NN 8201 NO 439

W. Lange

Cytogenetisch en embryologisch onderzoek aan kruisingen tussen Hordeum vulgare en H. bulbosum

BIBLIOTHEEK
DER
LANDBOUWHOGESCHOOL
WAGENINGEN.

NN08201.439

W. Lange

Cytogenetisch en embryologisch onderzoek aan kruisingen tussen Hordeum vulgare en H. bulbosum

Proefschrift
ter verkrijging van de graad van
doctor in de landbouwwetenschappen
op gezag van de Rector Magnificus, dr. ir. F. Hellinga,
hoogleraar in de cultuurtechniek,
te verdedigen tegen de bedenkingen van een commissie uit
de Senaat van de Landbouwhogeschool te Wageningen
op vrijdag 28 februari 1969 te 16 uur

1969 Centrum voor landbouwpublikaties en landbouwdocumentatie

Wageningen

Stellingen

I

Het is onwaarschijnlijk dat de verschillen in slagingspercentage van de reciproke kruisingen tussen *Hordeum vulgare* (2x = 14) en *H. bulbosum* (4x = 28) in verband staan met de invloed van polyploïdie op incompatibiliteitsverschijnselen.

O. Banga, 1953, Inleiding tot de plantenveredeling.
Tjeenk-Willink, Zwolle, pag. 445.
Dit proefschrift.

II

Het voorkomen van 'quadrivalents et bivalents composites' in de meiose van triploïde hybriden tussen *Lolium perenne* en *Festuca pratensis* kan worden verklaard door aan te nemen dat deze associaties het gevolg zijn van pseudo-chiasmata.

S. Essad, 1966, Annls Amél. Pl. 16: 5-41.

III

De veronderstelling dat de resistentie van *Triticum spelta* tegen de gele roest van tarwe niet-fysiospecifiek is, is onjuist en misleidend voor de kwekers.

R. W. Stubbs *et al.*, 1968, Zaadbelangen 22: 28-29.
A. C. Zeven *et al.*, 1968, Euphytica 17: 381-384.

IV

Het oostelijk deel van het Bestemmingsplan Uiterwaarden en het gedeelte van het Bestemmingsplan Roeibaan ten noorden van de baan dient te worden herzien, waarbij de landschappelijke en natuurwetenschappelijke waarde van de Wageningse Berg zwaarder moeten wegen dan stedebouwkundige en/of weg- en waterbouwkundige aspecten.

Bestemmingsplan Uiterwaarden, 1968, Gemeente Wageningen.
Bestemmingsplan Roeibaan, 1968, Gemeente Wageningen.

V

De extreme aneusomatie die door Meyer is vastgesteld bij knolbegonia's moet welhaast berusten op artefacten of onnauwkeurige tellingen. De door haar gepresenteerde karyogrammen moeten tot stand zijn gekomen door een ontoelaatbare interpretatie van de waargenomen beelden.

Martha Meyer, 1965, Biol. Zbl. 84: 563-605.

VI

De in de Voorwaarden voor het voortbrengen van gecertificeerd zaad van granen voor oogst 1968 (Voorwaarden TC-granen 1968) genoemde rechten en plichten van licentiehouders en telers zijn nog onvoldoende met elkaar in evenwicht.

VII

Voor de bepaling van de verwantschap tussen soorten zijn de eigenschappen kruisbaarheid, chromosomenassociatie bij de hybriden en fertiliteit van de hybriden in principe niet beter bruikbaar dan morfologische eigenschappen.

VIII

Een efficiëntere wetenschapsbeoefening kan worden bereikt door een onderzoekbeleid waarbij de probleemstelling centraal staat en waarbij de autonomie van de individuele onderzoeker zowel als die van de onderzoekinstelling pas op de tweede plaats komt.

IX

Het is ontoelaatbaar maleïne hydrazide te gebruiken als kiemremmingsmiddel bij uien.

Proefschrift van W. Lange.
Wageningen, 28 februari 1969.

Ladies and gentlemen, if the human race is to survive, more attention must be paid to biology.

P. Maheshwari, 1965.

Zonder de medewerking van velen was dit proefschrift niet tot stand gekomen. Dit is een constatering die niet verbazingwekkend is en nauwelijks interessant. Het feit echter dat de medewerking mij is verleend en de plezierige wijze waarop zij mij is verleend is het vermelden waard en is voor mij aanleiding mijn dank te betuigen aan allen die, op welke wijze dan ook, aan dit proefschrift hebben bijgedragen. In de eerste plaats wil ik mijn ouders en mijn vrouw noemen, hetgeen geen nadere toelichting behoeft, en voorts enkelen van de direct betrokkenen.

Het Bestuur en de Directie van de Stichting voor Plantenveredeling, S.V.P., hebben mij in de gelegenheid gesteld onderzoek te verrichten, waarbij zij mij een grote mate van vrijheid bij de keuze van het onderwerp en de programmering van het onderzoek hebben gelaten. Daarnaast hebben zij mij niet slechts alle mogelijke faciliteiten verleend, maar ook hebben zij mij gedurende het onderzoek steeds gesteund door hun grote belangstelling.

Mijn promotor, professor Sneep, ben ik erkentelijk voor de wijze waarop hij het onderzoek heeft gevolgd en begeleid; vooral ook voor zijn waardevolle opmerkingen tijdens de besprekingen van het manuscript.

Vrijwel vanaf de aanvang van dit onderzoek heeft de heer Jochemsen mij ter zijde gestaan: hij blonk hierbij uit door een grote mate van nauwgezetheid en uithoudingsvermogen. Voorts ben ik dankbaar voor de assistentie verleend door de dames Willy van den Ham-van Elden en Heidi Haase en voor de assistentie van verscheidene anderen.

De heren dr. Sybenga, ir. Slootmaker en Dirks waren zo vriendelijk het manuscript kritisch door te lezen en te voorzien van op- en aanmerkingen. Tevens heeft ir. Slootmaker het onderzoek van nabij gevolgd, waarbij vaak uitgebreide discussies ontstonden over uiteenlopende problemen.

Tenslotte dient nog vermeld te worden dat de wiskundige verwerking van de gegevens is uitgevoerd door de heer Post jr., dat de foto's tot stand zijn gekomen met veel hulp van de heer Post sr., dat de tekeningen zijn vervaardigd door de heer Van Halem, dat het manuscript vele malen is getypt, waaraan verscheidene dames hebben medegewerkt, maar vooral Margriet van den Berg en Willy Meurs-Heijnekamp, en dat de vertaling van samenvatting en bijschriften voornamelijk door de heer Rigg is verzorgd.

De contacten met Pudoc waren plezierig en leerzaam, terwijl de wijze waarop zij het manuscript hebben behandeld een waarborg vormde ter voorkoming van veel moeilijkheden.

Inhoud

Inleiding 1

Kruisingen en hybriden 4

Bespreking van de literatuur 4

Materiaal en methoden 8
De kruisingsplanten 8
De kruisingstechniek 12
Het isoleren en de cultuur van embryo's 13

Resultaten van de kruisingen 14
De kruisingscombinaties 16
De invloed van de kruisingsouders 18

Beschrijving van hybriden en overige nakomelingen 19
Het literatuuroverzicht 19
De hybriden 20
De overige nakomelingen 31

Beschrijving van nakomelingen van hybriden 32
De nakomelingen van triploïde hybriden 33
De nakomelingen van tetraploïde hybriden 33

Embryologische onderzoekingen 41

Bespreking van de literatuur 41

Materiaal en methoden 45

Bouw van het onbevruchte vruchtbeginsel van H. vulgare (2x) 46

Ontwikkeling van de caryopsis van H. vulgare (2x) bij intraraskruising 47
Het embryo 47
Het endosperm 50

De antipoden 52
Het moederlijke weefsel 53

Ontwikkeling van de caryopsis bij H. vulgare (2x) × H. bulbosum (2x) — VV × BB 55
Het embryo 55
Het endosperm 57
De antipoden 59
Het moederlijke weefsel 59

Ontwikkeling van de caryopsis bij H. vulgare (2x) × H. bulbosum (4x) — VV × BBBB 60
Het embryo 60
Het endosperm 61
De antipoden 63
Het moederlijke weefsel 63

Ontwikkeling van de caryopsis bij H. vulgare (4x) × H. bulbosum (4x) — VVVV × BBBB 64
Het embryo 64
Het endosperm 65
De antipoden 65
Het moederlijke weefsel 66

Cytogenetische onderzoekingen 67

Bespreking van de literatuur 67

Materiaal en methoden 74

Beschrijving van de karyotypen 75
De ouders 76
De hybriden 78
De overige nakomelingen 82

Vergelijking van de karyotypen 85

Onderzoekingen aan nucleoli 87

Beschrijving van de meiosen 93
De ouders 94
De hybriden 96
De overige nakomelingen 111

Vergelijking van de meiosen 114

Onderzoekingen aan de pollen 116

Discussie 120

Kruisbarrière en embryocultuur 120
De zaadzetting 120
De zaadontwikkeling 121
De embryocultuur 128

Hybride planten 129
De karyotypen en de nucleoli 130
De eliminering van chromosomen 133
De steriliteit en de meiose 137

Overige nakomelingen 141

Slotbeschouwing 144

Mogelijkheden voor de veredeling 146

Samenvatting 148

Kruisingen en hybriden 148

Embryologische onderzoekingen 149

Cytogenetische onderzoekingen 150

Discussie 151

Summary 153

Crossing and the hybrids 153

Embryology 154

Cytogenetics 154

Discussion 156

Literatuur 157

Inleiding

De beoefenaars van de plantenveredeling hebben reeds lang getracht soortkruisingen te benutten, want door deze kruisingen kunnen meer mogelijkheden voor het bereiken van hun doel ter beschikking komen. Hierbij wordt onder meer gedacht aan het introduceren van bepaalde eigenschappen in cultuurgewassen. De resultaten van soortkruisingen zijn zeer verschillend, mede als gevolg van de criteria die worden gehanteerd ter onderscheiding van soorten. Meestal echter zullen soortkruisingen minder goed gelukken dan kruisingen binnen een soort en dit verschil is het onderwerp geweest van vele en uitgebreide onderzoekingen.

Kruisingen tussen *Hordeum vulgare* en *H. bulbosum* zijn meermalen onderzocht met het doel goede eigenschappen van *H. bulbosum* over te brengen naar cultuurgerst. Hierbij werd vooral gedacht aan de eigenschappen kouderesistentie en resistentie tegen verschillende ziekten. De kruisingen waren vrijwel altijd zonder resultaat, als gevolg van het vroegtijdig aborteren van het embryo. Het *in vitro* opkweken van het jonge embryo kon hierin soms enige verbetering brengen. Aldus werden hybriden verkregen, die echter meestal steriel waren, zodat tot nu toe deze onderzoekingen nog niet tot het gewenste resultaat hebben geleid. Daarom is bij de Stichting voor Plantenveredeling, S.V.P., onderzoek aan deze soortkruising ter hand genomen met het doel de kennis over de optredende moeilijkheden verder uit te breiden en zodoende te trachten tot een oplossing van de moeilijkheden te komen. De keuze van *H. bulbosum* als ouderplant is gedaan op grond van de reeds genoemde goede eigenschappen, maar tevens omdat de algemene habitus van de plant uit landbouwkundig oogpunt relatief gunstig is en omdat de grote bloemen en meeldraden en de relatief grote zaden technische voordelen betekenen bij het kruisen en de embryocultuur. (Zoals dat bij de granen gebruikelijk is zal in het hiernavolgende de graanvrucht een zaad worden genoemd.) Tenslotte is hierbij gedacht aan de mogelijkheid van het bestaan van analogieën met andere, voor de plantenveredeling van belang zijnde soortkruisingen.

Het onderzoek, dat de kruising als uitgangspunt heeft, heeft in het algemeen een cytologisch karakter in de brede zin van het woord. Het hoofdstuk 'Embryologische onderzoekingen' is gewijd aan de cytologisch-anatomische bestudering van de ontwikkeling van de korrel vanaf de bevruchting. Het is een vergelijkend onderzoek tussen intraraskruising van cultuurgerst en drie soortkruisingen, waarbij *H. vulgare* als moeder- en *H. bulbosum* als vaderplant is gebruikt. Er is speciale aandacht geschonken aan de embryogenese en aan de ontwikkeling van het endosperm. In het hoofdstuk 'Cytogenetische onderzoekingen' is enerzijds de

morfologie van chromosomen bestudeerd door de bepaling van het karyotype van ouders en hybriden. In verband hiermee zijn tevens de aantallen nucleoli en hun frequentieverdeling bepaald. Anderzijds is het gehele verloop van de reductiedeling onderzocht, eveneens van ouders en hybriden, waarbij speciale aandacht is besteed aan aneuploïde cellen. Deze hoofdstukken en het eraan voorafgaande, waarin de kruisingen en hun resultaten zijn vermeld, bevatten voornamelijk de besprekingen van de literatuur, de verslaggeving over het verloop van het onderzoek en de resultaten ervan, met vermelding van gegevens over materiaal en methoden. In het hoofdstuk 'Discussie' worden tenslotte de resultaten van het onderzoek besproken. Deze opbouw is een gevolg van de omstandigheid dat de resultaten van de drie, ogenschijnlijk los van elkaar staande onderdelen van het onderzoek uiteindelijk zo sterk in elkaar grijpen, dat een gezamenlijke discussie noodzakelijk lijkt.

In het geslacht *Hordeum* L. komen ongeveer dertig soorten voor. Nevski (1941) maakte een onderverdeling van het geslacht in zes secties, waarbij *H. bulbosum* L. de enige soort is in de sectie BULBOHORDEUM NEVSKI en waarbij in de sectie CRITHE DOELL. de soorten *H. spontaneum* C. KOCH, *H. vulgare* L. en *H. distichon* L. zijn ondergebracht. Bowden (1959) stelde een aan de regels van de Internationale Code van Botanische Nomenclatuur aangepaste revisie van de sectie CRITHE voor. De sectie kreeg de naam van het geslacht, dus sectie HORDEUM BOWDEN en in deze sectie komt slechts één soort voor namelijk *H. vulgare* L. emend. BOWDEN. Deze soort omvat alle grootzadige in het wild voorkomende en gecultiveerde gersten, waaronder *H. spontaneum* en de in 1938 beschreven *H. agriocrithon* ÅBERG. Vervolgens prensenteerde Bowden (1959) een infraspecifieke indeling van *H. vulgare* L. emend. BOWDEN, maar in een latere publikatie (Bowden, 1960) kwam hij daar weer op terug met de mededeling dat deze infraspecifieke indeling nog gewijzigd zal moeten worden. Omdat deze indeling voor dit onderzoek niet van wezenlijk belang is zal voor de toch noodzakelijke soortaanduiding de naam *H. vulgare* worden gebruikt in de zin van Bowden.

Het feit dat zowel *H. bulbosum* als *H. vulgare* elk alleen in een sectie voorkomen is een aanwijzing voor de nogal geïsoleerde plaats welke beide soorten in het geslacht innemen. Deze aparte plaats komt vooral tot uiting als de morfologie van de soorten wordt vergeleken met die van de andere soorten. *H. bulbosum* is groot en fors ontwikkeld, met aan de stengelbasis een knolvormige verdikking. Tevens is het de enige kruisbevruchtende soort in het geslacht. *H. vulgare* is eveneens vrij fors ontwikkeld; de soort omvat zeer veel morfologisch uiteenlopende planttypen. De grootzadigheid is een belangrijke eigenschap.

Binnen de soort *H. bulbosum* komen twee cytotypen voor: een diploïd met $2n = 14$ en een autotetraploïd met $2n = 28$ (Bowden, 1965). Het bestaan van het diploïde type is relatief kort geleden ontdekt (Lein, 1948). Het verspreidingsgebied is gelegen rond het westelijke en het centrale gedeelte van de Middellandse Zee.

Het tetraploïde type heeft een veel wijdere verspreiding, rond het oostelijk deel van de Middellandse Zee in het Midden-Oosten. In Griekenland komen beide cytotypen naast elkaar voor (Lein, 1948; Bowden, 1965; Katznelson & Zohary, 1967).

H. vulgare heeft diploïde en kunstmatig geïnduceerde autotetraploïde cytotypen. Vertegenwoordigers van deze soort komen als cultivars over een groot deel van de wereld voor; de in het wild voorkomende typen hebben een beperkter verspreidingsgebied, namelijk vanaf het oostelijk deel van de Middellandse Zee tot in centraal Azië (Nevski, 1941; Bowden, 1959 en 1965).

Kruisingen en hybriden

Het eerste doel van het onderzoek was de produktie van soorthybriden, waarbij ervan is uitgegaan dat het gebruik van embryocultuur noodzakelijk is. Alle combinaties tussen de diploïde en tetraploïde cytotypen van beide ouders zijn bestudeerd, zo mogelijk met behulp van een uitgebreide collectie rassen en herkomsten. Omdat veel kruisingen moesten worden uitgevoerd zijn de planten op het veld geteeld en zijn ook alle kruisingen op het veld uitgevoerd. Dit had uiteraard grote nadelen met betrekking tot de invloed van de uitwendige omstandigheden op de kruisingen. Het dient te worden vermeld dat de gebruikte ouderplanten van te voren niet zijn geselecteerd, noch op fertiliteit, noch op gunstige eigenschappen. Dit is nagelaten teneinde een zo volledig mogelijk beeld te krijgen van de potenties van de populaties van de oudersoorten die ter beschikking stonden.

Bespreking van de literatuur

In vergelijking met de vrij uitgebreide literatuur over soortkruisingen in het geslacht *Hordeum* is de literatuur over kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* nogal beperkt. In oudere literatuur wordt meestal alleen gemeld dat een kruising is geprobeerd, zonder details over het aantal uitgevoerde bestuivingen en over de zaadzetting. Von Tschermak (1914) en Menabde (1938) vermeldden dat kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* mislukten. De eerste geslaagde kruising tussen deze soorten is uitgevoerd door Kuckuck (1934, zie tabel 1). Lein (1948) maakte melding van een omvangrijk kruisingsprogramma dat Freisleben in de jaren 1940-1944 heeft uitgevoerd met als kruisingsouders diploïde en tetraploïde *H. vulgare* en tetraploïde *H. bulbosum*. De zaadzetting was steeds zeer gering en zaden die vermoedelijk hybriden waren kiemden in de regel niet. Met tetraploïde gerst is eenmaal een hybride verkregen maar deze plant ging dood vóór de bloei. De kruisingen waarover details zijn gepubliceerd zijn samengevat in tabel 1. Hieraan moet nog worden toegevoegd dat Vinogradova (1946) zonder resultaat een onbekend aantal kruisingen heeft uitgevoerd tussen *H. vulgare* (2x, ♀) en *H. bulbosum* (4x, ♂); Morrison & Rajhathy (1959) vermeldden dat in de reciproke kruising geen zaden werden gevormd. Tenslotte zou Schooler (1964) gunstige resultaten hebben verkregen met de kruising *H. bulbosum* (4x) × *H. vulgare* (4x). Met behulp van embryocultuur verkreeg deze auteur verscheidene hybriden, waarvan sommige fertiel waren. Helaas zijn geen gegevens verstrekt over het aantal kruisingen, het aantal geslaagde kruisingen en het karakter van de hybriden.

Tabel 1. Overzicht van kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* aan de hand van gegevens uit de literatuur. De kruisingscombinaties zijn weergegeven met genoomsymbolen, bijv. VV = *H. vulgare* (2x), BB = *H. bulbosum* (2x).

Kruisings-combinatie	Aantal kruisingen (bloemen)	Aantal zaden	Aantal embryo-cultures	Aantal planten	Auteurs
VV × BB	164	161	0	0	Davies, 1956
VV × BB	49	49	17	1	Davies, 1956
BB × VV	160	25	0	2	Davies, 1956
VV × BBBB	4578	349	0	1	Kuckuck, 1934
VV × BBBB	437	8	0	0	Resničuk, 1939
VV × BBBB	698	.[1]	0	0	Smith, 1942
VV × BBBB	663	267	183	11	Konzak *et al.*, 1951
VV × BBBB	289	194	0	0	Davies, 1956
VV × BBBB	217	166	98	5	Davies, 1956
VV × BBBB	.[1]	.[1]	554	21	Morrison *et al.*, 1959
BBBB × VV	1084	0	.	.	Kuckuck, 1934
BBBB × VV	171	3	0	1	Vinogradova, 1946
BBBB × VV	121	0	.	.	Konzak *et al.*, 1951
BBBB × VV	245	13	0	0	Davies, 1956
VVVV × BB	149	13	0	0	Davies, 1956
BB × VVVV	100	0	.	.	Davies, 1956
VVVV × BBBB	73	33	0	0	Davies, 1956
VVVV × BBBB	66	28	20	1	Davies, 1956
BBBB × VVVV	155	7	0	7	Davies, 1956
BBBB × VVVV	2760	0	0	.	Cauderon & Cauderon, 1956
Cross-combination	Number of crosses (flowers)	Number of seeds	Number of embryo cultures	Number of plants	Source

[1] Auteur(s) vermeldde(n) geen aantal / author(s) reported no number.

Table 1. Summary of crosses between *H. vulgare* and *H. bulbosum* from literature data. The cross-combinations are recorded in genome symbols, e.g. VV = *H. vulgare* (2x), BB = *H. bulbosum* (2x).

Schooler (pers. med.) deelde later mede dat de hybriden diploïd of autotetraploïd waren, vele waren steriel, sommige gingen in jong stadium dood, sommige bloeiden niet, maar enkele waren fertiel bij zelfbevruchting en sommige waren alleen fertiel bij terugkruising met één van de ouders. Schooler schrijft het succes toe aan: de zorg die aan de ouderplanten is besteed zodat ze zoveel mogelijk vrij van ziekten bleven, voldoende zonlicht, optimum temperatuur en het gebruik van embryocultuur.

Van de resultaten in tabel 1 kan nog worden gezegd dat vrijwel alle auteurs vermeldden dat de zaden in meer of mindere mate waren verschrompeld. De diploïde hybriden van Davies (1956) gingen in een jong stadium dood. Van de in totaal 39 triploïde hybriden gingen er twee in een jong stadium dood, de overige waren vitaal maar volledig steriel. De tetraploïde hybride van de kruising VVVV × BBBB ging ook in een jong stadium dood; van de zeven hybriden van de reciproke kruising (Davies, 1956 en 1958) gingen er vier in een jong stadium dood, terwijl de overige drie planten diploïd en fertiel waren en zeer veel leken op *H. vulgare*, zodat deze planten worden beschouwd als alloplasmatische hybriden.

Reeds in 1934 sprak Kuckuck het vermoeden uit dat het *in vitro* kweken van geïsoleerde hybride embryo's de kans op succes van de kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* zou kunnen vergroten. Deze voorspelling is nadien door verschillende auteurs waar gemaakt, hoewel de resultaten nog niet overweldigend zijn. Dit zou het gevolg kunnen zijn van verschillende omstandigheden. Kuckuck (1934) vond een enorm verschil in zaadzetting tussen de vier jaren waarin hij de kruisingen uitvoerde, hetgeen wijst op een invloed van de uitwendige omstandigheden op de kruisbaarheid. Ook is er een groot verschil waargenomen in kruisbaarheid tussen bepaalde combinaties van herkomsten en rassen. Kuckuck vond dat wintergerst beter resultaat opleverde dan zomergerst. Dit kon door Konzak *et al.* (1951) niet worden bevestigd, hoewel er in hun materiaal wel verschillen in kruisbaarheid optraden tussen verschillende gerstrassen. De Canadese onderzoekers Morrison *et al.* (1959) achten een door de ouderplanten veroorzaakt verschil in de interspecifieke compatibiliteit echter niet bewezen omdat er nog zoveel onbekende factoren zijn die het slagen van de kruising kunnen beïnvloeden. Schooler (pers. med.) heeft ouderplanten geselecteerd op fertiliteit maar niet onderzocht of dit inderdaad een gunstig effect heeft gehad op zijn resultaten. Over het algemeen werden in de bovengenoemde onderzoekingen relatief weinig oudercombinaties beproefd.

Vroegere onderzoekingen zijn in ongunstige zin beïnvloed door het vaak al in een zeer jong stadium aborteren van de hybride embryo's, zodat deze op het tijdstip van de isolering nog maar net waren begonnen aan de embryonale differentiatie. De ontwikkeling van het embryo zal echter in het volgende hoofdstuk nader ter sprake komen, zodat hier slechts vermeld dient te worden dat verschillende tijdstippen worden genoemd als zijnde optimaal voor de isolering van het embryo. Konzak *et al.* (1951) volgden de ontwikkeling van het zaad totdat een specifieke verkleuring optrad, waarna het embryo zo spoedig mogelijk moest worden geïsoleerd, hetgeen nooit later was dan 15 dagen na de bestuiving. Davies (1960) varieerde het tijdstip tussen 14 en 28 dagen na de bestuiving en Morrison *et al.* (1959) isoleerden meestal reeds na 8 tot 12 dagen. Uitwendige zowel als interne factoren beïnvloedden de abortie. Zowel Konzak *et al.* als Davies vermeldden dat de ontwikkeling van de geïsoleerde embryo's zeer variabel was. Sommige embryo's hadden geen waarneembare groei, andere vertoonden alleen ongedifferentieerde groei en vrij regelmatig werd alleen een wortel of alleen een spruit

gevormd. Deze abnormaliteiten worden door genoemde auteurs toegeschreven aan de onnatuurlijke omstandigheden waarin het embryo wordt geplaatst en aan beschadigingen tijdens de manipulaties bij het isoleren.

Het is opvallend dat voor alle cultures van embryo's uit kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* hetzelfde voedingsmedium is gebruikt, namelijk het medium volgens Randolph & Cox (1943). Dit medium is oorspronkelijk samengesteld voor de cultuur van *Iris*-embryo's. Sommige auteurs (Morrison *et al.*, 1959; Davies, 1960) brachten in dit medium kleine wijzigingen aan die van ondergeschikt belang zijn. Schooler (1960) vond dat de toevoeging van 'Gibrel', een olie-emulsie met gibberellazuur als werkzaam bestanddeel, de groei van spruiten en wortels stimuleerde.

Er zijn zeer uiteenlopende waarden opgegeven voor het aantal cultures dat besmet raakte met schimmels of bacteriën, hetgeen een gevolg kan zijn geweest van de omstandigheden waaronder het materiaal is opgekweekt en van de ter beschikking staande hulpmiddelen. Tenslotte was een laatste kritiek stadium bij de embryocultuur de overgang van buiscultuur naar grondcultuur. Verscheidene veelbelovende plantjes konden deze overgang niet verwerken en gingen na korte tijd dood.

Met onvolgroeide embryo's van *H. vulgare* zijn een aantal interessante experimenten uitgevoerd. Merry (1942) beschreef de *in vitro* ontwikkeling van op verschillende leeftijd geïsoleerde embryo's. Het was hem niet mogelijk embryo's die minder dan 12 dagen na de bestuiving werden geïsoleerd te laten uitgroeien tot normale planten; het embryo was dan ± 800 μm lang. Uit het feit dat de via embryocultuur verkregen kiemplanten veelal kleiner en zwakker zijn dan normale kiemplanten concludeerden Kent & Brink (1947) dat het embryo te vroeg kiemt. Het zou beter zijn de embryonale ontwikkeling nog wat te laten doorgaan. Teneinde dit te bereiken probeerden zij verschillende toevoegingen aan het medium van Randolph & Cox. Enkele stoffen hadden een gunstig effect, vooral de toevoeging van 1 % caseïnehydrolysaat. Deze toevoeging had een tweeledig effect op de groei van gerstembryo's (Ziebur *et al.*, 1950): (1) door de verhoogde osmotische waarde van de voedingsbodem werd de kieming van de embryo's geremd en (2) de aminozuren en de PO_4^{3-}-ionen van het caseïnehydrolysaat hadden een gunstige invloed op de embryonale groei. Bij de cultuur van zeer jonge gerstembryo's bleek deze toevoeging echter de groei te remmen. (Ziebur & Brink, 1951); voor deze embryo's was 0,1 % caseïnehydrolysaat het gunstigst, waarbij het noodzakelijk was de voedingsbodem een veel hogere osmotische waarde te geven; hiertoe werd de suikerconcentratie verhoogd tot 12,5 %. Norstog (1956) heeft waargenomen dat toevoeging van 90 % cocosmelk aan het voedingsmedium volgens White een gunstig effect had op de groei van gerstembryo's van 300 μm lengte. Hetzelfde effect werd bereikt met een iets gewijzigd medium (Norstog, 1961), waarbij aan het medium volgens White 20 % cocosmelk werd toegevoegd, alsmede 400 mg glutaminezuur (op aanraden van Rijven, 1956)

en waarbij de suikerconcentratie werd verhoogd tot 12 %. Op dit medium groeiden embryo's van 500 μm vrijwel normaal verder; bij 250 μm was een differentiatiedrempel en kleinere embryo's vertoonden een abnormale differentiatie, bijvoorbeeld radiale symmetrie. In embryo's kleiner dan 125 μm trad geen differentiatie van wortel of spruit op, hoewel soms enige groei werd waargenomen. Het is jammer dat Norstog geen onderzoek heeft verricht over de ontwikkeling tot volledige planten; hij volgde alleen gedurende enige tijd de embryonale groei. Chang (1963) heeft de ontwikkeling van jonge gerstembryo's *in vivo* en *in vitro* vergeleken, waarbij voor de *in vitro* cultuur twee media zijn gebruikt: het medium volgens White en dit medium met toevoeging van 90 % cocosmelk. De ontwikkeling van de embryo's *in vitro* was trager dan *in vivo*, terwijl *in vitro* nooit volledige differentiatie werd gevonden door te vroege kieming van de embryo's. Vaak werd abnormale differentiatie *in vitro* waargenomen. Ook waren de embryo's *in vitro* groter, hetgeen voornamelijk het gevolg was van vergrote celafmetingen. Helaas werd ook hier geen melding gemaakt van pogingen normale planten op te kweken uit zeer jonge embryo's; de cultures werden na 30 dagen afgebroken.

Materiaal en methoden

De kruisingsplanten

Het in de kruisingen gebruikte materiaal staat vermeld in de tabellen 2 tot en met 5. In deze tabellen is tevens vermeld hoeveel maal de rassen of herkomsten zijn gebruikt als kruisingsouder. Hierbij is, in afwijking van wat in de literatuur gebruikelijk is (zie tabel 1), het aantal kruisingen opgegeven in het aantal kruisingsaren. Teneinde een benadering te verkrijgen van het aantal bestoven bloempjes kan bij *H. vulgare* als moederplant het aantal aren worden vermenigvuldigd met 20, terwijl bij diploïde en tetraploïde *H. bulbosum* deze vermenigvuldigingsfactor ongeveer 25 respectievelijk 30 bedraagt. Voor de aanduiding van de kruisingscombinaties zijn evenals in tabel 1 genoomsymbolen gebruikt.

Het zaad van de diploïde gerst (tabel 2) is verkregen uit collecties in Wageningen, Svalöv, Keulen, Clermont-Ferrand, Lyon, Leningrad, Beltsville en Canberra. De onbekende herkomsten bestaan uit materiaal dat is ontvangen onder verschillende botanische namen; het bleken, na determinatie, allemaal typen van *H. vulgare* te zijn, waarvan de eraan toegekende namen òf verouderd òf onjuist waren. De herkomsten van in het wild voorkomende typen bestaan uit materiaal dat is binnengekomen onder de namen *H. spontaneum* (24 herkomsten) en *H. agriocrithon* (2 herkomsten). Het zijn tweerijige en zesrijige grootzadige gersten met een brosse aarspil die in het hier toegepaste nomenclatuursysteem worden gerekend tot *H. vulgare*.

De autotetraploïde gerst (tabel 3) is afkomstig uit collecties in Svalöv en Keulen, terwijl van twee rassen (Balder en Jumbo) de autotetraploïden, ten behoeve van dit onderzoek, binnen de S.V.P. zijn geproduceerd (Speckmann, 1964). Het auto-

Tabel 2. Rassen en overige herkomsten van *H. vulgare* (2x) en het aantal kruisingen dat is uitgevoerd met *H. bulbosum* (2x en 4x), gerekend in kruisingsaren.

Rassen en overige herkomsten	Aantal kruisingen (aren)			
	VV × BB	VV × BBBB	BB × VV	BBBB × VV
Atlas	1	—	—	9
Balder	28	64	20	65
Bock	—	—	—	5
Brage	6	—	—	10
Cambrier	—	—	—	4
Dayton	—	—	—	6
Dea	57	5	48	15
Delta	1	5	6	24
D 8/55	—	2	—	—
Edda II	—	—	—	3
Jumbo	40	53	63	17
Maythorpe	1	12	—	—
Minerva	—	9	9	20
Proctor	46	36	23	19
Riniker	18	—	—	8
Trias	60	16	32	28
Vinesco	84	94	72	61
Volla	—	7	—	—
Wong	5	—	—	—
6 onbekende herkomsten / 6 specimens of unknown provenance	69	34	16	23
26 herkomsten van wild materiaal / 26 wild specimens	71	54	36	11
Varieties and other specimens	VV × BB	VV × BBBB	BB × VV	BBBB × VV
	Number of crosses (spikes)			

Table 2. Varieties and other specimens of *H. vulgare* (2x) and number of crosses made with *H. bulbosum* (2x and 4x), expressed in spikes crossed.

tetraploïde materiaal is steeds cytologisch gecontroleerd teneinde het chromosomenaantal vast te stellen en eventuele aneuploïde planten eruit te selecteren.

