Selbstungen in Form von Selbstinkompatibilität vorkommt. Eine Blockierung des Wachstums von Pollenschläuchen im Griffel aufgrund eines ähnlichen Genoms könnte auch auf die Kreuzungskombination $4x \times 3x$ zutreffen, welche die wenigsten Pollenschläuche am Fruchtknoten aufwies. Die Kreuzungen mit einer diploiden Mutterpflanze wiesen den höchsten Anteil Pollenschläuche im Bereich des Fruchtknotens auf, was wahrscheinlich mit dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Kreuzungspartner begründet werden könnte. So auch bei den reziproken Kreuzungen: Der Pollen Diploider resultierte in einem hohen Anteil an Pollenschläuchen am Fruchtknoten unabhängig von der Ploidiestufe der Mutterpflanze. Bei der triploiden Mutterpflanze ($3x \times 2x$) könnten neben aneuploiden und diploiden auch haploide Gameten gebildet worden sein. Dann konnten möglicherweise Gameten gleicher Ploidiestufe fusionieren, obwohl die Kreuzungspartner unterschiedliche Ploidiestufen aufwiesen. In einer Untersuchung an *Prunus armeniaca*, *P. avium* und *P. cerasus* zeigte sich, dass die Pollenkeimung *in vitro* und *in vivo* sortenabhängig war (Bolat & Pirlak 1999). Nur für *P. avium* konnte eine Korrelation der Ergebnisse zur Pollenqualität der beiden Untersuchungsmethoden ermittelt werden.

Die Ergebnisse der *in vivo*-Pollenkeimung der vorliegenden Arbeit waren nur bedingt aussagekräftig in Bezug auf die Befruchtungsfähigkeit. Die homoploide Kreuzung auf diploidem Niveau erbrachte mit Abstand die größte Saatgutmenge mit 2141 Samen. Deutlich weniger Saatgut entstand aus den interploiden Kreuzungen. Insgesamt resultierten die Kreuzungen mit einer diploiden Mutterpflanze im größten Samenertrag, was mit den Ergebnissen zum Pollenschlauchwachstum korreliert. Da männliche Gameten in einer deutlich höheren Zahl gebildet werden, scheint eine Selektion auf befruchtungsfähige weibliche Gameten stattzufinden. Die geringe Nachkommenschaftsgröße der Kreuzung $3x \times 3x$ erklärt sich durch Meiosestörungen. Auffällig war die geringe Nachkommenschaftsgröße von 91 Samen aus der Kreuzung $4x \times 4x$, was mit der geringen Pollenkeimung *in vivo* von nur 13 % korrelierte. Daher könnten erneut nahe Verwandtschaft und Autotetraploidie Ursachen für eine verringerte Nachkommenschaftsgröße sein. Auch in *Chaenomeles japonica* führte die Kreuzung autotetraploider Genotypen zu einem verringerten Samenansatz (Stanys et al. 2006). Bei polyploiden Pflanzen ist die reguläre Verteilung der Erbanlagen während der Meiose häufig

gestört. Trotzdem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass bei polyploiden Pflanzen von *C. vulgaris* die Bildung funktionstüchtiger Gameten möglich, jedoch aufgrund von Meiosestörungen reduziert ist.

Die Größe des Saatguts bei *C. vulgaris* war abhängig von der Ploidiestufe der Mutterpflanze. Die größten Samen gingen aus den Kreuzungen mit einer tetraploiden Mutterpflanze hervor. Etwas kleiner waren die Samen der triploiden Mutterpflanzen und die kleinsten Samen resultierten aus den Kreuzungen mit einer diploiden Mutterpflanze.

Bei der Untersuchung der Samenkeimung zeigte sich eine negative Korrelation zu den Ergebnissen des Samenertrags. Bei Kreuzungen mit einer triploiden Mutter war der Samenertrag äußerst gering, jedoch keimten die wenigen Samen sehr gut. Die natürliche Selektion, aufgrund unterschiedlicher Chromosomenzahlen, scheint hier schon während der Befruchtung zu wirken. Bei Befruchtung diploider Mutterpflanzen mit Pollen von abweichender Chromosomenzahl könnte die Selektion bei der Samenkeimung stattfinden, weil diese sehr gering war, und Befruchtung sowie Samenbildung vermutlich normal abliefen. Die Keimraten des Saatguts resultierend aus homoploiden Kreuzungen waren höher als die des Saatguts aus den interploiden Kreuzungen gleicher Mutterpflanzen. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der nah verwandten Gattung *Vaccinium*. Darrow et al. (1949), Sharpe (1953), Rousi (1966) und Chavez & Lyrene (2009) zeigten für *Vaccinium*, dass homoploide Kreuzungen in mehr lebensfähigen Nachkommen resultierten als interploide Kreuzungen. Nach sowohl interploiden als auch interspezifischen Kreuzungen können Störungen bei der Entwicklung des Endosperms auftreten, weshalb eine normale Samenentwicklung beeinträchtigt sein kann (Johnston et al. 1980; Lin 1984).

4.4 Problematik der Triploidie

4.4.1 Erzeugung von Triploiden

Triploide haben in der Pflanzenzüchtung eine besondere Relevanz, da eine Störung der Meiose wahrscheinlich ist und eine daraus häufig resultierende Sterilität zu samenlosen Früchten führt (Frost & Soost 1968), welche wirtschaftlich wertvoll sind. Diese Sterilität Triploider kann auch zum Züchterschutz genutzt werden. Um die Möglichkeit zur Erzeugung von Triploiden bei *C. vulgaris* zu prüfen, wurden interploide Kreuzungen durchgeführt und die Ploidiestufen der Nachkommenschaften durch Messung des DNA-Gehaltes bestimmt.

Die Erzeugung von Triploiden bei *C. vulgaris* war durch gezielte interploide Kreuzung möglich. Mit der Kreuzungsvariante $4x \times 2x$ wurden 67 % Triploide erstellt. Die reziproke Kreuzung $2x \times 4x$ führte nicht zu triploiden Nachkommen, sondern zu 67 % Diploiden und 33 % Tetraploiden. Infolge eines „triploiden Blocks“ (Marks 1966) entstanden aus der Kreuzung $2x \times 4x$ ausschließlich Diploide und Tetraploide, d. h. triploide Nachkommen wurden „geblockt“. Saatgut kann sich normal entwickeln, wenn das Verhältnis der maternalen (m) und paternalen (p) Genome im Endosperm $2m : 1p$ ist (Ramsey & Schemske 1998), welches sich aus homoploiden Kreuzungen ergibt. Trotzdem kann fertiles Saatgut auch nach interploiden Kreuzungen entstehen. Die „Endosperm Balance Number“-Hypothese (EBN) erklärt, dass eine normale Samenentwicklung von dem effektiven Genomverhältnis im

Endosperm abhängt und nicht von den Ploidiestufen der Kreuzungspartner (Johnston et al. 1980; Lin 1984). Nach EBN-Hypothese können sich Samen aus homoploiden und interploiden Kreuzungen normal entwickeln. Das Genomverhältnis müsse annähernd $2m : 1p$ im Endosperm sein.

Für *C. vulgaris* wurde gezeigt, dass der „triploide Block“ die Erzeugung von Triploiden nicht vollständig verhindert. Der „triploide Block“ beruht auf Abweichungen von dem normalen Verhältnis der Expression maternal und paternal geprägter Gene (Köhler et al. 2010). Das Gen *MEA* wird ausschließlich maternal im Endosperm exprimiert (Kinoshita et al. 1999). Eine erhöhte *MEA*-Expression reprimiert Polycomb-Group-Zielgene und normalisiert damit die Entwicklung von triploidem Saatgut. Daher ist eine geringere *MEA*-Expression, verursacht durch einen geringeren maternalen Genomanteil, für Fehlentwicklungen von triploidem Saatgut verantwortlich (Erilova et al. 2009). Aus diesem Grund ist die Kombination einer tetraploiden Mutterpflanze mit einem diploiden Pollenspender besser geeignet für die Erstellung triploider Genotypen als die reziproke Kreuzung (Ramsey & Schemske 1998), was in Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit steht. Auch für die mit *C. vulgaris* nah verwandte Gattung *Vaccinium* wurde gezeigt, dass die reziproke Kreuzung $2x \times 4x$ in einer Nachkommenschaft von Diploiden sowie Tetraploiden resultierte, und keine Triploiden auftraten (Ortiz et al. 1992a).

Die Erweiterung des polyploiden Genpools war in der vorliegenden Arbeit durch interploide Kreuzungen möglich. Die Ploidiestufen der Nachkommen des interploiden Kreuzungsexperimentes zeigten eine deutliche Selektion auf euploide Pflanzen. Bis auf die Kreuzungskombination $4x \times 2x$ war an der Entstehung von Aneuploiden bei *C. vulgaris* stets ein triploider Kreuzungspartner beteiligt. Die Entstehung weniger aneuploider Genotypen könnte möglicherweise auf Meiosestörungen der Kreuzungspartner zurückzuführen sein. Infolge von Meiosestörungen triploider Genotypen von *Vitis* erwies sich ihre Kreuzung bei der Erstellung von Aneuploiden für die Erzeugung samenloser Früchte als geeignet (Park et al. 1999; Park et al. 2002). Aufgrund solcher Störungen könnten in der vorliegenden Arbeit auch die 4 % triploide Nachkommen aus der Kreuzungskombination $4x \times 4x$ entstanden sein, da die tetraploiden Elternpflanzen vermutlich mitunter haploide Gameten bildeten.

4.4.2 Fertilität von Triploiden

Die drei Chromosomensätze von triploiden Genotypen können zu Störungen bei den meiotischen Teilungen führen. Um zu prüfen, inwieweit diese Störungen die Fertilität von Triploiden bei *C. vulgaris* beeinträchtigen, wurden Meiose und freie Abblüte von triploiden Genotypen untersucht.

Die Meiose sollte an jeweils fünf Genotypen pro Ploidiestufe sichtbar gemacht werden, um die Reifeteilung zwischen den Ploidiestufen unabhängig vom Genotyp vergleichen zu können. Meiosephasen auf triploider Stufe konnten nur bei Genotyp 2008.177/451 untersucht werden. Ursache dafür war die Schwierigkeit das Entwicklungsstadium der Blütenknospen zu finden, in dem Pollenmutterzellen in den Antheren gebildet werden und Chromosomen sichtbar sind. Bei der cytologischen Untersuchung des Genotyps wurden Unregelmäßigkeiten deutlich, da während der Trennung der Homologen in Anaphase I ein Chromosom (Laggard) in der Äquatorialebene zurückblieb. In Telophase I waren ein bis zwei Chromosomen in der Mitte der Zelle zu erkennen. In diesen Fällen kam es vermutlich zu Störungen bei der Chromosomenpaarung. Während der zweiten Reifeteilung war zu erkennen, dass sich Chromosomen in Metaphase II nicht in der Äquatorialebene einfanden und

auch in Anaphase II ohne homologes Äquivalent zurückblieben. In Telophase II waren keine Unregelmäßigkeiten zu erkennen. Letztendlich waren normale Cytokinesen sichtbar, in der die Zellmembranen ergänzt werden und die Zellteilung vervollständigt wird. Dies deutet auf die Bildung fertiler euploider Gameten des triploiden Genotyps von *C. vulgaris* hin. Um dies genauer zu prüfen, wurde die Pollenvitalität des Genotyps 2008.177/451 und vier weiteren triploiden Genotypen bestimmt. Die durchschnittliche Pollenvitalität, welche über die Färbbarkeit vitaler Pollenkörner mit Fluoresceindiazetat bestimmt wurde, betrug 23 % und verdeutlicht, dass vermutlich ein hoher Anteil steriler aneuploider Gameten gebildet wurde. Die reduzierte Pollenvitalität korrelierte mit den nachgewiesenen Meiosestörungen. Dennoch können triploide Genotypen von *C. vulgaris* eingeschränkt fertile euploide Gameten bilden.

Unregelmäßigkeiten bei der Chromosomentrennung Triploider wurden bereits von Lesley (1928) und Huskins (1934) für *Solanum lycopersicum* gezeigt. Wie in der vorliegenden Arbeit waren Chromosomen erkennbar, die während der Anaphase in der Äquatorialebene zurückblieben. Weitere erste cytologische Untersuchungen an Triploiden konnten Meiosestörungen bei *Datura* (Belling & Blakeslee 1922) und *Zea mays* (McClintock 1929) deutlich machen. Die Konsequenz dieser Unregelmäßigkeiten sind Gameten mit unterschiedlichen Chromosomenzahlen. Pollenkörner mit unvollständigen und unterschiedlichen Chromosomensätzen wurden schließlich bei Triploiden von *Aquilegia chrysantha* × *flavellata* (Skalinska 1945) und *Zea mays* (Punyasingh 1947) nachgewiesen.

Im Gegensatz zum triploiden Genotyp 2008.177/451 ließen die Meiosephasen der diploiden und tetraploiden Genotypen in der vorliegenden Arbeit keine Störungen erkennen. Meiosestörungen der Tetraploiden konnten zwar nicht cytologisch sichtbar gemacht werden, aber sie wurden durch die verringerte Pollenvitalität von 57 % im Vergleich zu den Diploiden (72 %) und durch triploide Nachkommen bei tetraploiden Kreuzungspartnern im Rahmen dieser Arbeit deutlich. Denn die Meiose Polyploider ist komplexer und daher fehleranfälliger (Myers & Hill 1940). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit konnten Rezaei et al. (2010) Meiosestörungen in tetraploiden *Triticum turgidum* sichtbar machen. Eine frühzeitige Wanderung der Chromosomen zu den Polen während Metaphase I und Nachzügler von Chromosomen (Laggards) während Anaphase I wurden beobachtet. Darüber hinaus war eine dicke Chromosomenbrücke erkennbar, die bis Telophase I aufrechterhalten blieb und schließlich durch Cytokinese zerbrochen wurde. Des Weiteren zeigten sich Mikronuklei in den Pollenmutterzellen und an die Pole gezogenes dekondensiertes Chromatin in Anaphase II.

Triploide Genotypen von *C. vulgaris* sind nicht steril und können daher nicht zum Züchterschutz verwendet werden. Nach freier Abblüte von Triploiden in einem Feld diploider Pflanzen im Zuchtgarten des Kooperationspartners Heidepflanzen de Winkel wurden Samenansätze gefunden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wurden die Triploiden mit haploidem Pollen der Diploiden bestäubt. Eine geringe Keimfähigkeit der Samen von durchschnittlich 40 % könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich um nicht vitale Aneuploide handelte. Letztendlich stand eine Nachkommenschaft von 117 Sämlingen zur Verfügung mit 66 Diploiden, vier Triploiden, 15 Tetraploiden und 32 Aneuploiden. Der hohe Anteil diploider Nachkommen (56 %) ist vermutlich dadurch zu erklären, dass gebildete haploide Gameten der Mutterpflanze einen Selektionsvorteil haben. Unreduzierte diploide Gameten wurden von den Samenträgern anscheinend in geringerer Anzahl gebildet, da der Anteil triploider Nachkommen (3 %) gering war. Tetraploid waren 13 % der Nachkommen, welche möglicherweise über Selbstung der Triploiden und somit durch Fusion zweier unreduzierter Gameten entstanden sein könnten. Der Anteil Aneuploider (27 %) war vergleichsweise doppelt so hoch, worunter hauptsächlich hyperdiploide und hypotriploide Genotypen waren. Aneuploide Gameten von *C. vulgaris* weisen demnach eine reduzierte

Vitalität auf. Dennoch wurde eine Selektion auf euploide Pflanzen deutlich, wie dies bereits anhand der Nachkommen des interploiden Kreuzungsexperimentes gezeigt wurde. Wirkt Selektion erst nach der Befruchtung, dann könnten in der vorliegenden Arbeit Genotypen einen Selektionsvorteil gehabt haben, die aus Gameten mit haploidem Chromosomensatz und mit einzelnen zusätzlichen Chromosomen erzeugt wurden. Dies steht in Einklang mit Pollenkornuntersuchungen bei *Aquilegia chrysantha* × *flavellata* (Skalinska 1945). Hier bildeten die triploiden Genotypen haploide Gameten und solche mit wenigen zusätzlichen Chromosomen.

Die Fertilität triploider Mutterpflanzen unterschied sich in der vorliegenden Arbeit zwischen freier Abblüte und gezielter Kreuzung. Die Fertilität der fünf Triploiden bei freier Abblüte war deutlich höher, weil mit 117 Sämlingen (bei gezielter Kreuzung waren es acht Sämlinge) eine viel größere Nachkommenschaft zur Verfügung stand. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich die Pflanzen im Zuchtgarten des Kooperationspartners Heidepflanzen de Winkel befanden und dadurch einerseits mit Pollen von zahlreichen Pflanzen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund und andererseits über einen längeren Zeitraum hinweg auf natürliche Weise bestäubt wurden. Die triploiden Pflanzen des interploiden Kreuzungsexperimentes wurden per Hand bestäubt und wiesen, angesichts weniger Nachkommen, eine deutlich geringere Fertilität auf. Möglicherweise wurden bei der Bestäubung per Hand die Griffel der Knospenblüten verletzt oder abgebrochen. Der Einfluss einer Genotypspezifität auf das Ergebnis kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da mit unterschiedlichen Genotypen gearbeitet wurde.

4.5 Genotypenidentifikation mittels molekularer Marker

4.5.1 Nutzung von AFLP und SSR-Markern zur Analyse einer Nachkommenschaft aus freier Abblüte einer tetraploiden Pflanze

Um die Abstammung der Nachkommenschaft einer freien Abblüte eines tetraploiden *C. vulgaris* Genotyps zu untersuchen, wurden molekulare Marker genutzt. AFLP- und SSR-Marker wurden kombiniert, weil sie sich mit ihrem dominanten bzw. codominanten Markersystem ergänzen.

Von vier diploiden, 29 triploiden und 45 tetraploiden Nachkommen der tetraploiden Mutterpflanze '7705' wurden AFLP-Banden (Vos et al. 1995) ermittelt, die nicht in der Mutterpflanze vorkamen. Insgesamt wurden 180 AFLP-Loci analysiert. Die diploiden Nachkommen wiesen 12 % von Genotyp '7705' abweichende Banden, die triploiden 10 % und die tetraploiden 4 % differente Banden auf. Die diploide Kontrollgruppe, welche aus vier nicht mit Genotyp '7705' verwandten Genotypen bestand, wies 27 % AFLP-Loci auf, die nicht von Genotyp '7705' vererbt werden konnten. Unabhängig von der Ploidiestufe könnten alle Nachkommen durch Selbstung der Mutterpflanze '7705' entstanden sein, weil sie eine geringe Anzahl differenter AFLP-Loci aufwiesen. Bei den tetraploiden Nachkommen ist diese Entstehungsweise aber am wahrscheinlichsten, da sie die gleiche Ploidiestufe wie die Mutterpflanze haben. Durch Selbstung müssten sich alle Loci der tetraploiden Nachkommen in der Mutterpflanze wiederfinden, dies traf auf vier tetraploide Genotypen zu. Der durchschnittliche Wert von 4 % neuer Banden der 45 untersuchten Tetraploiden könnte jedoch auf Rekombinationsvorgänge zurückzuführen sein, die neue Amplifivate generierten. Daher können wenige Fremdbestäubungen mit

unreduziertem Pollen diploider Pflanzen nicht ausgeschlossen werden. Wie bereits durch die Ergebnisse des interploiden Kreuzungsexperimentes gezeigt werden konnte, entstehen durch die Kreuzungskombination $4x \times 2x$ bei *C. vulgaris* durchaus tetraploide Nachkommen. Aber auch durch Crossover nach Selbstbestäubung sind neue Fragmente möglich. Ein weiterer Hinweis auf die Entstehung der tetraploiden Nachkommen durch Selbstung ist, dass diese Entstehungsweise auf polyploidem Niveau wahrscheinlicher ist als auf diploidem (Stebbins 1950). Z. B. zeigten Miller und Venable (2000) die Aufhebung der Selbststerilität von diploiden *Lycium* auf polyploidem Niveau. Das dominante Markersystem der AFLP-Methode ist sehr sicher und zeigt zahlreiche Loci, die individuell weniger informativ sind, aber ihre statistische Leistung aus ihrer Anzahl ziehen (Mariette 2002). AFLP-Loci liefern eine ausreichend hohe Anzahl an reproduzierbaren polymorphen Banden (Krauss 1999).

Dass in der Nachkommenschaft nur 6,7 % Triploide auftraten, ist durch den „triploiden Block“ (Marks 1966; Köhler et al. 2010) erklärbar. Die geringere genetische Ähnlichkeit der Triploiden mit Mutterpflanze '7705' im Vergleich zu den Tetraploiden verdeutlicht eine prozentual höhere Fremdeinkreuzung der diploiden Pflanzen, in deren Feld die Mutterpflanze '7705' stand. Die dennoch hohe Übereinstimmung der Banden von 90 %, die auch in Genotyp '7705' vorkamen, lässt darauf schließen, dass die eingekreuzten diploiden Pflanzen nah mit den Elternpflanzen des tetraploiden Genotyps '7705' ('Maria' \times 'Perestrojka') verwandt und möglicherweise F1-Pflanzen aus der gleichen Kreuzung waren.

In der AFLP-Analyse wiesen der triploide Nachkomme 2008.177/200 und der diploide Nachkomme 2008.177/251 keine von Mutterpflanze '7705' abweichenden Banden auf. Da SSR-Marker wenige, aber hochgradig informative polymorphe Loci mit einem hohen Unterscheidungsvermögen umfassen (Powell et al. 1996; Meudt & Clarke 2007), wurden die zwei Nachkommen mittels SSR-Markern untersucht. Durch ihre Kodominanz können bei Heterozygoten die verschiedenen Allele auf dem Gel sichtbar gemacht werden. Der triploide Genotyp 2008.177/200 wies zwei von der Mutterpflanze '7705' abweichende Allele auf. Bei diesem Genotyp war mittels SSR-Marker eine Fremdeinkreuzung nachweisbar. Der diploide Genotyp 2008.177/251 zeigte in der SSR-Analyse an Locus Ecoc142 ein Allel, welches in der Mutterpflanze '7705' nicht auftrat. Durch die geringe Anzahl abweichender Banden wird dieser Genotyp als einziger diploider Nachkomme von Mutterpflanze '7705' angesehen. Er könnte durch Apomixis der Mutterpflanze '7705' oder durch Bildung und Fusionen zweier haploider Gameten entstanden sein. Die weiteren drei diploiden Genotypen 2008.177/15, 2008.177/360 und 2008.177/455 wiesen in der SSR-Analyse ein, drei bzw. zwei differente Allele auf. Bei ihnen wird nicht von direkten Selbstungsnachkommen des Genotyps '7705' ausgegangen. Eine insgesamt nahe Verwandtschaft der Diploiden zur Mutterpflanze wird vermutet, da ihre AFLP-Banden im Durchschnitt zu 88 % in Genotyp '7705' vorhanden waren. Bei den drei Diploiden könnte es sich möglicherweise auch um Verunreinigungen des Saatguts mit F1-Pflanzen der gleichen Kreuzung handeln.

Die Ergebnisse von acht der elf etablierten SSR-Marker fanden bei der Analyse der Nachkommenschaft Verwendung, weil sie polymorphe Amplifikate ergaben. Dass drei SSR-Marker in dieser Untersuchung keine polymorphen Produkte aufwiesen, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die untersuchten Genotypen sehr nah miteinander verwandt sind. Sieben SSR-Marker zeigten für die untersuchten Nachkommen unabhängig von der Ploidiestufe ein oder zwei Allele. Ausschließlich SSR-Marker Ecoc142 wies drei Allele bei den zwei triploiden Genotypen 2008.177/200 und 2008.177/308 sowie bei den drei tetraploiden Genotypen 2008.177/2, 2008.177/4 und 2007.177/7 auf. Das dritte Allel, welches bei der Mutterpflanze '7705' nicht auftrat, lässt vermuten, dass die tetraploiden Nachkommen nicht ausschließlich durch Selbstung, sondern auch durch Fremdbestäubung entstanden sein könnten. Bei

Triploiden müssten mit höherer Wahrscheinlichkeit drei Allele anstelle der zwei Allele auftreten, weil bei ihnen von einer Einstäubung diploider Pflanzen aus dem Zuchtgarten ausgegangen wird. In der SSR-Untersuchung der vorliegenden Arbeit wurden im Wesentlichen aber nur zwei Allele sichtbar.

Die Laubfärbung des diploiden Genotyps 2008.177/455 und der drei tetraploiden Genotypen 7, 16 und 56 der Population 2008.177 ähnelte im Frühjahr auffällig dem Weißgelb der Sorte 'Hammondii rubrifolia'. Nur für den diploiden Genotyp 2008.177/455 konnte eine Einstäubung der Sorte nachgewiesen werden. Dafür wurden die spezifischen AFLP-Loci, die nur in der Sorte und nicht in Genotyp '7705' auftraten, untersucht. Der diploide Genotyp 2008.177/455 wies 72 % dieser spezifischen Sortenbanden auf, die tetraploiden Genotypen hingegen nur 2 % und 19 %, und bei Kontroll-Genotypen schwankte der Anteil dieser spezifischen Banden zwischen 0 % und 16 %. Die Ergebnisse sind ein Hinweis auf die Einkreuzung von 'Hammondii rubrifolia' in den diploiden Genotyp 2008.177/455 bzw. das Saatgut könnte mit dieser Sorte verunreinigt gewesen sein. Durch die geringen Anteile spezifischer Sortenbanden bei den Tetraploiden konnte die Einkreuzung der Sorte nicht nachgewiesen werden. Spezifische AFLP-Loci des Genotyps '7705' verifizierten die Ergebnisse, denn es zeigte sich ein Anteil der Banden bei dem Diploiden von geringen 35 % und bei den Tetraploiden von 81 % und 86 %. Der geringe Anteil bei Genotyp 2008.177/455 lässt sogar auf eine Verunreinigung des Saatguts mit der Sorte 'Hammondii rubrifolia' und nicht auf deren Einkreuzung schließen. Die mögliche Einkreuzung der Sorte wurde nicht mit SSRs geprüft, weil die SSR-Marker für diese wenigen nah verwandten Genotypen keine brauchbaren polymorphen Amplifikate aufwiesen.

4.5.2 Nutzung von SSR-Markern zur Identifikation abgeleiteter Sorten

Auf Basis von SSR-Markern war die Etablierung eines verbesserten Systems zur Genotypenidentifizierung wünschenswert, weil durch somatische Polyploidisierung entstandene Polyploide potentiell abgeleitete Sorten darstellen.

Die Marker-Etablierung bestand aus drei Schritten. Der erste Test der SSR-Marker erfolgte auf Agarosegelen, der zweite mit fluoreszenzmarkiertem M13-Tail (Schuelke 2000) auf Polyacrylamidgelen und der dritte mit direkt fluoreszenzmarkierten Primern auf Polyacrylamidgelen. Dass die Anzahl verwendbarer Marker von einem Etablierungsschritt zum nächsten kleiner wurde, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die PCR-Protokolle jeweils neu angepasst und somit nicht exakt die gleichen PCR-Reaktionen durchgeführt wurden.