In tabel 4 zijn de herkomsten van diploïde *H. bulbosum* genoemd. Het uit Svalöv verkregen zaad is van materiaal dat is verzameld in Joegoslavië, CPI 14487 komt uit Tunesië en van de overige herkomsten was niet meer te achterhalen waar ze vandaan kwamen. Omdat *H. bulbosum* een kruisbevruchter is, met vooral in het diploïde cytotype een grote mate van auto-incompatibiliteit (Lein, 1948; Lundqvist, 1962; Lange, 1965), mag worden aangenomen dat de planten sterk heterozygoot zijn, hetgeen ook blijkt uit de variabiliteit die wordt gevonden tussen de planten van één herkomst.

Tabel 3. Rassen van *H. vulgare* (4x) en het aantal kruisingen dat is uitgevoerd met *H. bulbosum* (2x en 4x), gerekend in kruisingsaren.

Rassen	Aantal kruisingen (aren)			
	VVVV × BB	VVVV × BBBB	BB × VVVV	BBBB × VVVV
Atlas (4x)	15	51	19	52
Balder (4x)	6	108	—	41
Brage (4x)	—	22	—	4
Dayton (4x)	2	8	—	6
Dicktoo (4x)	10	4	—	2
D 8/55 (4x)	2	27	—	13
Edda II (4x)	5	21	—	5
Frederickson (4x)	—	4	—	—
Hâtif Bonte (4x)	13	8	—	3
Jumbo (4x)	17	105	15	71
Kentucky (4x)	7	9	6	14
New Ebis (4x)	2	27	—	—
Pallas (4x)	—	25	—	—
Riniker (4x)	8	8	—	3
Wong (4x)	4	4	10	8
Ymer (4x)	2	10	—	6
Varieties	VVVV × BB	VVVV × BBBB	BB × VVVV	BBBB × VVVV
	Number of crosses (spikes)			

Table 3. Varieties of *H. vulgare* (4x) and number of crosses made with *H. bulbosum* (2x and 4x), expressed in spikes crossed.

Tabel 4. Herkomsten van *H. bulbosum* (2x) en het aantal kruisingen dat is uitgevoerd met *H. vulgare* (2x en 4x), gerekend in kruisingsaren.

		Aantal klonen	Aantal kruisingen (aren)			
			BB × VV	BB × VVVV	VV × BB	VVVV × BB
Svalöv	popul. 2x	41	206	25	334	57
Beltsville	Konzak 273	5	73	15	59	—
Canberra	CPI 14487	2	25	—	42	—
	CPI 18736	2	7	—	11	—
	CPI 18973	3	14	10	19	31
Pollenmengsel / mixture BB			—	—	22	5
		Number of clones	BB × VV	BB × VVVV	VV × BB	VVVV × BB
			Number of crosses (spikes)			

Table 4. Specimens of *H. bulbosum* (2x) and the number of crosses made with *H. vulgare* (2x and 4x), expressed in spikes crossed.

Tabel 5. Herkomsten van *H. bulbosum* (4x) en het aantal kruisingen dat is uitgevoerd met *H. vulgare* (2x en 4x), gerekend in kruisingsaren.

		Aantal klonen	Aantal kruisingen (aren)			
			BBBB × VV	BBBB × VVVV	VV × BBBB	VVVV × BBBB
Svalöv	popul. 4x	22	69	110	112	122
Beltsville	PI 247050	3	19	7	20	10
Gatersleben	GRA 24/61	15	66	17	63	26
	GRA 54/60	8	8	—	9	—
	GRA 142/60	1	11	—	—	—
	GRA 377/60	8	18	5	22	11
	GRA 60/61	13	17	24	35	20
Wageningen	popul. 4x	4	37	5	69	37
Canberra	CPI 13798	1	—	—	—	11
	CPI 13889	1	4	—	—	25
	CPI 14276	1	—	—	6	3
	CPI 14805	1	—	4	—	12
	CPI 14807	1	—	13	—	9
	CPI 14809	1	—	—	7	11
	CPI 15012	1	—	4	—	—
	CPI 15015	1	3	4	10	—
	CPI 15303	1	—	6	—	12
	CPI 15304	1	4	2	5	—
	CPI 16925	1	2	—	—	—
	CPI 18967	1	5	—	—	—
	CPI 23526	1	—	13	—	—
	CPI 23529	1	—	4	—	—
	CPI 23531	1	5	—	4	—
	CPI 23532	1	3	—	—	—
	CPI 23623	1	4	—	—	3
	CPI 24103	1	—	—	4	—
	CPI 25758	1	4	—	5	—
	CPI 27345	1	5	4	—	4
	CPI 28357	1	—	1	—	—
	CPI 28358	1	3	1	—	—
	Hb Ku-5	1	—	—	—	18
	Hb 0082	1	—	4	—	5
	Hb 0101	1	—	—	6	—
	Hb 561	1	4	—	—	—
	Hb 656	1	4	—	—	—
Leningrad	19128	3	33	—	5	—
Taschkent	70	2	—	—	9	—
Pollenmengsel / mixture BBBB			—	—	—	102
		Number of clones	BBBB × VV	BBBB × VVVV	VV × BBBB	VVVV × BBBB
			Number of crosses (spikes)			

Table 5. Specimens of *H. bulbosum* (4x) and the number of crosses made with *H. vulgare* (2x and 4x), expressed in spikes crossed.

Tetraploïde *H. bulbosum* komt in zeer veel collecties voor; het was vrij gemakkelijk van dit cytotype een zeer gevarieerde collectie bijeen te brengen (tabel 5). De oorspronkelijke herkomst was meestal niet met zekerheid na te gaan. Waarschijnlijk komen de meeste nummers uit het zuid-oostelijke Balkangebied en uit het westelijke deel van het Midden-Oosten. Ook bij tetraploïde *H. bulbosum* bestaat een grote variabiliteit binnen één herkomst.

De kruisingsplanten zijn op het veld gezaaid of geplant, al of niet na cytologische controle, de planten van *H. vulgare* in rijtjes of kleine veldjes, het materiaal van *H. bulbosum* als alleenstaande planten. De oorspronkelijk uit zaad verkregen planten van *H. bulbosum* zijn in stand gehouden als klonen bestaande uit twee planten. De grote variabiliteit tussen de klonen heeft ertoe geleid dat bij kruisingen de klonen steeds afzonderlijk zijn behandeld. Een uitzondering is gemaakt bij kruisingen met pollenmengsels, deze mengsels zijn samengesteld uit pollen van een willekeurig aantal planten.

De kruisingstechniek

Bij de kruisingen zijn zowel *H. vulgare* als *H. bulbosum* als moederplant gebruikt. In het eerste geval werd gekruist volgens de methode die is beschreven door Bonnett (1938). Zodra de aren in het goede stadium waren voor de emasculatie, meestal wanneer de toppen van de naalden iets boven de schede van het topblad uitkwamen, werden de aren uit de schede gepeld. Al de zijdelingse aartjes evenals de onderste en de bovenste aartjes van de centrale rij werden weggenomen. Met de punt van een pincet werd een opening gemaakt in de brede zijkant van het lemma, waardoor de meeldraden met de pincet naar buiten werden gehaald. De geëmasculeerde aar werd zo mogelijk weer iets in de bladschede teruggebracht en ingehuld in een smal papieren zakje. Meestal twee dagen na de emasculatie werden pollen van de vaderplant verzameld; de bestuiving werd dan uitgevoerd door, via de eerder gemaakte opening, in iedere bloem een rijpe meeldraad te deponeren, waarna de bestoven aren weer werden ingehuld. De verzamelde meeldraden bleven nooit langer dan enkele uren buiten de aren van de vaderplant voordat ze werden gebruikt voor de bestuiving.

Wanneer *H. bulbosum* moederplant was dan werden lemma en palea met de punten van de pincet iets uit elkaar geduwd, teneinde de meeldraden er tussen uit te nemen of een meeldraad van de vaderplant er tussen in te schuiven. De bepaling van het stadium voor de emasculatie geschiedde aan de hand van de kleur van de meeldraden, welke in geen geval geel mocht zijn. Bij de bestuiving werd erop gelet of de stempels al rijp waren: ze steken dan iets buiten de bloem. Het rijp worden van de stempels duurde vaak langer dan bij de cultuurgerst, zodat de bestuivingen twee tot vijf à zeven dagen na de emasculatie werden uitgevoerd. De aren van *H. bulbosum* hebben, mede door hun grote lengte, een iets langere bloeiperiode per aar dan de cultuurgerst, zodat meestal boven aan de

aar meer bloempjes moesten worden weggenomen. Desondanks bleven gemiddeld per aar van *H. bulbosum* meer bloempjes over voor de kruising dan in een aar van *H. vulgare*.

Indien ongeveer veertien dagen na de bestuiving een begin van zaadzetting zichtbaar was werden die zaden eruit genomen en klaar gemaakt voor de embryocultuur.

Het isoleren en de cultuur van embryo's

De techniek voor het isoleren van embryo's stemt overeen met de algemeen toegepaste methoden. De handelingen werden verricht in een steriele kamer. De jonge zaden werden eerst uitwendig ontsmet gedurende tien minuten in een verzadigde oplossing van calciumhypochloriet ($Ca(ClO)_2$); daarna werden ze drie maal gespoeld met steriel water. Onder een prepareermicroscoop werden de embryo's uit de zaden geprepareerd, waarbij de zaden in een aan de voedingsbodem isotonische suikeroplossing lagen. Vervolgens werden de embryo's overgebracht naar de cultuurbuis, waarbij er zo mogelijk voor werd gezorgd dat de oriëntatie van het embryo op de voedingsbodem zodanig was dat het groeipunt naar boven was gekeerd, hetgeen voor de kieming van het embryo gunstiger bleek te zijn.

De embryo's werden gekweekt op een schuingestolde voedingsbodem in vrij grote cultuurbuizen (Ø 22 mm). Per buis werd 20 ml cultuurmedium gebruikt, omdat de ontwikkeling van embryo tot plantje nogal wat tijd in beslag kan nemen: de grote hoeveelheid cultuurmedium vormt dan een soort buffer tegen uitdrogen. De cultuurbuizen werden afgesloten met een wrattenprop van niet ontvette watten. De buizen met medium zijn gesteriliseerd in een autoclaaf gedurende 20 minuten bij 120°C.

Twee soorten voedingsoplossingen zijn vrij willekeurig door elkaar gebruikt. Ten eerste een medium volgens Tomaszewski (1958) van de volgende samenstelling:

KNO_3	500 mg	glutaminezuur	100 mg
$Ca(H_2PO_4)_2$	100 mg	ferricitraat 1 % aq.	3 ml
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	100 mg	saccharose	30 g
$MgSO_4.7H_2O$	100 mg	agar	8 g
KCl	100 mg	aqua dest.	tot 1000 ml

Aan dit medium is 1 gram caseïnehydrolysaat toegevoegd, alsmede in latere experimenten 50 mg gistextract en 0,25 mg H_3BO_3. Het tweede medium, volgens Wagenaar (1959) bestond uit:

Difco orchid agar	18,5	g
Difco gistextract	40	mg
Difco caseïnehydrolysaat	1	g
tryptofaan	40	mg
aqua dest.	tot 1000	ml

De Difco orchid agar bevat in deze concentratie:

$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	500 mg	$FeSO_4.7H_2O$	12,5 mg
KH_2PO_4	125 mg	$MnSO_4.7H_2O$	3,75 mg
$MgSO_4.7H_2O$	125 mg	saccharose	10 g
$(NH_4)_2SO_4$	250 mg	Difco bacto agar	7,5 g

Aan dit medium is 10 gram saccharose toegevoegd, alsmede in latere experimenten 500 mg glutaminezuur en 0,25 mg H_3BO_3. Er is geen verschil gevonden in bruikbaarheid van de beide media.

In een later stadium van het onderzoek zijn een aantal experimenten uitgevoerd teneinde de invloed te bestuderen die de osmotische waarde van het medium en de toevoeging van gibberellazuur op de ontwikkeling van de embryo's heeft. Deze experimenten zullen hier niet nader worden besproken; ze hebben er toe geleid dat de suikerconcentratie in de beide media werd verhoogd tot 7%. Bij deze concentratie werd de kieming van de embryo's enigszins vertraagd, zodat de embryonale groei nog wat kon doorgaan; tevens was de ontwikkeling van de jonge plantjes goed. De toevoeging van gibberellazuur had een gunstige doch geringe invloed op het aantal embryo's dat kiemde, maar de jonge plantjes werden lang en slap en ook de wortelvorming was enigszins geremd en abnormaal, zodat ter verkrijging van normale planten deze toevoeging niet gewenst leek.

De cultuurbuizen met embryo's werden in een broedstoof bij 25°C in het donker geplaatst totdat het embryo een kiempje had gevormd van 1-2 cm. Daarna werd de buis in de kas in diffuus daglicht geplaatst. Wanneer de wortelontwikkeling uitbleef of slecht was werd de buis nog langer in het donker gelaten, want licht zou de wortelontwikkeling ongunstig beïnvloeden. Afhankelijk van de verdere ontwikkeling van het plantje werd het overgeplant in gezeefde potgrond als de spruit 3-5 cm lang was. Teneinde de overgang naar de grondcultuur zo gunstig mogelijk te laten verlopen werd een huls van slap plastic over de potrand geschoven en aan de bovenkant afgesloten; het plantje verbleef zodoende in een ruimte met zeer hoge luchtvochtigheid. De potten werden in turfmolm geplaatst dat goed vochtig werd gehouden. De lichtverminderende invloed van het plastic werd enigszins gecompenseerd door bijverlichting. Zodra het plantje goed was aangeslagen werd het normaal in de kas verder geteeld en later meestal uitgeplant op het veld.

Resultaten van de kruisingen

De kruisingen zijn uitgevoerd in de jaren 1962 tot en met 1966. Niet alle kruisingscombinaties zijn ieder jaar aan bod gekomen, mede doordat bijvoorbeeld de tetraploïde *H. vulgare* pas in 1964 in het kruisingsprogramma werd opgenomen. In tabel 6 wordt een overzicht gegeven van alle uitgevoerde kruisingen en van de resultaten ervan. De soorten zijn gemakshalve aangeduid met genoomformules: VV = *H. vulgare* (2x), BB = *H. bulbosum* (2x), enz. In de tabellen 2 tot en met 5 is reeds opgenomen hoe vaak een bepaalde herkomst als moederplant of als

Tabel 6. Samenvatting van de kruisingen en de kruisingsresultaten.

Kruisingscombinatie	Aantal kruisingen (aren)	Aantal embryo-cultures	Aantal planten
VV × BB	487	450	3
BB × VV	325	143	6
VV × BBBB	391	801	146
BBBB × VV	328	90	12
VVVV × BB	93	16	0
BB × VVVV	50	10	0
VVVV × BBBB	441	328	26
BBBB × VVVV	228	50	8
Cross-combination	Number of crosses (spikes)	Number of embryo cultures	Number of plants

Table 6. Summary of crosses and results of crossing.

vaderplant is gebruikt in de verschillende kruisingen, terwijl op pagina 8 is vermeld op welke wijze uit het aantal kruisingsaren een benadering kan worden verkregen van het aantal bestoven bloempjes.

Mede doordat het tellen van het aantal bestuivingen te tijdrovend was is geen poging ondernomen een exact getal vast te stellen voor de zaadzetting. Een andere reden hiervoor is dat het zeer moeilijk was een duidelijk criterium te vinden voor de zaadzetting. Wanneer ieder zichtbaar uitgroeien van de caryopsis als criterium zou zijn genomen dan zou een ireëel hoog getal zijn verkregen doordat allerlei zeer kleine verschrompelde zaadjes dan nog meegeteld zouden worden. Een betere benadering is het aantal embryo's dat in cultuur is genomen, maar dit is evenmin een exact getal doordat weleens een embryo verloren ging bij het prepareren en doordat in de latere jaren alleen de grotere embryo's in cultuur werden genomen. De ervaring had namelijk geleerd dat van de kleine embryo's toch niets terecht kwam.

Ondanks het nodige voorbehoud dat moet worden gemaakt tonen de getallen van tabel 6 dat de zaadzetting, gerekend naar de opbrengst aan embryo's beter is wanneer *H. vulgare* als moederplant wordt genomen. Deze afhankelijkheid geldt niet voor het percentage geslaagde embryocultures. Dit percentage moet echter ook met enig voorbehoud worden bezien, omdat gemiddeld ongeveer 15% van de cultures door infectie verloren ging. Tevens moest een criterium worden gekozen voor het al of niet geslaagd noemen van een culture; dit is zo gekozen dat een embryocultuur als geslaagd werd beschouwd wanneer daaruit een plant groeide die in ieder geval zo groot werd dat aan de hand van de morfologie van de plant of de morfologie van zijn chromosomen kon worden bepaald wat er van

de kruising was terechtgekomen. De embryo's die zich in de cultuurbuis ontwikkelden tot kleine plantjes maar kort voor of kort na de overgang naar grondcultuur dood gingen zijn dus als niet geslaagd beschouwd. Daarnaast waren er, behalve de vele embryo's die in het geheel niet groeiden, embryo's die zich in de cultuurbuis abnormaal ontwikkelden. Er waren veel typen abnormaliteiten: ongedifferentieerde callusgroei, alleen worteldifferentiatie, alleen spruitdifferentiatie en abnormale spruitdifferentiatie waarbij bijvoorbeeld alleen het coleoptiel uitgroeide maar het vegetatiepunt niet of waarbij de spruit kurketrekkervormig uitgroeide. Hoewel vaak werd geprobeerd deze afwijkende structuren door transplantatie nog een gunstig resultaat te laten opleveren is dat in de meeste gevallen niet gelukt.

De ontwikkeling van de embryo's was, hoewel ze vrijwel steeds na 14 dagen in cultuur werden genomen, zeer variabel. De variabiliteit was het grootst tussen de verschillende kruisingscombinaties, maar ook binnen een kruisingscombinatie of zelfs tussen verschillende zaden van een kruisingsaar kon nog een belangrijke variabiliteit worden vastgesteld. Bij het prepareren werd de indruk verkregen dat er een verband bestond tussen de mate van ontwikkeling van het embryo en de hoeveelheid endosperm in de korrel. Een groot embryo ging vaak samen met relatief veel endosperm, over het algemeen was de hoeveelheid endosperm echter zeer klein in vergelijking met door intraspecifieke kruising verkregen korrels van dezelfde leeftijd.

De kruisingscombinaties

Bij de combinatie VV × BB waren de embryo's over het algemeen zeer klein. Het is opvallend dat alle drie verkregen planten onstonden uit kruisingen met in het wild voorkomende typen van *H. vulgare*. De planten waren echter niet vitaal, ze gingen alle voor de bloei dood nadat ze gedurende enkele maanden zeer traag of vrijwel niet waren gegroeid. Aan de hand van het chromosomenaantal en de morfologie van de chromosomen kon echter worden vastgesteld dat er sprake was van twee typen planten: één plant was haploïd met het genoom van *H. vulgare* en de overige twee planten waren diploïde hybriden. De beide hybriden kwamen uit dezelfde kruisingsaar; een kloon van *H. bulbosum* uit Beltsville was hierbij vaderplant.

Ook bij de reciproke kruising, BB × VV, waren de embryo's over het algemeen zeer klein. Toch werden nog zes planten verkregen waarvan er echter twee voor de bloei dood gingen. Deze twee planten waren allebei haploïd met het genoom van *H. vulgare*. De overige vier planten waren diploïde hybriden; zij kregen de nummers HY 2001 tot en met HY 2004. Het was opvallend dat de beide haploïde planten zijn verkregen op planten van één kloon van *H. bulbosum* met de rassen Vinesco en Jumbo als vaders. De hybriden ontstonden op twee klonen van *H. bulbosum* waarbij steeds het ras Jumbo de vader was. De drie klonen van *H. bulbosum* behoorden tot de herkomst die uit Svalöv was verkregen. De plant HY 2002 heeft bijna twee jaar geleefd, de overige hybriden waren in 1968 nog in

leven en vier of drie jaar oud. Het eerste jaar hebben de hybriden op het veld gestaan, daarna zijn ze vanwege hun matige vitaliteit overgebracht naar de kas. De drie planten zijn gescheurd zodat klonen werden verkregen.

De combinatie VV × BBBB was veruit de beste. Er bestond grote variabiliteit tussen de embryo's en daarbij werden vrij grote, goed ontwikkelde embryo's aangetroffen. Het resultaat bestond uit 146 planten die weer uiteenvielen in twee typen: één plant was haploïd met het genoom van *H. vulgare*, de overige planten waren triploïde hybriden. Hiervan gingen er 13 in een jong stadium dood. De haploïde plant kwam uit het ras Balder. Aan de triploïde hybriden hebben acht rassen, zes herkomsten van wild materiaal en drie onbekende herkomsten bijgedragen als moederplant. De vaderplanten waren 28 klonen van 10 herkomsten, terwijl 19 van de hybriden zijn ontstaan uit kruisingen die zijn uitgevoerd met het pollenmengsel. De planten werden alle in het eerste jaar gescheurd en als kloon bestaande uit twee planten op het veld uitgeplant. De vitaliteit van de planten is zeer variabel, per jaar gaat gemiddeld ongeveer eenzesde van de klonen dood.

De combinatie BBBB × VV lukte minder goed: er werd maar weinig zaadzetting gevonden. De embryo's waren variabel van grootte maar over het algemeen kleiner dan die van de vorige combinatie. Er werden 12 planten verkregen, alle triploïde hybriden. De moederplanten waren zes klonen van vier herkomsten, de vaderplanten kwamen uit vier rassen en uit één herkomst van wild materiaal, waarbij de rassen Minerva en Trias opvielen met 5 respectievelijk 4 nakomelingen. De planten werden op dezelfde wijze behandeld als de overige triploïde hybriden; het lijkt erop dat de vitaliteit iets groter is. De triploïde hybriden uit de reciproke kruisingen tussen *H. vulgare* (2x) en *H. bulbosum* (4x) kregen gezamenlijk de nummers HY 3001 tot en met HY 3144.

De kruisingscombinaties VVVV × BB en BB × VVVV hebben nooit planten opgeleverd. Er zijn relatief weinig kruisingen gemaakt, de zaadzetting was gering en de embryo's waren zeer klein.

De combinatie VVVV × BBBB vertoonde weer een betere zaadzetting. Ook hier werd een grote variabiliteit tussen de embryo's waargenomen. Het resultaat bestond uit 26 planten die waren te verdelen in twee groepen. De 15 planten van de eerste groep waren diploïd en hadden twee genomen van *H. vulgare*, zodat deze planten kunnen worden beschouwd als dihaploïden. Van deze planten gingen er negen voor de bloei dood, de overige waren éénjarig. De moederplanten kwamen uit vier tetraploïde gerstrassen, de vaderplanten waren elf klonen van acht herkomsten. Het was opvallend dat alle planten die in bloei zijn gekomen Atlas (4x) als moederplant hadden. Deze planten kregen de nummers P 2001 tot en met P 2006. (De letter P is afkomstig van het woord plasma en is ingevoerd ter onderscheiding van de in de volgende alinea beschreven alloplasmatische dihaploïden: de A-nummers. De beide typen dihaploïden hebben dezelfde genomensamenstelling en een verschillend plasma.) De tweede groep planten die uit deze kruisingscombinatie werd verkregen bestond uit tetraploïde hybriden en uit planten met duidelijk meer dan 14 chromosomen en eigenschappen die wezen op een

hybride karakter. Van de elf planten waren er zes niet stabiel wat betreft hun chromosomenaantal; van deze planten zijn er drie in een jong stadium dood gegaan, de andere drie planten komen bij de bespreking van de hybriden nog ter sprake. De resterende vijf planten waren, voor zover kon worden nagegaan, in het vegetatieve weefsel vrijwel stabiel met betrekking tot het chromosomenaantal; drie ervan zijn in een jong stadium dood gegaan, de andere twee komen eveneens later nog ter sprake. De moederplanten kwamen uit drie tetraploïde rassen, waarbij Atlas (4x) het beste resultaat opleverde, namelijk acht van de elf planten. De vaderplanten waren acht klonen van vier herkomsten, het waren klonen die in deze kruisingscombinatie ook dihaploïden hadden opgeleverd. (Dit kon niet worden vastgesteld voor drie planten die waren ontstaan uit kruisingen welke zijn uitgevoerd met het pollenmengsel.) De vijf planten die niet in een jong stadium zijn dood gegaan hebben één jaar op het veld gestaan; vier ervan zijn daarna gescheurd en in de kas gezet, ze zijn niet erg vitaal.

Gezien het geringe aantal embryocultures leverde de combinatie BBBB × VVVV een relatief hoog aantal planten. Deze acht planten zijn weer te verdelen in twee groepen. Drie planten waren diploïd en hadden twee genomen van *H. vulgare*, deze planten worden beschouwd als alloplasmatische dihaploïden; ze hebben op het veld gestaan en ze waren éénjarig. Twee klonen van *H. bulbosum* waren de moederplanten en Jumbo (4x) was de vader. De planten kregen de nummers A 2001 tot en met A 2003. (De letter A is afkomstig van het woord alloplasmatisch.) De resterende vijf planten van de combinatie BBBB × VVVV waren tetraploïde hybriden, ze hadden vijf klonen van *H. bulbosum* als moederplanten en de vaders waren Atlas (4x), Jumbo (4x) en D 8/55 (4x). De vitaliteit van de planten was variabel, de meeste hebben een jaar op het veld gestaan en daarna in de kas. Ook deze planten waren meestal niet stabiel wat betreft hun chromosomenaantal, hetgeen bij de bespreking van de hybriden nader ter sprake zal komen. De tien tetraploïde hybriden uit de reciproke kruisingen tussen tetraploïde ouderplanten kregen de nummers HY 4001 tot en met HY 4010.

De invloed van de kruisingsouders

De ouderplanten lijken een zekere invloed te kunnen uitoefenen op het resultaat van de kruisingen. Deze invloed kan tot uitdrukking komen in het aantal embryocultures of in het aantal planten dat uiteindelijk is verkregen, waarbij geen verband lijkt te bestaan tussen deze twee fasen van het kruisingsproces. Tevens is de indruk verkregen dat de invloed van een bepaalde ouderplant kan uitgaan als de plant wordt gebruikt als moeder of als vader, waarbij de invloed van die plant in reciproke kruisingen niet gelijksoortig hoeft te zijn. Doordat de resultaten van de kruisingen door verschillende factoren worden beïnvloed is het niet mogelijk over de invloed van de ouderplant exacte getallen te vermelden, er zullen slechts enige voorbeelden ter illustratie worden gegeven. Het ras Proctor was ten aanzien van de zaadzetting zeer goed als moederplant in kruisingen met diploïde

en tetraploïde *H. bulbosum*, maar desondanks zijn uit deze kruisingen relatief weinig nakomelingen gekomen; als vaderplant heeft het ras bijna niets opgeleverd. Het ras Jumbo was een goede vaderplant in de kruisingen BB × VV en BBBB × VVVV; in de eerste kruising leverde het vijf van de zes nakomelingen en in de tweede kruising vijf van de acht nakomelingen. In de kruising VVVV × BBBB leverde Atlas (4x) de beste resultaten: 16 van de 26 nakomelingen, terwijl deze 16 nakomelingen tevens over het algemeen het meest vitaal waren. Tenslotte waren er bepaalde klonen van *H. bulbosum* (4x) die in de kruisingen BBBB × VV en BBBB × VVVV relatief goed waren. Het is niet duidelijk waardoor de invloed van de ouderplanten zou kunnen worden veroorzaakt.

Beschrijving van hybriden en overige nakomelingen

Daar van diploïde en tetraploïde hybriden nog nooit eerder volwassen planten zijn verkregen is een morfologische beschrijving gemaakt. Daarnaast zullen gegevens worden verstrekt over het onderzoek naar de mate van steriliteit van de hybriden en over een vegetatieve splitsing die zich in de meeste tetraploïde hybriden heeft voltrokken. Tenslotte zullen de overige nakomelingen kort worden besproken. Voorafgaand aan de bespreking van de hybriden en de overige nakomelingen zal een overzicht worden gegeven van de literatuur over triploïde en alloplasmatische hybriden.

Het literatuuroverzicht

Triploïde hybriden uit kruisingen tussen *H. vulgare* (2x, ♀) en *H. bulbosum* (4x, ♂) zijn reeds globaal beschreven door Konzak *et al.* (1951). De planten van deze auteurs waren over het algemeen niet intermediair tussen de ouders, maar leken sterk op *H. bulbosum*. In het jeugdstadium hadden ze de typische rozetgroei. De knollen waren niet zo groot als van *H. bulbosum*, of zelfs geheel afwezig. Hoewel het aartype een sterke mate van overeenkomst vertoonde met *H. bulbosum* was de lengte van de helmhokjes intermediair tussen de beide ouders. Er was variatie in de beharing en in de intensiteit van de groene kleur. Alle hybriden waren in zekere mate meerjarig. De triploïde hybriden van Kuckuck (1934), Morrison & Rajhathy (1959) en Davies (1960) hadden overeenkomstige morfologische eigenschappen. Alle auteurs vermeldden volledige steriliteit van deze hybriden. Kuckuck heeft ze beproefd als moederplant in terugkruisingen met de beide ouders (65 en 13 bloemen bestoven met respectievelijk *H. vulgare* en *H. bulbosum*): er was geen zaadzetting. Konzak *et al.* (1951) beproefden beide reciproke kruisingen met gerst en vonden tweemaal het begin van zaadzetting wanneer gerst als vader werd gebruikt. Morrison *et al.* (1959) vonden daarentegen enige zaadzetting wanneer diploïde gerst werd bestoven met pollen van de triploïde hybriden. De gevormde embryo's werden in cultuur genomen maar de 35 embryocultures leverden niets op. Davies (1960) vermeldde tenslotte dat de reciproke kruisingen tussen

triploïde hybriden en diploïde gerst bij hem geen resultaat hebben opgeleverd.

De drie alloplasmatische hybriden die Davies (1958) verkreeg uit de kruising BBBB × VVVV waren diploïd en leken zeer sterk op *H. vulgare*. Twee van deze planten hadden slechts één eigenschap die afweek van het gerstras dat als ouder was gebruikt, namelijk een vertakte halm boven de laatste knoop. Maar deze eigenschap werd bij *H. bulbosum* niet gevonden. De derde plant had in zijn jeugdontwikkeling nog enigszins de rozetgroei van *H. bulbosum*, terwijl in sommige aren een afwijkende bloemmorfologie werd gevonden, zoals kelkkafjes met lange naalden en in de zijdelingse aartjes kroonkafjes met naalden, beide eigenschappen van *H. bulbosum*. Soms werden in deze afwijkende aren nog andere abnormaliteiten gevonden zoals slecht ontwikkelde bloemen, het ontbreken van vruchtbeginsels en soms minder meeldraden. De drie planten waren fertiel, zowel bij zelfbevruchting als bij reciproke kruising met diploïde gerst. De terugkruising met *H. bulbosum* ging echter niet beter dan bij de normale kruising tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum*. De nakomelingen van de kruisingen met gerst en van de zelfbevruchtingen waren niet van gerst te onderscheiden.

De hybriden

De diploïde, triploïde en tetraploïde hybriden lijken, voor zover het echte hybriden zijn, vrij sterk op elkaar. Er bestaat een grote variabiliteit tussen hybriden met dezelfde genomensamenstelling, hetgeen vooral bij de triploïden duidelijk naar voren komt. Deze variabiliteit wordt ook gevonden in beide ouderplanten, maar het was, waarschijnlijk mede door het sterk heterozygote karakter van *H. bulbosum*, niet mogelijk verband te leggen tussen de beide variabiliteiten. Er is geen morfologisch verschil gevonden tussen hybriden met gelijke genomensamenstelling maar ontstaan uit reciproke kruisingen. De eventueel aanwezige verschillen gingen geheel verloren in de variabiliteit. Wel lijkt het erop dat planten met *H. bulbosum* als moeder iets vitaler zijn. De hybriden lijken sterk op *H. bulbosum* hoewel ze niet zo groot en niet zo vitaal zijn. Bij veel hybriden komt, vooral aan het einde van het groeiseizoen, een specifieke, donkerbruine, vlekkerige verkleuring van het blad voor. Er wordt wel verondersteld dat deze verkleuring het gevolg is van gelocaliseerde verstoring van de fysiologie van het blad, maar wat dan de oorzaak van de verstoring is, is niet bekend.