Ein EST-SSR-Marker konnte erfolgreich für *C. vulgaris* etabliert werden – von insgesamt 17 getesteten Primerkombinationen. Dass die Etablierung von nur einem EST-SSR-Marker möglich war, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die flankierenden Sequenzen, welche für das Primerdesign zur Verfügung standen, selbst aus zahlreichen Sequenzwiederholungen bestanden.

Der Transfer von SSR-Markern zwischen Gattungen innerhalb der Ericaceae war möglich. Zehn genomische SSR-Marker wurden auf *C. vulgaris* übertragen. Insgesamt wurden 103 Primerkombinationen getestet. Je näher die Gattungen, aus deren Genomen die SSRs stammten, mit der Besenheide verwandt waren (Gillespie & Kron 2010), ein desto größerer Anteil von SSR-Markern konnte auf *C. vulgaris* übertragen werden. Es wurden 25 % der getesteten SSRs von *Erica coccinea* (n = 2), 19 % von *Diplarche multiflora* (n = 7) und 6 % von *Menziesia goyozanensis* (n = 1) etabliert. SSR-

Marker aus dem Genom von *Rhododendron* und *Vaccinium corymbosum* konnten nicht etabliert werden. Im Gegensatz zu den übrigen Gattungen, die wie *C. vulgaris* zur Unterfamilie Ericoideae gehören, ist die Gattung *Vaccinium* in der Unterfamilie Vaccinioideae eingeordnet. Die beiden Pflanzenarten *C. vulgaris* und *V. corymbosum* waren vermutlich phylogenetisch zu weit voneinander entfernt, so dass kein Transfer von SSR-Markern möglich war. Durch die phylogenetische Distanz konnten vermutlich auch keine SSR-Marker von *Rhododendron* übertragen werden. Die Pflanzengattung gehört zwar genauso wie *M. goyozanensis* zur Tribus Rhodoreae, aber in der Verwandtschaftsanalyse von Gillespie und Kron (2010) war erkennbar, dass *Rhododendron* weniger nahmit *C. vulgaris* verwandt ist als *M. goyozanensis*. *D. multiflora*, die in die Tribus Empetreae eingeordnet wird, ist näher mit *C. vulgaris* verwandt. Unter den untersuchten Arten ist *E. coccinea* am nächsten mit *C. vulgaris* verwandt und ist phylogenetisch der gleichen Tribus (Ericaceae) zugeordnet. Innerhalb der Poaceae war der Transfer von SSR-Markern erfolgreicher als innerhalb der Ericaceae. Die Übertragbarkeit genomischer SSR-Marker von *Zea mays* auf *Saccharum officinarum* betrug 74,5 % (Hernandes et al. 2001). SSR-Marker von *Triticum turgidum* zeigten eine Übertragbarkeit von 60 % (Röder et al. 1995) und 27 % (Korzun et al. 2001) auf *Secale cereale*. SSR-Marker können demzufolge von nahen Verwandten übertragen werden, allerdings muss eine große Zahl an SSR-Primern getestet werden, um genügend zuverlässige polymorphe Marker für die gewünschte Pflanzenart zu erhalten.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit durch Analyse einer EST-Datenbank und durch Markertransfer innerhalb der Pflanzenfamilie Ericaceae elf polymorphe SSR-Marker für *C. vulgaris* etabliert. In der SSR-Charakterisierungspopulation von 40 Genotypen variierten die Marker stark in ihrer Ausprägung an Polymorphismen mit vier bis elf Allelen und einem Durchschnitt von acht Allelen pro SSR-Locus. Die beobachtete Heterozygotie (H_0) variierte von 35 % bis 90 % mit einem Durchschnitt von 62 %, während die erwartete Heterozygotie (H_E) zwischen 35 % und 89 % schwankte bei einem Durchschnitt von 65 %. Die ähnlichen Werte von H_0 und H_E deuten an, dass mögliche Versuchsfehler nur in geringem Maße aufgetreten sein könnten. Die 40 heterogenen Genotypen, welche für die Validierung der Primersequenzen verwendet wurden, spiegelten die genetische Diversität von *C. vulgaris* wider. Durch heterogene Testpopulationen können von Anfang an die meisten Allele identifiziert werden (Sinama et al. 2011). Die richtige Auswahl der zu untersuchenden Genotypen ist sehr wichtig, um das Auftreten neuer Allele, die sich in ihrer Produktgröße sehr unterscheiden können, in der späteren Anwendung der SSR-Marker zu vermeiden (Collins et al. 2000; Cryer et al. 2005).

Die Amplifikate der elf etablierten Marker waren bei *C. vulgaris* stets im Größenbereich von 63 bp bis 260 bp. Die acht genomischen SSR-Marker DA6, DG70, DG71, DG105, Ecoc108, Ecoc142 und Mg59 ergaben PCR-Produkte, welche den erwarteten Fragmentgrößen aus den nahen Verwandten innerhalb der Ericaceae entsprachen. Ein ähnliches Bandenmuster und eine Übereinstimmung in der Amplifikatgröße könnten darauf hindeuten, dass die Marker von den gleichen Loci abgeleitet wurden und zeigt, dass die Sequenzen der Primer-Bindungsstellen hoch konserviert sind. Auch innerhalb der Poaceae waren Bandenmuster und Amplifikatgröße zwischen Gattungen nahezu gleich (Röder et al. 1995; Hernandes et al. 2001; Korzun et al. 2001). Dass viele Marker zwischen Pflanzenarten jedoch nicht übertragen werden können, verdeutlicht dennoch vorhandene genetische Unterschiede. Durch die Anwendung der zwei SSR-Marker DC109 und DC114 aus *D. multiflora* in der vorliegenden Arbeit wurden PCR-Produkte von 230 bp bis 260 bp bei *C. vulgaris* erzeugt, obwohl sie bei *D. multiflora* Amplifikate geringerer Größe von 148 bp bzw. 179 bp lieferten (Zhang et al. 2013). Da sich die Wiederholungszahl der Motive innerhalb der DNA-Sequenz bereits bei Genotypen innerhalb einer Art unterscheiden kann, kann es demzufolge auch bei der Übertragung auf eine andere Gattung zu

unterschiedlichen Produktgrößen kommen. Durch den deutlichen Unterschied in der Produktgröße der zwei Marker, kann eine mögliche Ableitung von anderen Loci in *C. vulgaris* als bei *D. multiflora* nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Übereinstimmung der SSR-Motive der Marker mit *C. vulgaris*-SSR-Sequenzen bisher nur für den Marker Mg59 aus dem Genom von *Menziesia goyozanensis* geprüft. Das Motiv „(TC)₅CC(TC)₁₄C(TC)“ aus *M. goyozanensis* wurde in *C. vulgaris* verifiziert. Dies spiegelte sich bereits in der Übereinstimmung der Produktgröße des Markers in *M. goyozanensis* und *C. vulgaris* wider. Die PCR-Produkte der anderen Marker werden in weiteren Arbeiten sequenziert. Bei dem EST-SSR-Marker Cv29 wird mit ziemlicher Sicherheit von einer Vervielfältigung der repetitiven Sequenz (AG) ausgegangen, da die EST-Sequenzen bekannt sind. Die EST-Datenbank wurde mit den Genotypen 'Maria' und 'Boskoop' erzeugt. Da *C. vulgaris* keine große genetische Variabilität aufweist (Borchert et al. 2008), ist der Marker zwischen den Sorten wahrscheinlich sehr gut übertragbar. Zur vollkommenen Sicherheit sollte aber auch das PCR-Produkt dieses Markers Cv29 in weiteren Arbeiten sequenziert werden.

Je geringer die Frequenz des am häufigsten vorkommenden Allels eines SSR-Markers in einer Population ist, desto besser können mit Hilfe des SSR-Markers Genotypen differenziert werden (Ibañez & Eeuwijk 2003). Am geringsten waren diese Frequenzen in der vorliegenden Arbeit für die Marker Ecoc108 (15 %) und Cv29 (20 %) im Vergleich zu den anderen Markern (36 % – 80 %). Die zwei Marker zeigten ergänzend eine gleichmäßige Verteilung der Allele im genetischen Pool von *C. vulgaris*. Die verhältnismäßig geringe Frequenz ihrer Allele ging mit einer hohen Anzahl an elf und zehn Allelen einher. Die Allelzahl korrelierte jedoch nicht mit dem Heterozygotiegrad, welcher 88 % für Marker Ecoc108 und 45 % für Marker Cv29 betrug. SSR-Marker Mg59 wies nur fünf Allele und einen im Vergleich höchsten Heterozygotiegrad von 90 % auf. Der SSR-Marker DG2 wies trotz elf vorhandener Allele einen Heterozygotiegrad von nur 43 % auf.

Um die Anwendbarkeit der SSR-Marker zu prüfen, wurden sie anhand der Subpopulationen der SSR-Charakterisierungspopulation beschrieben. Die acht gesammelten Wildformen ergaben den durchschnittlich höchsten Heterozygotiegrad von 72 %. Den geringsten Heterozygotiegrad wiesen die zwölf nachweislich durch Kreuzungen entstandenen Sorten von 52 % auf. Dies ist nachvollziehbar, weil die Züchter sich eines bestimmten Genpools bedienen, der die phänotypisch wertvollsten Sorten liefert. Mit der Verwendung ähnlicher Kreuzungspartner gehen in der Züchtung dann einige Allele verloren. Etwas höher war der Heterozygotiegrad mit 62 % bei den 26 Sorten aus dem Handel. Wurden zusätzlich noch die acht Wildformen einbezogen, ergab sich ein höherer Heterozygotiegrad von 64 %. Die Allelzahl korrelierte einerseits mit der Anzahl an Genotypen, denn die Subpopulation mit 34 Genotypen zeigte die durchschnittlich höchste Zahl von acht Allelen und die 26 Sorten aus dem Handel wiesen im Durchschnitt sieben Allele auf. Andererseits korrelierte die Allelzahl mit der genetischen Diversität, denn die acht Wildformen zeigten durchschnittlich sechs Allele und die nachweislich durch Kreuzungen entstandenen Sorten vier Allele. Die Resultate sind nachvollziehbar und weisen auf eine Verlässlichkeit der SSR-Marker hin.

Ein verbessertes Verfahren zur Sortenidentifikation bei *C. vulgaris* mittels SSR-Marker wurde in der vorliegenden Arbeit erfolgreich von Ibañez und Eeuwijk (2003) übertragen, welche ein solches Verfahren mittels SSR-Marker für Reben erarbeiteten. Das System zur Sortenidentifikation war für *C. vulgaris* wünschenswert und wichtig in Bezug auf potentiell abgeleitete Sorten durch somatisch induzierte Polyploide. Die Differenzierung des Sortenspektrums durch die SSR-Marker wurde geprüft

und ihre Allelfrequenzen nach der Methodik von Ibañez und Eeuwijk (2003) populationsgenetisch untersucht. Durch die Annahme einer möglichen uneingeschränkten Paarung konnten die Allelfrequenzen der elf Marker auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) und das Kopplungsgleichgewicht (LE) getestet werden. Bei Züchtung wird in der Regel nicht von Panmixie ausgegangen, jedoch wurde in dieser Analyse eine mehr oder weniger uneingeschränkte Paarung vorausgesetzt, weil 26 Sorten aus dem Handel verwendet wurden, die den Genpool der europäischen Züchter widerspiegeln.

Innerhalb der fünf SSR-Loci Cv29, DG70, DG71, Ecoc142 und Mg59 waren die Allele nicht unabhängig, d. h. die Allele kamen häufiger oder seltener vor, als es eine uneingeschränkte Paarung erwarten ließ – was durch die Selektion bei der Sortenentwicklung bedingt sein könnte. Zwischen den zwei SSR-Loci Cv29 und DG2 waren die Allele auch nicht unabhängig. Die sechs Marker DA6, DC109, DC114, DG2, D105 und Ecoc108, die HWE und LE erfüllten, wurden verwendet, um die Wahrscheinlichkeit zu bestimmen, dass zwei Sorten aus dem Set der 26 Vergleichssorten zufällig identische Bandenmuster im Gel zeigen könnten (Übereinstimmungs-Wahrscheinlichkeit). Die Genotypfrequenzen für die 26 Sorten waren unterschiedlich. Der höchste Wert von 0,6 % wurde für die Sorte 'Dark Beauty' berechnet. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,6 % stimmt irgendeine Sorte rein zufällig im SSR-Fingerprint mit der Sorte 'Dark Beauty' überein (obwohl sie nicht die Sorte 'Dark Beauty' ist). Dies ist bedingt durch die hohe Zahl von Allelen, die unterschieden werden können. Nur in einem von 1758 Fällen wäre mit der SSR-Analyse keine sichere Differenzierung des Sortenspektrums möglich. Diese geringe Wahrscheinlichkeit ist eine solide Grundlage für Entscheidungen bei potentiellen Züchtungsstreitigkeiten, daher können die etablierten SSR-Marker diesbezüglich verwendet werden.

Durch die berechnete geringe Übereinstimmungs-Wahrscheinlichkeit kann eine potentiell abgeleitete Sorte durch 100 % übereinstimmender SSR-Banden im Gel nachgewiesen werden. Die Sorten 'Melanie', 'Anette', 'Sandy', 'Annegret', 'Anneliese', 'Fritz Kircher', 'CV7', 'Karla', 'Venetia', 'Minka' und 'Miranda' führten in der Vergangenheit zu Rechtsstreitigkeiten, und wurden in der vorliegenden Arbeit mittels neun polymorpher SSR-Marker analysiert. Da die Sorten 'Annegret' und 'Anneliese' identische Allele aufwiesen, ist davon auszugehen, dass 'Anneliese' eine potentiell abgeleitete Sorte von 'Annegret' ist, obwohl sie sich phänotypisch unterscheiden. Im Zuchtbuch des Kooperationspartners war vermerkt, dass die Sorte 'Anneliese' ein Sport von 'Annegret' sei. Dies konnte nun mittels SSR-Methode bestätigt werden.

Für die Analyse der Abstammung Polyploider können die elf für *C. vulgaris* etablierten polymorphen SSR-Marker genutzt werden, da ein System zur Identifikation abgeleiteter Sorten von Ibañez und Eeuwijk (2003) übertragen werden konnte und es sich als anwendbar erwies.

4.6 Züchtung von *Calluna vulgaris* auf polyploidem Niveau

Für die Züchtung der Besenheide sind polyploide Pflanzen eine attraktive Möglichkeit. Da ihre Blüten nur 2 mm bis 3 mm groß sind, entsteht die Farbwirkung der blühenden Pflanze über Blütenmenge und Dichte des Blütenstandes. Weil polyploide Pflanzen größere Einzelblüten haben, wird diese Wirkung noch verstärkt. In Bezug auf diese züchterisch relevanten Merkmale wurden die Blüten der triploiden und tetraploiden Nachkommen der tetraploiden Pflanze '7705' makroskopisch mit Hilfe von Vergleichspflanzen untersucht.

Es fiel eine Merkmalskopplung kleiner dicht stehender Blüten auf triploider Stufe auf. 31,0 % der Triploiden hatten kleine Blüten in hoher Dichte und 20,7 % mittelgroße Blüten in hoher Dichte. Die wertvollste Merkmalskombination für Züchter ist allerdings ein dichter Blütenstand großer Blüten am Zweig, welche in der vorliegenden Arbeit nur bei 3,4 % der Triploiden und 2,8 % der Tetraploiden zu erkennen war. Diese unerwünschte Merkmalskopplung ist auch von polyploiden Genotypen anderer Pflanzenarten bekannt. Polyploide haben in der Regel größere, aber weniger Blüten als Diploide. Bereits Straub (1950) erkannte eine negative Korrelation zwischen Größe und Dichte der Blüten bei verschiedenen *Brassica*-Arten. Husband (2000) beobachtete bei Polyploiden von *Chamerion* weniger Blüten am traubigen Blütenstand. Ebenso bemerkte Anderson (2007) bei polyploiden Pflanzen von *Dendrodium* weniger Blüten pro Traube. Auch bei Polyploiden von *Vicia villosa* war eine geringere Blütendichte erkennbar (Tulay & Unal 2010), und bei *Salvia splendens* zeigten sich weniger Blüten pro Ähre bei Polyploiden im Vergleich zu Diploiden (Percival 2013).

In der vorliegenden Arbeit wiesen unabhängig von der Blütengröße 55,1 % der Triploiden und 33,2 % der Tetraploiden eine hohe Blütendichte auf, was einem hohen Zierwert entspricht. Vor allem die angestrebten Triploiden zeigten im Vergleich am häufigsten eine hohe Blütendichte. Die Tetraploiden wiesen am häufigsten Blüten von mittlerer Größe auf – in lockerer (25,1 %), mittlerer (23,1 %) und kompakter Anordnung (22,5 %). Es stellte sich dementsprechend eine große Aufspaltung der züchterisch relevanten Merkmale heraus. Züchtung auf polyploidem Niveau hat den Vorteil, dass die Aufspaltung der Merkmale zu vielen unterschiedlichen Kombinationen führt. So kann eine hohe phänotypische Variabilität generiert werden, was bereits Bever und Felber (1992) sowie Moody et al. (1993) bei populationsgenetischen Untersuchungen autopolyploider Pflanzen auffiel.

Neben Blütengröße und Blütendichte ist der Blütentyp ein weiteres züchterisch relevantes Merkmal. Die Besonderheit der „Knospenblütigkeit“ ist in der Züchtung von *C. vulgaris* von größtem Interesse, weil dieser Blütentyp länger seinen Zierwert behält (Borchert & Hohe 2010). An 357 tetraploiden Nachkommen aus der freien Abblüte des tetraploiden Genotyps '7705' konnte mittels Blütenbonitur ermittelt werden, ob der Blütentyp auf tetraploidem Niveau disom oder tetrasom vererbt wird. Da es sich bei *C. vulgaris* um autotetraploide Genotypen handelt, wurde davon ausgegangen, dass auf tetraploidem Niveau eine tetrasome Vererbung stattfindet. Dies bedeutet, dass die Genotypen vier homologe Chromosomen aufweisen, die alle frei miteinander kombiniert werden können. In diploiden *C. vulgaris* ist das Merkmal des Blütentyps auf einen Locus begrenzt. Einfachblüher sind dominant über Knospenblüher (Borchert & Hohe 2009). In der Population 2008.177 waren fünf triploide (17,2 %) und 16 tetraploide knospenblühende Pflanzen (4,5 %) vorhanden.

Die Spaltungsanalyse konnte nur mit den Tetraploiden durchgeführt werden, weil die Triploiden durch Bestäubung mit Pollen von diploiden Pflanzen unbekanntem Ursprungs entstanden sein könnten. Bei Genotyp '7705' wurde von der genetischen Konstitution von „AAaa“ in Bezug auf den Blütentyp ausgegangen, weil die Elternpflanzen 'Maria' („aa“) und 'Perestroijka' („AA“) Knospenblüher bzw. homozygote Einfachblüher waren. Tetrasomie bedeutet eine freie Kombination von allen vier Allelen und würde zu einem Spaltungsverhältnis von 35 : 1 führen. Disomie ist durch eine Kombination von jeweils einem elterlichen Allel miteinander gekennzeichnet und würde in einer fixierten Heterozygotie ohne knospenblühende Nachkommen resultieren. Da in der tetraploiden Nachkommenschaft 16 Knospenblüher herauspalteten, wurde von einer rezessiven und tetrasomen Vererbung auf tetraploidem Niveau ausgegangen. Die Hypothese wurde mittels χ^2 -Test ($3,838 < 3,841$) nicht abgelehnt. Die polysome Vererbung von *C. vulgaris* ist vorteilhaft für die Züchtung, da dieser Vererbungsmodus zu einem hohen Heterozygotiegrad in polyploiden Populationen führt (Parisod et

al. 2010). Für *Solanum*-Populationen konnte gezeigt werden, dass diese größere genetische Variabilität in eine erhöhte Fitness und Fertilität mündet (Carputo et al. 2003). Auch bei der mit *C. vulgaris* nah verwandten Gattung *Vaccinium* zeigte sich eine ausgeprägte Fertilität autotetraploider Genotypen (Lyrene et al. 2003).

Die Züchtung von *C. vulgaris* auf polyploidem Niveau ist möglich. Für die Züchtung von polyploiden Knospenblühern sollte jeder Kreuzungspartner mindestens ein rezessives Allel für das Merkmal „Knospenblütigkeit“ aufweisen. Je mehr rezessive Allele miteinander kombiniert werden können, desto höher ist der Anteil polyploider Knospenblüher in der Nachkommenschaft. Am besten eignet sich hierfür die Kreuzung polyploider Knospenblüher mit heterozygoten Einfachblühern. Für die Erzeugung triploider Knospenblüher wird empfohlen, tetraploide Knospenblüher als Samenträger und diploide heterozygote Einfachblüher als Pollenspender zu verwenden.

5 Literaturverzeichnis

- Abe, H., Maki, M., Horie, S., & Suyama, Y. (2011). *Isolation and characterization of microsatellite loci for Menziesia goyozanensis, an endangered shrub species endemic to Mt. Goyo in northern Japan*. Conservation Genetics Resources: 3(3):569-571.
- Allum, J., Bringloe, D., & Roberts, A. (2007). *Chromosome doubling in a Rosa rugosa Tunb. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time*. Plant Cell Reports: 26:1977-1984.
- Alvarez, A., van de Wiel, C., Smulders, M., & Vosman, B. (2001). *Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus Lycopersicon*. Theoretical and Applied Genetics: 103:1283–1292.
- Anderson, N. (2007). *Flower Breeding and Genetics: Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century*. Springer: 546.
- Avery, G., & Pottendorf, L. (1945). *Polyploidy, auxin and nitrogen in green plants*. American Journal of Botany: 32:669-671.
- Baird, W., Estager, A., & Wells, J. (1994). *Estimating Nuclear DNA Content in Peach and Related Diploid Species Using Laser Flow Cytometry and DNA Hybridization*. Journal of the American Society for Horticultural Science: 119:1312-1316.
- Bajpai, A., & Singh, A. (2006). *Meiotic behavior of Carica papaya L.: spontaneous chromosome instability and elimination in important cvs. in north Indian conditions*. Cytologia: 71(2):131-136.
- Baltisberger, M. (2009). *Systematische Botanik. Einheimische Farn- und Samenpflanzen*. Hochschulverlag AG an der ETH Zürich.
- Behr, H., & Tröster, B. (2014). *Markt Report Blumen & Zierpflanzen*. AMI GmbH: 12:1-2.
- Behrend, A., Borchert, T., Spiller, M., & Hohe, A. (2013). *AFLP-based genetic mapping of the “bud-flowering” trait in heather (Calluna vulgaris)*. BMC Genetics: 14(64).
- Behrend, A., Gluschak, A., Przybyla, A., & Hohe, A. (2015). *Interploid crosses in heather (Calluna vulgaris)*. Scientia Horticulturae: 181(2):162–167.
- Belling, J., & Blakeslee, A. (1922). *The assortment of chromosomes in triploid Daturas*. The American Naturalist: 56:339–346.
- Belling, J., & Blakeslee, A. (1924). *The distribution of chromosomes in tetraploid Daturas*. The American Naturalist: 58:60–70.
- Bennett, M., & Smith, J. (1976). *Nuclear DNA amounts in angiosperms*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences: 274:227-274.

- Bennett, M., Price, H., & Johnston, J. (2008). *Anthocyanin inhibits propidium iodide DNA fluorescence in Euphorbia pulcherrima: Implications for genome size variation and flow cytometry*. *Annals of Botany*: 101:777-790.
- Bever, J., & Felber, F. (1992). *The theoretical population genetics of autopolyploidy*. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*: 8:185–217.
- Beyhan, N., & Serdar, U. (2008). *Assessment of pollen viability and germinability in some European chestnut genotypes (Castanea sativa L.)*. *Horticultural Science*: 35(4):171–178.
- Blakslee, A., & Avery, A. (1937). *Methods of inducing doubling of chromosome in plants by treatment with colchicine*. *Journal of Heredity*: 28:393-411.
- Boaventura, Y., Medina, D., Vieira, M., & Arruda, H. (1981). *Número de cloroplastos e nível de ploidia em espécies de Coffea L.* *Revista Brasileira de Botânica*: 4:15-21.
- Boches, P., Bassil, N., & Rowland, L. (2005). *Microsatellite markers for Vaccinium from EST and genomic libraries*. *Molecular Ecology*: 5:657-660.
- Bolat, I., & Pirlak, L. (1999). *An Investigation on Pollen Viability, Germination and Tube Growth in Some Stone Fruits*. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*: 23:383-388.
- Borchert, T., & Gawenda, I. (2010). *Development and application of high-throughput amplified fragment length polymorphism technique in Calluna vulgaris (Ericaceae)*. *Electronic Journal of Biotechnology*: 13(2).
- Borchert, T., & Hohe, A. (2009). *Identification of molecular markers for the flower type in the ornamental crop Calluna vulgaris*. *Euphytica*: 170:203-213.
- Borchert, T., & Hohe, A. (2010). *Classification of flower types in Calluna vulgaris L. (Hull)*. *Acta Horticulturae*: 855:41-46.
- Borchert, T., Behrend, A., & Hohe, A. (2012). *On the genetics of the 'Bud-Flowering' trait in the ornamental crop Calluna vulgaris*. *Acta Horticulturae*: 930:111-117.
- Borchert, T., Eckardt, K., Fuchs, J., Krüger, K., & Hohe, A. (2009). *'Who's who' in two different flower types of Calluna vulgaris (Ericaceae): morphological and molecular analyses of flower organ identity*. *BMC Plant Biology*: 9:148.
- Borchert, T., Krüger, J., & Hohe, A. (2008). *Implementation of a model for identifying Essentially Derived Varieties in vegetatively propagated Calluna vulgaris varieties*. *BMC Genetics*: 9:56 .
- Bowcock, A., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, A., Minch, E., Kidd, J., & Cavalli-Sforza, L. (1994). *High-resolution human evolutionary trees from polymorphic microsatellites*. *Nature*: 368:455–457.
- Bowden, W. (1940). *Diploidy, Polyploidy and winter hardiness relationships in the flowering plants*. *American Journal of Botany*: 27:357-371.
- Bradshaw, H., & Stettler, F. (1993). *Molecular genetics of growth and development in Populus. I. Triploidy in hybrid poplars*. *Theoretical and Applied Genetics*: 86:301–7.