Als gevolg van de morfologische gelijkenis die bestaat tussen de drie typen hybriden wordt volstaan met één morfologische beschrijving die is gebaseerd op drie diploïde klonen, op zeven triploïde klonen die zijn verkregen uit vijf verschillende oudercombinaties en op drie tetraploïde klonen. In de beschrijving zullen eventuele verschillen tussen de drie typen hybriden apart worden genoemd. De beschrijving moet worden bezien tegen de achtergrond van een beschrijving van het geslacht *Hordeum* waarvoor wordt verwezen naar Nevski (1941) en Bowden (1962). Deze auteurs (zie ook Bowden, 1965) hebben eveneens de soorten *H. bulbosum* en *H. vulgare* beschreven, waarbij voor de laatste soort tevens kan worden

verwezen naar verscheidene handboeken en monografieën (Åberg, 1940; Åberg & Wiebe, 1948; Hoffmann, 1959), zodat een beschrijving van deze soorten hier achterwege kan blijven. Ter verduidelijking van de morfologische beschrijving zijn metingen verricht; de metingen aan de aren zijn samengevat in tabel 7. In deze tabel zijn de drie typen hybriden afzonderlijk vermeld; de metingen zijn verricht aan dezelfde klonen die zijn gebruikt voor de beschrijving. Tevens zijn in de tabel de resultaten opgenomen van metingen aan diploïde en tetraploïde cytotypen van de beide oudersoorten. Bij *H. bulbosum* zijn de metingen verricht aan klonen van verschillende herkomsten; de metingen aan *H. vulgare* zijn verricht aan de rassen Jumbo en Balder. De figuren 1 tot en met 3 tonen aren en tripletten van verschillende objecten.

De hybriden: planten meerjarig, matig polvormend (de triploïden iets beter dan de andere); halmen aan de basis niet of nauwelijks verdikt of bij de triploïden matig bolvormig verdikt (knollen tot 0,5 cm dik), rechtopgaand, zelden schuin of half-liggend, aan de basis meestal matig tot sterk geknikt, 50-110 cm lang, de triploïden vaak groter dan de andere, met 4-6 (8) bladeren, glad, donkergroen tot licht geel-groen; bladeren vlak, groen, meestal iets ruw, soms ruwer, zelden met gladde onderzijde, met ruwe of iets ruwe bladrand, vrij dicht of spaarzaam behaard met vrij lange, witte, zachte haren, bij de diploïden meestal de onderzijde en bij de triploïden vaak de bovenzijde sterker behaard; tongetje kort, vliezig, afgeknot, soms scheef, meestal met rafelige rand, bij de tetraploïden duidelijk groter; oortjes klein of ontbrekend of bij de tetraploïden vrij lang, lijn-sikkelvormig, vliezig; bladscheden niet of weinig ruw, groen tot donkergroen, alle kaal of de onderste dicht tot zeer dicht behaard met vrij lange, witte, zachte haren en dan naar boven toe afnemende beharing, de bovenste steeds glad en kaal, soms als overgangsstadium bladscheden met één rij haren op de buitenste rand; aren langgerekt, rechtopgaand, vrij dicht, vierrijïg, lichtgroen; aarspil taai of vrij taai, geledingen bijna lijnvormig, afgeplat, glad, met aan de randen wimpers van korte of iets langere witte haren; aartjes in tripletten, éénbloemig met een priemvormig borstelig behaard of kort behaard rudiment van een tweede bloempje, zeer zelden met een rudimentair tweede bloempje met rudimentaire kafjes, eveneens zelden met in de zijdelingse aartjes korter rudiment dan in de middelste aartjes; de middelste aartjes tweeslachtig, in hoge mate steriel, zittend, de zijdelingse aartjes met mannelijke en sterk gereduceerde vrouwelijke bloemorganen, kort gesteeld, steriel; kelkkafjes lijn-lancetvormig, lichtgroen bij de triploïden en groen tot donkergroen bij de andere, vaag generfd, genaald, zeer ruw of weinig ruw met korte borstelige haren of tandjes aan de buitenzijde en langs de naald, met vliezige rand, ongelijkvormig, de buitenste van de zijdelingse aartjes vrij smal, kort met een twee- of driemaal zo lange naald, de overige ongeveer aan elkaar gelijk, die van het middelste aartje vaak nog iets breder met sterker toelopende basis, breder en iets langer dan de buitenste van de zijdelingse aartjes, met evenlange tot tweemaal zo lange naald, zelden met lange zachte naar binnen gerichte haren langs de randen; kroonkafjes lancetvormig tot

Tabel 7. Morfologische eigenschappen van de oudersoorten en de hybriden (resultaten van de metin aan aren in mm).

		VV	VVVV	VB	VBB
Aarlengte (zonder naalden)		75 -100	70 - 85	35 -90	50 -140
Aarbreedte (zonder naalden)		4 - 11	8 - 12	6 -10	5 - 12
Lengte aarspilgeleding		3,4- 3,5	3,7- 4,5	3,0- 3,9	2,4- 4,0
Lengte rudiment tweede bloempje		2,5- 3,5	4,0- 5,5	4 - 6	3 - 7
Buitenste kelkkafje van zijdelingse aartjes:	lengte	3 - 6	4 - 8	4 - 7	5 - 8
	breedte	0,5- 0,9	0,6- 1,0	0,3- 0,5	0,3- 0,6
	naald	3 - 13	5 - 19	8 -16	10 - 25
Overige kelkkafjes:	lengte	3 - 6	4 - 8	5 - 8	5 - 8
	breedte	0,5- 0,9	0,6- 1,0	0,5- 0,7	0,5- 1,0
	naald	3 - 13	5 - 19	6 -10	8 - 20
Zijdelingse aartjes: buitenste kroonkafje:	lengte	7 - 11	9 - 14	9 -12	9 - 12
	breedte	2,0- 7,0	2,0- 8,0	3,0- 4,5	2,0- 4,5
	naald	0 -170	0 -190	1 -15 (35)	0 - 5
binnenste kroonkafje:	lengte	5 - 11	6 - 14	9 -11	8 - 11
	breedte	1 - 4,5	1,5- 5,0	1,5- 2,5	1,5- 2,5
Middelste aartjes: buitenste kroonkafje:	lengte	10 - 12	12 - 15	10 -12	10 - 13
	breedte	5,5- 7,5	7,5- 9,0	3,0- 4,0	3,0- 5,0
	naald	140 -175	135 -220	47 -90	20 - 70
binnenste kroonkafje:	lengte	10 - 12	12 - 15	9 -12	9 - 13
	breedte	4,0- 5,0	4,0- 5,0	2,0- 2,5	1,5- 3,5
Lengte helmknoppen		3 - 4	4 - 5	2 - 4	3 - 6

ellipsvormig, licht geel-groen, met groene nerven, de buitenste vijfnervig, de buitenzijde bovenaan op de nerven en langs de naalden ruw en getand, de binnenste smal, evenlang als of vooral bij de zijdelingse aartjes iets korter dan de buitenste, tweenervig, ongenaald, aan de buitenzijde bovenaan op de nerven iets ruw, met nogal vliezige randen, kroonkafjes van de zijdelingse aartjes kort of iets langer gesteeld, ongenaald en gepunt of kort genaald of met een evenlange of anderhalf maal zo lange, zelden langere naald, kroonkafjes van de middelste aartjes zittend, evenlang als of iets langer dan die van de zijdelingse aartjes, de buitenste stevig, uitlopend in een lange stevige naald met variabele lengte, bij diploïden vier- tot achtmaal zo lang, bij triploïden twee- tot zesmaal zo lang en bij tetraploïden vier- tot tienmaal zo lang.

Bij de hybriden komt evenals bij *H. bulbosum* een paarse verkleuring voor, die op vrijwel alle onderdelen van de plant kan voorkomen en veelal zeer variabel is. Over het algemeen neemt de verkleuring toe in de loop van het groeiseizoen; de

Table 7. Morphological characteristics of the parental species and the hybrids (results of measurements of the spikes in mm).

VVBB	BB	BBBB		
35 - 75	40 -120	55 -180	Length of spikes (without awns)	
5 - 8	5 - 8	6 - 9	Width of spikes (without awns)	
3,3- 4,4	2,2- 3,2	2,4- 3,4	Length of rachis internode	
3 - 7	4 - 6	3 - 8	Length of rudimentary second flower	
			Outer glume of	
4 - 7	4 - 6	4 - 6	lateral spikelets:	length
0,3 0,7	0,2- 0,4	0,3- 0,5		width
4 - 20	11 - 22	11 - 22		awn
5 - 8	5 - 7	5 - 7	Other glumes:	length
0,5- 1,0	0,5- 0,8	0,6- 1,0		width
5 - 16	8 - 15	5 - 17		awn
			Lateral spikelets:	
9 - 12	7 - 14	8 - 12	lemma:	length
2,5- 3,5	1,5- 3,5	2,5- 3,0		width
0 - 24 (42)	0	0		awn
9 - 12	7 - 12	7 - 11	palea:	length
1,5- 2,5	1,0- 2,0	2,0- 3,0		width
			Central spikelets:	
10 - 13	10 - 13	10 - 13	lemma:	length
3,0- 4,5	2,0- 3,5	3,0- 3,5		width
36 -105	15 - 28	19 - 42		awn
10 - 13	10 - 12	10 - 12	palea:	length
1,5- 3,0	1,0- 2,0	1,5- 2,0		width
3 - 5	6 - 7	7 - 8	Length of anthers	

kleur is meestal minder intensief dan bij *H. bulbosum*. Een andere variabele en eveneens in het oog springende eigenschap is de aanwezigheid van een waslaag; deze komt vooral op de halmen, bladscheden en bloemen voor.

Aan de hybriden is onderzocht in welke mate steriliteit optreedt door bij vrijwel alle aren na te gaan of zaad werd gevormd bij vrije afbloei op het veld of in de kas, bij inhullen van de aar, of bij kruising, waarbij de hybriden als moeder- en vaderplant zijn gebruikt. Daarnaast zijn de pollen onderzocht, maar de resultaten daarvan zullen in aansluiting op de bespreking van de reductiedeling in het hoofdstuk 'Cytogenetische onderzoekingen' worden vermeld. De resultaten van het onderzoek naar de zaadzetting zijn samengevat in tabel 8. Als gevolg van de verschillen in vitaliteit en in aantallen planten zijn deze onderzoekingen voornamelijk uitgevoerd met de triploïden.

De diploïde hybriden waren vrijwel geheel steriel. In 1968 zijn bij kruising met

Figuur 1. Aren van oudersoorten (0,4 ×). 1. *H. vulgare* (2x), tweerijïg; 2. *H. vulgare* (2x), vierrijïg; 3. *H. bulbosum* (2x); 4. *H. bulbosum* (4x).

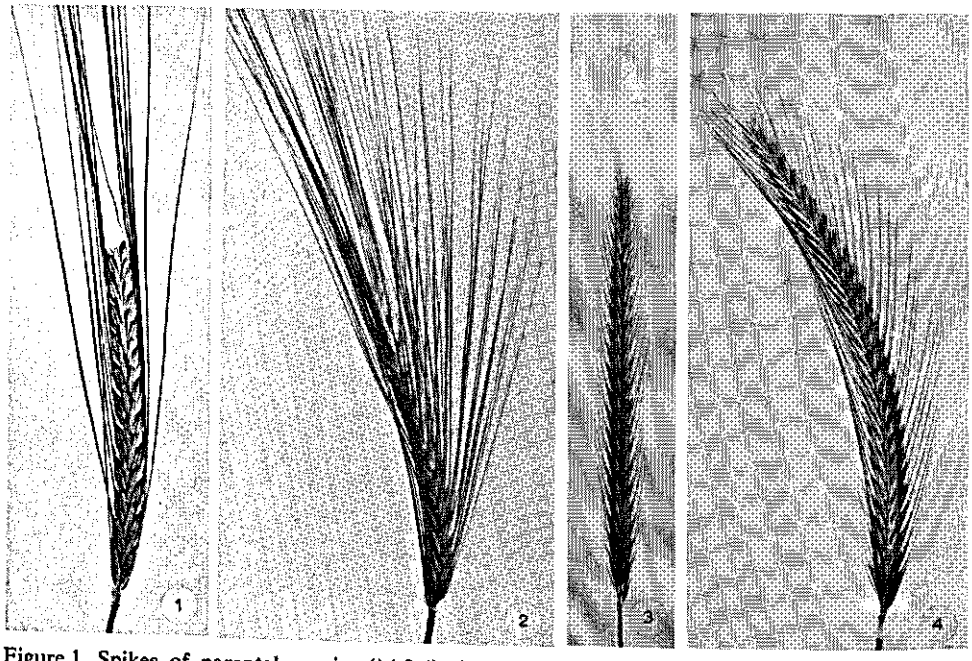


Figure 1. Spikes of parental species (× 0.4). 1. *H. vulgare* (2x), two-rowed; 2. *H. vulgare* (2x), four-rowed; 3. *H. bulbosum* (2x); 4. *H. bulbosum* (4x).

Figuur 2. Tripletten van oudersoorten (3 ×). Nummers als in figuur 1.

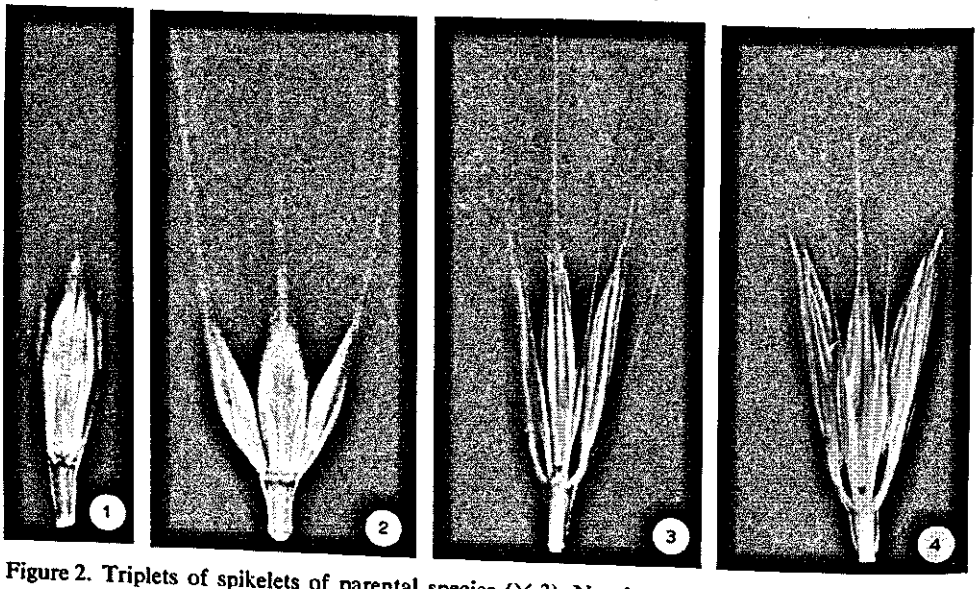


Figure 2. Triplets of spikelets of parental species (× 3). Numbers as in figure 1.

Figuur 3. Aren en tripletten van hybriden (aren 0,6 ×, tripletten 3 ×). 1. diploïde hybride (VB); 2. triploïde hybride (VBB); 3. tetraploïde hybride (VVBB).

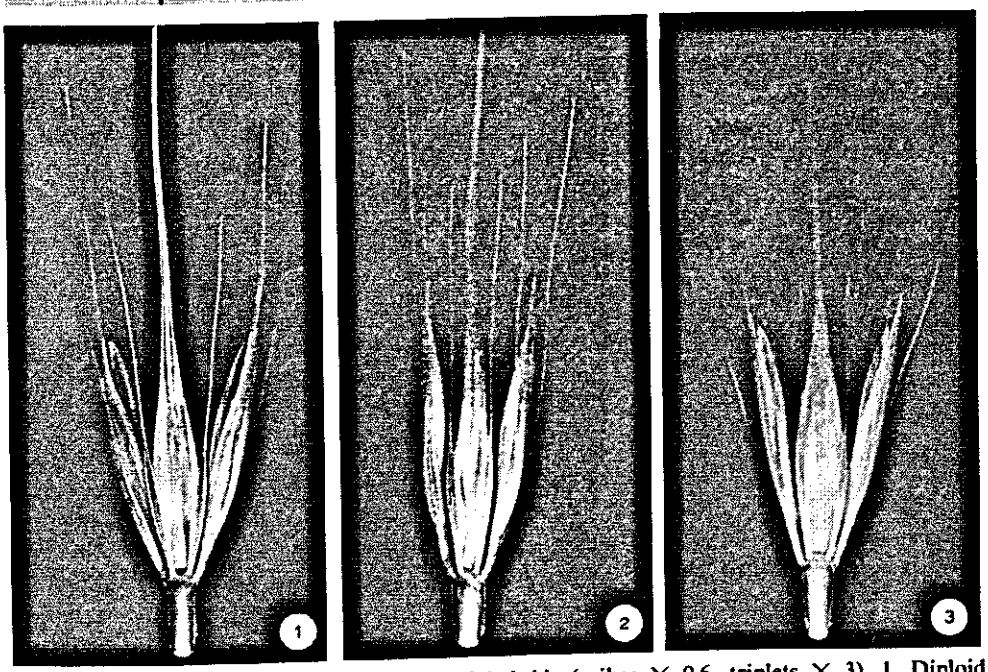


Figure 3. Spikes and triplets of spikelets of hybrids (spikes × 0.6, triplets × 3). 1. Diploid hybrid (VB); 2. Triploid hybrid (VBB); 3. Tetraploid hybrid (VVBB).

Tabel 8. Zaadzetting in de hybriden bij vrije afbloei en bij inhulling, en de zaadzetting bij kruisingen tussen hybriden en oudersoorten.

	Aantal aren	Aantal zaden	Aantal planten
Diploïde hybriden / diploid hybrids			
vrije afbloei / free pollination	± 150	0	—
ingehuld / isolated flowers	22	0	—
kruisingen / crosses VB × VV	53	4	.[1]
Triploïde hybriden / triploid hybrids			
vrije afbloei / free pollination	± 10000	38	3
ingehuld / isolated flowers	18	0	—
kruisingen / crosses VBB × VV	106	0	—
VBB × VVVV	38	0	—
VBB × BB	15	0	—
VBB × BBBB	14	0	—
VV × VBB	84	0	—
VVVV × VBB	63	0	—
BB × VBB	10	0	—
BBBB × VBB	19	0	—
Tetraploïde hybriden / tetraploid hybrids			
vrije afbloei / free pollination	± 100	85[2]	± 75
ingehuld / isolated flowers	56	136[3]	± 125
kruisingen[4] / crosses[4] VVBB × VV	34	30	.[1]
	Number of spikes	Number of seeds	Number of plants

[1] Nog niet bekend / not yet known.
[2] Voornamelijk aan acht aren / mainly on eight spikes.
[3] Aan vijf aren / on five spikes.
[4] Soms niet of niet tijdig geëmasculeerd / sometimes not emasculated or not emasculated in time.

Table 8. Seedset in the hybrids after free pollination and isolated flowering and seedset after crosses between hybrids and parental species.

gerst vier zaden gevonden, maar deze moeten nog nader worden onderzocht. De triploïden leverden zeer sporadisch wel eens een zaadje, dat veelal klein en verschrompeld was. Van 20 van de 38 zaden die op het veld zijn aangetroffen is het embryo in cultuur genomen, de andere zaden zijn op de planten afgerijpt. Geen van beide methoden heeft veel succes gehad, want er zijn slechts drie planten verkregen, waarvan één via embryocultuur. Deze planten zullen later nog worden besproken (zie pagina 33).

De tetraploïde hybriden vertoonden een zeer interessant beeld: ze waren vaak instabiel. In de meeste gevallen waren ze vrijwel steriel, maar soms, en dan meestal na een rustperiode, kregen ze geheel of gedeeltelijk een gewijzigde morfologie, die vaak samenging met het optreden van een vrij goede fertiliteit. Zoals in de discussie

nog nader zal worden uiteengezet berust dit verschijnsel waarschijnlijk op eliminering van chromosomen en wel zodanig dat wanneer een plant of een deel van een plant deze eliminering had overleefd, vrijwel steeds een euploïd chromosomenaantal werd gevonden, bestaande uit complete genomen. Bijna steeds ontstonden uit de instabiele hybriden planten of scheuten die morfologisch sterk overeenkwamen met het bij de kruising gebruikte ouderras van *H. vulgare*. Eénmaal echter is een tetraploïde hybride veranderd in een diploïde hybride, welke overgang voornamelijk kon worden vastgesteld aan de hand van het chromosomenaantal en de chromosomenmorfologie.

De overgang van tetraploïde hybride naar diploïde *H. vulgare* was duidelijk waarneembaar. De diploïde planten of scheuten waren éénjarig, geheel onbehaard, behoudens één uitzondering waarbij sterke beharing optrad, ze hadden bredere bladeren en stengels, vertoonden de aarmorfologie van gerst en werden, op twee uitzonderingen na, min of meer fertiel. Bijna alle tetraploïde hybriden hebben de vegetatieve overgang of uitsplitsing vertoond, welke nu per plant kort zal worden besproken.

HY 4001. Kruising BBBB 4046 × Jumbo (4x) in 1964. Heeft in 1965 gebloeid met 12 aren; een hybride, niet diploïde sector leverde tien steriele aren en een vermoedelijk diploïde sector leverde twee aren met samen 36 zaden; de aren waren afzonderlijk ingehuld. Heeft later nog met veel steriele aren gebloeid en heeft nooit meer een fertiele sector afgesplitst. Is in september 1967 dood gegaan. Alle uit de 36 zaden verkregen nakomelingen waren diploïd en sterk gelijkend op *H. vulgare*. De vermoedelijk diploïde sector kreeg het nummer HA 2001.

HY 4002. Kruising BBBB 4070 × Atlas (4x) in 1964. Heeft nooit morfologisch zichtbare vegetatieve splitsing vertoond. Heeft in 1965 één niet kiemkrachtig zaad geleverd en in 1968 bij kruising met diploïde gerst acht zaden die nog nader moeten worden onderzocht; bij deze kruisingen is niet steeds geëmasculeerd zodat ook zelfbevruchting kan zijn opgetreden. Was in najaar 1968 nog in leven.

HY 4003. Kruising BBBB 4094 × Atlas (4x) in 1964. Vertoonde vanaf het begin al enigszins afwijkende morfologie. Heeft in 1965 met drie aren gebloeid, die zijn ingehuld en samen ongeveer 100 zaden leverden. Is in het najaar van 1965 dood gegaan. De nakomelingschap splitste uit: 50 diploïde planten en 42 tetraploïde planten, alle sterk gelijkend op *H. vulgare*. Daar de aren gezamenlijk waren geoogst valt niet te zeggen of de uitsplitsing was gekoppeld aan de aren. Het deel dat de diploïde zaden heeft geleverd kreeg het nummer HA 2003, het tetraploïden leverende deel HA 4003.

HY 4004. Kruising Atlas (4x) × BBBB 4044 in 1964. Had in 1965 hybride karakter. Heeft toen gebloeid met 7 aren; een niet ingehulde aar leverde één niet-kiemkrachtig zaad. Heeft in 1966 niet gebloeid. Is gescheurd in twee delen. Eén deel is daarna teruggelopen tot een klein plantje met weinig groeikracht, het leverde in 1967 één aar met twee zaden. Dit deel van de plant is in najaar 1967 dood gegaan. De zaden leverden twee diploïde, op *H. vulgare* lijkende planten, die echter

Figuur 4. Aren en halm van op *H. vulgare* lijkende scheuten die zijn ontstaan uit de tetraploïde hybride HY 4004, na vegetatieve eliminering van chromosomen (aren 0,8 ×). 1. fertiele aar; 2. steriele aar; 3. halm van de steriele aar.

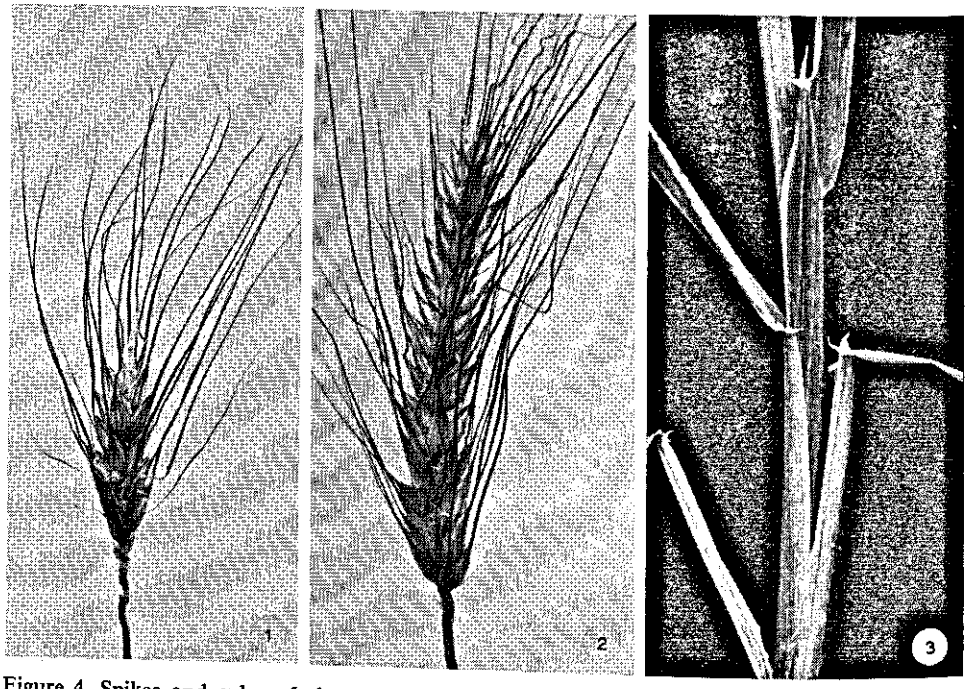
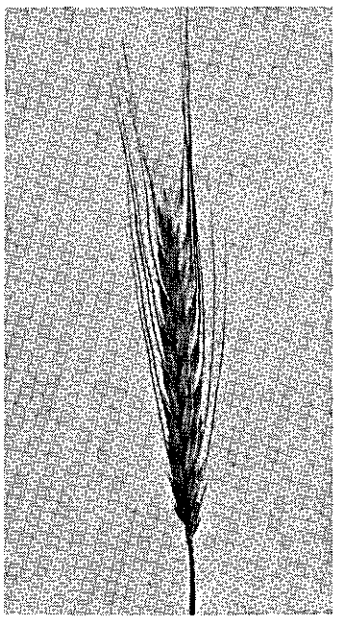


Figure 4. Spikes and culm of shoots, resembling *H. vulgare*, which originated from the tetraploid hybrid HY 4004, after vegetative elimination of chromosomes (spikes × 0.8). 1. Fertile spike; 2. Sterile spike; 3. Culm of sterile spike.

niet erg vitaal waren en voor de bloei zijn dood gegaan. Het deel dat diploïde zaden leverde kreeg het nummer HP 2004. Het tweede deel van de oorspronkelijke plant heeft in 1967 niet gebloeid, het splitste in 1968 één scheut af met duidelijke eigenschappen van *H. vulgare*, maar met sterk behaarde bladeren en bladscheden en met grote, steriele aar (figuur 4). Dit deel was in najaar 1968 nog in leven.

HY 4005. Kruising Atlas (4x) × BBBB 4047 in 1964. Vertoonde in 1965 vegetatieve splitsing: zeven aren leverden 61 zaden en vijf aren waren steriel. Bloeide in 1966 met 16 aren, die twee niet-kiemkrachtige zaden opleverden; de plant had een duidelijk hybride karakter. Heeft in 1967 gebloeid met verscheidene steriele aren en heeft in 1968 gebloeid met 26 aren die alle zijn bestoven met pollen van diploïde gerst; dit leverde 22 zaden. De plant was in najaar 1968 nog in leven. De nakomelingen van de in 1965 geoogste zaden waren diploïd en leken sterk op *H. vulgare*. Het deel van de oorspronkelijke plant dat deze zaden leverde kreeg het nummer HP 2005. De in 1968 uit kruisingen verkregen zaden moeten nog worden bestudeerd, zodat de aard nog niet bekend is. De herkomst van het zaad is evenmin bekend doordat de kruisingen soms zijn uitgevoerd zonder voorafgaande emasculatie.



Figuur 5. Aar van diploïde plant met hybride eigenschappen die is ontstaan uit de tetraploïde hybride HY 4006, na vegetatieve eliminering van chromosomen (0,8 ×).

Figure 5. Spike of diploid plant with hybrid characters, which originated from the tetraploid hybrid HY 4006, after vegetative elimination of chromosomes (× 0.8).

HY 4006. Kruising BBBB 4124 × Jumbo (4x) in 1965. Leek hybride. Heeft in 1966 gebloeid met 40 aren maar was geheel steriel. Bleek in het voorjaar 1967 te zijn veranderd in een diploïde plant met hybride karakter en bleef steriel (figuur 5). Was in najaar 1968 nog in leven.

HY 4007. Kruising Atlas (4x) × BBBB 4006 in 1965. Leek hybride. Heeft in 1966 niet gebloeid. Is in voorjaar 1967 teruggelopen tot kleine plant. Bloeide in 1967 met één aar; dit leverde 18 zaden op. Is in voorjaar 1968 dood gegaan. De zaden leverden diploïde, op *H. vulgare* lijkende planten. Het diploïden leverende deel kreeg het nummer HP 2007.

HY 4008. Kruising Atlas (4x) × BBBB 4006 in 1965. Leek hybride. Heeft in 1966 gebloeid met vier steriele aren. Heeft in 1967 weer gebloeid met verscheidene steriele aren en in 1968 met slechts twee steriele aren. Was in najaar 1968 nog in leven.

HY 4009. Kruising Atlas (4x) × BBBB 4006 in 1965. Leek hybride. Is in 1966 kort voor het in bloei komen dood gegaan.

HY 4010. Kruising BBBB 4113 × D 8/55 (4x) in 1966. Vertoonde in 1967 vegetatieve splitsing. Produceerde vijf op *H. vulgare* lijkende, echter steriele aren en één steriele aar met min of meer hybride eigenschappen. In de wortels werden 14 chromosomen geteld, hoewel er oorspronkelijk 28 waren geweest. De steriliteit van de op *H. vulgare* lijkende aren werd getoetst bij vrije afbloei in de kas en bij kunstmatige bestuiving met pollen van diploïde en tetraploïde gerst. De morfologische verschillen tussen de halmen met de verschillende aren waren duidelijk waarneembaar: het verschil in beharing was sprekend, terwijl ook de aartypen duidelijk te herkennen waren, mede doordat het vaderras D 8/55 (4x) een

Figuur 6. Aar, halmen en tripletten van de tetraploïde hybride HY 4010, welke vegetatieve splitsing heeft vertoond. 1. op *H. vulgare* lijkende, vermoedelijk diploïde aar (0,5 ×); 2. triplet van op *H. vulgare* lijkende aar (3 ×); 3. links: halm van op *H. vulgare* lijkende scheut; rechts: halm van scheut met hybride eigenschappen; 4 en 5. tripletten van aar met hybride eigenschappen (3 ×).

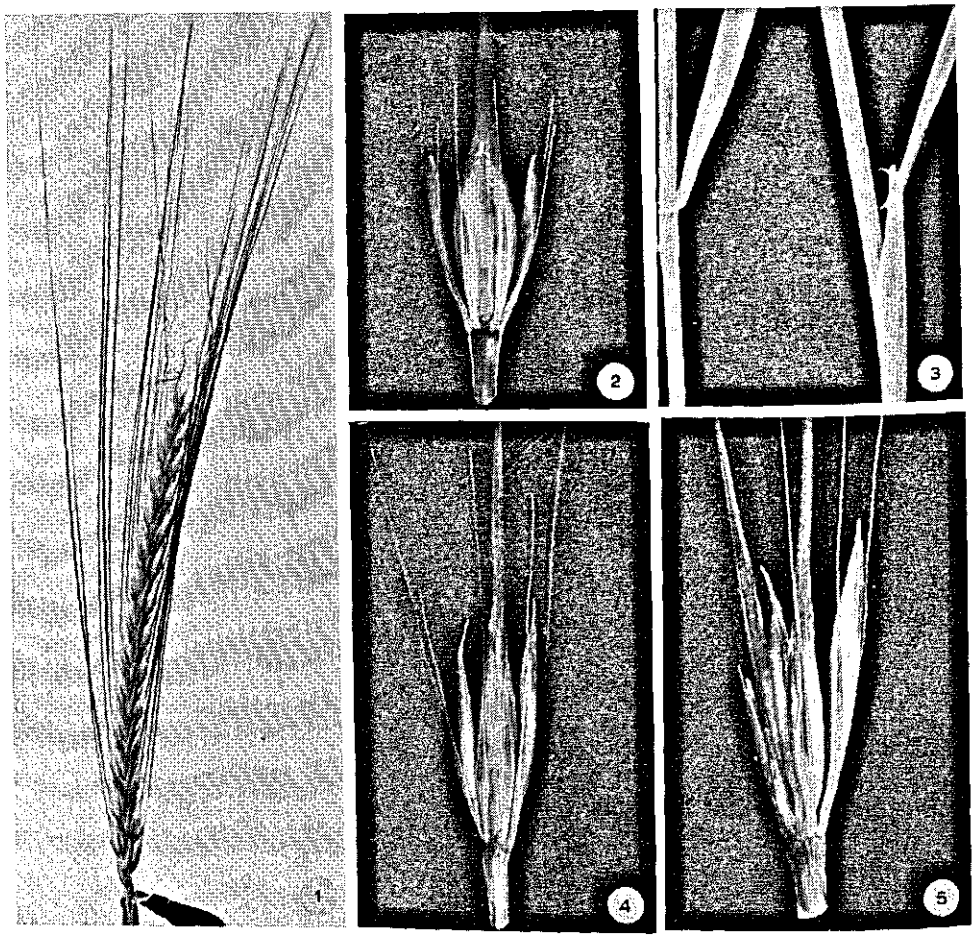


Figure 6. Spike, culms and triplets of spikelets of the tetraploid hybrid HY 4010, which showed vegetative segregation. 1. Probable diploid spike which resembles *H. vulgare* (× 0.5); 2. Triplet of spike, resembling *H. vulgare* (× 3); 3. Left: culm of shoot, resembling *H. vulgare*; right: culm of shoot with hybrid characters; 4 and 5. Triplets of spike with hybrid characters (× 3).

tweerijige gerst is, waarbij de zijdelingse aartjes klein en ongenaald zijn (figuur 6). De gemiddelde lengte van de sluitcellen van de huidmondjes in bladeren aan de hybride halm was significant groter dan de lengte van de sluitcellen in een op *H. vulgare* lijkende scheut. De morfologie van de aartjes in de hybride aar deed veronderstellen dat er sectoren met een abnormaal chromosomengarnituur aanwezig waren. De aartjes waren niet zoals in de overige echte hybriden; soms was er een kafje teveel of te weinig en soms was het rudiment van het

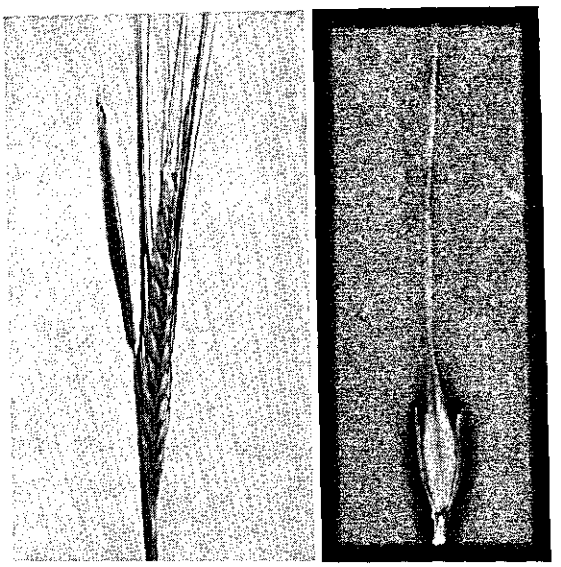
tweede bloempje uitgegroeid tot een klein en onvolkomen bloempje. De zijdelingse aartjes waren veelal ongelijkvormig, vaak aan één kant sterk gereduceerd. De kafnaalden waren zeer variabel, zowel wat betreft hun aanwezigheid als wat betreft hun lengte. De plant is in het voorjaar 1968 dood gegaan.