- Bretagnolle, F., & Thompson, J. (1995). *Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopoloid plants*. *New Phytologist*: 129:1-22.
- Brochmann, C., & et al. (2004). *Polyploidy in arctic plants*. *Biological Journal of the Linnean Society*: 82:521–536.
- Brummer, E., Cazcarro, P., & Luth, D. (1999). *Ploidy Determination of Alfalfa Germplasm Accessions Using Flow Cytometry*. *Crop Science*: 39(4):1202-1207.
- Carputo, D., Frusciant, L., & Peloquin, S. (2003). *The role of 2n gametes and endosperm balance number in the origin and evolution of polyploids in the tuber-bearing Solanums*. *Genetics* : 163:287-294.
- Chakraborti, S., Vijayan, K., Roy, B., & Qadri, S. (1998). *In vitro induction of tetraploidy in mulberry (Morus alba L.)*. *Plant Cell Reports*: 17:799-803.
- Chaudhury, A., & et al. (1997). *Fertilization-independent seed development in Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 94:4223–4228.
- Chavez, D., & Lyrene, P. (2009). *Production and Identification of Colchicine-derived Tetraploid Vaccinium darrowii and its Use in Breeding*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*: 134(3):356-363.
- Clausen, J., Keck, D., & Hiesey, W. (1945). *Experimental studies on the nature of species.II. Plant evolution through amphiploidy and autopoloidy with examples from the Machinae*. *Carnegie Institution for Science*: 564:174.
- Cohen, D., & Yao, J. (1996). *In vitro chromosome doubling of nine Zantedeschia cultivars*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*: 47:43-49.
- Collins, H., Li, H., & Inda, S. (2000). *A simple and accurate method for determination of microsatellite total allele content differences between DNA pools*. *Human Genetics*: 106:218-226.
- Collins, J. (1933). *Morphological and cytological characteristics of triploid pineapples*. *Cytologia*: 4:248–56.
- Comai, L. (2005). *The advantages and disadvantages of being polyploid*. *Nature Reviews Genetics*: 6:836-846.
- Cramer, C. (1999). *Laboratory Techniques for Determining Ploidy in Plants*. *Hort Technology*: 9(4):594-596.
- Cryer, N., Butler, D., & Wilkinson, M. (2005). *High throughput, high resolution selection of polymorphic microsatellite loci for multiplex analysis*. *Plant Methods*: 1:3.
- Dansi, A., Mignouna, H., Zoundjihekpon, J., Sangare, A., Asiedu, R., & Ahoussou, N. (2000). *Using isozyme polymorphism to assess genetic variation within cultivated yams (Dioscorea cayenensis/Dioscorea rotundata complex) of the Republic of Benin*. *Genetic Resources and Crop Evolution*: 47:371–383.
- Darlington, C. (1937). *Recent Advances in Cytology*. London: Churchill. 2nd ed.

- Darrow, G., Dermen, H., & Scott, D. (1949). *A tetraploid blueberry from a cross of diploid and hexaploid species*. *Journal of Heredity*: 40:304-306.
- De Keyser, E., Shu, Q., Van Bockstaele, E., & De Riek, J. (2010). *Multipoint-likelihood maximization mapping on 4 segregating populations to achieve an integrated framework map for QTL analysis in pot azalea (*Rhododendron simsii* hybrids)*. *BMC Molecular Biology*: 11:1.
- De Oliveira, V., Forni-Martins, E., Magalhaes, P., & Alves, M. (2004). *Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae)*. *Genetics and Molecular Biology*: 27(2):215-222.
- De Riek, J., & Debener, T. (2010). *Present use of molecular markers in ornamental breeding*. *Acta Horticulturae*: 855:77-83.
- DeLaat, A., Gohde, W., & Vogelzakg, M. (1987). *Determination of Ploidy of Single Plants and Plant Populations by Flow Cytometry*. *Plant Breeding*: 99(4):303-307.
- Dendauw, J., De Riek, J., Arens, P., Van Bockstaele, E., Vosman, B., & De Loose, M. (2001). *Development of sequenced tagged microsatellite sites (STMS) markers in azalea*. *Acta Horticulturae*: 546:193-197.
- Dermen, H. (1940). *Colchicine polyploidy and technique*. *The Botanical Review*: 6:599-635.
- Dewitte, A., Eeckhaut, T., Van Huylenbroeck, J., & Van Bockstael, E. (2010). *Induction of 2n pollen formation in *Begonia* by trifluralin and N2O treatments*. *Euphytica*: 171:283-293.
- Dhooge, E., Denis, S., Eeckhaut, T., Reheul, D., & Van Labeke, M. (2009a). *In vitro induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus**. *Euphytica*: 168:33-40.
- Dhooge, E., Grunewald, W., Leus, L., & Van Labeke, M. (2009b). *In vitro polyploidisation of *Helleborus* species*. *Euphytica*: 165:89–95.
- Dhooge, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., & Van Huylenbroeck, J. (2011). *Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*: 104(3):359-373.
- Dijkstra, H., & Speckmann, G. (1980). *Autotetraploidy in Caraway (*carum carvi* L.) for the increase of the aetheric oil content of the seed*. *Euphytica*: 29:89-96.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M., Poizat, C., Zanetto, A., . . . Laigret, F. (2002). *Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.)*. *Theoretical and Applied Genetics*: 105:127–138.
- Dold, S. (2013). *Massenspektrometrische Analyse von Anthocyanen und deren Metaboliten in komplexen biologischen Proben*. Dissertation Universität Gießen: Institut für Anorganische und Analytische Chemie.
- Doležel, J. (1991). *Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants*. *Phytochemical Analysis*: 2:143–154.

- Doležel, J. (1997). *Application of flow cytometry for the study of plant genomes*. Journal of Applied Genetics: 38(3):285-302.
- Doležel, J., & Bartos, J. (2005). *Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size*. Annals of Botany: 95:99-110.
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). *Flow cytometry in plants: an overview*. Wiley: 41-65.
- Dörken, V., & Jagel, A. (2012). *Calluna und Erica, Besenheide und Heide (Ericaceae) als Winterblüher der Friedhöfe und Gärten*. Jahrbuch des Bochumer Botanischen Vereins: 3:203-209.
- Dorsey, E. (1936). *Induced Polyploidy in wheat and rye: Chromosome Doubling in Triticum, Secale and Triticum-Secale Hybrids Produced by Temperature Changes*. Journal of Heredity: 27(4):155-160.
- Dunemann, F., Kahnau, R., & Stange, I. (1999). *Analysis of complex leaf and flower characters in Rhododendron using a molecular linkage map*. Theoretical and Applied Genetics: 98:1146–1155.
- Eckardt, K. (2009). *Blütenbildung bei Calluna vulgaris (L.) HULL*. Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden.
- Eeckhaut, T., Samijn, G., & Van Bockstaele, E. (2002). *In vitro polyploidy induction in Rhododendron simsii hybrids*. Acta Horticulturae: 572:43–49.
- Eeckhaut, T., Werbrouck, S., Leus, L., Van Bockstaele, E., & Debergh, P. (2004). *Chemically induced polyploidization in Spathiphyllum wallisii Regel through somatic embryogenesis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture: 78:241-246.
- Eeuwijk, F., & Law, J. (2004). *Statistical aspects of essential derivation, with illustrations based on lettuce and barley*. Euphytica: 137(1):129-137.
- Ehrendorfer, F. (1980). *Polyploidy and distribution*. New York, NY, USA: Plenum Press: 45-60.
- Ehsen, B. (2011). *Sichtungsergebnisse von Calluna-Knospenblühern: Von einer "Laune der Natur" zum Verkaufsschlager*. Baumschule.
- Eigsti, O. (1947). *The pollen tube method for making comparisons of differences in mitotic rates between diploid and tetraploid*. Genetics: 32:85.
- Eigsti, O. (1957). *Induced polyploidy*. American Journal of Botany: 44:272-279.
- Eigsti, O., & Dustin, P. (1955). *Colchicine in Agriculture, medicine, biology, chemistry*. Iowa University Press: Ames, Iowa.
- Erickson, A., & Markhart, A. (2002). *Flower developmental stage and organ sensitivity of bellpepper (Capsicum annuum L.) to elevated temperature*. Plant, Cell & Environment: 25:123–130.
- Erilova, A., & et al. (2009). *Imprinting of the Polycomb group gene MEDEA serves as a ploidy sensor in Arabidopsis*. PLoS Genetics: 5:e1000663.

- Esen, A., & Soost, R. (1973). *Seed development in Citrus with special reference to 2x x 4x crosses*. American Journal of Botany: 60:448–62.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). *Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis*. Evolutionary Bioinformatics Online: 1:47-50.
- Fairbanks, M., Hardy, G., & McComb, J. (2002). *Mitosis and meiosis in plants are affected by the fungicide phosphate*. Australasian Plant Pathology: 31:281–289.
- Fawcett, J., Maere, S., & Van De Peer, Y. (2009). *Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA: 106:5737–5742.
- Francis, D. (2007). *The plant cell cycle - 15 years on*. New Phytologist: 174:261-278.
- Frost, H., & Soost, R. (1968). *Seed reproduction: development of gametes and embryos*. University of California Press: 2:290–324.
- Fuzinatto, V., Pagliarini, M., & Valle, C. (2008). *Evaluation of microsporogenesis in an interspecific Brachiaria hybrid (Poaceae) collected in distinct years*. Genetics and Molecular Research: 7:424-432.
- Galbraith, D., Harkins, K., & Knapp, S. (1991). *Systemic Endopolyploidy in Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology: 96(3):985–989.
- Gillespie, E., & Kron, K. (2010). *Molecular phylogenetic relationships and a revised classification of the subfamily Ericoideae (Ericaceae)*. Molecular Phylogenetics and Evolution: 56:343–354.
- Gluschak, A., Przybyla, A., Behrend, A., & Hohe, A. (2015). *Zwei, drei oder vier: Ploidiemutationen in der Züchtung von Sommerheide*. Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V.: Jahresbericht IGZ 2013/2014:32–35.
- Grant, V. (1981). *Plant speciation*. 2nd ed. Columbia University Press, New York.
- Greilhuber, J. (1988). *'Self-tanning'—a new and important source of stoichiometric error in cytophotometric determination of nuclear DNA content in plants*. Plant Systematics and Evolution : 158:87–96.
- Grossniklaus, U., & et al. (1998). *Maternal control of embryogenesis by MEDEA a Polycomb group gene in Arabidopsis*. Science: 280:446–450.
- Gürtler, S., Klocke, E., & Schrader, O. (2013). *Mutagenese und Polyploidisierung zur Schaffung neuer genetischer Variabilität bei der Hortensie (Hydrangea macrophylla)*. Journal für Kulturpflanzen: 65(7):273-284.
- Haldane, J. (1933). *The causes of evolution*. Longwood Green, London.
- Hayden, M., Nguyen, T., Waterman, A., & Chalmers, K. (2008). *Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping*. BMC Genomics: 9:80.

- Hernandez, P., Oorado, G., Laurie, D., Martin, A., & Snape, J. (2001). *Microsatellites and RFLP probes from maize are efficient sources of molecular markers for the biomass energy crop Miscanthus*. *Theoretical and Applied Genetics*: 102:616–622.
- Heslop-Harrison, J., & Heslop-Harrison, Y. (1970). *Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence – intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate*. *Stain Technology*: 45:115.
- Husband, B. (2000). *Constraints on polyploid evolution: a test of the minority cytotype exclusion principle*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*: 267(1440):217–223.
- Huskins, C. (1934). *Anomalous segregation of a triploid tomato*. *Journal of Heredity*: 25:281–286.
- Ibañez, J., & van Eeuwijk, F. (2003). *Microsatellite profiles as a basis for intellectual property protection in grape*. *Acta Horticulturae*: 603:41-47.
- Iizuka, M., & Ikeda, A. (1968). *Induction of polyploidy in Lilium formosanum Wallace*. *The Japanese Journal of Genetics*: 43:95–101.
- Ilarslan, I. (1990). *Diploid ve Tetraploid Çavdar (Secale cereale L.) Bitkisinin Morfolojik, Sitolojik ve Palinolojik Yapılarının karşılaştırılması*. Doktora Tezi, A.Ü. Fen Bilimleri Enst., Ankara.
- Jackson, R., & Casey, J. (1982). *Cytogenetic analysis of autopolyploids: models and methods for triploids to octoploids*. *American Journal of Botany*: 69:487–501.
- Jacquemart, A. (2003). *Floral traits of Belgian Ericaceae: are they good indicators to assess the breeding system?* *Belgian Journal of Botany*: 136(2):154-164.
- Jenczewski, E., & et al. (2003). *PrBn, a major gene controlling homeologous pairing in oilseed rape (Brassica napus) haploids*. *Genetics*: 164:645–653.
- Johnston, S., Nijs, T., Peloquin, S., & Hanneman, R. (1980). *The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses*. *Theoretical and Applied Genetics*: 57:5–9.
- Johnston, J., Bennett, M., Rayburn, A., Galbraith, D., & Price, H. (1999). *Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei*. *American Journal of Botany*: 86(5):609-613.
- Joshi, P., & Verma, R. (2004). *High Frequency Production of Colchicine Induced Autotetraploids in Faba Bean (Vicia faba L.)*. *Cytologia*: 69(2):141-147.
- Kashi, Y., King, D., & Soller, M. (1997). *Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation*. *Trends in Genetics*: 13(2):74–78.
- Kehr, A. (1996). *Woody plant polyploidy*. *American Nurseryman Magazine*: 183:38-47.
- Kermani, M., Sarasan, V., Roberts, A., Yokoya, K., Wentworth, J., & Sieber, V. (2003). *Oryzalin-induced chromosome doubling in Rosa and its effect on plant morphology and pollen viability*. *Theoretical and Applied Genetics*: 107:1195-1200.
- Khosravi, P., Kermani, M., Nematzadeh, G., Bihamta, M., & Yokoya, K. (2008). *Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of Rosa*. *Euphytica*: 160(2):267-275.

- Kinoshita, T., & et al. (1999). *Imprinting of the MEDEA Polycomb gene in the Arabidopsis endosperm*. Plant Cell: 11:1945–1952.
- Kiyosue, T., & et al. (1999). *Control of fertilization-independent endosperm development by the MEDEA Polycomb gene in Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences: 96:4186–4191.
- Köhler, C., Mittelsten Scheid, O., & Erilova, A. (2010). *The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants*. Trends in Genetics: 26(3):142-148.
- Korzun, V., Malyshev, S., Kartel, N., Westermann, T., Weber, W., & Börner, A. (2001). *A genetic map of rye (Secale cereale L.) combining RFLP, isozyme, protein, microsatellite and gene loci*. Theoretical and Applied Genetics: 102:709-717.
- Krauss, S. (1999). *Complete exclusion of nonsires in an analysis of paternity in a natural plant population using amplified fragment length polymorphism (AFLP)*. Molecular Ecology: 8(2):217-226.
- Kron, K., Judd, W., Stevens, P., Crayn, D., Anderberg, A., Gadek, P., . . . Luteyn, J. (2002). *Phylogenetic classification of Ericaceae: molecular and morphological evidence*. The Botanical Review: 68(3):335–423.
- Krüger, K., Bornhake, C., Müller, A., Behrend, A., & Hohe, A. (2013). *Aussat von Callunen: In acht Monaten vom Samen zur Blüte*. Gärtnerbörse.
- Kuleung, C., Baenziger, P., & Dweikat, I. (2004). *Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale*. Theoretical and Applied Genetics: 108:1147–1150.
- Langlet, O. (1927). *Beiträge zur Zytologie der Ranunculaceen*. Svensk Botanisk Tidskrift: 21:1-17.
- Lesley, J. (1928). *The cytological and genetical study of progenies in triploid tomatoes*. Genetics: 13:1–43.
- Li, H., Liang, Y., Junsui, L., Gao, X., & He, C. (2011). *Characterization of 10 polymorphic microsatellite markers for Mediterranean blue mussel Mytilus galloprovincialis by EST database mining and cross-species amplification*. Journal of Genetics: 90(1).
- Lin, B. (1984). *Ploidy barrier to endosperm development in maize*. Genetics: 107:103–115.
- Lüttge, U., Kluge, M., & Bauer, G. (2005). *Botanik*. Wiley-VCH: 5:241.
- Lutz, A. (1907). *A preliminary note on the chromosomes of Oenothera lamarckiana and one of its mutants, Oenothera gigas*. Science: 27:151-152.
- Lyrene, P., Vorsa, N., & Ballington, J. (2003). *Polyploidy and sexual polyploidization in the genus Vaccinium*. Euphytica: 133:27-36.
- Ma, Y., Islam-Faridi, M., Crane, C., Stelly, D., Price, H., & Byrne, D. (1996). *A New Procedure to Prepare Slides of Metaphase Chromosomes of Roses*. HortScience: 31(5):855–857.
- Mabberley, D. (2008). *Mabberley's plant book*. 3. Aufl. – Cambridge.

- Mahy, G., & Jacquemart, A. (1999). *Early Inbreeding Depression and Pollen Competition in Calluna vulgaris (L.) Hull*. *Annals of Botany*: 83:697-704.
- Marie, D., & Brown, S. (1993). *A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species*. *Biology of the Cell*: 78:41-51.
- Marks, G. (1966). *The origin and significance of intraspecific polyploidy: experimental evidence from Solanum chacoense*. *Evolution*: 20:552-57.
- Matsuoka, Y., & Nasuda, D. (2004). *Durum wheat as a candidate for the unknown female progenitor of bread wheat: an empirical study with a highly fertile F1 hybrid with Aegilops tauschii Coss*. *Theoretical and Applied Genetics*: 109:1710-1717.
- Mayer, V., & Aguilera, A. (1990). *High levels of chromosome instability in polyploids of Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*: 231:177-186.
- McClintock, B. (1929). *A cytological and genetical study of triploid maize*. *Genetics*: 14:180-222.
- Meudt, H., & Clarke, A. (2007). *Almost Forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances*. *Trends in Plant Science*: 12(3):106-117.
- Miller, J., & Venable, D. (2000). *Polyploidy and the evolution of gender dimorphism in plants*. *Science*: 289:2335-2338.
- Molin, W., & Khan, R. (1997). *Mitotic disruptor herbicides: recent advanced and opportunities*. *Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology*: 143-158.
- Moody, M., Mueller, L., & Soltis, D. (1993). *Genetic-variation and random drift in autotetraploid populations*. *Genetics*: 134:649-657.
- Moore, J., & Janick, J. (1983). *Methods in Fruit Breeding*. Purdue University Press.
- Morejohn, L., Bureau, T., Molè-Bajer, J., Bajer, A., & Fosket, D. (1987). *Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro*. *Planta*: 172(2):252-264.
- Morejohn, L., Bureau, T., Tocchi, L., & Fosket, D. (1984). *Tubulins from different higher plant species are immunologically nonidentical and bind colchicine differentially*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 81(5):1440-1444.
- Mueller, U., & Wolfenbarger, L. (1999). *AFLP genotyping and fingerprinting*. *Trends in Ecology & Evolution*: 14:389-394.
- Muller, J. (1979). *Form and function in angiosperm pollen*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*: 66:593-692.
- Müntzing, A. (1936). *The Evolutionary Significance of Autopolyploidy*. *Hereditas*: 21(2-3):363-378 .
- Murashige, T., & Nakano, R. (1966). *Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants*. *Journal of Heredity*: 57:114-118.

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Plant Physiology*: 15: 473-497.
- Myers, W., & Hill, H. (1940). *Studies of chromosomal association and behavior and occurrence of aneuploidy in autotetraploid grass species, orchard grass, tall oat grass, and crested wheatgrass*. *Botanical Gazette*: 102(2):236–255.
- Naito, K., Isagi, Y., & Nakagoshi, M. (1998). *Isolation and characterization of microsatellites of *Rhododendron metternichii* Sieb. et Zucc. var. hondoense Nakai*. *Molecular Ecology*: 7(7):925-931.
- Nitsch, J. (1969). *Experimental androgenesis in *Nicotiana**. *Phytomorphology*: 19:389-404.
- Norrmann, G., Quarin, C., & Keeler, K. (1997). *Evolutionary Implications of Meiotic Chromosome Behavior, Reproductive Biology, and Hybridization in 6X and 9X Cytotypes of *Andropogon gerardii* (Poaceae)*. *American Journal of Botany*: 84(2):201-208.
- Norton, J. (1966). *Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts*. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*: 89:132–134.
- Nybom, H. (2004). *Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants*. *Molecular Ecology*: 13:1143-1155.
- Oberle, G., & Watson, R. (1953). *The use of 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride in viability tests of fruit pollens*. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*: 61:299–303.
- Ortiz, R., Bruederle, L., Lavery, T., & Vorsa, N. (1992b). *The origin of polyploids via 2n gametes in *Vaccinium* section *Cyanococcus**. *Euphytica*: 61:241-246.
- Ortiz, R., Vorsa, N., Bruederle, L., & Lavery, T. (1992a). *Occurrence of unreduced pollen in diploid blueberry species, *Vaccinium* sect. *Cyanococcus**. *Theoretical and Applied Genetics*: 85:55-60.
- Paden, D. (1990). *Doubling chromosomes with colchicines treatment in vitro as determined by chloroplast number in epidermal guard cells*. *Journal American Rhododendron Society*: 44:162-165.
- Parfitt, D., & Ganeshan, S. (1989). *Comparison of procedures for estimating viability of *Prunus* pollen*. *American Society for Horticultural Science*: 24(2):354–356.
- Parisod, C., Holderegger, R., & Brochmann, C. (2010). *Evolutionary consequences of autopolyploidy*. *New Phytologist*: 186:5-17.
- Park, S., Hiramatsu, M., & Wakana, A. (1999). *Aneuploid plants derived from crosses with triploid grapes through immature seed culture and subsequent embryo culture*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*: 59:125-133.
- Park, S., Wakana, A., Kim, J., & Jeong, C. (2002). *Male and female fertility in triploid grapes (*Vitis complex*) with special reference to the production of aneuploid plants*. *Journal of Grapevine Research*: 41:11-19.

- Paterson, A., Bowers, J., & Chapman, B. (2004). *Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 101:9903–9908.
- Pearson, H., & Harney, P. (1984). *Pollen viability in rosa*. *American Society for Horticultural Science*: 19(5):710–711.
- Percival, M. (2013). *Floral Biology*. Department of Botany, University College of South Wales and Monmouthshire: 96.
- Pfossen, M., Amon, A., Lelley, T., & Heberle-Bors, E. (1995). *Evaluation of Sensitivity of Flow Cytometry in Detecting Aneuploidy in Wheat Using Disomic and Ditelosomic Wheat-Rye Addition Lines*. *Cytometry*: 21:387-393 .
- Poschlod, P. (1990). *Vegetationsentwicklung in abgetorften Hochmooren des bayerischen Alpenvorlandes unter der Berücksichtigung standortkundlicher und populationsbiologischer Faktoren*. *Dissertationes botanicae*: Cramer, Berlin.
- Powell, W., Machray, G., & Provan, J. (1996). *Polymorphism revealed by simple sequence repeats*. *Trends in Plant Science*: 1(7):215–222.
- Price, H., & Johnston, J. (1996). *Analysis of plant DNA content by fuelsen microspectrophotometry and flow cytometry*. Jauhar PP (ed.), *Methods of genome analysis in plants*: 115-132.
- Przybyla, A., Behrend, A., & Hohe, A. (2012). *Generation of polyploids in Calluna vulgaris*. 24th. International EUCARPIA Symposium Section Ornamentals “Ornamental Breeding Worldwide”, Warsaw, Poland, 02.-05.09.2012. *Book of Abstracts*. p. 75.
- Przybyla, A., Behrend, A., Bornhake, C., & Hohe, A. (2014). *Breeding of polyploid heather (Calluna vulgaris)*. *Euphytica*: 199:273-282.
- Punyasingsh, K. (1947). *Chromosome numbers in crosses of diploid, triploid and tetraploid maize*. *Genetics*: 32:541–54.
- Ramanna, M., & Jacobsen, E. (2003). *Relevance of sexual polyploidization for crop improvement—a review*. *Euphytica*: 133:3–18.
- Ramsey, J., & Schemske, D. (1998). *Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*: 29:467–501.
- Ramsey, J., & Schemske, D. (2002). *Neopolyploidy in flowering plants*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*: 33:589–639.
- Randolph, L. (1932). *Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 18:222-229.
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). *GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism*. *Journal of Heredity*: 86:248-249.

- Reinhardt, S. (2006). *Vergleichende morphologische-anatomische und physiologische Untersuchung zur Samenanlagenqualität von Cyclamen persicum Mill.- unter besonderer Berücksichtigung der Saatgutqualität*. Dissertation, FSU Jena: 118.
- Rezaei, M., Arzani, A., & Sayed-Tabatabaei, B. (2010). *Meiotic behaviour of tetraploid wheats (Triticum turgidum L.) and their synthetic hexaploid wheat derivatives influenced by meiotic restitution and heat stress*. Journal of Genetics: 89(4):401-407.
- Roberts, A. (2007). *The use of bead beating to prepare suspensions of nuclei for flow cytometry from fresh leaves, herbarium leaves, petals and pollen*. Cytometry Part A: 71:1039-1044.
- Röder, M., Plaschke, J., König, S., Börner, A., Sorrells, M., Tanksley, S., & Ganai, M. (1995). *Abundance, variability and chromosomal location of microsatellite wheat*. Molecular Genetics and Genomics: 246:327–333.
- Roloff, A., & Bärtels, A. (2006). *Flora der Gehölze: Bestimmung, Eigenschaften und Verwendung*. Stuttgart: Ulmer.
- Rose, J., Kubba, J., & Tobutt, K. (2000a). *Chromosome doubling in sterile Syringa vulgaris x S. pinnatifolia hybrids by in vitro culture in nodal explants*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture: 63:127-132.
- Rousi, A. (1966). *The Use of North-European Vaccinium species in blueberry breeding*. Acta Agriculturae Scandinavica: 16:50-54.
- Rousset, F. (2008). *Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux*. Molecular Ecology Resources: 8:103-106.
- Roux, N., Toloza, A., Radecki, Z., Zapata-Arias, F., & Dolezel, J. (2003). *Rapid detection of aneuploidy in Musa using flow cytometry*. Genetics and Genomics: 21(5):483–490.
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods in Molecular Biology: 132:365-386.
- Saliba-Colombani, V., & et al. (2000). *Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome*. Genome: 43:29-40.
- Schnell, F. (1982). *A synoptic study of the methods and categories of plant breeding*. Pflanzenzüchtung: 89:1–18.
- Schuelke, M. (2000). *An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments*. Nature Biotechnology: 18:233 - 234.
- Schwanitz, F. (1949). *Eine wirkungsvolle und sparsame Methode der Colchicinbehandlung (Colchicin-Traganth-Schleim)*. Der Züchter: 19(10):301-302.
- Scott, R., Spielmann, M., Bailey, J., & Dickinson, H. (1998). *Parent-of-origin effects on seed development in Arabidopsis thaliana*. Development: 125(17):3329–3341.
- Sears, E. (1976). *Genetic control of chromosome pairing in wheat*. Annual Review of Genetics: 10:31–51.