Concluderend kan worden gezegd dat de diploïde, triploïde en tetraploïde hybriden in hoge mate steriel zijn. Zodra echter uit de tetraploïde hybriden een op *H. vulgare* lijkende scheut of sector wordt afgesplitst kan daarin een normale fertiliteit optreden, waarbij het opvalt dat deze onafhankelijk lijkt te zijn van het cytoplasma. Het feit dat van de twee op *H. vulgare* lijkende aren van HY 4004 er slechts één twee zaden leverde terwijl de andere aar leeg bleef en het feit dat de vermoedelijk diploïde, op *H. vulgare* lijkende aren van HY 4010 in het geheel geen zaden leverden, is moeilijk te verklaren. De eerst genoemde aar van HY 4004 was klein en slecht ontwikkeld hetgeen een reden kan zijn voor de slechte zaadzetting; de andere aar van HY 4004 groeide op een halm met sterk behaarde bladeren en bladscheden, zodat in dit geval misschien nog niet alle chromosomen van *H. bulbosum* waren geëlimineerd. De genoemde aren van HY 4010 waren echter morfologisch geheel normaal, zodat in dit geval een voor deze oudercombinatie specifieke onverdraagzaamheid tussen het genoom en het cytoplasma misschien de oorzaak is van het uitblijven van zaadzetting.

De diploïde en fertiele planten of scheuten die van de tetraploïde hybriden zijn afgesplitst en die gelijkenis vertonen met *H. vulgare*, zijn qua samenstelling geheel vergelijkbaar met de dihaploïden die uit dezelfde kruisingscombinatie zijn verkregen. De planten P 2001 tot en met P 2006 en de plantgedeelten HP 2004, HP 2005 en HP 2007 hebben het cytoplasma van *H. vulgare*, terwijl de planten A 2001 tot en met A 2003 en de plantgedeelten HA 2001, HA 2003 en HA 4003 het cytoplasma van *H. bulbosum* hebben. De overeenkomst is tot uitdrukking gebracht in de gebruikte lettercode, waarbij HP en HA aldus moeten worden gelezen: uit hybriden ontstaan en overeenkomst vertonend met P respectievelijk A. Zoals in de discussie nader zal worden uiteengezet lijkt het aannemelijk te veronderstellen dat de planten P en A op dezelfde wijze zijn ontstaan als de planten HP en HA, waarbij in het eerste geval de eliminering van chromosomen reeds heeft plaats gevonden in het embryonale stadium of in ieder geval vóór de eerste analyse van het chromosomenaantal na de embryocultuur.

De overige nakomelingen

Alle nog niet beschreven nakomelingen zijn haploïden en dihaploïden. Uit kruisingen tussen de diploïde cytotypen van de soorten zijn in het totaal drie haploïden ontstaan: één met het cytoplasma van *H. vulgare* en twee met het cytoplasma van *H. bulbosum*. Alle drie planten gingen in een jong ontwikkelingsstadium dood; aan de morfologie van hun chromosomen was echter vastgesteld dat het hier haploïden betrof die één genoom van *H. vulgare* hadden. De jonge plantjes hadden



Figuur 7. Aar en triplet van haploïde *H. vulgare* ontstaan uit de kruising VV × BBBB (aar 0,7 ×, triplet 3 ×).

Figure 7. Spike and triplet of spikelets of haploid *H. vulgare* originated from the cross VV × BBBB (spike × 0.7, triplet × 3).

weinig vitaliteit, ze hebben respectievelijk vier, zeven en tien maanden geleefd; de oudste had het cytoplasma van *H. vulgare*. Ze waren geheel onbehaard, stoelden weinig uit, hadden wat breder blad, allemaal eigenschappen die een bevestiging zijn van het feit dat hier sprake is van haploïden van *H. vulgare*, tenminste wat betreft hun chromosomen.

Uit de kruisingen VV × BBBB is één haploïde plant ontstaan, eveneens met de chromosomen van *H. vulgare*, ditmaal in het cytoplasma van dezelfde soort. De plant bleef bijna drie jaar in de kas in leven. In die tijd heeft hij verscheidene malen met enkele aren gebloeid. Pogingen door scheuren een kloon te maken zijn mislukt evenals pogingen met behulp van colchicine een diploïd te produceren. De plant was in alle opzichten een verkleinde uitgave van het uitgangsras Balder (figuur 7); hij was geheel steriel.

Tenslotte zijn er dan nog de reeds genoemde dihaploïden: de P- en A-nummers. Deze leken zeer sterk op het ouderras, ze waren éénjarig en fertiel. Ingehulde aren van deze planten leverden gemiddeld respectievelijk 39 en 37 zaden per aar. De nakomelingschappen waren wederom diploïd, éénjarig en fertiel. In de hierna volgende paragraaf zal een vergelijkend onderzoek worden beschreven, waarin de nakomelingschappen van de P- en A-nummers, alsmede die van de HP- en HA-nummers zijn vergeleken met diploïde en tetraploïde cytotypen van de ouderrassen van *H. vulgare*.

Beschrijving van nakomelingen van hybriden

Afgezien van enkele zaden die in 1968 op diploïde en tetraploïde hybriden zijn verkregen en die nog nader onderzocht moeten worden, zijn er twee typen hybriden, die nakomelingen hebben geleverd. De triploïde hybriden hebben bij vrije afbloei

op het veld 38 zaden geleverd waaruit drie levensvatbare planten zijn gegroeid. De tetraploïde hybriden leverden 221 zaden die over het algemeen kiemkrachtig waren en waaruit diploïde, op *H. vulgare* lijkende planten groeiden, die op hun beurt al weer nakomelingschappen hebben geleverd. Het is niet mogelijk van de nakomelingen van de hybriden een gedetailleerde beschrijving te geven. Er zal worden volstaan met een korte morfologische karakterisering en wat cytologische gegevens van de nakomelingen van de triploïde hybriden, terwijl voor de nakomelingen van de tetraploïden de resultaten zullen worden vermeld van het reeds genoemde vergelijkende onderzoek.

De nakomelingen van de triploïde hybriden

Van deze drie planten hebben twee een min of meer hybride karakter, terwijl de derde een duidelijke dwerggroei heeft en ook nog niet heeft gebloeid. De planten zijn meerjarig, steriel, hebben een trage groei en vooral een slecht wortelstelsel, hetgeen cytologisch onderzoek zeer bemoeilijkt. Doordat de zaden zijn ontstaan bij vrije afbloei op het veld, valt over de herkomst weinig te zeggen. De plant met dwerggroei heeft 13-15 chromosomen, waarvan twee chromosomen met satellieten. Verscheidene cellen bevatten microkernen, een verschijnsel dat veelal samengaat met het optreden van onregelmatigheden bij de celdeling. De andere twee planten hadden aanvankelijk 28 chromosomen, waarvan twee satellietchromosomen, maar in latere tellingen konden niet meer dan 25-26 chromosomen per cel worden geteld. Soms kon worden waargenomen dat de satellieten overeenkomst vertoonden met die van *H. vulgare*. Deze resultaten laten voorshands geen uitspraak toe over de herkomst van de planten en ze zijn hier slechts vermeld om aan te geven dat de triploïde hybriden niet volledig steriel zijn, hoewel gecontroleerde kruisingen geen resultaat hebben opgeleverd.

De nakomelingen van tetraploïde hybriden

Vijf van de tien tetraploïde hybriden hebben kiemkrachtige zaden opgeleverd waaruit op *H. vulgare* lijkende planten zijn gegroeid. Van drie hybriden is het zaad in 1965 geoogst; de planten stonden op het veld en de aren waren ingehuld. Van de resterende twee hybriden is het zaad in 1967 geoogst; de planten stonden in de kas en de aren waren niet ingehuld. Alle nakomelingschappen waren diploïd behalve die van HY 4003 welke splitste in diploïde en tetraploïde planten. De nakomelingen van HY 4004 kunnen hier niet verder worden besproken, het waren twee diploïde planten die beide voor de bloei dood gingen.

De nakomelingen van vier tetraploïde hybriden, welke feitelijk de nakomelingen zijn van onder de nummers HA en HP beschreven sectoren van tetraploïde hybriden, zijn vergeleken met gerst. In het experiment zijn mede opgenomen de nakomelingen van planten die zijn beschreven onder de nummers A en P en die eveneens zijn verkregen uit kruisingen tussen de tetraploïde cytotypen van de ouder-

soorten. De herkomsten van de oorspronkelijke planten zijn al eerder in dit hoofdstuk beschreven (pagina's 17 en 18). Als gevolg van de geringe hoeveelheid zaaizaad was het experiment van bescheiden omvang. De nakomelingschappen waren vertegenwoordigd als eerste, tweede of derde generatie, waarbij de eerste generatie de nakomelingschap van de oorspronkelijke plant is, terwijl de tweede en derde generatie de nakomelingschappen zijn van de eerste en de tweede generatie. Het merendeel van de nakomelingschappen is door zelfbevruchting tot stand gekomen; slechts drie nakomelingschappen zijn van niet ingehulde aren, welke echter in de kas stonden zodat zelfbevruchting waarschijnlijk was. Zo mogelijk zijn verschillende generaties van één object onderzocht. Bij de beschrijving en in tabel 9 zijn de generaties aangeduid met romeinse cijfers achter het nummer van de oorspronkelijke plant of plantsector. De nakomelingschappen van de nummers HA, A, HP en P worden proefnummers genoemd en de planten ervan proefplanten. Als vergelijking dienen de controles, respectievelijk controleplanten. Deze behoren tot de rassen Jumbo en Atlas, welke zijn gekozen omdat ze werden gebruikt in de soortkruisingen, zodat kan worden verondersteld dat het genotype van deze rassen al dan niet gewijzigd in het cytoplasma van *H. bulbosum* (HA- en A-nummers) of *H. vulgare* (HP- en P-nummers) in de proefplanten voorkomt.

Alle proefnummers en controles zijn wintertypen, zodat in het najaar is gezaaid. Maar omdat reeds bekend was, dat vooral de HA- en de A-nummers in het najaar op het veld slecht aan de groei komen is op 10 november 1967 in een koude kas in kistjes gezaaid. Rijlengte was 45 cm, afstand tussen de rijen 8 cm, per rij 20 zaden behalve van HP 2007 I waarvan slechts 18 zaden beschikbaar waren, zaaidiepte 1-1,5 cm. Van de eerste generatie van HY 4003 zijn ongeveer een week na het zaaien de plantjes cytologisch onderzocht teneinde de scheiding tussen de diploïden (HA 2003 I) en de tetraploïden (HA 4003 I) tot stand te brengen. Doordat bij deze nummers enkele zaden niet kiemden is niet bekend hoeveel diploïde en tetraploïde zaden oorspronkelijk zijn gezaaid. De kistjes hebben ruim een maand in de koude kas gestaan en zijn op 19 december 1967 overgebracht naar een gekoelde ruimte met een constante temperatuur van 2°C, waarin ze tot 8 april 1968 bleven. Op 10 april 1968 zijn de rijtjes uitgeplant op het veld; afstand tussen de rijen was 24 cm, in de rij bleef de situatie van na het zaaien gehandhaafd. Aan de beide uiteinden waren reeds randrijen ingezaaid. Er is naar gestreefd de behandeling van de verschillende objecten zo veel mogelijk uniform te laten verlopen. Bestrijding van meeldauw was noodzakelijk, deze is uitgevoerd met Karathane. De proefnummers zijn in enkelvoud en de controles in duplo in de proef opgenomen. Gedurende de gehele proefperiode zijn aan de planten waarnemingen verricht; de meeste resultaten hiervan zijn samengevat in tabel 9. Per object is het aantal pakjes per aar en de zaadzetting zo mogelijk bepaald aan 20 aren; het duizend-korrel-gewicht is zo mogelijk bepaald aan 500 korrels en omgerekend tot een vochtgehalte van 16%. Gezien de herkomst van de nakomelingschappen worden HA 2001 en alle A-nummers vergeleken met Jumbo (2x), HA 2003 en alle HP- en P-nummers met Atlas (2x), terwijl HA 4003 wordt ver-

geleken met Atlas (4x). De nakomelingschappen van planten met het cytoplasma van *H. bulbosum* zullen eerst worden besproken en daarna de nakomelingschappen van planten met het cytoplasma van *H. vulgare*. De tijdsaanduiding wordt vermeld in dagen, waarbij steeds het aantal dagen na het zaaien wordt bedoeld.

Het ras Jumbo kiemde snel en voor honderd procent, deze kiemsnelheid werd door HA 2001 II en A 2003 II en III geëvenaard, terwijl de andere A-nummers veel trager kiemden. Geen van deze nakomelingschappen had een zo hoog kiempercentage, vooral A 2002 I kiemde zeer matig. De diploïde en tetraploïde nakomelingschappen van HY 4003 kiemden iets beter dan de controles van het ras Atlas. Gedurende het groeiseizoen is nog wel eens een plant dood gegaan, hetgeen bij de controles niet gebeurde.

De vroegste ontwikkeling verliep bij de controleplanten iets sneller dan bij de proefplanten; dit verschil was echter bij het begin van de uitstoeling niet meer waarneembaar. Vlak voordat de planten werden overgezet in de gekoelde ruimte, hadden de meeste twee scheuten. In de gekoelde ruimte zijn de planten langzaam doorgegroeid en vooral behoorlijk uitgestoeld. Op de 150e dag, vlak nadat de planten uit de gekoelde ruimte kwamen, is het aantal scheuten per plant bepaald. Behoudens enkele uitzonderingen hadden de proefplanten gemiddeld meer scheuten dan de controleplanten, hetgeen vooral bij A 2003 II en III zeer opvallend was. Het is interessant het aantal scheuten per plant op de 150e dag te vergelijken met het aantal aren per plant dat uiteindelijk tot ontwikkeling is gekomen. De controleplanten hebben gemiddeld meer aren gevormd dan er scheuten waren op de 150e dag, in tegenstelling tot de HA- en A-nummers, die minder aren vormden dan er scheuten waren op de 150e dag, waaruit blijkt dat bij deze planten een vrij groot aantal scheuten niet tot aarvorming is gekomen. Bij de uitplant op het veld kon nog worden waargenomen dat de wortelontwikkeling van de HA- en A-nummers duidelijk slechter was dan van de controles.

Voordat de planten in de gekoelde ruimte zijn geplaatst is een verschil in planttype waargenomen. De controleplanten waren meer rechtopgaand en de proefplanten ietwat plat. In de gekoelde ruimte is dit verschil gehandhaafd of enigszins groter geworden. Na het uitplanten op het veld hadden de HA- en de A-nummers moeite omhoog te komen (figuur 8). Het feit dat Atlas een sterker ontwikkelde waslaag had dan Jumbo en daardoor iets grijzer en mat blad had was in de proefnummers terug te vinden, in die zin dat HA 2003 en HA 4003 de bladkleur van Atlas benaderden en de overige HA- en A-nummers die van Jumbo. Over het algemeen was het blad van de HA- en A-nummers fijner dan dat van de controles, welk verschil verloren ging bij het omhoog komen en schieten van de planten.

Bij de verdere plantontwikkeling bleven de proefplanten achter bij de controleplanten. Dit blijkt in tabel 9 uit de gegevens over de gewashoogte: de proefplanten waren duidelijk kleiner. Het feit dat de gemiddelde plantlengte (dit is het gemiddelde van de lengten van de langste halm van iedere plant, gemeten bij de oogst) kleiner is dan de gewashoogte op de 221e dag, is een gevolg van de vrij grote spreiding in plantlengte waardoor een gewas groter lijkt dan de gemiddelde plant-

Tabel 9. Vergelijking van diploïde en tetraploïde *H. vulgare* met op *H. vulgare* lijkende nakomelingen van: (1) tetraploïde hybriden (HA en HP) en (2) diploïden uit kruisingen tussen tetraploïde *H. vulgare* en tetraploïde *H. bulbosum* (A en P). De romeinse cijfers achter de plantnummers duiden de generatie van de nakomelingschappen aan.

	Jaar zaad-winning	Aantal planten/rij					Aantal scheuten/plant				Aantal aren/plant
Dagen na zaaien		7	10	14	150	oogst	28	33	38	150	oogst
Jumbo (2x)	1967	14	20	20	20	20	1	1	2	3,1	4,0
Jumbo (2x)	1967	12	20	20	20	20	1	1	2	2,7	3,8
HA 2001 II	1966	10	18	18	17	17	1	1	2	2,7	1,7
A 2001 I	1965	0	15	18	17	16	1	1	2	3,9	2,2
A 2002 I	1965	0	6	13	12	12	1	1	1	2,5	2,3
A 2002 II	1966	5	16	19	19	19	1	1	2	3,5	2,5
A 2003 I	1965	0	15	17	17	17	1	1	2	3,2	2,7
A 2003 II	1966	13	19	19	19	19	1	1	2	5,1	2,6
A 2003 III	1967	14	15	17	17	17	1	1	2	5,1	3,1
Atlas (2x)	1967	7	15	16	15	15	1	1	2	3,1	4,3
Atlas (2x)	1967	6	13	16	17	17	1	1	2	2,8	4,7
HA 2003 I	1965	?	19	19	19	18	1	2	2	3,4	2,0
HA 2003 II	1966	16	20	20	20	20	1	2	2	3,9	2,2
HP 2005 II	1966	14	18	18	18	18	1	2	2	4,2	4,7
HP 2005 III	1967	17	19	20	19	18	2	2	2	4,2	4,1
HP 2007 I	1967	15	17	17	17	17	1	2	2	4,1	3,7
P 2001 I	1965	0	9	17	17	16	1	1	2	2,5	2,8
P 2001 II	1966	8	20	20	20	20	2	2	2	4,0	3,0
P 2001 III	1967	4	17	18	18	18	1	2	2	4,2	3,7
P 2002 I	1965	1	15	18	18	18	1	2	2	3,6	2,9
P 2002 II	1966	10	20	20	20	20	1	2	2	3,6	3,6
P 2002 III	1967	12	16	18	18	18	1	2	2	3,6	3,6
P 2004 I	1965	0	17	19	19	19	1	2	2	3,2	3,3
P 2004 II	1966	13	20	20	20	20	2	2	2	4,9	3,7
P 2004 III	1967	9	15	16	18	18	1	2	2	3,9	3,5
Atlas (4x)	1967	2	17	18	18	18	1	1	2	2,3	2,8
Atlas (4x)	1967	1	12	17	17	17	1	1	2	2,4	3,9
HA 4003 I	1965	?	17	17	16	13	1	1	1	2,8	1,3
HA 4003 II	1966	0	17	18	18	18	1	1	1	2,3	1,4
Days after sowing		7	10	14	150	harvest	28	33	38	150	harvest
	Year of cropping	Number of plants/row					Number of shoots/plant				Number of spikes/plant

Table 9. Comparison of diploid and tetraploid *H. vulgare* with progeny, resembling *H. vulgare*, of: (1) tetraploid hybrids (HA and HP) and (2) diploids from crosses between tetraploid *H. vulgare* and tetraploid *H. bulbosum* (A and P). Roman numerals after the plant No refer to generation number of the progenies.

Gewashoogte (cm)						Plant-lengte (cm)	Aantal pakjes/aar	% zaad-zetting	Aantal kor-rels/aar	Duizend-korrel-ge-wicht (g)	
28	38	189	199	211	221	oogst	oogst	oogst	oogst	oogst	Dagen na zaaien
17	25	33	55	95	115	103	58	90	52	40,5	Jumbo (2x)
17	25	32	55	95	108	101	61	91	55	41,6	Jumbo (2x)
11	17	16	35	55	80	76	52	74	39	35,1	HA 2001 II
9	14	18	35	53	75	70	51	76	38	35,0	A 2001 I
8	13	12	20	47	75	71	52	85	44	35,5	A 2002 I
9	15	13	28	50	75	67	47	79	37	39,7	A 2002 II
7	11	15	32	53	75	74	53	84	44	40,0	A 2003 I
11	16	20	38	60	77	74	55	80	44	34,1	A 2003 II
11	16	20	35	60	80	78	57	82	47	36,5	A 2003 III
16	21	29	55	95	115	105	57	88	50	44,0	Atlas (2x)
16	21	31	53	97	115	105	59	91	54	41,3	Atlas (2x)
9	15	8	32	60	90	76	46	79	37	34,3	HA 2003 I
10	16	10	35	70	90	79	46	82	38	36,1	HA 2003 II
11	17	24	48	90	110	105	54	93	50	42,6	HP 2005 II
14	18	27	50	93	110	109	52	89	46	41,3	HP 2005 III
15	22	26	52	100	115	113	54	85	46	43,0	HP 2007 I
8	14	21	50	87	115	102	56	87	49	42,0	P 2001 I
13	18	24	50	95	115	102	51	85	44	41,1	P 2001 II
11	17	28	55	100	115	105	51	88	45	40,0	P 2001 III
9	15	23	47	95	115	104	52	88	46	40,7	P 2002 I
16	22	25	52	98	115	109	50	85	43	42,5	P 2002 II
15	21	24	52	95	115	108	53	90	48	38,8	P 2002 III
13	18	23	48	93	115	104	57	89	51	41,8	P 2004 I
16	22	26	48	95	115	106	52	92	48	41,0	P 2004 II
13	17	26	50	97	115	105	54	86	47	39,3	P 2004 III
16	25	29	55	80	100	88	46	61	28	63,2	Atlas (4x)
16	25	26	50	80	100	80	47	62	29	62,8	Atlas (4x)
10	15	10	20	50	70	67	36	39	14	44,3	HA 4003 I
14	19	13	30	52	75	65	35	30	11	42,3	HA 4003 II
28	38	189	199	211	221	har-vest	har-vest	har-vest	har-vest	har-vest	Days after sowing
Height of crop (cm)						Plant height (cm)	Num-ber of flo-wers/spike	% seed-set	Num-ber of grains/spike	Thous-and-grain weight (g)	

Figuur 8. Diploïde en tetraploïde, op *H. vulgare* lijkende nakomelingen uit de kruising *H. bulbosum* (4x) × *H. vulgare* (4x) en controleplanten, gefotografeerd op 204e dag na zaaien. Links: diploïden; rechts: tetraploïden.

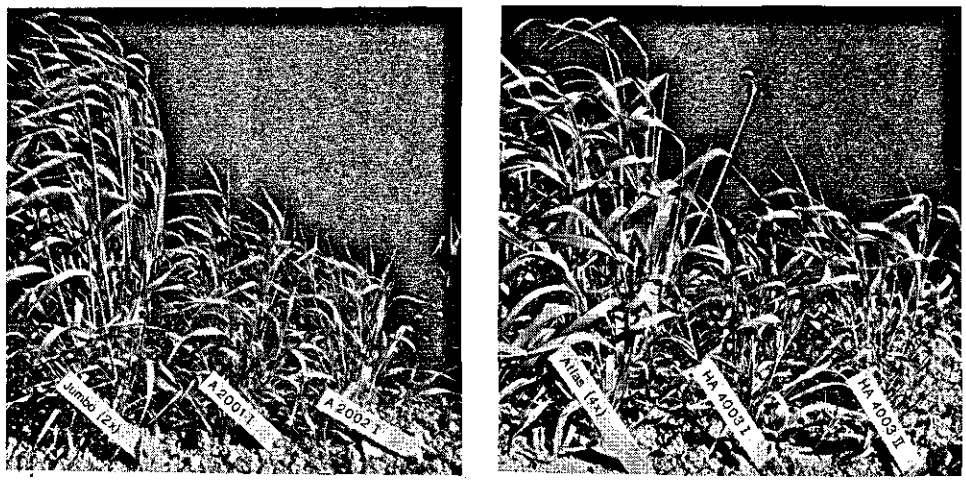


Figure 8. Diploid and tetraploid progeny, resembling *H. vulgare*, of the cross *H. bulbosum* (4x) × *H. vulgare* (4x) and control plants; photographed on 204th day after sowing. Left: diploids; right: tetraploids.

lengte, en wordt tevens veroorzaakt door het feit dat bij de plantlengte de naalden niet zijn meegemeten. Niet alleen in lengte maar ook in ontwikkelingssnelheid bleven de proefplanten achter, hetgeen duidelijk is waargenomen bij onder andere het verschijnen van het vlagblad, het verloop van de bloei en het verloop van de rijping. Tussen de proefnummers waren eveneens verschillen: HA 2003 was bijvoorbeeld iets vroeger dan de overige.

De slechtere ontwikkeling van de HA- en A-nummers vergeleken met de controles kwam wel zeer goed tot uiting in alle kenmerken die bij de oogst zijn geanalyseerd. Zoals reeds werd genoemd waren het aantal aren per plant en de gemiddelde plantlengte aanzienlijk minder. Hetzelfde kan worden gezegd van het aantal pakjes per aar en de zaadzetting, waardoor het aantal korrels per aar eveneens belangrijk minder was. Tenslotte was ook het duizend-korrel-gewicht lager, hoewel soms in mindere mate. Hierdoor varieerde de opbrengst van de proefnummers van de helft tot een kwart van die van de controles, terwijl die van HA 4003 nog lager was.

De nakomelingschappen van de HP- en P-nummers werden alle vergeleken met het ras Atlas. Over het algemeen vertoonden deze proefplanten een grotere overeenkomst met de controleplanten dan bij de HA- en A-nummers het geval was. De kiemsnelheid en het kiempercentage van de diploïde Atlas waren niet groot, hetgeen waarschijnlijk moet worden toegeschreven aan de kwaliteit van het zaaizaad. Veel proefnummers overtroffen in deze eigenschappen de controles, alleen de kiemsnelheid van het zaad uit 1965 was iets lager. Het zichtbaar worden van het tweede

Figuur 9. Diploïde, op *H. vulgare* lijkende nakomelingen uit de kruising *H. vulgare* (4x) × *H. bulbosum* (4x) en controleplanten, gefotografeerd op 204e dag na zaaien.

Figure 9. Diploid progeny, resembling *H. vulgare*, of the cross *H. vulgare* (4x) × *H. bulbosum* (4x) and control plants; photographed on 204th day after sowing.

en derde blad verliep bij de proefnummers even snel als bij Atlas, maar bij het daarop volgende begin van de uitstoeling waren de proefnummers, behoudens P 2001, vijf tot soms tien dagen vroeger dan de controles. Na de koude periode was bij vrijwel alle nakomelingschappen het gemiddeld aantal scheuten per plant in meer of mindere mate groter dan bij Atlas. Wordt het aantal scheuten per plant op de 150e dag vergeleken met het aantal aren per plant, dan blijkt dat Atlas meer aren heeft gevormd dan er scheuten waren op de 150e dag, terwijl de HP- en P-nummers, behoudens enkele uitzonderingen, óf ongeveer evenveel óf minder aren hadden dan er scheuten waren op de 150e dag. Het valt hierbij op dat de proefplanten van de eerste generatie zich iets anders gedroegen dan die van de tweede en de derde generatie.

De ontwikkeling van de proefnummers na de uitplant op het veld was, behoudens het hierboven genoemde verschil in aantal aarvormende scheuten per plant, ongeveer gelijk aan die van de controles (figuur 9). Sommige proefnummers waren iets trager bij het schieten en het in aar komen, maar de bloei begon bij alle gelijktijdig en op hetzelfde moment als bij de controles. Ook de korrelvulling en de afrijping verliep bij de proefnummers en de controles op overeenkomstige wijze. Bij de oogst bleek dat de proefplanten meestal iets minder pakjes per aar hadden dan de controleplanten maar de zaadzetting was procentueel ongeveer even groot, zodat het aantal korrels per aar ook iets minder was dan in de controles. Het duizend-korrel-gewicht lag voor alle objecten in dezelfde orde van grootte of voor de proefplanten iets lager, zodat de opbrengst van de meeste proefplanten uiteindelijk lager was dan van de controle. De nakomelingen van HP 2005 vormden een gunstige uitzondering, vooral HP 2005 II evenaarde de controle.

Uit dit experiment kan worden geconcludeerd dat de nakomelingen van de nummers HA, A, HP en P in vele opzichten min of meer van gerst verschillen, ondanks een sterke morfologische gelijkenis met de gerstrassen waar ze het meest op

zouden moeten lijken volgens de hypothese die een verklaring geeft voor hun herkomst. Het is duidelijk gebleken dat de nakomelingen, die zijn verkregen uit kruisingen of hybriden waarvan *H. bulbosum* de moederplant was, veel sterkere afwijkingen vertoonden dan de nakomelingen waarvan *H. vulgare* in de oorspronkelijke kruising de moederplant was. Het ligt voor de hand te veronderstellen dat hier sprake is van een cytoplasmatische invloed; een invloed die gedeeltelijk ook in latere generaties gehandhaafd blijft, hoewel de tweede en de derde generatie van de HA- en A-nummers veelal een betere uitstoeling en een sterkere vegetatieve ontwikkeling hadden dan de eerste generatie. Dit verschijnsel kan echter een gevolg zijn geweest van slechtere kwaliteit van het zaaizaad uit 1965 ten opzichte van dat van de latere jaren, hetgeen dan heeft geresulteerd in een slechtere begin-ontwikkeling van de planten.

Naast de plasmatische invloed moet echter nog een ander effect in het spel zijn dat verantwoordelijk is voor de verschillen tussen de HP- en P-nummers enerzijds en Atlas (2x) anderzijds. Deze verschillen betreffen vooral het uitstoelen en de daarop volgende aarontwikkeling, alsmede de grootte van de aren, en het is niet onaannemelijk dat dit effect ook bijdraagt tot de verschillen tussen de HA- en A-nummers en hun controles. Uit dit experiment valt niet te concluderen wat de aard van het effect is, evenmin is het eenvoudig een verklaring te geven voor het optreden van het effect. De veronderstelling dat genetisch materiaal van *H. bulbosum* zou zijn overgegaan in deze nakomelingen lijkt onwaarschijnlijk, omdat het dan wel zeer verwonderlijk is dat in alle nakomelingen hetzelfde of overeenkomstig materiaal moet zijn overgegaan, want er zijn nooit eigenschappen waargenomen die duiden op enige genetische vermenging met *H. bulbosum*. Het zou mogelijk kunnen zijn dat *H. bulbosum* tijdens of kort na de bevruchting van de originele kruising een invloed heeft uitgeoefend op het cytoplasma van de nakomeling, hoewel dit, vooral voor de P-nummers, nogal onwaarschijnlijk lijkt. Een laatste mogelijkheid zou zijn dat in de tijd die is verstreken tussen het tetraploïd maken van de gerst en de uitvoering van dit experiment een genetisch verschil is ontstaan tussen de diploïde en de tetraploïde cytotypen van hetzelfde ras, waardoor gameten uit de tetraploïden in hun genetische opbouw niet meer goed zijn te vergelijken met diploïden.