- Segarra-Moragues, J., Donat-Caerols, S., & Ojeda Copete, F. (2009). *Isolation and characterization of microsatellite loci in the Cape fynbos heath Erica coccinea (Ericaceae)*. Conservation Genetics: 10:1815-1819.
- Seilheimer, M., & Stösser, R. (1982). *Pollenschlauchwachstum von diploiden und triploiden Apfelsorten in vivo*. Die Gartenbauwissenschaft: 47(2):49–55.
- Sgorbati, S., Masci, S., Soler, V., & Marchi, P. (1989). *Rapid cytofluorimetric determination of leaf nuclear DNA content in the polyploid series Ranunculus marsicus (R. auricomus agg., Ranunculaceae)*. Plant Systematics and Evolution: 167(3-4):219-226.
- Sharpe, R. (1953). *Horticultural development of Florida blueberries*. Florida State Horticultural Society: 66:188-190.
- Sinama, M., Dubut, V., & Costedoat, C. (2011). *Challenges of microsatellite development in Lepidoptera: Euphydryasaurinia (Nymphalidae) as a case study*. European Journal of Entomology: 108:261-266.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., & Bresinsky, A. (1991). *Strasburger, Lehrbuch der Botanik*. Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York.
- Skalinska, M. (1945). *Cytogenetic studies in triploid hybrids of Aquilegia*. Journal of Genetics: 47:87–111.
- Song, K., Lu, P., Tang, K., & Osborn, T. (1995). *Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences: 92(17):7719-7723.
- Sourdille, P., Tavaud, M., Charmet, G., & Bernard, M. (2001). *Transferability of wheat microsatellites to diploid Triticeae species carrying the A, B and D genomes*. Theoretical and Applied Genetics: 103:346–352.
- Speckmann, G., Post, J., & Dijkstra, H. (1965). *The length of stomata as an indicator for polyploidy in rye-grasses*. Euphytica: 14(3):225-230.
- Stanley, R., & Linskens, H. (1974). *Pollen*. Springer.
- Stanys, V., Weckman, A., Staniene, G., & Duchovskis, P. (2006). *In vitro induction of polyploidy in japanese quince (Chaenomeles japonica)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture: 84:263-268.
- Stebbins, G. (1947). *Types of polyploids: their classification and significance*. Advances in Genetics: 1:403–429.
- Stebbins, G. (1950). *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press.
- Stebbins, G. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold Ltd., London: 216.
- Stebbins, G. (1985). *Polyploidy, Hybridization, and the Invasion of New Habitats*. Annals of the Missouri Botanical Garden: 72:824–832.
- Stevens, P. (2007). *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 8.

- Stift, M., Berenos, C., Kuperus, P., & van Tienderen, P. (2008). *Segregation models for disomic, tetrasomic and intermediate inheritance in tetraploids: a general procedure applied to Rorippa (yellow cress) microsatellite data*. *Genetics*: 179:2113–2123.
- Straub, J. (1950). *Wege zur Polyploidie, eine Anleitung zur Herstellung von Pflanzen mit Riesenwuchs*. Naturwissenschaftlicher Verlag vorm. Gebrüder Borntraeger.
- Sun, X., Hodge, J., Zhou, Y., Nguyen, M., & Griffith, L. (2004). *The eag potassium channel binds and locally activates calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. *The Journal of Biological Chemistry*: 279(11):10206-10214.
- Tautz, D., & Schlötterer, C. (1994). *Simple sequences*. Elsevier: 4(6):832–837.
- Tsukaya, H. (2008). *Controlling size in multicellular organs: focus on the leaf*. *PLoS Biology*: 6:1373–1376.
- Tsukaya, H. (2013). *Does Ploidy Level Directly Control Cell Size? Counterevidence from Arabidopsis Genetics*. *PLoS ONE*: 8(12):e83729.
- Tulay, E., & Unal, M. (2010). *Production of colchicine induced tetraploids in Vicia villosa roth*. *CARYOLOGIA*: 63(3):292-303.
- Uhrikova, A., & Dubravkova, Z. (1997). *The chromosome numbers of some selected plant species of flora in Slovakia*. *Oecologia Montana*: 6:1-3.
- Untergrasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B., Remm, M., & Rozen, S. (2012). *Primer 3 - new capabilities and interfaces*. *Nucleic Acids Research*: 40(15):e115.
- Vaughn, K. (2000). *Anticytoskeletal Herbicides*. *Plant Cell Monographs*: 11:193-205.
- Verma, D., & Hong, Z. (2001). *Plant callose synthase complexes*. *Plant Molecular Biology*: 47(6):693–701.
- Viccini, L., & Carvalho, R. (2002). *Meiotic chromosomal variation resulting from irradiation of pollen in maize*. *Journal of Applied Genetics*: 43:463–469.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., . . . Kuiper, M. (1995). *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. *Nucleic Acids Research*: 23(21):4407–4414.
- Walker, D., Monino, I., & Correal, E. (2006). *Genome size in Bituminaria bituminosa (L.) C.H. Stirton (Fabaceae) populations: separation of “true” differences from environmental effects on DNA determination*. *Environmental and Experimental Botany*: 159:104–116.
- Wang, N., Quin, Z., Yang, J., & Zhang, J. (2010). *Development and Characterization of 15 Microsatellite Loci for Rhododendron delavayi Franch. Ericaceae*. *Horticultural Science*: 45(3):457-459.
- Wcislo, H. (1990). *Further studies in chromosome numbers of Polish angiosperms*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*: 32:175-177.

- Weber, J., & May, P. (1989). *Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain-reaction*. *The American Journal of Human Genetics*: 44:388–396.
- Werner, D., & Chang, S. (1981). *Stain testing viability in stored peach pollen*. *American Society for Horticultural Science*: 16(4):522–523.
- Wong, A., & et al. (2001). *Characterization of AFLP markers in damselfies: prevalence of codominant markers and implications for population genetic applications*. *Genome*: 44:677-684.
- Woodhead, M., & et al. (2005). *Comparative analysis of population genetic structure in *Athyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions*. *Molecular Ecology*: 14:1681-1695.
- Zhang, L., Zhang, Z., & Gao, L. (2013). *Isolation and characterization of 27 microsatellite markers for the endemic species *Diplarche multiflora* (Ericaceae)*. *Applications in Plant Sciences*: 1(1).
- Zimmer, K. (1991). *Hauptkulturen im Zierpflanzenbau*. Ulmer Stuttgart: 3:418.
- Zlesak, D., Thill, C., & Anderson, N. (2005). *Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis minima* (Sims) Voss seedlings*. *Euphytica*: 141:281-290.

6 Anhang

Tabelle 44: Nährmedium für *in vitro*-Kulturen (Murashige & Skoog 1962), mit veränderter Vitaminzusammensetzung nach Nitsch (1969) (Fa. Duchefa).

Mikroelemente	Menge [mg/l]	Konzentration [μ M]
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	0,11
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	0,10
FeNaEDTA	36,70	100,00
H ₃ BO ₃	6,20	100,27
KI	0,83	5,00
MnSO ₄ · H ₂ O	16,90	100,00
NaMoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25	1,03
ZnSO ₄ · / H ₂ O	8,60	29,91
Makroelemente		
CaCl ₂	332,02	2,99
KH ₂ PO ₄	170,00	1,25
KNO ₃	1900,00	18,79
MgSO ₄	180,54	150
NH ₄ NO ₃	1650,00	20,61
Vitamine (Nitsch 1969)		
Biotin	0,05	0,21
Folsäure	0,50	1,13
Glycin	2,00	26,64
Myo-Inositol	100,00	554,94
Nicotinsäure	5,00	40,62
Pyridoxin HCl	0,50	2,43
Thiamin HCl	0,50	1,48

Tabelle 45: Zuordnung der Verhältnisse der Peakpositionen „*C. vulgaris* / *P. hybrida*“ im Histogramm zu der jeweiligen Chromosomenzahl auf der Grundlage, dass ein diploider Genotyp von *C. vulgaris* 16 Chromosomen aufweist ($2n = 2x = 16$). Durch Schwankungen im Verhältnis der Peakpositionen wird der Bereich 0,32–0,42 dem diploiden Niveau, 0,51–0,60 dem triploiden Niveau und 0,69–0,79 dem tetraploiden Niveau zugeordnet. Ideale Peakverhältnisse mit entsprechenden Chromosomenzahlen der euploiden Stufen fett markiert.

Anzahl Chromosomen	Verhältnis Peakposition <i>Calluna</i> / <i>Petunia</i>	Ploidiestufe
10	0,23	Hypodiploid
11	0,25	
12	0,28	
13	0,30	
14	0,32	Diploid
15	0,35	
16	0,37	
17	0,39	
18	0,42	
19	0,44	
20	0,46	Hyperdiploid
21	0,49	hypotriploid
22	0,51	Triploid
23	0,53	
24	0,56	
25	0,58	
26	0,6	
27	0,62	Hypertriploid
28	0,65	Hypotetraploid
29	0,67	
30	0,69	Tetraploid
31	0,72	
32	0,74	
33	0,76	
34	0,79	
35	0,81	Hypertetraploid
36	0,83	
37	0,86	
38	0,88	
39	0,9	
40	0,93	

Tabelle 46: Ermittelter DNA-Gehalt von elf Sorten mittels Durchflusscytometrie und Propidiumiodid-Färbung.

Sorten	DNA-Gehalt [pg]
‘Venetia’	1,30
‘Arabella’, ‘Elegantissima’, ‘Roter Oktober’	1,29
‘Aphrodite’, ‘Sandy’, ‘Wink 1-2006’, ‘Wink 4-2006’	1,28
‘Mariella’, ‘Moulin Rouge’	1,26
‘Marlies’	1,24

Tabelle 47: Durchführung von 54 Kreuzungsvarianten. Pro Variante wurden 20 Blüten an jeweils drei Pflanzen pro Genotyp bestäubt. Sechs interploide und drei homoploide Kombinationen der Ploidiestufen.

Neun Ploidie-Kombinationen bei Kreuzungen mit verschiedenen Genotypen		
tetraploid × tetraploid	triploid × tetraploid	diploid × tetraploid
2008.177/33 × '7705'	'Anke' × '7705'	'Ginkels Glorie' × '7705'
2008.177/119 × '7705'	2008.177/330 × '7705'	'David Eason' × '7705'
2008.177/123 × '7705'	2008.177/382 × '7705'	'Maria' × '7705'
2008.177/33 × 2008.177/2	'Anke' × 2008.177/2	'Ginkels Glorie' × 2008.177/2
2008.177/119 × 2008.177/2	2008.177/330 × 2008.177/2	'David Eason' × 2008.177/2
2008.177/123 × 2008.177/2	2008.177/382 × 2008.177/2	'Maria' × 2008.177/2
tetraploid × triploid	triploid × triploid	diploid × triploid
2008.177/33 × 2008.177/451	'Anke' × 2008.177/451	'Ginkels Glorie' × 2008.177/451
2008.177/119 × 2008.177/451	2008.177/330 × 2008.177/451	'David Eason' × 2008.177/451
2008.177/123 × 2008.177/451	2008.177/382 × 2008.177/451	'Maria' × 2008.177/451
2008.177/33 × 2008.177/25	'Anke' × 2008.177/25	'Ginkels Glorie' × 2008.177/25
2008.177/119 × 2008.177/25	2008.177/330 × 2008.177/25	'David Eason' × 2008.177/25
2008.177/123 × 2008.177/25	2008.177/382 × 2008.177/25	'Maria' × 2008.177/25
tetraploid × diploid	triploid × diploid	diploid × diploid
2008.177/33 × 'Long White'	'Anke' × 'Long White'	'Ginkels Glorie' × 'Long White'
2008.177/119 × 'Long White'	2008.177/330 × 'Long White'	'David Eason' × 'Long White'
2008.177/123 × 'Long White'	2008.177/382 × 'Long White'	'Maria' × 'Long White'
2008.177/33 × 'Josephine'	'Anke' × 'Josephine'	'Ginkels Glorie' × 'Josephine'
2008.177/119 × 'Josephine'	2008.177/330 × 'Josephine'	'David Eason' × 'Josephine'
2008.177/123 × 'Josephine'	2008.177/382 × 'Josephine'	'Maria' × 'Josephine'

Tabelle 48: Gewählte Sequenzen der Primer-Paare (Behrend et al. 2013) für die AFLP-Analyse.

Primer-Paar	MseI Primer	HindIII Primer
1	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A + TCT-3'	5'-GAC TGC GTA CCA GCT T + CGA-3'
2	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A + TCT-3'	5'-GAC TGC GTA CCA GCT T + AGT-3'
3	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A + TCC-3'	5'-GAC TGC GTA CCA GCT T + CAT-3'
4	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A + TCC-3'	5'-GAC TGC GTA CCA GCT T + ACA-3'
5	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A + TCG-3'	5'-GAC TGC GTA CCA GCT T + CA-3'
6	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A + TCG-3'	5'-GAC TGC GTA CCA GCT T + AC-3'
7	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A + TAC-3'	5'-GAC TGC GTA CCA GCT T + CA-3'
8	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A + TAC-3'	5'-GAC TGC GTA CCA GCT T + AC-3'
9	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A + AGT-3'	5'-GAC TGC GTA CCA GCT T + CGA-3'
10	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A + AGT-3'	5'-GAC TGC GTA CCA GCT T + AGT-3'

Tabelle 49: 17 EST-SSR-Primerpaare, die auf der Grundlage der Blüten-EST-Daten von *C. vulgaris* mit Hilfe des Programms *Primer 3* erstellt und mittels PCR für die Sorten 'Athene', 'Venetia' und den Wildtyp 'San Remo' auf Agarosegelen getestet wurden.