Embryologische onderzoekingen

Bij de produktie van hybriden uit kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* is het gebruik van embryocultuur noodzakelijk, omdat het hybride embryo meestal in een jong stadium van zijn ontwikkeling aborteert. Hoewel de embryocultuur niet zonder moeilijkheden verloopt, zou de conclusie getrokken kunnen worden dat het embryo geen actieve rol speelt bij de abortie, vooral daar de moeilijkheden bij de embryocultuur veelal kunnen worden toegeschreven aan voor deze techniek specifieke onvolkomenheden. De oorzaak van de abortie zou dan buiten het embryo moeten worden gezocht. In de literatuur over analoge situaties bij verschillende typen kruisingen worden sterke afwijkingen in de ontwikkeling van het endosperm beschreven, die veelal voldoende aanwijzingen verschaffen voor de hypothese dat het endosperm niet in staat is zodanig te functioneren dat een normaal embryo ontstaat.

Teneinde te onderzoeken of deze hypothese van toepassing is op de soortkruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* zijn drie kruisingscombinaties bestudeerd. Na de bespreking van de literatuur zullen de resultaten van dit onderzoek worden vermeld. De ontwikkeling van de gehele caryopsis is bestudeerd, waarbij de drie kruisingscombinaties zijn vergeleken met een intraraskruising van *H. vulgare*. Enige gegevens over de bouw van het embryo in rijp zaad van gerst zijn afkomstig van onderzoekingen van Slootmaker (pers. med.).

Bespreking van de literatuur

Bij kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* is de ontwikkeling van embryo, endosperm en omliggende weefsels nooit in detail bestudeerd. Dergelijke studies zijn wel aan andere kruisingscombinaties uitgevoerd. De belangrijkste resultaten hiervan zullen kort worden besproken, waarbij alleen aandacht zal worden besteed aan kruisingen binnen de grassenfamilie. Dit naar aanleiding van het feit dat Brink & Cooper (1947) in een overzichtsartikel over de endospermontwikkeling stellen dat de situatie bij de grassen duidelijk anders is dan bij vele andere plantenfamilies: het endosperm is persistent en speelt een belangrijke rol bij de zaadontwikkeling en de kieming, de antipodencellen zijn in vele gevallen voor de rijping van de zaadknop verscheidene malen gedeeld, zodat 15-40 grote, plasmarijke cellen zijn gevormd, welke vermoedelijk een rol spelen bij de eerste zeer snelle ontwikkeling van het endosperm, waarbij ze door secretie bepaalde stoffen afstaan aan het endosperm, en tenslotte zijn veel van de gevonden abnormaliteiten in de ontwik-

keling van het endosperm specifiek voor deze familie.

Verscheidene malen is melding gemaakt van het optreden van abnormaliteiten bij soortkruisingen in de grassenfamilie. Kihara & Nishiyama (1933) bestudeerden de reciproke kruisingen tussen *Avena sativa* (6x = 42) en *A. strigosa* (2x = 14) in vergelijking met beide ouders. De bevruchting en de vroegste ontwikkeling verliep in alle gevallen overeenkomstig, maar al spoedig traden in de soortkruisingen abnormaliteiten op in de ontwikkeling van het endosperm. Dit leidde meestal tot degeneratie van het endosperm met als gevolg dat vrijwel alle zaden aborteerden. De reciproke kruisingen hadden een duidelijk verschillend patroon van ontwikkeling en degeneratie van het endosperm. De verschijnselen zijn door de auteurs verklaard door aan te nemen dat de mannelijke gameten een activerende stimulans uitoefenen op de eicel en de poolkernen, waarbij deze stimulans in de kruising 2x × 6x te sterk en in de kruising 6x × 2x te zwak zou zijn.

Boyes & Thompson (1937) onderzochten de ontwikkeling van embryo en endosperm bij enkele soortkruisingen in het geslacht *Triticum*, waarbij ook verschillen in chromosomenaantallen van de ouders een rol speelden. Er werden allerlei onregelmatigheden gevonden in de ontwikkeling van het endosperm, die echter zelden leidden tot zaadabortie. De ernst van de abnormaliteiten stond niet in verband met de afwijkingen van de verhouding van het aantal genomen van embryo, endosperm en moederplant.

Veel onderzoek is verricht aan de kruising tussen *H. jubatum* (4x = 28) en *Secale cereale* (2x = 14) (Cooper & Brink, 1944; Brink & Cooper, 1944; Brink *et al.*, 1944). De ontwikkeling van het hybride zaad werd vergeleken met die van *H. jubatum* bij zelfbevruchting. Het hybride zaad aborteerde binnen twee weken waarvoor een onregelmatige of volledig gestoorde ontwikkeling van het endosperm de directe oorzaak was. Het is eenmaal gelukt met behulp van embryocultuur een levensvatbare hybride te verkrijgen. De auteurs trokken hieruit de conclusie dat het embryo volkomen normaal was en geen actieve rol speelde bij de abortie. De abnormaliteiten in het endosperm werden verklaard door aan te nemen dat de antipoden niet goed functioneerden; hierdoor werd de secretie geremd en het endosperm abnormaal. Deze hypothese is door Beaudry (1951), een onderzoeker uit de school van Brink en Cooper, bevestigd aan de hand van kruisingen tussen *Elymus virginicus* (4x = 28) en *Agropyron repens* (6x = 42).

Reeds in 1945 presenteerden Thompson & Johnston een andere hypothese ter verklaring van de zaadabortie. Deze onderzoekers bestudeerden de kruising tussen *H. vulgare* (2x) en *S. cereale* (2x) en vonden geen duidelijk verschil tussen de ontwikkeling van de antipoden in het normale en die in het hybride zaad. De oorzaak van de gevonden abnormaliteiten in het endosperm werd door deze onderzoekers geheel in het endosperm gesitueerd.

Odenbach (1965) heeft eveneens kruisingen tussen *H. vulgare* en *S. cereale* bestudeerd en daarbij veel aandacht besteed aan de antipoden en het endosperm. De bevruchting verliep normaal evenals de vroegste ontwikkeling, maar na twee dagen was de groei van het hybride endosperm vertraagd en traden de eerste

onregelmatigheden op. Er zijn veel typen abnormaliteiten beschreven: onder andere reuzekernen, welke zouden ontstaan door een aan de spiralisatiecyclus gekoppelde endomitose. Er was een duidelijke invloed van de uitwendige omstandigheden op de delingsfrequentie in het endosperm en op het percentage reuzekernen. Het endosperm werd nooit cellulair en het zaad aborteerde binnen twee weken. De antipoden bij de intraraskruisingen van *H. vulgare* en bij de soortkruisingen gedroegen zich overeenkomstig. Er was langzame celvergroting met daarbij allerlei vormen van endomitose, waarvan de endochromocentra het meest opvallend waren. Deze zijn waarschijnlijk ontstaan doordat de chromosomen zich vele malen deelden maar bij het centromeer gepaard bleven. Zeer zelden trad kern- of celdeling op in de antipoden. Bij de soortkruisingen bleven de antipoden iets langer intact. Als oorzaak van de gestoorde ontwikkeling noemt Odenbach een verstoring van het DNA-metabolisme. De genomenverhoudingen zouden geen rol spelen, er wordt meer gedacht aan specifieke kruisbaarheidsbelemmerende genen.

Het onderzoek van Reusch (1959 a, b en c) betrof soortkruisingen tussen *Lolium perenne* (2x = 14) en *Festuca pratensis* (2x = 14). Werd *F. pratensis* gebruikt als moederplant dan was het resultaat steeds slecht; de reciproke kruising had in het algemeen een beter resultaat, waarbij een invloed van de gebruikte ouderplanten op het resultaat van de kruisingen is gevonden. Deze invloed kwam het eerst tot uiting in het tijdstip waarop de eerste abnormaliteiten in het endosperm werden waargenomen. Bij *F. pratensis* × *L. perenne* waren er meestal afwijkingen in de endospermmitose, er was nooit celvorming en in de buurt van de antipoden werden reuzekernen gevormd. De onregelmatigheden namen toe met de tijd en het uiteindelijke resultaat was een volledige abortie. Bij de kruising *L. perenne* × *F. pratensis* vond de celvorming in het endosperm vroeger plaats dan normaal, terwijl later allerlei abnormaliteiten in de kernen ontstonden en de groei sterk werd vertraagd. Bij sommige oudercombinaties werden enige levensvatbare zaden gevormd. Er was een duidelijke invloed van de uitwendige omstandigheden op de kwaliteit van het zaad; vooral een hoge temperatuur leek een gunstige invloed te hebben op de mate van endospermontwikkeling. De ontwikkeling van het embryo was steeds gecorreleerd met de ontwikkeling van het endosperm. Reusch schreef de directe oorzaak van de slechte zaadontwikkeling toe aan het endosperm, waarbij het tijdstip van celvorming van belang was voor de uiteindelijke hoeveelheid endosperm. In het ene geval was het endosperm vóór de celvorming al zo abnormaal dat het niet in staat was cellen te vormen, terwijl bij de reciproke kruising de celvorming te vroeg kwam, waardoor uiteindelijk minder endosperm werd gevormd. De verschillen tussen de oudercombinaties zijn door Reusch verklaard door aan ieder genotype een bepaalde 'genetische waarde' toe te kennen, waarbij dan niet de genomenverhoudingen maar de verhoudingen tussen de genetische waarden van de genomen van belang zouden zijn. Afwijkende verhoudingen zouden een disharmonie tussen de kern en het cytoplasma veroorzaken die zich manifesteerde in een verstoord DNA-metabolisme, met als gevolg een abnormale ontwikkeling van het endosperm.

Het is opvallend dat in de grassenfamilie abnormaliteiten in de endospermontwikkeling zijn beschreven die sterk lijken op de bovengenoemde onregelmatigheden maar die voorkomen bij bepaalde kruisingen binnen een soort. Zo beschreef Landes (1939) de ontwikkeling van embryo en endosperm na gedwongen zelfbevruchting bij *S. cereale*. Naast een groot aantal onbevruchte embryozakken, die het gevolg waren van de auto-incompatibiliteit van deze soort, werden bevruchte embryozakken gevonden, waarin het embryo echter aborteerde als gevolg van een abnormale ontwikkeling van het endosperm. Bij kruisingen tussen diploïde en tetraploïde cytotypen van een soort is eveneens abortie als gevolg van onregelmatigheden in het endosperm gevonden. Dergelijke kruisingen zijn beschreven voor *S. cereale* (Håkansson & Ellerström, 1950), voor *Zea mays* (Cooper, 1951) en voor *H. vulgare* (Håkansson, 1953). Alle auteurs vermeldden verschillen tussen de reciproke kruisingen, terwijl ook tussen de drie genoemde soorten verschillen zijn gevonden, waarbij vooral in *Zea mays* de abnormaliteiten een ander karakter hadden dan in de overige soorten: onder andere met relatief weinig gestoorde kerndelingen in het endosperm. In vrijwel alle gevallen leidden de abnormaliteiten tot zaadabortie. De oorzaak van de verschijnselen wordt hoofdzakelijk gezocht in de gewijzigde genomenverhoudingen.

Merry (1941) bestudeerde de normale ontwikkeling van het embryo van gerst, dat wil zeggen bij zelfbevruchting. De delingen verliepen, met uitzondering van de eerste twee, niet volgens een bepaald patroon, hoewel de uitwendige vorm van het embryo zich steeds weer op dezelfde wijze ontwikkelde. Gedurende de eerste zeven dagen na de bevruchting vond geen orgaandifferentiatie plaats, hoewel de cellen zeer actief deelden waardoor het pro-embryo een lengte kreeg van ongeveer 300 μm. De cellen in het bovenste deel van het pro-embryo deelden sneller en bleven kleiner. Op de achtste dag werd een insnoering gevormd die aangaf waar het vegetatiepunt zou komen. Het deel erboven groeide uit tot coleoptiel en scutellum. Twee dagen later was het begin van de primaire kiemwortel gedifferentieerd, en nog drie dagen later werd de grenshoek tussen het scutellum en de coleorrhiza zichtbaar. In dezelfde tijd was het begin van het embryonale vaatsysteem gevormd. Op de vijftiende dag was het coleoptiel gesloten rondom het zich ontwikkelende spruitaanlegsel. Er werden enkele bladeren aangelegd evenals enkele zijspruitaanlegsels en kiemwortels. De dorsale zijde van het scutellum differentieerde tot een epiteellaag die actief is bij het opnemen van voedsel uit het endosperm.

Suetsugu (1951) bestudeerde eveneens de volledige ontwikkeling van het embryo van twee gerstrassen, beide bij zelfbevruchting. De gebeurtenissen vonden plaats volgens dezelfde volgorde als werd beschreven door Merry (1941); er waren kleine verschillen in het tijdschema, waarschijnlijk berustend op genetische verschillen tussen de rassen en op verschillen in uitwendige omstandigheden.

Materiaal en methoden

Al het materiaal voor dit onderzoek is afkomstig van kunstmatige bestuivingen, teneinde variatie in het tijdstip van de bevruchting zo gering mogelijk te doen zijn. De volgende kruisingscombinaties zijn uitgevoerd:

Proctor (2x) × Proctor (2x) 1963
Balder (2x) × Balder (2x) 1964
Proctor (2x) × *H. bulbosum* (2x) 1963 (en 1964)
Proctor (2x) × *H. bulbosum* (4x) 1964
Balder (4x) × *H. bulbosum* (4x) 1965

Met het ras Proctor zijn grote series kruisingen uitgevoerd. Dit ras is gekozen omdat het een relatief goede zaadzetting vertoonde. De kruisingsseries met het ras Balder zijn kleiner; er is geen controle-serie van Balder (4x) uitgevoerd omdat volgens Håkansson (1953) de ontwikkeling bij diploïde en tetraploïde cytotypen van hetzelfde ras min of meer gelijk is. Voor de bestuiving is meestal een pollenmengsel gebruikt dat, voor zover het *H. bulbosum* betrof was samengesteld uit stuifmeel van een groot aantal planten van verschillende herkomsten. Alleen bij de 4x × 4x kruisingen zijn steeds pollen van één kloon van *H. bulbosum* gebruikt.

Gedurende de eerste 14 dagen na de bestuiving zijn dagelijks kruisingsaren gefixeerd en vervolgens op 16, 19, 23, 28, 34 en 40 dagen na de bestuiving. De fixatie werd uitgevoerd in F.P.A. (formaline (40 %): propionzuur (99 %): ethylalcohol (70 %) = 1 : 1 : 18), gedurende tenminste 24 uur. Daarna is tweemaal gespoeld met alcohol (70 %). Ten behoeve van squashpreparaten zijn aren gefixeerd in een mengsel van drie delen alcohol (96 %) en één deel ijsazijn.

Voor de verdere bewerking zijn zaden die een duidelijke ontwikkeling te zien gaven uit de aren geprepareerd. Ten behoeve van het snijden met het microtoom zijn de zaden via tertiaire butylalcohol ingebed in paraffine (smeltpunt 52°C). Daarna zijn ze gesneden op een dikte van 10 of 12 μm en soms bij de oudere stadia nog iets dikker. Meestal zijn longitudinale coupes gemaakt gemaakt met het snijvlak evenwijdig aan het dorsi-ventrale mediaanvlak. De linten zijn met eiwitglycerine op objectglazen geplakt en daarna met Haidenhain's hematoxiline gekleurd. De preparaten zijn ingesloten met een kunsthars 'Rhenohistol'. Per object, dat wil zeggen per kruising per dag, zijn gemiddeld vier caryopses bestudeerd; over het algemeen van de jonge stadia iets meer en van de oudere stadia iets minder. Voor de squashpreparaten zijn de zaden na de fixatie gedurende 6 minuten gehydrolyseerd in 1 *N* HCl bij 60°C, daarna gekleurd met basische fuchsine volgens Feulgen en gesquashed in azijnzuur (45 %). De squashpreparaten zijn voornamelijk gebruikt voor de bestudering van dezelfde verschijnselen die in de microtoompreparaten reeds waren gevonden, daarnaast zijn tellingen van chromosomenaantallen meestal in de squashpreparaten verricht. Het aantal squashpreparaten was beperkt en de resultaten van de bestudering van deze preparaten verschilden niet wezenlijk van die van de microtoompreparaten, zodat bij de beschrijvingen niet

zal worden vermeld in welk soort preparaten de verschijnselen zijn bestudeerd.

Bouw van het onbevruchte vruchtbeginsel van H. vulgare (2x)

De zaadknop van *H. vulgare* is anatroop en zijdelings met de placenta vergroeid (figuur 10). Onderin de volgroeide embryozak bevindt zich de eicel, geflankeerd door twee synergiden. Direct erboven is de secundaire embryozakkern met eromheen een weinig cytoplasma, dat een dunne laag rond de eicel, de synergiden en de secundaire embryozakkern vormt en dan verder in een dunne sliert uitloopt tot aan de antipoden. De antipoden bestaan uit ongeveer 40 grote cellen met dicht cytoplasma en meestal één of meer vacuolen per cel. De cellen liggen dicht aaneen bovenin de embryozak aan de kant van de chalaza; ze hebben één grote kern waarin soms aanwijzingen zijn waar te nemen van endomitose en er zijn meestal 1-3 nucleoli per kern. Het nucellusweefsel bestaat uit parenchymatische cellen, waarvan de buitenste, tegen het integument gelegen cellen duidelijk als laag zijn gerangschikt, terwijl de daarbinnen gelegen cellen min of meer willekeurig door elkaar liggen. Vooral boven- en onderin de zaadknop is vrij veel nucellusweefsel te vinden. De integumenten, die vanuit de chalaza beginnen, zijn beide twee cellagen dik. Het buitenste integument is korter dan het binnenste zodat de micropile slechts door het laatste wordt gevormd. Tussen de integumenten en de vruchtwand is een nauwe ruimte waardoor de pollenbuizen naar beneden groeien. De vruchtwand is aan de binnenzijde begrensd door twee cellagen zogenaamde dwarsgerichte cellen en aan de buitenzijde door een epidermis. In de vruchtwand ontwikkelt zich een vaatbundel, welke ongeveer tot aan de placenta reikt.

Figuur 10. Links: onbevrucht zaadbeginsel van *H. vulgare* (2x) ras Proctor (60 ×). Rechts: kerndeling in zygote van *H. vulgare* (2x), één dag na de bestuiving (700 ×).

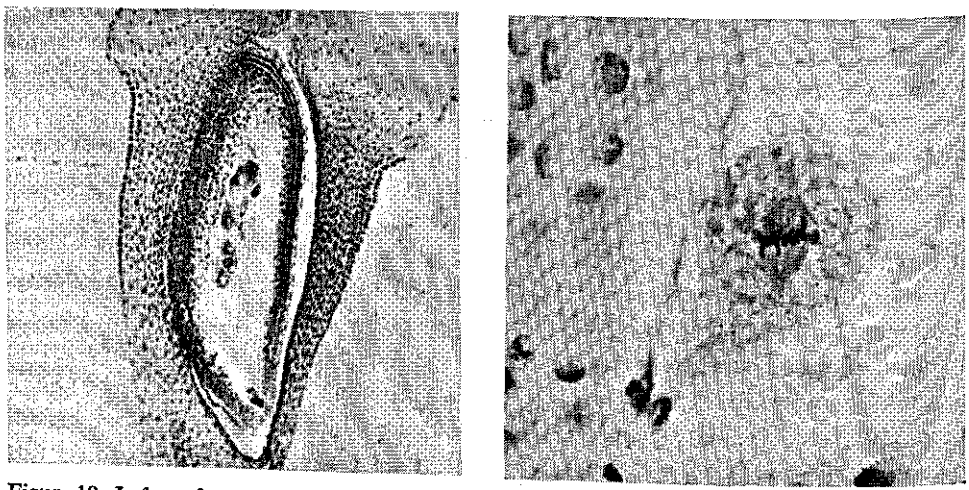


Figure 10. Left: unfertilized caryopsis of *H. vulgare* (2x) variety Proctor (× 60). Right: division of nucleus in zygote of *H. vulgare* (2x), the day after pollination (× 700).

Met uitzondering van de antipoden vertonen de rassen Proctor en Balder in alle opzichten veel overeenkomst. De antipoden bij Balder zijn minder in aantal, meer variabel in grootte en hebben een meer hangende apicale positie. Bijna steeds worden bij Balder enkele antipoden gevonden met twee of zelden drie kernen.

Ontwikkeling van de caryopsis van H. vulgare (2x) bij intraraskruising

De bevruchting heeft steeds binnen 24 uur na de bestuiving plaatsgevonden, hetgeen voornamelijk aan het embryo en het endosperm was te zien. De verschillende onderdelen van de caryopsis zullen nu afzonderlijk worden besproken. Bij deze bespreking zal, evenals bij de besprekingen van de soortkruisingen een tijdsaanduiding in dagen worden gehanteerd, waarbij steeds is bedoeld het aantal dagen na de bestuiving.

Het embryo

De ontwikkeling van het embryo is schematisch weergegeven in figuur 11. Eén dag na de bestuiving heeft in bijna alle pro-embryo's de eerste deling plaatsgevonden (figuur 10). De delingswand verloopt dwars of iets schuin, de bovenste cel is groter en min of meer bolvormig. De beide cellen gaan door met delen waardoor het aantal cellen toeneemt; de cellen worden echter steeds kleiner, zodat gedurende de eerste vier dagen de afmetingen van het pro-embryo relatief weinig toenemen. Het pro-embryo groeit daarna snel uit tot een bol-peervormig lichaam, waarbij het bovenste deel ondanks de veel kleinere cellen, door een aanzienlijk grotere delingsactiviteit sneller ontwikkelt. De kernen hebben één tot drie of zelden vier nucleoli. Na vier à vijf dagen worden in de cellen in het onderste deel vacuolen gevormd.

Op de zevende dag, bij een embryolengte van ruim 300 μm wordt de eerste morfologische differentiatie zichtbaar (figuur 12). Een insnoering aan de ventrale zijde van het embryo geeft de grens aan tussen het vegetatiepunt en het erboven gelegen coleoptiel en scutellum. De aanleg van de primaire kiemwortel wordt op de achtste dag zichtbaar. Door het gehele embryo komen nu cellen voor met vacuolen. In het basale deel zijn de cellen groot met grote vacuolen en in de meristemen zijn de cellen klein met een vrij dicht cytoplasma en vrijwel zonder vacuolen.

Het embryo groeit nu snel en krijgt al min of meer zijn definitieve vorm. Het coleoptiel groeit als een kapje over het vegetatiepunt en op de twaalfde dag is het gesloten. In het spruitaanlegsel zijn dan het eerste en tweede bladprimordium gevormd. Te zelfder tijd zijn de tweede en derde kiemwortel aangelegd, waarbij steeds één à twee dagen na de eerste aanleg ook het wortelmutsje zichtbaar wordt. De coleorrhiza groeit sterk uit, met grote en gevacuoliseerde cellen. Voorts wordt het embryonale vaatsysteem aangelegd met vertakkingen naar de verschillende

0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
14
16
19
±70

Figuur 11. Schema van de ontwikkeling van het embryo van *H. vulgare* (2x) ras Proctor bij intraraskruising. Cijfers staan voor dagen na de bestuiving (0-7 : 200 ×; 8-11 : 75 × 12 - ± 70 : 33 ×).

Figure 11. Scheme of development of the embryo of *H. vulgare* (2x) variety Proctor after intravarietal crossing. Numerals refer to days after pollination (0-7 × 200; 8-11 × 75 and 12-about 70 × 33).

onderdelen van het spruitaanlegsel, de wortels en het scutellum.

Ongeveer 14 dagen na de bestuiving wordt het eerste zijspruitaanlegsel gevormd. Aan de dorsale zijde van het nu sterk uitgegroeide scutellum wordt de epiteellaag gevormd als een pallisade-achtige laag die het resultaat is van een grote delingsactiviteit (figuur 13). Het tegen deze laag liggende endosperm is reeds verbruikt voor de ontwikkeling van het embryo. De snelle groei neemt nu langzaam af, maar de orgaanvorming gaat nog door. Vooral het kiempje en de wortelaanlegsels worden groter zodat in het volgroeide embryo zeker de helft van het volume door deze organen wordt ingenomen. Boven het coleoptiel vormt het scutellum aan de ventrale zijde nog een rib: een klein kapvormig uitgroeisel (figuur 14). Het kiempje in het volgroeide embryo heeft vier bladaanlegsels en drie, zelden vier zijspruitaanlegsels, terwijl er acht wortelaanlegsels zijn. In de cellen van het

Figuur 12. Mediane doorsneden van embryo's, 7 dagen na de bestuiving. 1. VV × VV (250 ×); 2. VV × BB (500 ×); 3. VV × BBBB (500 ×); 4. VVVV × BBBB (500 ×).

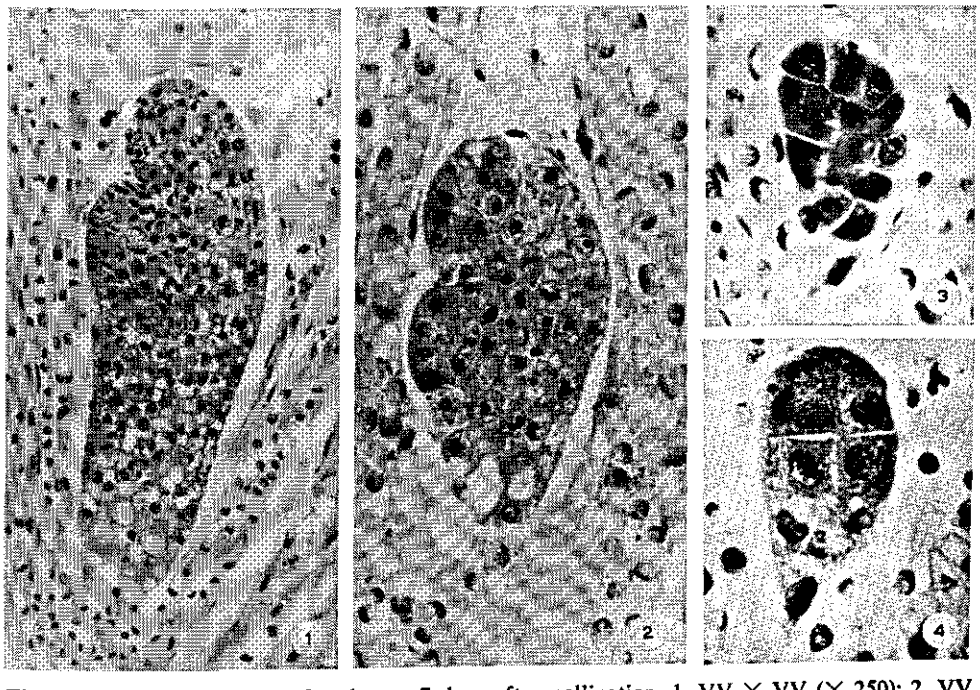


Figure 12. Median sections of embryos, 7 days after pollination. 1. VV × VV (× 250); 2. VV × BB (× 500); 3. VV × BBBB (× 500); 4. VVVV × BBBB (× 500).

Figuur 13. Mediane doorsneden van embryo's, 14 dagen na de bestuiving. 1. VV × VV (35 ×); 2. VV × BB (200 ×); 3. VV × BBBB (200 ×); 4. VVVV × BBBB (200 ×).

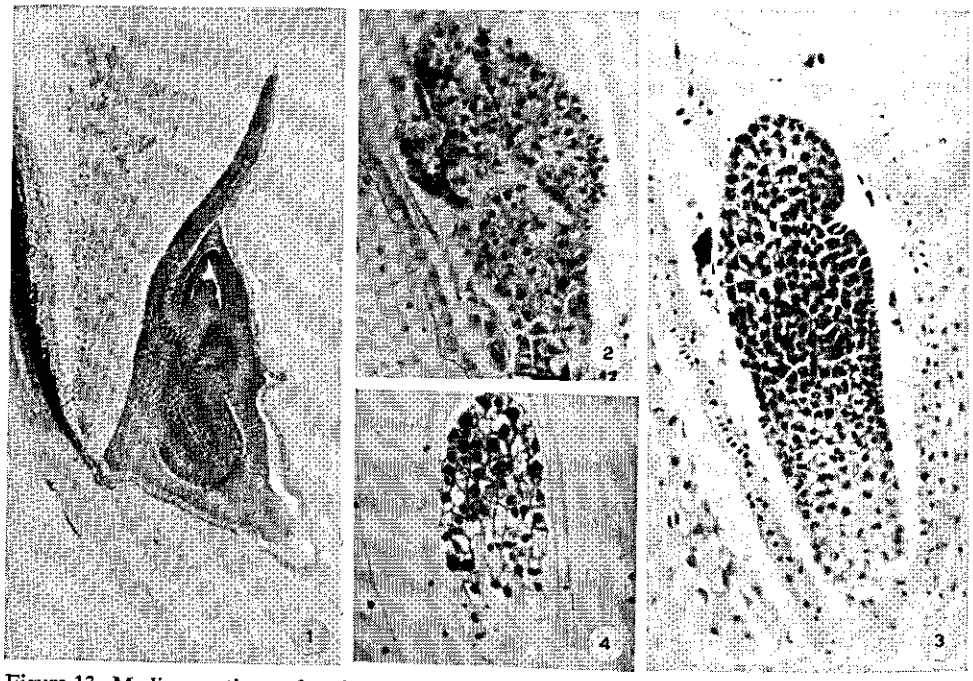


Figure 13. Median sections of embryos, 14 days after pollination. 1. VV × VV (× 35); 2. VV × BB (× 200); 3. VV × BBBB (× 200); 4. VVVV × BBBB (× 200).

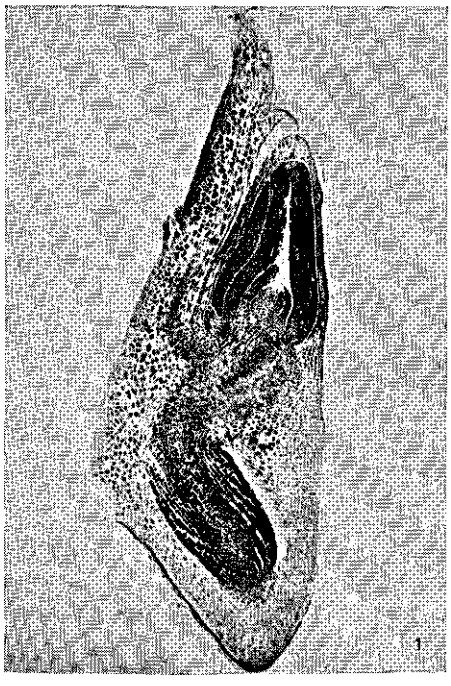
bovenste deel van het scutellum worden korrelige insluitsels gevonden.

Het embryo bij Balder vertoont in principe dezelfde ontwikkeling als hierboven is beschreven voor Proctor, alleen wat trager. Vooral in het begin van de ontwikkeling bestaat in beide rassen een overeenkomstige correlatie tussen embryolengte en mate van differentiatie. Het volgroeide embryo is bij Balder echter ongeveer 500 μm korter dan bij Proctor, waarbij de orgaandifferentiatie min of meer gelijk is. Bij Balder heeft, in tegenstelling tot Proctor het pro-embryo veelal slechts één grote nucleolus per kern, hetgeen waarschijnlijk wordt veroorzaakt door fusie van nucleoli; in latere ontwikkelingsstadia zijn de nucleoli bij de beide rassen overeenkomstig.

Het endosperm

De delingen in het endosperm komen zeer snel op gang en verlopen de eerste twee dagen synchroon (figuur 15). Na één dag zijn er acht of zestien kernen, de volgende dag is het aantal kernen al niet meer exact te tellen: het zijn er meer dan driehonderd. De kernen liggen vrij in het cytoplasma dat voornamelijk langs de wand van de embryozak is gesitueerd. Rond en boven het pro-embryo is het cytoplasma dichter en het basale deel van de embryozak is er gedeeltelijk mee

Figuur 14. Mediane doorsneden van embryo's (25 ×). 1. volgroeid embryo van *H. vulgare* (2x) ras Proctor; 2. VV × BBBB, 23 dagen na de bestuiving.



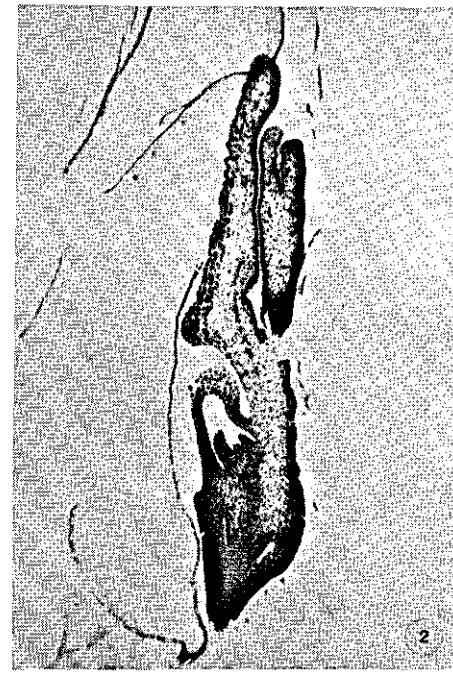


Figure 14. Median sections of embryos (× 25). 1. Full-grown embryo of *H. vulgare* (2x) variety Proctor; 2. VV × BBBB, 23 days after pollination.

gevuld. De kernen hebben 1-5 (zelden 6) nucleoli.