SSR-Marker	Sequenz Primer Forward	Sequenz Primer Reverse
Cv1	GCTGCTCAAAGTGCCTGTG	GAAACCAACTGAGGGTGGAG
Cv2	TGTGAGAGAAGCAGAGTCATTTG	TCTTCTGCACCAACATAGCAA
Cv3	TTTTTGTGAGAGAAGCAGAGTCA	TCTCCGCCAAGTTTCTTGAG
Cv5	CCGTTCTGTTGAACTTCC	TCCTACCAACACATGAGACCA
Cv6	GGTGAGAGAGGAGTCTAGAAATCG	GTGTGTGTGCGTGTGTGTGT
Cv7	GAGGAGTCTGAAATCGTCGAA	GTGTGTGTGCGTGTGTGTGT
Cv9	GAGGAGTCTAGAAATCGTCGAA	GTGTGTGTGCGTGTGTGTGT
Cv11	GAGGAGTCTAGAAAATCGTCGAA	GTGTGTGTGCGTGTGTGTGT
Cv18	GAGGAGTCTAGAAATCGTCGAA	CCGTAACGCAGACTCCATTT
Cv22	AGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG	GTCGCGATCATCTTCTTCGT
Cv23	ATGAGTGCCCTTGCTACAGG	TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC
Cv24	TCTGTCACCCTGTGTTTTCG	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC
Cv25	TCTGTCACCCTGTGTTTTCG	TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC
Cv26	ATGAGTGCCCTTGCTACAGG	TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC
Cv27	AGCAAATCAAGCACACACG	TGACGACTTGGAGGATTTGT
Cv28	GTGTGATCCGTTCTGTTGA	TGAGGATTTCCGTCCAACT
Cv29	GGTGATCCGTTCTGTTGAA	GGGCCGGTAGTTCTTAGGAT

Tabelle 50: Allelzahl (N_a), beobachtete Heterozygotie (H_o) und erwartete Heterozygotie (H_e) von vier Subpopulationen der SSR-Charakterisierungspopulation: (1) der Genotypen ohne F1(2) und ohne Nachkommenschaft (NKS) aus der Kreuzung 'Maria' x F1(2) (Population 2005.49), (2) Sorten im Handel, (3) nachweislich durch Kreuzungen entstandene Sorten und (4) gesammelte Wildformen; s = Standardabweichung.

	Genotypen ohne F1(2) und NKS; n = 34			Sorten im Handel; n = 26		
SSR	N_a	H_o	H_e	N_a	H_o	H_e
Cv29	10	0,44118	0,87050	8	0,50000	0,86124
DA6	7	0,55882	0,50176	7	0,53846	0,50075
DC109	7	0,41176	0,40869	6	0,30769	0,34615
DC114	5	0,88235	0,64662	5	0,84615	0,62971
DG2	11	0,50000	0,55356	9	0,42308	0,43514
DG70	6	0,58824	0,67471	5	0,50000	0,61463
DG71	11	0,58824	0,77875	8	0,57692	0,79186
DG105	4	0,73529	0,60009	4	0,73077	0,55581
Ecoc108	11	0,88235	0,90781	11	0,92308	0,91629
Ecoc142	10	0,47059	0,74583	8	0,46154	0,72474
Mg59	5	0,97059	0,75110	5	0,96154	0,73152
Mittelwert	7,909	0,63904	0,67631	6,909	0,61538	0,64617
s	2,737	0,19690	0,15365	2,119	0,21689	0,17861
	Gezüchtete Sorten; n = 12			Gesammelte Wildformen; n = 8		
SSR	N_a	H_o	H_e	N_a	H_o	H_e
Cv29	5	0,16667	0,78623	7	0,25000	0,89167
DA6	3	0,58333	0,53986	4	0,62500	0,51667
DC109	3	0,25000	0,23551	4	0,75000	0,59167
DC114	4	0,91667	0,64130	4	1,00000	0,69167
DG2	2	0,08333	0,08333	7	0,75000	0,81667
DG70	4	0,33333	0,48551	6	0,87500	0,84167
DG71	6	0,50000	0,82246	7	0,62500	0,69167
DG105	3	0,50000	0,42391	4	0,75000	0,74167
Ecoc108	9	0,83333	0,90580	7	0,75000	0,84167
Ecoc142	5	0,50000	0,59058	7	0,50000	0,82500
Mg59	3	1,00000	0,64855	5	1,00000	0,80000
Mittelwert	4,273	0,51515	0,56028	5,636	0,71591	0,75000
s	1,954	0,30235	0,24739	1,433	0,21716	0,11655

Tabelle 51: Wahrscheinlichkeiten (Genotypfrequenzen) – berechnet aus den Allelfrequenzen – bei einzelner Verwendung der sechs SSR-Marker, die das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und das Kopplungsgleichgewicht erfüllen, dass zwei Sorten aus dem Vergleichsset von 26 Proben ein identisches SSR-Bandenmuster aufweisen. Höchste Wahrscheinlichkeit ist fett markiert und unterstrichen.

„Matching-Probability“	DA6	DC109	DC114	DG2	DG105	Ecoc108
‘Adrie’	0,0533	<u>0,6524</u>	<u>0,2899</u>	0,0577	0,1420	0,0118
‘Alicia’	<u>0,4793</u>	0,6524	0,1450	<u>0,5625</u>	<u>0,3787</u>	0,0207
‘Athene’	0,4793	0,0621	0,1450	0,5625	0,1420	0,0181
‘Beauty Lady’	0,2130	0,6524	0,1450	0,5625	0,3077	0,0259
‘Boskoop’	0,0266	0,6524	0,2899	0,1154	0,3077	0,0207
‘Dark Beauty’	0,4793	0,6524	0,2899	0,5625	0,3077	<u>0,0362</u>
‘David Eason’	0,4793	0,0932	0,0414	0,0577	0,0096	0,0155
‘Findling’	0,4793	0,0033	0,1450	0,0288	0,3077	0,0148
‘Ginkels Glorie’	0,0533	0,6524	0,0725	0,0577	0,1420	0,0148
‘Hammondii’	0,4793	0,6524	0,2899	0,0288	0,3787	0,0362
‘Johnson’s Variety’	0,2130	0,0621	0,2899	0,5625	0,3077	0,0118
‘Long White’	0,0266	0,6524	0,2899	0,5625	0,3077	0,0104
‘Madonna’	0,2130	0,6524	0,2899	0,5625	0,1420	0,0259
‘Maria’	0,2130	0,6524	0,0414	0,0288	0,3787	0,0259
‘Mariella’	0,2130	0,6524	0,1450	0,5625	0,3787	0,0148
‘Multicolor’	0,4793	0,6524	0,2899	0,0288	0,1420	0,0259
‘Perestrojka’	0,4793	0,6524	0,1450	0,5625	0,1420	0,0259
‘Radnor’	0,0266	0,6524	0,2899	0,5625	0,3077	0,0207
‘Roter Oktober’	0,0178	0,6524	0,2899	0,5625	0,3077	0,0207
‘Sandhammeren’	0,4793	0,0621	0,0207	0,0288	0,3077	0,0104
‘Silver Knight’	0,4793	0,6524	0,2899	0,0577	0,3077	0,0207
‘Underwoodii’	0,4793	0,0621	0,2899	0,0059	0,3077	0,0259
‘Venetia’	0,0178	0,6524	0,1450	0,5625	0,3787	0,0059
‘Wickwar Flame’	0,0799	0,0311	0,2899	0,1154	0,3077	0,0155
‘Wink 2-2006’	0,4793	0,0621	0,2899	0,5625	0,3787	0,0148
‘Wink 3-2006’	0,2130	0,0621	0,2899	0,5625	0,3787	0,0089

Tabelle 52: Wahrscheinlichkeiten nach Multiplikation der Genotypfrequenzen der sechs SSR-Loci, die das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und das Kopplungsgleichgewicht erfüllten, dass zwei Sorten aus dem Vergleichsset von 26 Proben ein identisches SSR-Bandenmuster aufweisen. Höchste Wahrscheinlichkeit ist fett markiert und unterstrichen.

	„Matching-Probability“	Chance: 1 in
‘Adrie’	0,000000977	1023541
‘Alicia’	0,000199971	5001
‘Athene’	0,000006249	160026
‘Beauty Lady’	0,000090265	11078
‘Boskoop’	0,000003703	270051
<u>‘Dark Beauty’</u>	<u>0,000568667</u>	<u>1758</u>
‘David Eason’	0,000000016	62500000
‘Findling’	0,000000030	33333333
‘Ginkels Glorie’	0,000000305	3278689
‘Hammondii’	0,000035892	27861
‘Johnson’s Variety’	0,000007860	127226
‘Long White’	0,000009026	110791
‘Madonna’	0,000083321	12002
‘Maria’	0,000001628	614251
‘Mariella’	0,000063483	15752
‘Multicolor’	0,000009614	104015
‘Perestrijka’	0,000093736	10668
‘Radnor’	0,000018053	55392
‘Roter Oktober’	0,000012035	83091
‘Sandhammeren’	0,000000057	17543860
‘Silver Knight’	0,000033329	30004
‘Underwoodii’	0,000000407	2457002
‘Venetia’	0,000002116	472590
‘Wickwar Flame’	0,000000397	2518892
‘Wink2-2006’	0,000027207	36755
‘Wink3-2006’	0,000007255	137836

Lebenslauf

Geburtsdatum: 06.12.1986
Geburtsort: Suhl
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung und Berufserfahrung

Seit 04/2016 Laborleiterin im Pflanzenvertrieb Robert Mayer GmbH, Strullendorf
06/2015 bis 12/2015 Mitarbeiterin in Kakteenzucht Kakteen-Haage, Erfurt
07/2011 bis 05/2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau, Erfurt
Forschungsschwerpunkt: „Biologische Grundlagen der Entwicklung neuer Genotypen für die Züchtung von Zierpflanzen und Gemüse“
Promotionsthema: „Erstellung und Charakterisierung polyploider Genotypen von *Calluna vulgaris* (L.) Hull“
10/2005 bis 03/2011 Universität Bayreuth, Studium der Biologie
Masterarbeitsthema: „Populationsgenetische Untersuchung an der Hanfpalme *Trachycarpus fortunei* auf der Alpensüdseite“
Bachelorarbeitsthema: “A checklist and a provisional conspectus of *Hoya* R. Br. (Apocynaceae)”
06/2005 Abitur am Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium, Suhl

Praktika

05/2011 Bürgerspital Weingut, Würzburg: Pflege und Kultivierung von Weinreben
02/2011 Zentrum für Tumorgenetik, Wiesbaden: Zellkultivierung, Auswertung menschlicher Chromosomen, DNA- und RNA-Isolierung, PCR
07/2007 bis 09/2007 Gemeinschaftslabor für klinische Chemie und Mikrobiologie, Suhl: Antikörpernachweis, Erregerdifferenzierung

Veröffentlichungen

Behrend, A., Gluschak, A., **Przybyla, A.**, & Hohe, A. (2015). *Interploid crosses in heather (Calluna vulgaris)*. *Scientia Horticulturae*: 181(2):162–167.

Gluschak, A., **Przybyla, A.**, Behrend, A., & Hohe, A. (2015). *Zwei, drei oder vier: Ploidiemutationen in der Züchtung von Sommerheide*. Jahresbericht 2013/2014 des Leibniz-Institutes für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt: 32–35.

Przybyla, A., Behrend, A., & Hohe, A. (2012). *Generation of polyploids in Calluna vulgaris*. 24th. International EUCARPIA Symposium Section Ornamentals “Ornamental Breeding Worldwide”, Warsaw, Poland, 02.–05.09.2012. Book of Abstracts. p. 75.

Przybyla, A., Behrend, A., Bornhake, C., & Hohe, A. (2014). *Breeding of polyploid heather (Calluna vulgaris)*. *Euphytica*: 199(3):273–282.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Annette Hohe für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die fachliche Unterstützung bedanken. Mein weiterer besonderer Dank gilt Frau Dr. Anne Behrend für die zusätzliche kompetente Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Thomas Debener danke ich sehr für die Übernahme des Korreferats und Frau Prof. Dr. Traud Winkelmann für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und des weiteren Korreferats. Zudem danke ich Frau Prof. Dr. Heike Bohne, dass sie die Funktion des Drittprüfers übernehmen möchte.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Siegfried Zerche für seine Unterstützung bei statistischen Fragestellungen und sein Interesse für die Inhalte meiner Dissertation.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Kooperationspartner Peter de Winkel des Zuchtbetriebes Heidepflanzen de Winkel und seinen Mitarbeitern Christian Bornhake und Friederike Vogt für die Bereitstellung und Pflege von Pflanzenmaterial bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt auch Aileen Gluschak, dass ihre Projektarbeit (interploide Kreuzungen) hier Eingang fand; sowie Andreas Liehr, dass die Ergebnisse seiner Bachelorarbeit (Polyploidisierung durch Mitosehemmer) eingebracht werden konnten.

Bei der Etablierung von SSR-Markern hatte ich verschiedene Wissenschaftler an meiner Seite, bei denen ich mich ganz herzlich bedanken möchte: Dr. Marcus Linde, Dr. Jan De Riek, Dipl. biol. Ralph Heinrich und Dr. José Gabriel Segarra-Moragues.

Mein Dank gilt auch Mitarbeitern des „Institute for Agricultural and Fisheries Research“ (ILVO) in Belgien. Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Tom Eeckhaut für seine Hilfe und Anregungen bei der Bearbeitung meines Projektes. Bei Jorien Oomen bedanke ich mich für die interessante und lehrreiche Arbeit mit Chromosomen. Nicht zu vergessen sind Frau Dr. Leen Leus, Frau Dr. Emmy Dhooge und Pepijn De Raeymaecker – ihnen verdanke ich mein Verständnis zur Arbeit mit Mitosehemmern und zur Polyploidisierung von Pflanzen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Anke Müller, Janett Grimmer, Katja Krüger und Jörg Krüger für die technische und methodische Hilfestellung während meiner Zeit im Institut. Ich danke weiteren Mitarbeitern des Instituts für die Unterstützung bei verschiedenen Fragestellungen: Frau Dr. Aloma Ewald, Sabine Kalkofe-Roth, Martin Bauerfeind, Sabine Czekalla, Gabriele Eckart, Monika Graff, Martina Schiefler, Marina Beuke, Kerstin Schütze, Barbara Weinlich, Edith Grube, Joachim Jentsch und Tobias Döring.