Op de derde dag begint het endosperm van onder uit cellulair te worden; de delingssynchronisatie gaat verloren. Het aantal kernen en de hoeveelheid cytoplasma nemen nog sterk toe waarbij de laag cytoplasma tegen de ventrale wand van de embryozak dikker is en meer kernen bevat. In het cytoplasma komen vacuolen voor. De vierde dag is het gehele endosperm cellulair, terwijl de beschikbare ruimte nog niet geheel is gevuld. Rond iedere kern wordt een cel gevormd, zodanig dat aan de dorsale zijde een één cel dikke laag ontstaat, terwijl langs de ventrale zijde verscheidene lagen kleinere cellen met een dichter cytoplasma worden gevormd. Veel cellen hebben vacuolen behalve die boven het pro-embryo.

De verdere groei geschiedt door celdeling, waarbij de cellen boven het pro-embryo groot zijn met een dicht cytoplasma en de cellen bij de placenta klein blijven, eveneens met dicht cytoplasma, terwijl de overige cellen groot zijn en in sterke mate gevacuoliseerd. Na ongeveer zeven dagen is de beschikbare ruimte gevuld en begint van het midden uit de vorming van zetmeelkorrels op gang te komen. De cellen boven het embryo worden dan reeds platgedrukt en gedeeltelijk opgelost ten behoeve van het embryo.

Na negen dagen zijn grote delen van het endosperm gedifferentieerd tot opslag-

Figuur 15. Verschillende stadia in endospermontwikkeling. 1. synchrone kerndeling in endosperm van *H. vulgare* (2x) ras Proctor bij intraraskruising, 2 dagen na de bestuiving (600 ×). 2. endosperm- en zetmeelvorming van *H. vulgare* (2x) ras Balder bij intraraskruising, 11 dagen na de bestuiving (170 ×).

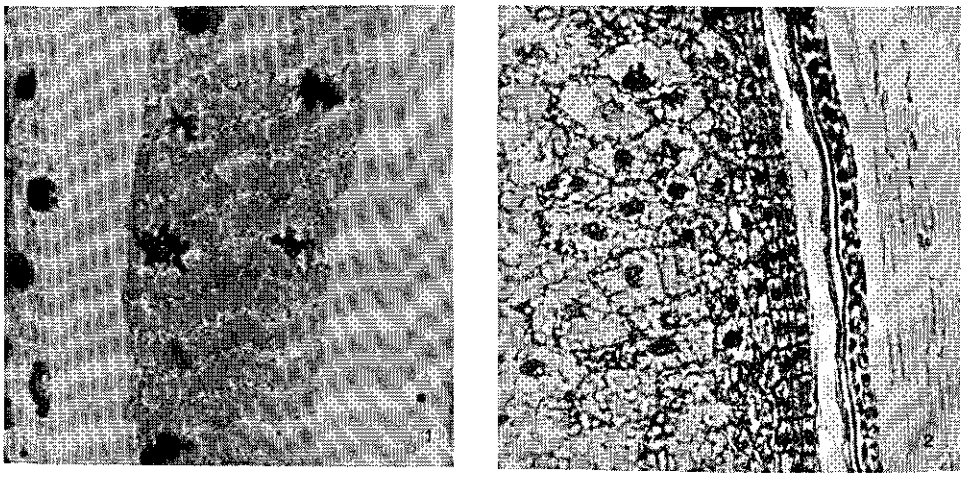


Figure 15. Different stages in endosperm development. 1. Synchronized division of nuclei in endosperm of *H. vulgare* (2x) variety Proctor after intravarietal crossing, 2 days after pollination (× 600). 2. Formation of endosperm and starch of *H. vulgare* (2x) variety Balder after intravarietal crossing, 11 days after pollination (× 170).

weefsel en gevuld met zetmeel. Langs de dorsale en laterale wanden is een soort cambium gevormd dat naar binnen toe cellen vormt. Zeer fraai zijn de overgangen tussen pas gedeelde cellen en met zetmeel gevulde cellen te zien (figuur 15). De delingsactiviteit van het cambium gaat door tot ongeveer de dertiende dag, waarna de buitenste cellagen zich gaan differentiëren tot aleuronlaag. De kleine cellen bij de placenta gaan geleidelijk desintegreren en boven het embryo zijn al veel cellen verbruikt, waarvan de resten als een heldere laag tegen het scutellum liggen. Na deze tijd lijkt de volumetoename van het endospermlichaam slechts door celvergroting tot stand te komen.

Het endosperm vertoont, evenals het embryo, bij Balder een vertraagde ontwikkeling in vergelijking met Proctor. Eveneens zijn aanvankelijk bij Balder per kern minder en grotere nucleoli aanwezig. Het uiteindelijke resultaat is echter geheel hetzelfde.

De antipoden

De antipoden worden vooral gedurende de tweede en derde dag groter en ook langgerekter in longitudinale richting. De vacuolisatie neemt toe en de aanvankelijk kleine vacuolen veranderen in één zeer grote vacuole per cel. In de kernen zijn vaak duidelijke aanwijzingen voor endomitose te vinden, veelal in de vorm van endochromocentra (figuur 16). De nucleoli zijn wisselend van grootte,

Figuur 16. Twee antipodencellen van *H. vulgare* (2x) ras Balder, de rechter cel heeft kern met endochromocentra (1200 ×).

Figure 16. Two antipodal cells of *H. vulgare* (2x) variety Balder, the cell to the right has a nucleus with endochromocentres (× 1200).

veelal wat onregelmatig van vorm, niet bolvormig en hebben soms vacuolen, hetgeen een eerste teken van degeneratie is. Vanaf de derde dag gaat de kerninhoud desintegreren, waarbij eerst een korrelige structuur ontstaat en later een vervloeiing. De nucleoli blijven vaak lang zichtbaar. Op de vierde dag zijn de cellen al platgedrukt tussen placenta en endosperm, terwijl de celinhoud nu ook gaat desintegreren. Binnen zeven dagen zijn de antipodencellen vrijwel geheel verdwenen, hetgeen zowel voor Proctor als voor Balder geldt.

Het moederlijke weefsel

Dit weefsel bestaat uit twee onderdelen: de zaadhuid en de vruchtwand. Het eerste onderdeel is samengesteld uit de nucellus en de integumenten, terwijl de verbinding tussen de vruchtwand en de nucellus tot stand komt via de placenta. Vooral na de eerste dag vertoont het moederlijke weefsel een zeer sterke groei. De lengte van de nucellus neemt van 0,6 mm in de onbevruchte zaadknop toe tot ruim 7 mm op acht à negen dagen na de bestuiving. Daarna wordt de lengte nog maar langzaam iets groter. Van de nucellus doet alleen de buitenste cellaag mee aan deze groei, eerst door celdeling en later door celstrekking. De binnen deze laag gelegen cellen desintegreren en verdwijnen gedurende de eerste vier dagen. In een later stadium desintegreert ook de buitenste laag vrijwel geheel, echter pas nadat aan de buitenzijde een cuticula is gevormd.

Het buitenste integument is na twee dagen vrijwel platgedrukt en al gedeeltelijk verdwenen. Het binnenste integument groeit evenals de nucellus eerst door celdeling en later door celstrekking. Na vijf tot zeven dagen wordt aan de buitenzijde van het integument een zeer duidelijke cuticula aangelegd. De cellen worden platgedrukt en vanaf tien dagen na de bestuiving gevuld met een sterk gekleurde korrelige massa. Later vervloeien deze korrels tot een bruine egale massa terwijl de cellen tussen de cuticulae desintegreren, waarbij een stevige laag wordt gevormd.

De placenta groeit voornamelijk door zeer actieve celdeling. De cellen zijn klein en plasmarijk en liggen zonder regelmaat door elkaar. Vanaf de vierde dag gaan de cellen van binnen uit geleidelijk desintegreren hoewel de delingsactiviteit in het meer naar buiten gelegen weefsel nog enige dagen doorgaat. Iets later dan in het integument wordt in de buitenste lagen van de placenta eveneens een sterk gekleurde korrelige massa gevormd, die aansluit bij het integument en die zich verder volgens hetzelfde patroon ontwikkelt. De binnen deze laag gelegen cellen gaan, voor zover ze nog niet zijn verdwenen, geheel vervagen als de vervloeiing in de buitenste laag een feit is geworden. Dit vervagen is waarschijnlijk het oplossen van de celinhoud, waarna de celwanden worden opgenomen in een heldere, iets bruin of geel gekleurde massa die in de cellen wordt afgezet. De cellen worden daarbij nogal platgedrukt.

De vruchtwand groeit voornamelijk door celvergroting, behalve de dwarsgerichte cellen en het gebied achter de placenta, waarin de vaatbundel zich ontwikkelt. De overige onderdelen vervagen, schilferen af of worden platgedrukt en opgenomen in de stevige laag. De dwarsgerichte cellen hebben aanvankelijk een grote delingsactiviteit. De cellen zijn plasmarijk met soms een iets korrelige inhoud. Na ongeveer zeven dagen vormen de cellen sclerenchymatisch verdikte wanden (figuur 17). Enige dagen later gaat de celinhoud vervagen, de dikke wanden worden opgenomen in de stevige laag en vormen als het ware een uitwendige versteviging. De vaatbundel vertoont eveneens in de beginperiode de snelste ontwikkeling. Na ongeveer zeven dagen is het hoogste punt bereikt, dat is bijna aan de bovengrens

Figuur 17. Dwarsgerichte cellen (links) en zaadhuid en endosperm (rechts) (750 ×). 1. VV × VV, 8 dagen na de bestuiving, cellen zonder insluitsels; 2. VV × BB, 7 dagen na de bestuiving, cellen met insluitsels.

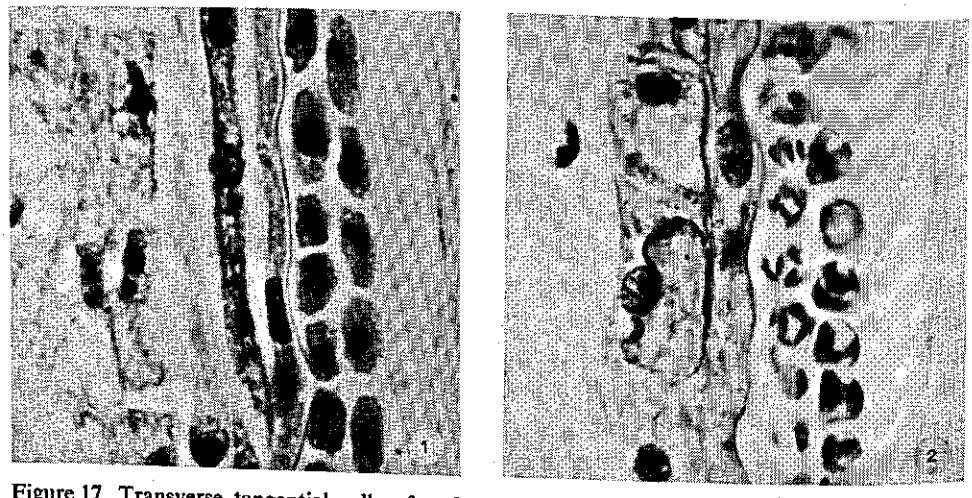


Figure 17. Transverse tangential cells of endocarp (left) and seed coat and endosperm (right) (× 750). 1. VV × VV, 8 days after pollination, cells without inclusions; 2. VV × BB, 7 days after pollination, cells with inclusions.

van de placenta. Daarna worden nog enige vaten aangelegd, zodat de bundel dikker wordt, totdat de ontwikkeling, samen met die van de omliggende weefsels afzwakt en stopt.

Het moederlijke weefsel ontwikkelt zich bij Balder op gelijke wijze, alleen wederom vertraagd. De dwarsgerichte cellen zijn minder uitgesproken en hun wanden zijn niet zo sterk verdikt.

Ontwikkeling van de caryopsis bij H. vulgare (2x) × H. bulbosum (2x) - VV × BB

Bij deze beschrijving zal verscheidene malen een vergelijking worden gemaakt met de intraraskruising. In tegenstelling tot deze laatste kruising is het echter niet mogelijk een vastomlijnd beeld van de ontwikkeling te schetsen, als gevolg van de grote variabiliteit die zich vooral in de latere stadia manifesteert. Er worden grote verschillen gevonden tussen caryopses van dezelfde leeftijd, vooral ten aanzien van de abortie. Daarom heeft deze beschrijving het karakter van een samenvoeging van momentopnamen, waarbij vooral de vrij goed ontwikkelde caryopses bij de beschrijving zijn betrokken.

Het embryo

De vroegste ontwikkeling van het pro-embryo is enigszins vertraagd maar overigens normaal (figuur 18). De eerste deling van de zygote vindt iets meer dan 24 uur na de bestuiving plaats, waarna de delingen elkaar in vrij normaal tempo opvolgen, zodat het pro-embryo op de vierde dag uit ongeveer 30 cellen bestaat. Vanaf deze tijd zijn in de cellen abnormaliteiten waargenomen die hun oorzaak vinden in een onregelmatig verlopen van de kerndelingen (figuur 19). De meest voorkomende afwijking zijn cellen met in het cytoplasma één of meer microkernen. Er zijn verschillende typen microkernen: met of zonder zichtbare kernwand en soms met een kleine nucleolus. De storingen in de kerndeling bestaan voornamelijk uit gecontraheerde chromosomen die op een willekeurige plaats in het cytoplasma liggen, terwijl het merendeel van de chromosomen in de metafase verkeert. Voorts zijn er anafasen met chromosomen die achterblijven in het equatoriaalvlak, en soms met chromatinebruggen. De abnormaliteiten nemen toe gedurende de ontwikkeling van het pro-embryo.

Na de vijfde dag wordt de groei van het pro-embryo vertraagd (figuur 12). Plaatselijk komen vacuolen in het cytoplasma voor en het is opvallend dat hier en daar relatief grote cellen ontstaan. Vanaf de zesde dag is het begin van degeneratie soms al waar te nemen in de vorm van enkele cellen waarvan de inhoud, beginnende met de kern, vervloeit en sterk wordt gekleurd. De pro-embryo's waarin de degeneratie zo vroeg begint aborteren vermoedelijk binnen enkele dagen.

Enige dagen later vertonen alle pro-embryo's deze pleksgewijze degeneratie, waarbij het rond de plek gelegen weefsel vaak wordt gemarkeerd door relatief

Figuur 18. Schema van de ontwikkeling van het embryo bij de kruising VV × BB. Cijfers staan voor dagen na de bestuiving (200 ×).

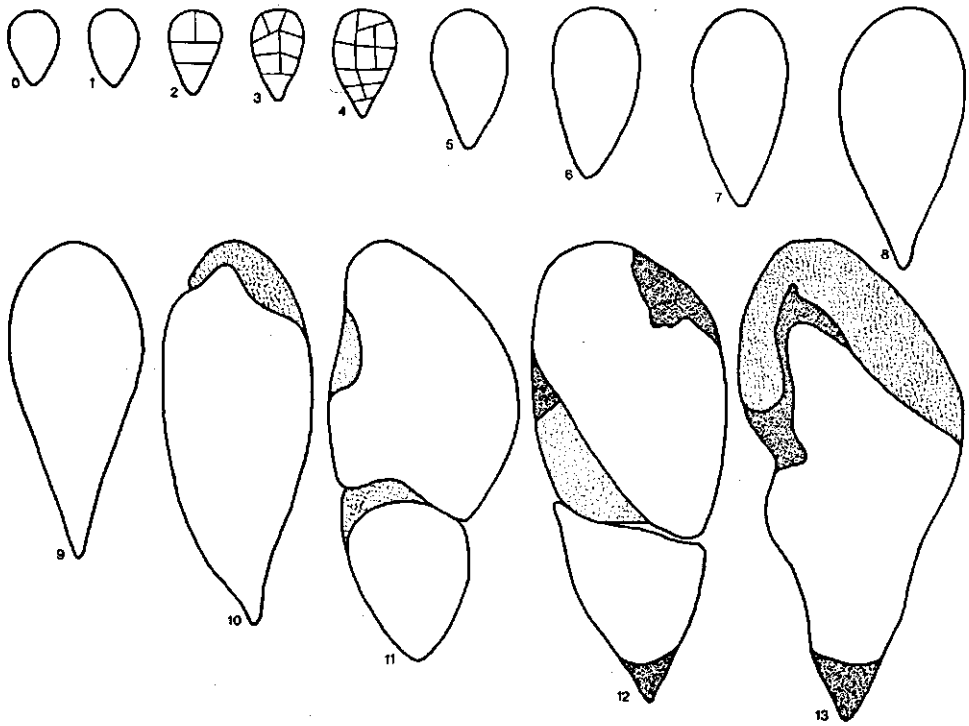


Figure 18. Scheme of development of the embryo in the cross VV × BB. Numerals refer to days after pollination (× 200).

Figuur 19. Abnormaliteiten in hybride embryo's (2000 ×). 1. anafase met twee achterblijvende chromosomen (VVVV × BBBB); 2. cel met microkernen (VV × BB).

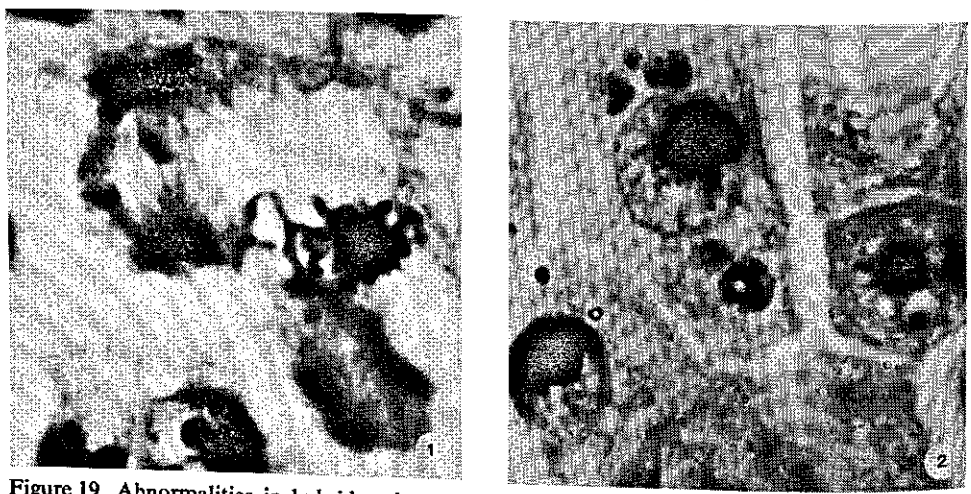


Figure 19. Abnormalities in hybrid embryos (× 2000). 1. Anaphase with two lagging chromosomes (VVVV × BBBB); 2. Cell with micronuclei (VV × BB).

grote cellen. In de gebieden waar delingen optreden zijn de cellen minder sterk gevacuoliseerd dan elders, maar de reeds genoemde storingen bij de kerndelingen blijven voorkomen. De niet-delende kernen hebben één of zelden twee nucleoli. De pleksgewijze degeneratie en de pleksgewijze delingsactiviteit hebben tot gevolg dat de uiterlijke vorm van het pro-embryo abnormaal wordt (figuur 13). Het krijgt in- en uitstulpingen, welke vaak gepaard gaan met een groepsgewijze situering van de cellen. In dit stadium is de variabiliteit tussen de pro-embryo's van dezelfde leeftijd zeer groot.

Tenslotte aborteert het gehele pro-embryo doordat de celinhoud desintegreert en de cellen vervagen, zodat niet veel meer overblijft dan een vaag klompje lege, ineengedrukte cellen. Deze collaps wordt in sommige pro-embryo's al vanaf tien dagen na de bestuiving gevonden, maar in andere later. Na veertien dagen zijn echter de meeste pro-embryo's geheel gedegenereerd of verdwenen. Zelden wordt nog een gedeeltelijk intact embryo gevonden. De grootste pro-embryo's bij deze kruising hebben een lengte van ruim 350 μm bereikt.

Het endosperm

De ontwikkeling van het endosperm is de eerste twee dagen iets vertraagd vergeleken met de intraraskruising en op de tweede dag komen er al duidelijke verschillen. De synchronisatie van de delingen gaat eerder verloren, er komen abnormale kernen met een groot aantal kleine, maar niet even grote, donker gekleurde bolletjes, die meestal langs de kernwand liggen; verder zijn er dezelfde storingen bij de kerndelingen die ook al in het pro-embryo zijn gevonden. De normale kernen hebben 1-4 nucleoli en de situering van de kernen en het plasma is niet afwijkend.

Vanaf de derde dag begint de celvorming op gang te komen en het duurt tenminste twee à drie dagen voordat het gehele endosperm cellulair is. Soms worden enkele kernen in één cel ingesloten, waarbij normale kernen en microkernen naast elkaar voorkomen. De abnormale kernen doen wel mee aan de celvorming. Het cytoplasma is zowel in als buiten de cellen sterk gevacuoliseerd, hetgeen wijst op een verminderde activiteit.

Het aantal abnormale kernen neemt snel toe en er zijn verschillende typen (figuur 20). Afwijkende kerndelingen treden veel op en resulteren in microkernen van verschillende vorm en afmeting. Chromatinebruggen kunnen na de deling stand houden, waardoor kernen ontstaan die met elkaar zijn verbonden. Bij een groter aantal chromatineverbindingen kan de kerndeling resulteren in een niet volledig gedeelde zandlopervormige dubbelkern. De kerninsluitsels zijn eveneens veelal abnormaal. Naast kernen met veel kleine bolletjes, die waarschijnlijk het gevolg zijn van het desintegreren van de kerninhoud, komen kernen voor met één abnormaal grote nucleolus. Alle kerninsluitsels kunnen in meer of mindere mate gedegenereerd zijn door gehele of gedeeltelijke oplossing van de inhoud ervan. Een enkele maal zijn cellen gevonden met precies 14 chromosomen. Een andere

Figuur 20. Abnormaliteiten in hybride endosperm (2000 ×). 1. telofase met brugvormende chromosomen (VV × BB); 2. anafase met chromatinebrug (VV × BB); 3. multipolaire spoelfiguur (VV × BB); 4. anafase met achterblijvende chromosomen (VV × BBBB).

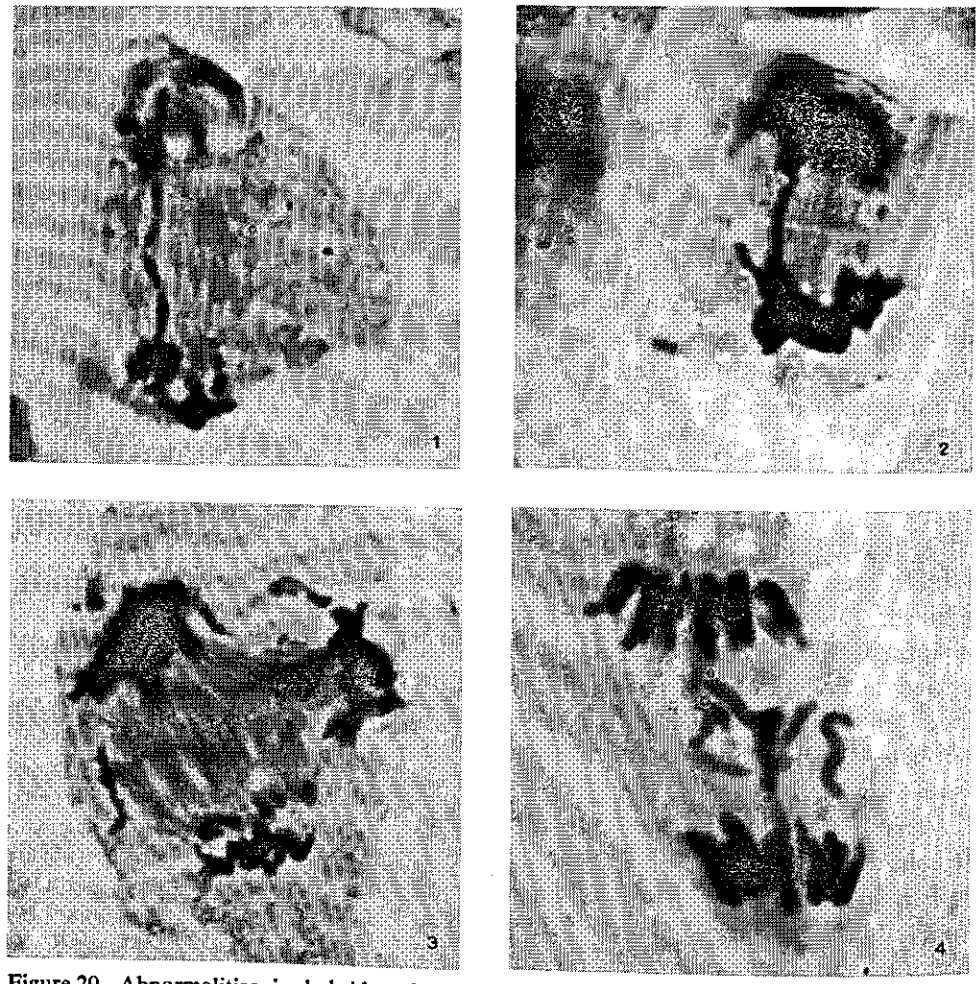


Figure 20. Abnormalities in hybrid endosperm (× 2000). 1. Telophase with bridge-forming chromosomes (VV × BB); 2. Anaphase with chromatin bridge (VV × BB); 3. Multipolar spindle (VV × BB); 4. Anaphase with lagging chromosomes (VV × BBBB).

abnormaliteit is de vorming van reuzekernen. Deze kernen komen vooral in het basale deel van de embryozak voor, en hun aantal neemt sterk toe bij verdergaande ontwikkeling van de caryopsis. De kernen ontstaan waarschijnlijk veelal mede door endomitose en ze worden gekarakteriseerd door een groot aantal nucleoli (tot 25 per kern) en door een grote hoeveelheid sterk gekleurde draderige massa, de chromosomen. De delingen in deze kernen zijn erg onregelmatig: er zijn multipolaire spoelfiguren, verschillende delingsstadia in één cel en voorts vele door de kern verspreid liggende chromosomen ten tijde van de metafase of

anafase. Soms is het moeilijk een duidelijk onderscheid te maken tussen cellen met reuzekernen en multinucleaire cellen. De kernen in de laatstgenoemde cellen kunnen synchroon delen, waarbij het erop lijkt dat na de deling alle kernmateriaal bijeenkomt als voorbereiding op de vorming van een reuzekern.

Ondanks alle abnormaliteiten gaat de ontwikkeling van het endosperm plaatselijk nog door tot tien à twaalf dagen na de bestuiving, waarbij er echter grote variabiliteit tussen en binnen de caryopses is. De endospermcellen gaan soms al vanaf de zesde dag degenereren, hetgeen gebeurt door het desintegreren van de celinhoud, al of niet nadat de kerninhoud is vervloeid en daarbij zeer donker wordt gekleurd. De cellen raken los van elkaar en worden uiteindelijk platgedrukt of verdwijnen na desintegratie. Het basale endosperm is meestal het eerst verdwenen en er blijft vrijwel niets van over. In het overige endosperm wordt in verscheidene cellen nog veel zetmeel gevormd dat na de celdegeneratie zichtbaar blijft in de overgebleven gelige, streperige, heldere massa. De degeneratie kan zeer pleksgewijs verlopen, maar na twaalf à veertien dagen is het endosperm meestal vrijwel geheel verdwenen.

De antipoden

De vroegste ontwikkeling van de antipoden is iets versneld vergeleken met die van de intraraskruising, maar overigens normaal. De kernvergroting verloopt sneller en ook de kerndegeneratie zet eerder in. Het cytoplasma is vaak zeer dicht, met enkele grote vacuolen of soms zeer sterk gevacuoliseerd. De grote variabiliteit tussen de antipodencellen, zelfs binnen een caryopsis, is zeer opvallend. Na zeven of acht dagen zijn vele cellen verdwenen of sterk gedegenereerd. Soms echter ontwikkelen de kernen van enkele cellen zich, waarschijnlijk mede als gevolg van endomitose, tot zeer grote reuzekernen, die tot tien dagen na de bestuiving zichtbaar kunnen blijven, maar dan ook verdwijnen.

Het moederlijke weefsel

De ontwikkeling van het moederlijke weefsel is aanvankelijk vrijwel identiek met die bij de intraraskruising. Na de derde dag echter vertraagt de lengtegroei, zodat na zeven à acht dagen, wanneer de uiteindelijke lengte is bereikt, de nucellus niet groter is dan ruim 4 mm. De vorming van de korrelstructuur in de placenta en in het binnenste integument vindt eerder plaats, evenals het desintegreren van het overige deel van de placenta. In de dwarsgerichte cellen worden ellipsoïde, vrij sterk gekleurde insluitsels gevormd (figuur 17). Als gevolg van de relatief snelle abortie van de caryopsis lijken de verschillende gebeurtenissen te worden versneld of onderbroken. De cellen van de nucellus vervagen maar worden niet platgedrukt, waarschijnlijk mede door het ontbreken van een naar buiten gerichte druk van het endosperm. De stevige laag wordt nauwelijks als zodanig aangelegd, de cellen van het integument zijn nog redelijk intact, hoewel de inhoud tot een

bruine massa is vervloeid. Ook de vruchtwand blijft intact, de cellen worden slechts weinig vervormd en vervagen.

Ontwikkeling van de caryopsis bij H. vulgare (2x) × H. bulbosum (4x) - VV × BBBB

Deze kruising vertoont eveneens een grote variabiliteit tussen de caryopses van dezelfde leeftijd. Bij de vergelijking van deze kruising met VV × VV en VV × BB moet rekening worden gehouden met een eventuele jaarinvloed. De omstandigheden in 1963 zijn waarschijnlijk iets gunstiger geweest dan in 1964, maar de verschillen zullen niet groot zijn en ze worden verre overtroffen door de verschillen als gevolg van de variabiliteit tussen de caryopses.

Het embryo

Het pro-embryo ontwikkelt zich zeer langzaam, maar overigens normaal (figuren 21 en 12). De kernen hebben één, soms twee en zeer zelden drie nucleoli en de delingen zijn geheel normaal, afgezien van een zelden optredende onregelmatigheid. Het cytoplasma is meestal vrij dicht, sommige grote nucleoli zijn niet geheel bolvormig of enigszins gevacuoliseerd. Vanaf de negende dag neemt de groei toe, maar pas op de dertiende dag is het begin van orgaandifferentiatie waarneembaar (figuur 13). Voor deze tijd zijn in sommige pro-embryo's al degeneratieverschijnselen opgetreden, waarbij plaatselijk de kernen vervloeien en donker worden gekleurd. Deze vroegtijdige degeneratie leidt meestal tot eveneens vroegtijdige abortie.

De eerste orgaandifferentiatie is meestal normaal, hoewel het embryo platter is dan bij intraraskruising, soms wordt abnormale differentiatie waargenomen, waarbij het groeipunt later dan de wortel of in het geheel niet wordt aangelegd. In dit stadium worden soms relatief veel delingsonregelmatigheden gevonden, resulterend in microkernen. Tevens wordt weleens zetmeel in het embryo gevormd. Zoals steeds zijn vooral de basale cellen gevacuoliseerd, terwijl bij verdergaande ontwikkeling de vacuolisering toeneemt.

Na de eerste orgaandifferentiatie gaat het embryo plotseling sterk groeien in longitudinale en tangentiale richting. De groei in dorsi-ventrale richting is veel minder, zodat een plat embryo ontstaat waarin de scheiding tussen scutellum en coleorrhiza niet als een hoek of knik is te vinden. De sterke groei gaat door tot drie à vier weken na de bestuiving, waarbij vooral de bovenste helft van het embryo sterk uitgroeit. Er wordt meestal een min of meer abnormaal spruitaanlegsel gevormd en slechts één wortelaanlegsel (figuur 14). De uitwendige vorm van het embryo wordt zeer onregelmatig, doordat de epidermale laag zeer actief deelt en daardoor min of meer gegolfd wordt. Soms ontwikkelen zich daarna verscheidene uitstulpingen waarbij ook het onder de epidermis liggende weefsel mee uitgroeit. Het onderste deel van het coleoptiel en de ventrale rib groeien eveneens

Figuur 21. Schema van de ontwikkeling van het embryo bij de kruising VV × BBBB. Cijfers staan voor dagen na de bestuiving (0-10 : 200 ×; 11-14 : 90 × en 16-28 : 33 ×).

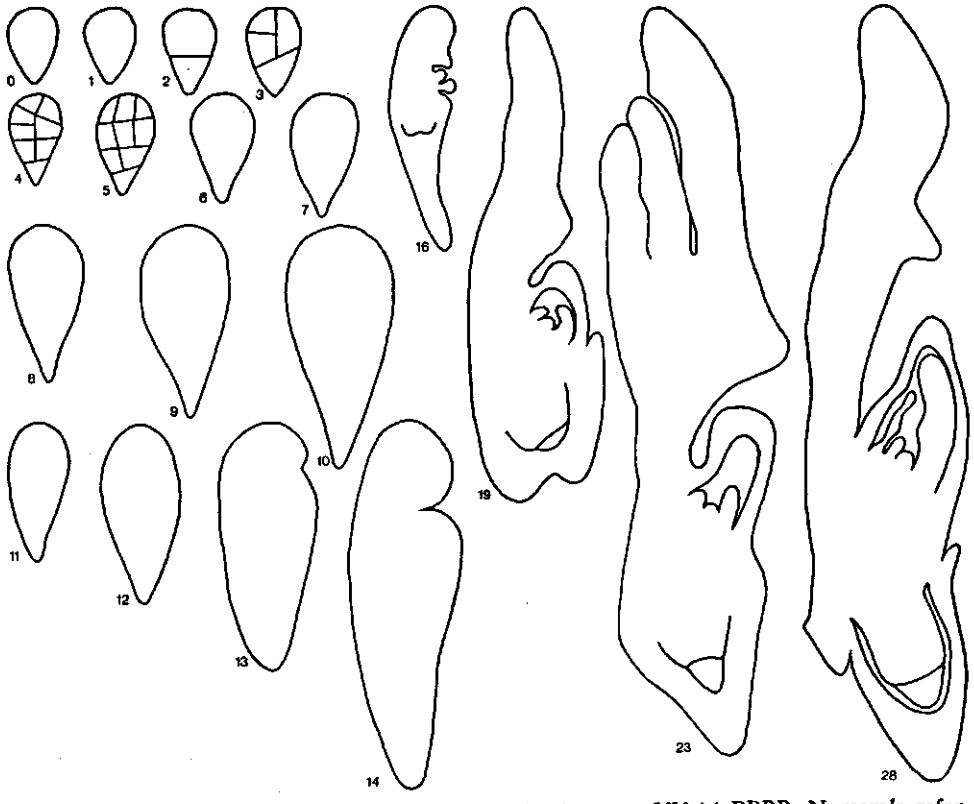


Figure 21. Scheme of development of the embryo in the cross VV × BBBB. Numerals refer to days after pollination (0-10 × 200; 11-14 × 90 and 16-28 × 33).

veel sterker uit dan normaal.

Vanaf de derde week gaat het embryo van onder uit degenereren. De cellen worden gevuld met donker kleurende korrels of bolletjes. De groei neemt af en de vacuolisering neemt toe, totdat de celinhoud gaat vervloeien en het embryo aborteert. Na ruim vier weken zijn alle embryo's dood, waarbij de grootste een lengte hebben bereikt van ruim 3 mm.

Het endosperm

Het endosperm ontwikkelt zich veel trager dan bij de kruisingen VV × VV en VV × BB. Vanaf de tweede dag zijn de delingen niet meer gesynchroniseerd en treden de eerste onregelmatigheden in de delingen op. In de schijnbaar normale kernen komen 1-4 nucleoli voor. De situering van het plasma met de kernen is normaal, maar het plasma bevat veelal vacuolen. Vanaf de vierde dag begint de celvorming vanuit de basis op gang te komen, waarbij vaak enkele kernen in één

Figuur 22. Abnormaliteiten in hybride endosperm (1 en 2: 1200 ×; 3 en 4: 900 ×). 1. zeer gestoorde kerndeling met achterblijvende chromosomen en bruggen (VV × BBBB); 2. telofase met chromatinebruggen (VVVV × BBBB); 3. multinucleaire cel (VV × BB); 4. reuzekern (VV × BBBB).

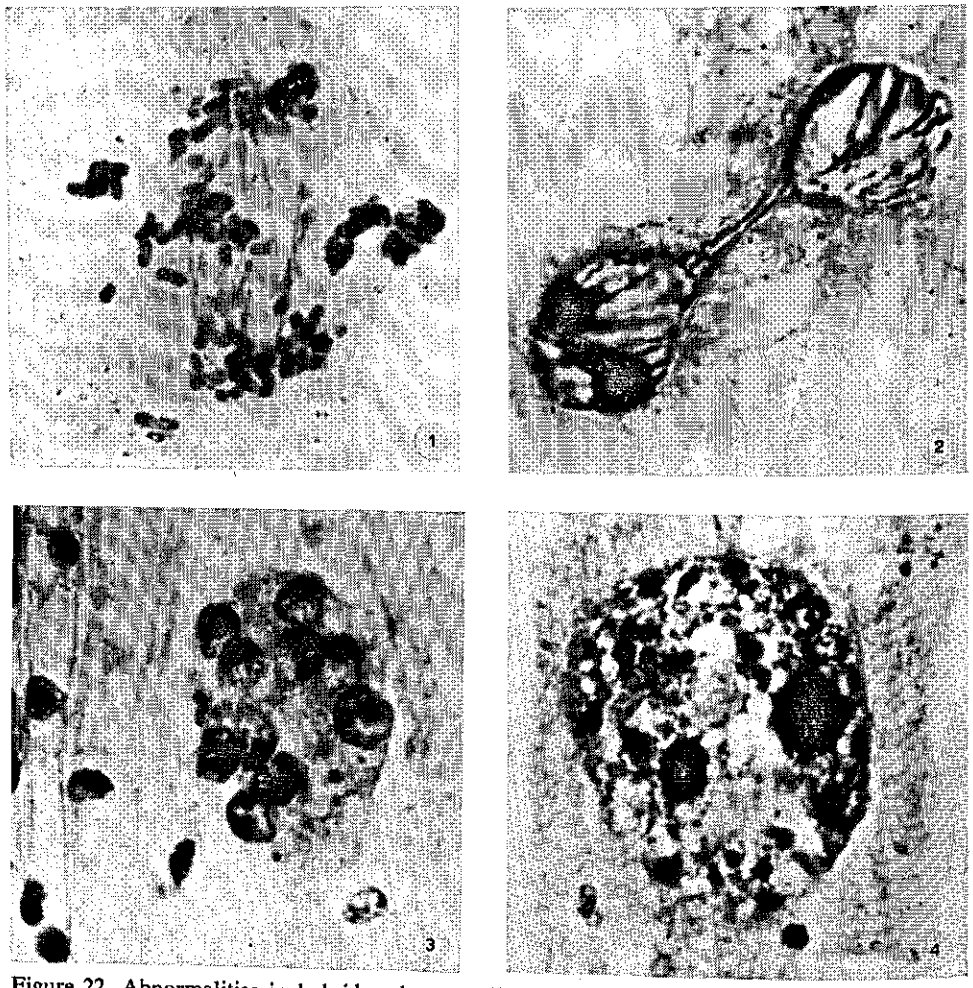


Figure 22. Abnormalities in hybrid endosperm (1 and 2 × 1200; 3 and 4 × 900). 1. Severely deranged division of nucleus with lagging chromosomes and bridges (VV × BBBB); 2. Telophase with chromatin bridges (VVVV × BBBB); 3. Multinucleate cell (VV × BB); 4. Giant nucleus (VV × BBBB).

cel worden ingesloten. Alle kernen worden echter in een cel opgenomen, tenzij ze voor die tijd zijn gedesintegreerd. De celvorming verloopt zeer traag en er is ook een grote variabiliteit tussen de caryopses.

De abnormaliteiten zijn dezelfde als bij de kruising VV × BB en in latere stadia zijn vooral de reuzekernen zeer opvallend (figuur 22). Deze kernen komen door het gehele endospermlichaam voor, maar vooral in het gebied boven het embryo. Ze ontstaan waarschijnlijk zowel door versmelting van de kernen in

multinucleaire cellen als door endomitose. De delingen zijn zeer onregelmatig. In sommige kernen zijn meer dan 100 chromosomen geteld. De overige kernen hebben vaak het verwachte aantal van 28 chromosomen, hoewel daarnaast alle overgangen naar cellen met 14 chromosomen zijn gevonden.

Ondanks al de abnormaliteiten gaat de ontwikkeling door en wordt relatief veel endosperm gevormd: meer dan bij de kruising VV × BB, maar veel minder dan bij de intraraskruising. Vanaf de achtste dag beginnen meer kernen te degenereren; degenererende nucleoli en desintegrerende kernen komen al wel eerder voor, maar nu worden vooral de reuzekernen abnormaler doordat de kerninhoud vervloeit. De delingsactiviteit neemt af en omstreeks de tiende dag is de beschikbare ruimte vrijwel gevuld. Onderin en langs de placenta zijn de cellen plasmarijk, terwijl de overige vrijwel geheel zijn gevuld met vacuolen. Vanuit het midden begint de zetmeelvorming op gang te komen. Het endosperm gaat plaatselijk desintegreren, te beginnen boven het embryo. In de overige delen gaat de structuur verloren en worden de cellen platgedrukt, waardoor een compacte heldere massa met zetmeelkorrels ontstaat. Deze situatie wordt ongeveer drie weken na de bestuiving bereikt.

Hoewel de ontwikkeling van het endosperm sterke overeenkomst vertoont met die bij de kruising VV × BB zijn er enige verschilpunten. Bij de kruising VV × BBBB is de ontwikkeling trager, maar er wordt, misschien juist daardoor, meer endosperm gevormd. De abnormaliteiten zijn dezelfde, maar bij de laatste kruising zijn er meer en grotere reuzekernen, terwijl de chromatineverbindingen in delende kernen, tussen kernen en tussen cellen meer voorkomen. Tenslotte lijkt het erop dat bij de kruising VV × BB de ontwikkeling zo vroeg wordt onderbroken dat uiteindelijk relatief meer endosperm verdwijnt, hetgeen misschien ook komt doordat bij deze kruising minder zetmeel wordt gevormd.

De antipoden

De eerste ontwikkeling van de antipoden verloopt iets trager dan die bij de intraraskruising, maar overigens normaal. Vanaf de vierde dag begint kerndegeneratie op te treden, waarbij de cellen enigszins worden uitgerekt en afgeplat. Na de degeneratie van de kern gaat ook het plasma degenereren. Soms zijn in de kernen grote aantallen gecontraheerde chromosomen te vinden. Ongeveer op de tiende dag zijn de antipodencellen geheel verdwenen.

Het moederlijke weefsel

De verschillende onderdelen van het moederlijke weefsel ontwikkelen zich eveneens veel trager dan bij intraraskruising. De nucellus bereikt pas na ongeveer dertien dagen zijn grootste lengte: ± 6 mm. Evenals bij de kruising tussen diploïde soorten worden in de dwarsgerichte cellen van de vruchtwand ellipsoïde insluitsels gevormd. De stevige laag die uiteindelijk rond het zaad wordt gevormd is beter

ontwikkeld dan bij de kruising tussen diploïde soorten, maar is niet zo compact als bij de intraraskruising. In de caryopses met een vroegtijdige abortie wordt de ontwikkeling van het moederlijke weefsel eveneens vroegtijdig onderbroken.

Ontwikkeling van de caryopsis bij H. vulgare (4x) × H. bulbosum (4x) - VVVV × BBBB

Doordat deze kruisingen zijn uitgevoerd met tetraploïde Balder is vergelijking met de hiervoor besproken soortkruisingen niet geheel mogelijk. De verschillende ontwikkelingsprocessen zijn hetzelfde maar de ontwikkeling bij Balder is enige dagen vertraagd ten opzichte van die bij Proctor. Ook bij deze kruising bleek weer een grote variabiliteit te bestaan tussen de caryopses van dezelfde leeftijd. Relatief meer caryopses vertoonden een vroegtijdige abortie.

Het embryo

De ontwikkeling van het pro-embryo is zeer traag; op de vierde dag zijn nog maar vier à vijf cellen gevormd (figuren 23, 12 en 13). Het is opvallend dat vanaf het eerste begin zowel het cytoplasma als de nucleoli vacuolen hebben, hetgeen een aanwijzing is voor een geringe activiteit in de cellen. Vanaf de vijfde dag worden onregelmatigheden in de delingen waargenomen, zoals eveneens zijn gevonden bij de andere twee soortkruisingen (figuur 19). De abnormaliteiten komen echter vrij frequent voor, zodat binnen enkele dagen vrijwel alle cellen

Figuur 23. Schema van de ontwikkeling van het embryo bij de kruising VVVV × BBBB. Cijfers staan voor dagen na de bestuiving (200 ×).

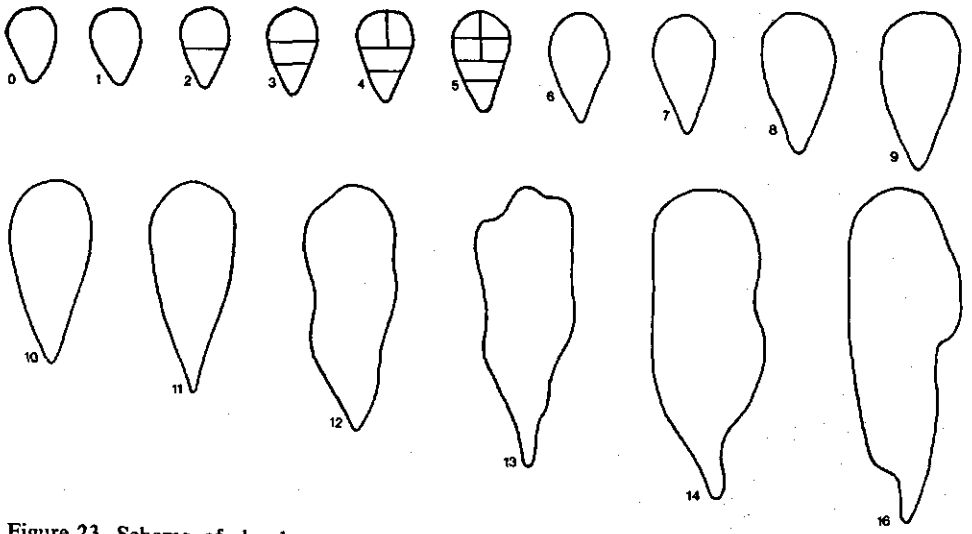


Figure 23. Scheme of development of the embryo in the cross VVVV × BBBB. Numerals refer to days after pollination (× 200).

één of meer microkernen hebben. Vanaf de tiende dag beginnen de kernen te degenereren, waarbij ze pycnotisch worden. De uitwendige vorm van het pro-embryo wordt onregelmatig, de cellen vervormen en desintegreren. Omstreeks 14 dagen na de bestuiving zijn de meeste pro-embryo's geaborteerd. De grootste hebben een lengte van ruim 200 μm bereikt.

Het endosperm

De ontwikkeling van het endosperm is evenals die van het pro-embryo zeer traag. Veel nucleoli hebben vanaf het begin vacuolen en vanaf de tweede dag worden reeds microkernen waargenomen. De celvorming begint ongeveer de vijfde dag, maar het duurt enige dagen voordat het gehele endosperm cellulair is. Soms worden enkele kernen in één cel ingesloten. Na het cellulair worden neemt de delingsactiviteit nog verder af, zodat in het geheel maar weinig endosperm wordt gevormd.

Het endosperm bij deze kruising wordt gekarakteriseerd door het relatief grote aantal microkernen en maar weinig reuzekernen. De microkernen blijven vaak lang met een grotere kern verbonden zodat het er soms op lijkt alsof de microkernen door afsnoering zouden ontstaan (figuur 22). Het aantal chromosomen van de kernen is zeer onregelmatig, meestal zijn het er minder dan het verwachte aantal 42.

Vanaf de achtste dag beginnen de kernen pycnotisch te worden, waarna een gedeelte van het endosperm desintegreert. Vooral het bovenste en het onderste deel van het endosperm verdwijnt, het middendeel degenereert voordat het is gedesintegreert, waarbij de cellen worden vervormd en vervagen; hierbij blijven eilandjes cellen langer intact dan hun omgeving. Omstreeks de twaalfde dag zijn alle cellen dood, terwijl in de resterende massa soms zetmeelkorrels zijn te onderscheiden.

De antipoden

In vergelijking met de andere soortkruisingen zijn de antipodencellen minder in aantal, variabeler in celgrootte en soms multinucleair. Deze verschillen bestaan echter eveneens tussen Balder en Proctor, zodat ze waarschijnlijk niets met de soortkruising te maken hebben. De ontwikkeling bij de soortkruising is echter afwijkend van die bij de intraraskruising met Balder. De cellen blijven tot aan de vijfde dag geheel intact, ze hebben veel en dicht cytoplasma en zijn zeer wisselend gevacuoliseerd. In de kernen komen allerlei chromosomencondensaties voor, waarbij aanwijzingen voor endomitose zijn te vinden. De nucleoli zijn onregelmatig en hebben veelal vacuolen.

Vanaf de vijfde dag worden de cellen uitgerekt in longitudinale richting en daarbij afgeplat. Tevens beginnen de kernen te degenereren. De cellen gaan vervagen en desintegreren waarbij de steeds verder degenererende kernen als enorme

donkere massa's het langst zichtbaar blijven. Omstreeks de elfde dag zijn de cellen geheel verdwenen.

Het moederlijke weefsel

Het moederlijke weefsel ontwikkelt zich eveneens zeer traag, de nucellus wordt ongeveer 4 mm lang. Het zaad aborteert voordat alle organen de volledige ontwikkeling hebben doorgemaakt. Van de nucellus blijft de buitenste cellaag zichtbaar, waarbij de cellen groot en geheel leeg zijn. In het binnenste integument en in de placenta wordt slechts in enkele gevallen de korrelige celinhoud gevormd omdat de cellen meestal reeds vervagen voordat de korrelstructuur ontstaat. Er worden twee cuticulae gevormd. De vruchtwand ontwikkelt zich relatief goed en blijft vaak het langst intact, zelfs wanneer het erbinnen gelegen zaad al is geaborteerd.

Cytogenetische onderzoekingen

De cytogenetische onderzoekingen aan ouders en hybriden omvatten de bestudering van de morfologie van de chromosomen, van het aantal nucleoli mede in verband met de satellietchromosomen en van de meiose. Het reeds beschreven materiaal bood hiervoor vele mogelijkheden, want vooral het vergelijken van de hybriden op verschillend ploïdie-niveau leverde interessante resultaten op. Hierbij dient echter niet te worden vergeten dat de diploïde en tetraploïde cytotypen van *H. bulbosum* tot één soort behoren en morfologisch nauwelijks van elkaar zijn te onderscheiden, maar dat deze cytotypen waarschijnlijk reeds lang van elkaar zijn geïsoleerd. Omdat triploïde *H. bulbosum* nooit is gevonden lijkt het waarschijnlijk dat een kruisingsbarrière tussen de cytotypen bestaat. Voorts had Zohary (pers. med.) reden te veronderstellen dat het tetraploïde cytotype van deze soort ongeveer achtduizend jaar geleden is ontstaan, dit in tegenstelling tot tetraploïde cytotypen van *H. vulgare* die op zijn hoogst ongeveer 30 jaar oud zijn.

Bespreking van de literatuur

Aan veel soorthybriden zijn cytogenetische onderzoekingen verricht die vaak beperkt zijn tot de bestudering van de meiose, met de daaraan verbonden bespiegelingen over verwantschapsverhoudingen. Soms is aandacht besteed aan de morfologie van de chromosomen en daarbij vaak aan de nucleoli. In het geslacht *Hordeum* is de bestudering van de karyotypen en de nucleoli beperkt gebleven tot de soorten; de meiose is in soorten en in soorthybriden bestudeerd.

Sybenga (1959) vergeleek een aantal methoden voor de meting van chromosomen. Het bleek dat de grootste nauwkeurigheid werd bereikt bij het gebruik van een objectief met grote vergroting (100 ×), waarbij directe meting met oculairschroefmicrometer of indirecte meting via foto nauwelijks verschil uitmaakte. Het gebruik van drie voorbehandelingsmethoden (8-hydroxychinoline, α-monobroomnaftaleen en colchicine) leverde geen significante verschillen, maar er waren aanwijzingen voor geringe verschillen die verloren gingen in de variabiliteit. Tenslotte werd het effect van het squashen bekeken. Het bleek dat de lengte van de chromosomen door hard squashen iets groter werd, waarbij de lengte van de langere armen relatief sterker werd vergroot dan die van de kortere armen. De hierdoor geïntroduceerde fout was echter eveneens kleiner dan de reeds aanwezige variabiliteit.

Essad *et al.* (1966) stelden dat eigenlijk nog geen bevredigende statistische methode is ontwikkeld voor de verwerking en vergelijking van chromosomen-

metingen. Wanneer een karyotype wordt beschreven op grond van de gemiddelden van meestal relatieve chromosomenlengten, dan zijn de chromosomen, voor zover ze niet herkenbaar zijn door bijvoorbeeld een satelliet, geclassificeerd op grond van de gemeten lengten. Bij deze classificatie kunnen fouten worden gemaakt, vooral bij chromosomenparen die sterk op elkaar lijken of bij chromosomen met armen van gelijke of vrijwel gelijke lengte. Deze fouten zijn hoofdzakelijk een gevolg van de spreiding van de meetresultaten. De meetresultaten van de op elkaar lijkende chromosomenparen zullen elkaar overlappen, waardoor een op meetresultaten berustende scheiding in wezen kunstmatig is en waarbij tevens de schatting van de meetvariantie te laag zal uitvallen. Bij de chromosomen met armen van gelijke of vrijwel gelijke lengte heeft de spreiding van de meetresultaten tot gevolg dat het onderscheid tussen lange en korte arm min of meer kunstmatig is, waardoor een onderschatting van de symmetrie kan plaatsvinden en waarbij eveneens de schatting van de meetvariantie te laag zal zijn. Dit heeft tot gevolg dat de schatting van de totale meetvariantie niet juist is, waardoor een statistische verwerking van chromosomenmetingen eigenlijk onmogelijk wordt.

Ondanks deze moeilijkheden zijn van verscheidene soorten karyotypen beschreven met behulp van gemiddelden van meetresultaten, waarbij een classificatie van de chromosomen noodzakelijk was. Deze beschrijvingen zullen daarom een grotere betrouwbaarheid hebben naarmate de chromosomen beter van elkaar zijn te onderscheiden. Er zijn in de literatuur bij de morfologische beschrijvingen van chromosomen verschillende nomenclatuursystemen gebruikt. Volgens het meest gangbare systeem wordt de insnoering van het centromeer de primaire insnoering genoemd en een eventuele andere zeer duidelijke insnoering, waarbij een satelliet wordt gevormd, de secundaire insnoering. De tertiaire insnoeringen zijn vaak onduidelijk en niet constant. Voor de beschrijving van de plaats van het centromeer ten opzichte van de totale chromosomenlengte is de nomenclatuur van Levan *et al.* (1964) gebruikt; hetgeen betekent dat bij aanduiding van de plaats van het centromeer met behulp van een index (= korte arm/lange arm) onder andere de volgende termen worden gebruikt: index = 1,00 → centromeer Mediaan; 1,00 > index > 0,60 → centromeer in mediane gebied; 0,60 > index > 0,33 → centromeer submediaan.

De chromosomen van *H. vulgare* zijn exact beschreven door Tjio & Hagberg (1951) en deze beschrijving is later iets herzien door Burnham & Hagberg (1956). De resultaten van deze auteurs zijn samengevat in tabel 10, waarbij, teneinde een vergelijking met de eigen resultaten te vergemakkelijken, de gemeten lengte van de chromosomen is uitgedrukt als percentage van de som van de totale lengte van alle chromosomen, met inbegrip van de satellieten. Deze wijze van uitdrukken is door Tjio & Hagberg (1951) eveneens gebruikt, maar deze auteurs betrokken de lengte van de satellieten niet in het totaal. Uit andere onderzoekingen bleek dat er waarschijnlijk kleine verschillen kunnen bestaan tussen rassen, maar het is niet zeker of de gevonden verschillen in alle gevallen reëel zijn. Nilan (1964) wijdde aan dit onderwerp enige kritische beschouwingen, waarbij ook tertiaire

Tabel 10. Beschrijving van het karyotype van *H. vulgare* (Tjio & Hagberg, 1951; Burnham & Hagberg, 1956). Chromosomenlengten als percentage van de totale lengte van alle chromosomen, met inbegrip van de satellieten (één genoom V = 100 %); de index is korte arm/lange arm.

Chromosoom nr.[1]	Relatieve lengte			Index
	lange arm	korte arm	totaal	
1	9,09	6,82	15,92	0,75
2	8,25	7,09	15,34	0,86
3	7,39	6,80	14,19	0,92
4	7,80	6,01	13,81	0,77
5	7,04	5,14	12,18	0,73
6	7,20	4,40	11,60	0,61
6+		6,80	14,00	0,94
7	9,11	3,74	12,84	0,41
7+		5,47	14,57	0,60
Chromosome nr.[1]	long arm	short arm	total	Index
	Relative length			

[1] Het plus-teken betekent plus satelliet / the plus sign means plus satellite.

Table 10. Description of the *H. vulgare* karyotype (Tjio & Hagberg, 1951; Burnham & Hagberg, 1956). Length of chromosomes as percentage of total length of all chromosomes, including satellites (one genome V = 100 %); the index is short arm/long arm.

insnoeringen werden besproken. In de literatuur bestaat verschil van mening over de chromosomen van de in het wild voorkomende typen van *H. vulgare*. Morrison (1959) is van mening dat de karyotypen van alle typen van deze soort gelijk zijn. Zijn waarnemingen zijn gedaan in squashpreparaten, maar er zijn geen metingen verricht. Schwanitz & Pirson (1955) vonden in microtoompreparaten dat de chromosomen van de in het wild voorkomende typen langer en vooral dunner zijn, maar ook hier zijn geen metingen verricht.

De chromosomen van *H. bulbosum* zijn nooit exact beschreven. Chin (1941) vermeldde dat het tetraploïde cytotype twee paar chromosomen met satellieten had, hetgeen door Morrison (1959) werd bevestigd. Deze laatste auteur heeft ook het diploïde cytotype bekeken en vond twee paar chromosomen die duidelijk zijn te herkennen: één paar met een satelliet en één paar met submediaan centromeer. In het tetraploïde cytotype zijn beide chromosomen in verdubbeld aantal teruggevonden hetgeen mede een aanwijzing is voor het autotetraploïde karakter van dit cytotype.

Het aantal nucleoli dat in *H. vulgare* voorkomt is meestal bestudeerd in de meiose. Inouye (1933) vond één, zelden twee en zeer zelden meer nucleoli. Burnham *et al.* (1954) hebben meestal één en zelden twee nucleoli waargenomen

in de diakinese. In het laatste geval waren de nucleoli verbonden met twee bivalenten. In de jonge pollenkorrels werden vaker twee nucleoli aangetroffen (in 25-35 % van de cellen). Een zeer kritische bestudering van dit onderwerp is van Tsuchiya (1960 en 1964) met behulp van trisomen. In de euploïden vond deze auteur in de meiose meestal één nucleolus (99,2 %) en zelden twee. In de trisomen van overeenkomstig materiaal werden, wanneer het extra chromosoom geen satellietchromosoom was (de chromosomen 1-5), ongeveer tweemaal zo vaak als in de euploïd cellen met twee nucleoli gevonden. Eén of zelden twee bivalenten waren met de nucleolus geassocieerd, nooit trivalenten. In de trisoom van chromosoom 6 werden vaker twee (10 %) en soms drie of vier nucleoli waargenomen. Vaak was de trivalent en soms een bivalent en univalent met een nucleolus verbonden. Bij de trisoom van chromosoom 7 werden eveneens vaker dan normaal twee nucleoli gevonden (6 %) en zelden drie. In dit geval was de trivalent en een bivalent of de univalent en één of twee bivalenten aan een nucleolus geassocieerd. Tsuchiya leidde hieruit af dat de chromosomen 6 en 7 de grootste nucleolus-activiteit hebben en dat de aanwezigheid van een extra chromosoom 1-5 tot gevolg heeft dat meer nucleoli worden gevormd, waarbij de nucleoli steeds zijn verbonden met de chromosomen 6 en 7.

Over de morfologie van de chromosomen in soorthybriden bestaan tegenstrijdige waarnemingen. Voor het geslacht *Hordeum* zijn hierover nooit gedetailleerde onderzoekingen gepubliceerd, maar wel voor andere geslachten van de grassenfamilie en voor andere families. Heneen (1962) vermeldde de resultaten van een soortkruising in het geslacht *Agropyron* waarbij de chromosomen in de hybride een gewijzigde lengteverhouding hadden ten opzichte van de ouders. Eén ouder had langere chromosomen dan de andere ouder, en in de hybride was het verschil in lengte nog groter geworden. Deze veranderde lengteverhouding is toegeschreven aan de chromosomendikte, omdat volgens een hypothese van Darlington (1937) in een hybride de chromosomen er naar zullen streven even dik te worden, zodat de dikkere chromosomen langer en dunner zullen worden en de dunnere chromosomen korter en dikker, hetgeen een gewijzigde lengteverhouding tot gevolg heeft. Heneen (1962) concludeerde echter uit een bespreking van de literatuur dat de hypothese van Darlington geen algemene geldigheid heeft, omdat er verscheidene gevallen bekend zijn waarin chromosomen, ondanks een verschil in dikte, een vrijwel ongewijzigde lengteverhouding in hybriden vertonen.

Zeer fraai materiaal voor de bestudering van de morfologie van chromosomen in een niet normale situatie zijn additielijnen, waarbij een chromosoom of chromosomenpaar van een soort is toegevoegd aan de complete genomen van een andere soort. Bhattacharyya *et al.* (1961) beschreven een dergelijk onderzoek voor addities van roggechromosomen aan tarwe. Het bleek dat sommige chromosomen een iets gewijzigde morfologie hadden, een andere lengte of een andere index, maar dit gold niet voor alle chromosomen en niet in alle gevallen op dezelfde wijze, zodat van een algemeen geldende regel geen sprake was. Een verklaring kon dan ook niet worden gegeven.

Een specifieke wijziging van chromosomenmorfologie in soorthybriden is in de literatuur veel beschreven, namelijk het niet zichtbaar zijn van de secundaire insnoering van de satellietchromosomen van één van de ouders. Navashin (1928) beschreef dit verschijnsel in soortkruisingen in *Crepis*, en stelde daarbij de term amfiplastie voor als benaming voor het verschijnsel. Hoewel veel voorbeelden zijn beschreven is de voorgestelde benaming maar weinig gebruikt. Veelal is het niet tot uitdrukking komen van de secundaire insnoering gekoppeld aan het niet optreden van de nucleolus (Heneen, 1962 en 1963; Keep, 1962), hoewel dit niet steeds het geval hoeft te zijn. Bij de reeds genoemde addities van roggechromosomen aan tarwe bleek dat, evenals in de amfiploïde *Triticale*, de secundaire insnoeringen van de satellietchromosomen van rogge werden onderdrukt onder invloed van tarwe, terwijl allerlei tertiaire insnoeringen van de roggechromosomen zichtbaar bleven (Bhattacharyya *et al.*, 1961). Bij soortkruisingen in het geslacht *Secale* is eveneens amfiplastie waargenomen (Sybenga, pers. med.).

Sinds is vastgesteld dat de nucleolus is geassocieerd aan een zeer bepaalde plaats op een chromosoom (McClintock, 1934) en dat deze plaats veelal wordt gemarkeerd door de secundaire insnoering, is de hypothese geponeerd dat amfiplastie en het niet gevormd worden van de nucleolus met elkaar in verband staan. Wat er in werkelijkheid gebeurt is echter niet bekend. Hiervoor zijn verschillende mogelijkheden: competitie om nucleolair materiaal en genetische, structurele of cytoplasmatische onderdrukking van de nucleolus-activiteit (Heneen, 1962; Keep, 1962), waarbij het geenszins duidelijk is of het niet optreden van de nucleolus de oorzaak of het gevolg is van het niet zichtbaar zijn van de secundaire insnoering, of dat beide gebeurtenissen het gevolg zijn van een onderdrukking van de activiteit van het bepaalde chromosoomdeel, de 'nucleolus organizer'.

De meiose van *H. vulgare* en *H. bulbosum* is verscheidene malen bestudeerd, zowel van diploïde als van tetraploïde cytotypen. In tabel 11 wordt een samenvatting gegeven van het belangrijkste deel van de gepubliceerde resultaten. Hieraan zijn toegevoegd enige waarnemingen aan haploïde gerst en een paar resultaten van de bestudering van triploïde hybriden uit de kruising *H. vulgare* (2x) × *H. bulbosum* (4x). De resultaten van de verschillende auteurs stemmen goed met elkaar overeen hoewel er kleine verschillen zijn. Zo vond Staudt (1960) bijvoorbeeld voor twee in het wild voorkomende typen van *H. vulgare* en voor hun F_1 steeds zeven bivalenten, maar het percentage staafbivalenten was hoger dan normaal in deze soort is gevonden. De verschillen in de tetraploïde *H. vulgare* en *H. bulbosum*, alsmede in de triploïde hybriden kunnen zijn veroorzaakt doordat verschillende herkomsten zijn gebruikt (Morrison & Rajhathy, 1960). De uitwendige omstandigheden kunnen ook van invloed zijn, want hoewel von Berg (1936) en Morrison & Rajhathy (1960) vermeldden dat de uitwendige omstandigheden geen duidelijke invloed hebben, beschreef Davies (1956) uitgebreide resultaten van de bestudering van de meiose van tetraploïde *H. bulbosum* onder geconditioneerde omstandigheden bij vijf verschillende temperaturen. Het bleek dat de temperatuur een invloed

Tabel 11. Literatuuroverzicht van de meiose van *H. vulgare* (x, 2x en 4x), *H. bulbosum* (2x en 4x) en van hun triploïde hybride.
I = univalent, II = bivalent, III = trivalent en IV = quadrivalent.

Genoom formule	Aantal cellen	Configuraties/cel I	II	III	IV	Auteur(s)
V	71	6,9	0,06	—	—	Tometorp, 1939
	451	6,9	0,07	—	—	Clavier & Cauderon, 1951
VV	50	—	7,0	—	—	Cauderon & Cauderon, 1956
	24	—	7,0	—	—	Davies, 1956, 1958, 1960
	25	—	7,0	—	—	Morrison & Rajhathy, 1960
	611	—	7,0	—	—	Staudt, 1960 [1, 2]
VVVV	226	0,21	5,52	0,08	4,12	Tsuchiya, 1953 [1]
	23	0,44	5,30	0,61	3,78	Cauderon & Cauderon, 1956
	23	0,74	7,13	0,22	3,09	Davies, 1956, 1958
	125	0,3	5,8	0,1	3,9	Morrison & Rajhathy, 1960 [1]
BB	. [3]	—	7,0	—	—	Lein, 1948
	80	—	7,0	—	—	Davies, 1956, 1958
	50	—	7,0	—	—	Morrison & Rajhathy, 1960
BBBB	248	0,08	4,66	0,08	4,59	von Berg, 1936
	21	0,05	5,52	0,05	4,20	Chin, 1941
	50	0,22	5,58	0,10	4,08	Cauderon & Cauderon, 1956
	120	0,05	4,67	—	4,66	Davies, 1956, 1958, 1960
	200	0,1	5,6	0,2	3,9	Morrison & Rajhathy, 1960 [1]
VBB	1186	5,66	5,98	1,08	0,04	Konzak *et al.*, 1951 [1]
	600	5,5	5,5	1,4	0,1	Morrison & Rajhathy, 1959 [1]
	220	6,39	5,90	0,94	0,01	Davies, 1956, 1960 [1]
Genome symbol	Number of cells	I	II	III	IV	Source
		Configurations/cell				

[1] Gemiddelde van verscheidene planten / average of several plants.
[2] In het wild voorkomende typen van *H. vulgare* / wild types of *H. vulgare*.
[3] Auteur vermeldde geen aantal / author reported no number.

Table 11. Review of literature on the meiosis of *H. vulgare* (x, 2x and 4x), *H. bulbosum* (2x and 4x), and of their triploid hybrid.
I = univalent, II = bivalent, III = trivalent and IV = quadrivalent.

uitoefende op de chiasmafrequentie en daardoor op de paringsconfiguraties.

De tetraploïde *H. bulbosum* vertoont het beeld van een typische autotetraploïd. Het percentage quadrivalenten is zelfs iets hoger dan in autotetraploïde *H. vulgare*. Toch is de afloop van de reductiedeling zeer regelmatig, hetgeen het gevolg is van het optreden van één chiasma per arm en sterk geterminaliseerde chiasmata waardoor de configuraties in de anafase gemakkelijk uiteen gaan. De verlaagde

chiasmafrequentie die in de onderzoekingen van Davies (1956) optrad bij hoge temperatuur (30°C) had geen verdere verhoging van de meiotische stabiliteit tot gevolg. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door een evenwicht dat bestaat tussen de chiasmafrequentie en de configuraties.

In de twee gevallen dat de meiose van haploïde gerst kon worden bestudeerd (Tometorp, 1939; Clavier & Cauderon, 1951) bleek enige associatie van chromosomen in de metafase op te treden. De auteurs verklaarden dit door aan te nemen dat chiasmata werden gevormd in kleine homologe delen van overigens niet-homologe chromosomen.

De bij de triploïde hybriden verkregen resultaten zijn door verschillende auteurs geïnterpreteerd als een aanwijzing voor het weinig homoloog zijn van de chromosomen van de beide ouders (Konzak *et al.*, 1961; Morrison & Rajhathy, 1959; Davies, 1956 en 1960). De bivalenten zouden het gevolg zijn van autosyndese van de chromosomen van *H. bulbosum*, de trivalenten zouden ontstaan door allosyndese en de quadrivalenten zouden het gevolg zijn van een translocatie in één van de beide genomen van *H. bulbosum*. Ook homologie tussen kleine delen van niet-homologe chromosomen van *H. vulgare* die in de diploïde ouder niet tot paring zullen leiden, is genoemd als mogelijke oorzaak van de associatie (Davies, 1956 en 1960).

Walters (1954) presenteerde de resultaten van een uitgebreide bestudering van pseudo-bivalenten die optraden bij soortkruisingen in het geslacht *Bromus*. Deze bivalent-achtige configuraties ontstonden door matrixverbindingen; ze waren soms moeilijk van echte bivalenten te onderscheiden. Er zijn verschillende typen pseudo-bivalenten beschreven, alsmede een ander type configuratie welke waarschijnlijk dezelfde oorsprong heeft: de 'sticky' univalenten. De pseudo-bivalenten ontstonden na paring van homologe segmenten of van niet-homologe chromosomen. Over het algemeen waren de pseudo-bivalenten in de equator gecoöriënteerd, in tegenstelling tot de sticky univalenten die op een willekeurige plaats in de cel lagen. De chromosomen van een pseudo-bivalent gingen in de anafase uiteen, omdat ze naar de polen werden getrokken; de sticky univalenten vertoonden, evenals normale univalenten, geen normale beweging naar de polen. Het was niet mogelijk de frequentie van het optreden van pseudo-bivalenten te bepalen omdat alle overgangen tussen sticky univalenten en normale bivalenten naast elkaar voorkwamen.

Het optreden van pseudo-bivalenten is door Wagenaar (1959 en 1960) beschreven voor drie hybriden tussen *H. jubatum* (4x) en *Secale cereale* (2x) en voor een hybride tussen *H. jubatum* (4x) en *H. bulbosum* (4x). Vooral in de laatste hybride werd vastgesteld dat in de profase een goede, waarschijnlijk geheel autosyndetische paring optrad, waarbij echter weinig chiasmata werden gevormd. Dit had tot gevolg dat veel chromosomenassociaties in de metafase weer uiteenvielen in univalenten. Sommige bleven echter min of meer intact, hoewel geen chiasmata aanwezig waren. De verbinding leek te worden gevormd door de matrix. Ook in dit geval kon de coöriëntering al of niet normaal zijn, hetgeen volgens Wagenaar verband zou kunnen houden met de positie van de centromeren van de verbonden

chromosomen ten opzichte van elkaar. Een exact tegenover elkaar geplaatst zijn zou normale coöriëntatie tot gevolg hebben.

Materiaal en methoden

Het materiaal is afkomstig van de reeds eerder genoemde en beschreven rassen en herkomsten van *H. vulgare* en *H. bulbosum* en van de soorthybriden. Voor de samenstelling van de beschrijvingen van de karyotypen zijn chromosomenmetingen verricht in cellen van verscheidene rassen, herkomsten of hybriden. Hierbij is meestal uitgegaan van de veronderstelling dat kleine verschillen die zouden kunnen bestaan tussen de gebruikte rassen, herkomsten en hybriden wegvallen in de variabiliteit die het gevolg is van de meettechniek en het squashen. Bij de bestudering van het aantal nucleoli in het somatische weefsel en van de meiose zijn daarentegen de rassen, herkomsten en soorthybriden wel afzonderlijk onder nummer behandeld. De herkomst van het materiaal zal daarom bij de behandeling van deze resultaten steeds worden vermeld.

De metingen van de chromosomen zijn verricht in squashpreparaten van worteltopjes van pas gekiemde zaden, jonge planten of scheurstukjes van meerjarige klonen. De wortels zijn na isolering voorbehandeld met een oplossing van 8-hydroxychinoline (0,002 *M* in water), volgens Tjio & Levan (1950), gedurende 4-16 uur, meestal bij een temperatuur van ± 4° C. Vervolgens zijn de wortels gefixeerd in een mengsel van drie delen ethylalcohol (96 %) en één deel ijsazijn (soms is deze fixatie weggelaten), daarna gehydroliseerd gedurende 10 minuten in 1 *N* HCl bij 60° C en tenslotte gekleurd met basische fuchsine volgens Feulgen. Na het kleuren bleek het vaak wenselijk de wortels nog wat zachter te maken door behandeling met een oplossing van Pectinol (een pectinase bevattend handelsprodukt). De wortels werden gesquashed in azijnzuur (45 %). Veel preparaten werden permament gemaakt met Bradley's dampuitwisselingsmethode (1948).

De bepaling van het aantal nucleoli per cel is verricht aan preparaten die op dezelfde wijze zijn vervaardigd als voor de chromosomenmeting, alleen de voorbehandeling kon achterwege blijven. In de goed gekleurde preparaten zijn de nucleoli in de kernen in interfase zichtbaar als ongekleurde bollen. Per preparaat zijn 400 cellen geanalyseerd en per object tien preparaten, zodat het uiteindelijke resultaat berust op waarnemingen aan 4000 cellen. Doordat een groot aantal cellen per preparaat is geanalyseerd is een goed beeld verkregen van de verdeling in het gehele worteltopje, want meestal was het aantal analyseerbare cellen in het preparaat maar weinig hoger dan 400.

Bij het onderzoek van de meiose zijn fraaie resultaten verkregen met een door Wittmann (1965) beschreven methode. Hierbij werden de jonge meeldraden gesquashed in een oplossing van hematoxyline, ijzer-aluin en chloraal-hydraat in azijnzuur (45 %). Het permanent maken van deze preparaten gebeurde eveneens volgens de dampuitwisselingsmethode van Bradley (1948); er moest echter bij deze kleurmethode worden ontkleurd vóór de dampuitwisseling.

Beschrijving van de karyotypen

De karyotypen van ouders en hybriden zijn beschreven teneinde te onderzoeken in hoeverre de morfologie van de chromosomen verandert in de soorthybriden. Daarnaast zijn de beschrijvingen van karyotypen gebruikt om de chromosomensamenstelling vast te stellen van planten, die zijn ontstaan uit de tetraploïde hybriden na vegetatieve splitsing. De beschrijvingen zijn samengesteld aan de hand van chromosomenmetingen in cellen waarin de chromosomen in metafase verkeerden en goed gespreid, zo veel mogelijk los van elkaar, recht en vlak lagen. De meting werd uitgevoerd met een oculairschroefmicrometer (15 ×) en met een olie-immersie objectief (apochromaat 90 ×) Van ieder chromosoom zijn de beide armen en eventueel de satelliet gemeten. Alle metingen zijn in duplo verricht en nadien is het gemiddelde van de beide metingen als uiteindelijk meetresultaat genomen. Indien de beide metingen van een chromosoomarm meer dan 10 % van elkaar verschilden zijn twee nieuwe metingen verricht. Voor de onderlinge vergelijking van de metingen van verschillende cellen zijn de resultaten van de metingen omgerekend tot relatieve waarden, zodanig dat de lengte van iedere chromosoomarm is uitgedrukt als percentage van de lengte van alle chromosomen tezamen. Uit de op deze wijze verkregen waarden voor alle chromosomenarmen is de totale lengte van ieder chromosoom en de index (korte arm/lange arm) berekend. Ieder chromosoom werd aldus gekarakteriseerd door vier getallen: lengte lange arm, lengte korte arm, totale lengte en index, eventueel met toevoeging van een satelliet. Vervolgens moesten, per gemeten cel, de chromosomen worden geclassificeerd, hetgeen is uitgevoerd door visuele vergelijking. Daartoe zijn de waarden van de vier karakteriserende eigenschappen van ieder chromosoom van een gemeten cel uitgezet in twee diagrammen, zodanig dat twee van de eigenschappen in een diagram zijn samengevat, waarbij in dat diagram een chromosoom door een punt werd weergegeven. Langs de horizontale en de verticale assen werden in het eerste diagram de lengten van respectievelijk lange arm en korte arm uitgezet en in het tweede diagram de waarden van respectievelijk totale lengte en index. De diagrammen van alle gemeten cellen van een object zijn met elkaar vergeleken waarbij is gezocht naar regelmaat in de puntenverdeling. Op deze wijze zijn de chromosomen geclassificeerd, waarna alle chromosomen van één klasse hetzelfde nummer werd toegekend. Daarna is het gemiddelde van de aldus verkregen getallengroepen berekend; dit gemiddelde is bij de hierna volgende tabellarische beschrijvingen van de karyotypen weergegeven.

Teneinde een indruk te verkrijgen van de betrouwbaarheid van de classificatie zijn de getallengroepen waaruit de gemiddelden zijn berekend statistisch met elkaar vergeleken, waarbij is vastgesteld of een gemiddelde al of niet significant van een ander gemiddelde verschilde. Deze vergelijking is uitgevoerd binnen iedere karakteriserende eigenschap; de resultaten zijn toegevoegd aan de tabellarische beschrijvingen van de karyotypen.

De ouders

Van de ouders zijn slechts de karyotypen van de diploïde cytotypen beschreven. De algemene verschijningsvorm van de chromosomen in de tetraploïde cytotypen rechtvaardigde de veronderstelling dat het diploïde karyotype ook van toepassing is op de tetraploïden; daarom zijn geen metingen aan de tetraploïden verricht.

De beschrijving van het karyotype van *H. vulgare* is weergegeven in tabel 12 en berust op meting van de chromosomen in elf cellen van vier rassen van diploïde *H. vulgare:* Vinesco (3 cellen), Jumbo (1 cel), Proctor (6 cellen) en Balder (1 cel) en in 24 cellen van haploïde *H. vulgare:* de plant die was verkregen uit de kruising Balder × *H. bulbosum* (4x). De resultaten van de diploïde en haploïde typen van *H. vulgare* zijn samengevoegd nadat statistisch was vastgesteld dat ertussen geen significant verschil bestond (figuur 24).

Deze beschrijving vertoont een goede overeenkomst met hetgeen uit de literatuur bekend was (zie tabel 10). Voorts blijkt dat de meeste gemiddelden significant van elkaar verschillen. In bijna alle gevallen waarin er geen verschil is tussen twee chromosomen betreft het slechts één van de vier vergelijkingsmogelijkheden, zodat de chromosomen op basis van de overige drie eigenschappen nog duidelijk kunnen worden onderscheiden.

De chromosomen van *H. bulbosum* zijn met behulp van metingen goed van elkaar te onderscheiden. De beschrijving van het karyotype is weergegeven in tabel 13 en berust op meting van de chromosomen in 27 cellen van diploïde *H. bulbosum:* voornamelijk van de uit Svalöv verkregen klonen (figuur 24). Twee chromosomen zijn direct te herkennen, zij hebben beide een submediaan centromeer en één ervan draagt de satelliet; deze chromosomen kregen de nummers 6 en 7. De overige vijf chromosomen zijn gerangschikt volgens afnemende totale lengte; twee

Figuur 24. Chromosomen in mitose (1200 ×). 1. *H. vulgare* (2x); 2. *H. bulbosum* (2x).

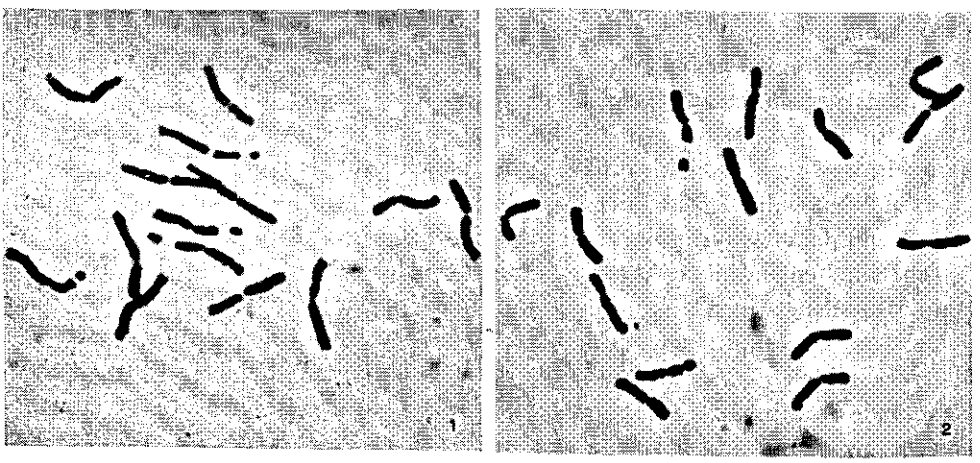


Figure 24. Chromosomes in mitosis (× 1200). 1. *H. vulgare* (2x); 2. *H. bulbosum* (2x).

Tabel 12. Beschrijving van het karyotype van *H. vulgare*. Chromosomenmeting in 11 cellen van *H. vulgare* (2x) en 24 cellen van *H. vulgare* (x). Chromosomenlengte als percentage van de totale lengte van alle chromosomen met inbegrip van de satellieten (één genoom V = 100 %); de index is korte arm/lange arm. Onderste deel van de tabel: statische vergelijking van de getallengroepen waaruit de gemiddelden zijn berekend. Linker helft: boven de diagonaal vergelijking van lange armen, onder de diagonaal korte armen; rechter helft: boven de diagonaal totale lengten, onder de diagonaal indexen. Symbolen: een punt = zeer significant verschil ($p \leqslant 0{,}01$), + = significant verschil ($0{,}01 < p \leqslant 0{,}05$), – = geen significant verschil. N.B. 6^+ en 7^+ betekent chromosoom 6 respectievelijk 7 plus satelliet.

Chromosoom nr.	Lange arm	Korte arm	Totale lengte	Index
1	9,03	7,00	16,04	0,78
2	8,26	6,97	15,24	0,84
3	7,56	6,77	14,34	0,90
4	7,89	6,03	13,92	0,77
5	7,23	5,06	12,29	0,70
6	6,94	4,24	11,19	0,61
6^+		6,56	13,50	0,95
7	9,05	4,04	13,10	0,45
7^+		5,60	14,65	0,62

Chromosome nr.	Long arm	Short arm	Total length	Index

	1	2	3	4	5	6	6^+	7	7^+
1		.	.	.	.	.	.	–	–
2	–		.	+	.	.	.	.	.
3	+	–		+	–	.	.	.	.
4	.	.	.		.	.	.	.	.
5	.	.	.	.		–	–	.	.
6	.	.	.	.	.		.	.	.
6^+	.	.	+	.	.	.		.	.
7	.	.	.	.	.	–	.		.
7^+	.	.	.	.	.	.	.	.	

	1	2	3	4	5	6	6^+	7	7^+
1		.	.	.	.	.	.	.	.
2	.		.	.	.	.	.	.	.
3	.	.		.	.	.	.	.	–
4	–	.	.		.	.	.	.	.
5	.	.	.	.		.	.	.	.
6	.	.	.	.	.		.	.	.
6^+	.	.	.	.	.	.		+	.
7	.	.	.	.	.	.	–		.
7^+	.	.	.	.	.	.	.	.	

Table 12. Description of the *H. vulgare* karyotype. Measurement of chromosomes in 11 cells of *H. vulgare* (2x) and 24 cells of *H. vulgare* (x). Length of chromosomes as percentage of total length of all chromosomes including satellites (one genome V = 100 %); index is short arm/long arm. Below: statistical comparison of the groups of figures from which the averages above are calculated. On the left above the diagonal comparison of long arms; below the diagonal, short arms; on the right above the diagonal, total lengths; below the diagonal, indices. Symbols: point = highly significant difference ($p \leqslant 0.01$), + = significant difference ($0.01 < p \leqslant 0.05$), – = no significant difference. N.B. 6^+ and 7^+ means chromosomes 6 and 7 plus respective satellites.

Tabel 13. Beschrijving van het karyotype van *H. bulbosum*. Chromosomenmeting in 27 cellen van *H. bulbosum* (2x). Voor verklaring zie tabel 12 (één genoom B = 100 %).

Chromosoom nr.	Lange arm	Korte arm	Totale lengte	Index
1	8,63	7,49	16,13	0,87
2	9,42	6,43	15,85	0,68
3	8,20	6,48	14,68	0,79
4	7,50	6,11	13,62	0,82
5	7,41	4,98	12,38	0,67
6	6,86	3,67	10,53	0,54
6⁺		6,40	13,25	0,93
7	9,73	4,35	14,07	0,45

Chromosome nr.	Long arm	Short arm	Total length	Index

	1	2	3	4	5	6	6⁺	7
1		.	.	.	.	.	.	.
2	.		.	.	.	.	.	+
3	.	–		.	.	.	.	.
4	.	.	.		–	.	.	.
5	.	.	.	.		.	.	.
6	.	.	.	.	.		.	.
6⁺	.	–	–	+	.	.		.
7	.	.	.	.	.	.	.	

	1	2	3	4	5	6	6⁺	7
1		–	.	.	.	.	.	.
2	.		.	.	.	.	.	.
3	.	.		.	.	.	.	.
4	+	.	–		.	.	+	+
5	.	–	.	.		.	.	.
6	.	.	.	.	.		.	.
6⁺	.	.	.	.	.	.		.
7	.	.	.	.	.	.	.	

Table 13. Description of the *H. bulbosum* karyotype. Measurement of chromosomes in 27 cells of *H. bulbosum* (2x). For explanation, see table 12 (one genome B = 100 %).

ervan (de nummers 2 en 5) hebben een vrijwel submediaan centromeer terwijl het centromeer van de resterende drie chromosomen in het mediane gebied is gelegen. Evenals bij *H. vulgare* verschillen de meeste gemiddelden significant van elkaar.

De hybriden

De classificatie van de chromosomen voor de samenstelling van de beschrijving van de karyotypen van de hybriden was iets moeilijker omdat daarbij veertien verschillende chromosomen naast elkaar voorkwamen. In de tetraploïden was het tevens moeilijk cellen te vinden waarin de chromosomen konden worden gemeten als gevolg van het grote aantal chromosomen. Toch bleek het mogelijk de beschrijvingen samen te stellen, vooral als gevolg van het feit dat de chromosomen van *H. bulbosum* in het geheel iets korter bleken te zijn dan die van *H. vulgare*, zodat de overlapping maar gedeeltelijk was.

De beschrijving van het karyotype van de diploïde hybride is weergegeven in tabel 14 en berust op meting van de chromosomen in 28 cellen van drie klonen:

Tabel 14. Beschrijving van het karyotype van diploïde hybriden uit de kruising *H. bulbosum* (2x) × *H. vulgare* (2x). Chromosomenmeting in 28 cellen. Voor verklaring zie tabel 12 (één genoom B + één genoom V = 100 %). De aanduiding van de chromosomennummers is dezelfde als in de oudersoorten.

Chromosoom nr.	Lange arm	Korte arm	Totale lengte	Index
H. bulbosum				
1	4,11	3,49	7,60	0,85
2	4,39	3,07	7,46	0,70
3	3,76	3,12	6,88	0,83
4	3,58	2,82	6,40	0,79
5	3,48	2,44	5,92	0,70
6	3,19	2,84	6,03	0,89
7	4,47	2,27	6,74	0,51
H. vulgare				
1	4,66	3,71	8,37	0,80
2	4,29	3,73	8,02	0,87
3	3,83	3,62	7,44	0,94
4	4,07	3,25	7,32	0,80
5	3,82	2,64	6,46	0,69
6	3,76	2,22	5,98	0,59
6⁺		3,64	7,40	0,97
7	4,64	2,28	6,92	0,49
7⁺		3,30	7,94	0,71

Chromosome nr.	Long arm	Short arm	Total length	Index

	H. bulbosum							*H. vulgare*								
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	6⁺	7	7⁺
H. bulbosum																
1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.
2	.		.	.	.	.	–	.	–	.	.	.	.	.	.	.
3	.	–		.	.	.	.	.	.	–	.	–	–	–	.	.
4	.	.	.		–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	–	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.
H. vulgare																
1	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	–	–
2	.	.	.	.	.	.	.	–		.	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.	.	+	.		.	–	–	–	.	.
4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		–	–	.	.
6	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.		.	.	.
6⁺	.	.	.	.	.	.	.	–	+	–	.	.	.		.	.
7	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	–	.		.
7⁺	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	

	H. bulbosum							*H. vulgare*								
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	6⁺	7	7⁺
H. bulbosum																
1		–	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	+	.	.
2	.		.	.	.	.	.	.	.	–	–	.	.	–	.	.
3	–	.		.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	–	.
4	.	.	+		.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.
5	.	–	.	.		–	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.
6	+	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	–	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	+	.
H. vulgare																
1	.	.	–	–	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.
2	–	.	+	.	.	–	.	.		.	.	.	.	.	.	–
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.		–	.	.	–	.	.
4	.	.	–	–	.	.	.	–	.	.		.	.	–	.	.
5	.	–	.	.	–	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.
6⁺	.	.	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.		.	.
7	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.		.
7⁺	.	–	.	.	–	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	

Table 14. Description of the karyotype of diploid hybrids from the cross *H. bulbosum* (2x) × *H. vulgare* (2x). Measurement of chromosomes in 28 cells. For explanation, see table 12 (one genome B + one genome V = 100 %). The numbering of chromosomes is the same as in the parental species.

de nummers HY 2001 (5 cellen), HY 2003 (16 cellen) en HY 2004 (7 cellen). De resultaten van de drie klonen zijn statistisch met elkaar vergeleken en vertoonden, behoudens een enkele uitzondernig, geen significante verschillen, zodat ze zijn samengevoegd tot één beschrijving van het karyotype van de diploïde hybriden. De enkele uitzonderingen betroffen voornamelijk HY 2001, hetgeen waarschijnlijk verband houdt met het geringe aantal metingen. De getallen zijn niet zonder meer te vergelijken met die van de ouders, omdat het relatieve waarden zijn. Deze vergelijking komt in de volgende paragraaf ter sprake. Er is echter één opvallend verschil: de satelliet van chromosoom 6 van *H. bulbosum* is niet als zodanig aanwezig (figuur 25). De secundaire insnoering van dit chromosoom treedt niet op en de lengte van de korte arm is vergelijkbaar met de lengte van de korte arm plus satelliet in *H. bulbosum*. Het onderste deel van de tabel is gedeeltelijk te vergelijken met dat van de tabellen van de ouders. Hieruit blijkt dat de betrouwbaarheid binnen de ouders en binnen de hybride ongeveer hetzelfde niveau heeft, maar als gevolg van kleine verschuivingen zijn het niet steeds dezelfde getallengroepen die wel of niet van elkaar verschillen.

De beschrijving van het karyotype van de triploïde hybride is weergegeven in tabel 15 en berust op meting van de chromosomen in 26 cellen van elf klonen: de nummers HY 3021 (1 cel), HY 3024 (2 cellen), HY 3029 (4 cellen), HY 3030 (3 cellen), HY 3035 (1 cel), HY 3037 (2 cellen), HY 3040 (2 cellen), HY 3058 (2 cellen), HY 3061 (2 cellen), HY 3067 (5 cellen) en HY 3078 (2 cellen). Gezien het geringe aantal waarnemingen per kloon zijn de klonen niet onderling vergeleken maar direct samengevoegd tot één beschrijving. Evenals in de diploïde hybride zijn de satellieten van de chromosomen 6 van *H. bulbosum* niet zichtbaar

Figuur 25. Chromosomen in mitose (1200 ×). 1. dipoïde hybride (VB); 2. triploïde hybride (VBB).

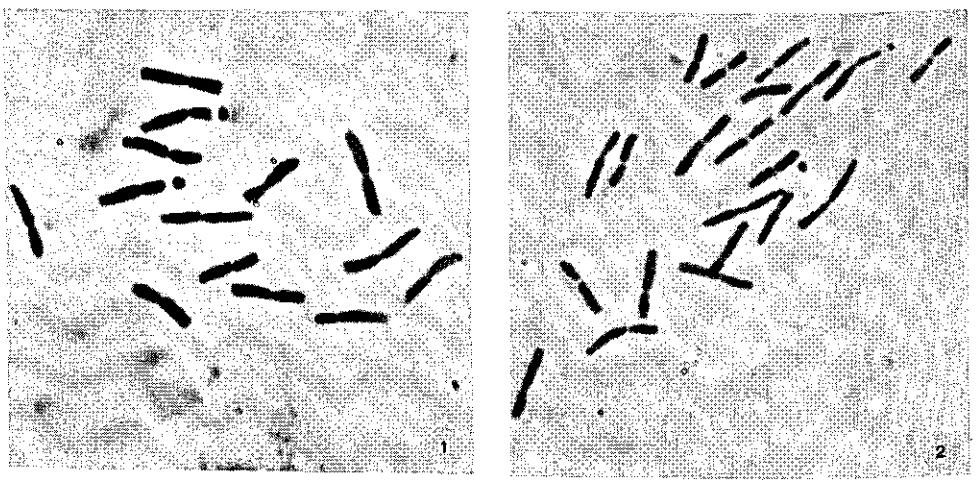


Figure 25. Chromosomes in mitosis (× 1200). 1. Diploid hybrid (VB); 2. Triploid hybrid (VBB).

Tabel 15. Beschrijving van het karyotype van triploïde hybriden uit de kruising *H. vulgare* (2x) × *H. bulbosum* (4x). Chromosomenmeting in 26 cellen. Voor verklaring zie tabel 12 (twee genomen B + één genoom V = 100 %). De aanduiding van de chromosomennummers is dezelfde als in de oudersoorten.

Chromosoom nr.	Lange arm	Korte arm	Totale lengte	Index
H. bulbosum				
1	2,69	2,38	5,07	0,89
2	2,90	2,04	4,94	0,71
3	2,57	2,07	4,64	0,81
4	2,33	1,84	4,17	0,79
5	2,29	1,58	3,87	0,69
6	2,16	1,91	4,07	0,89
7	3,02	1,52	4,54	0,51
H. vulgare				
1	3,36	2,66	6,02	0,80
2	3,11	2,65	5,76	0,85
3	2,85	2,60	5,45	0,91
4	2,83	2,26	5,09	0,80
5	2,64	1,80	4,44	0,68
6	2,65	1,61	4,26	0,61
6⁺		2,48	5,13	0,94
7	3,27	1,55	4,82	0,48
7⁺		2,27	5,54	0,70

Chromosome nr.	Long arm	Short arm	Total length	Index

	H. bulbosum							*H. vulgare*								
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	6⁺	7	7⁺
H. bulbosum																
1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	−	−	−	.	.
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	−	+	.	.	.	.	.
3	.	−	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	.
4	.	.	.	.	−	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H. vulgare																
1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+
2	.	.	.	.	.	.	.	−	.	.	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.	.	−	−	.	−	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	.	.	.	−	.	.	.	.	.	.	.	.	−	−	.	.
6	.	.	.	.	−	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6⁺	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	−	.	−	.	.	.	.	.	−	.	.	.
7⁺	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	−	.	.	.	.	.

	H. bulbosum							*H. vulgare*								
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	6⁺	7	7⁺
H. bulbosum																
1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	−	.	.	−	.	.
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.
3	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	.	.	−	.	.	+	.	.	.	.	.	.	−	.	.	.
5	.	−	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	−	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.
H. vulgare																
1	.	.	−	−	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	−	.	.	.	.	−	.	.	.	.	.	.	.	.	.	−
4	.	.	−	−	.	.	.	−	.	.	.	.	−	.	.	.
5	.	+	.	.	−	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6⁺	.	.	.	.	.	.	.	.	.	−	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7⁺	.	−	.	.	−	.	.	.	.	.	.	−	.	.	.	.

Table 15. Description of the karyotype of triploid hybrids from the cross *H. vulgare* (2x) × *H. bulbosum* (4x). Measurement of chromosomes in 26 cells. For explanation, see table 12 (two genomes B + one genome V = 100 %). The numbering of the chromosomes is the same as in the parental species.

(figuur 25). Uit de tabellen blijkt dat ook hier het niveau van de betrouwbaarheid ongeveer hetzelfde is, maar er zijn weer enkele kleine verschuivingen.

In tabel 16 is de beschrijving van het karyotype van de tetraploïde hybride weergegeven, welke beschrijving berust op meting van de chromosomen in twaalf cellen van vier klonen: de nummers HY 4001 (2 cellen), HY 4002 (4 cellen), HY 4005 (2 cellen) en HY 4008 (4 cellen). De eerste twee klonen hebben *H. bulbosum* als moederplant en de andere twee komen uit de reciproke kruising. Als gevolg van het geringe aantal waarnemingen zijn de klonen niet nauwkeurig met elkaar vergeleken, maar uit de gevonden cijfers blijkt geen verschil tussen de reciproke kruisingen. De betrouwbaarheid binnen de tetraploïde hybriden is iets minder dan in de andere groepen, maar toch nog voldoende om een beschrijving van het karyotype samen te stellen. Ook in deze hybriden zijn de satellieten van *H. bulbosum* niet als zodanig zichtbaar. De gegevens zijn vergelijkbaar met die van de diploïde hybride omdat bij de berekeningen eveneens de som van één genoom V plus één genoom B op 100 % is gesteld; de overeenkomst blijkt zeer groot te zijn.

De overige nakomelingen

In deze categorie vallen de planten die uit de tetraploïde hybriden zijn verkregen na vegetatieve eliminering van chromosomen, alsmede de diploïde planten die zijn verkregen uit kruisingen tussen de tetraploïde cytotypen van de oudersoorten en die waarschijnlijk eveneens door chromosomeneliminering zijn ontstaan. Er zijn twee verschillende typen: (1) een diploïde plant die is ontstaan uit een tetraploïde hybride (HY 4006) en die een hybride karakter heeft en (2) diploïde en tetraploïde planten die sterk lijken op *H. vulgare*.

De beschrijving van het karyotype van de plant van type 1 is weergegeven in tabel 17 en berust op meting van de chromosomen van acht cellen. Als gevolg van het aantal waarnemingen is de betrouwbaarheid niet zo groot als bij de voorgaande beschrijvingen. De overeenkomst met de diploïde hybriden is echter opvallend goed. Een toetsing tegen het karyotype van de diploïde hybride leverde geen significante verschillen op tussen de waarnemingen aan de overeenkomstige chromosomen. Hieruit wordt geconcludeerd dat in dit geval de eliminering van chromosomen heeft geresulteerd in een diploïde hybride.

De planten die hierboven zijn gegroepeerd als type 2 hebben met elkaar gemeen dat ze sterk lijken op *H. vulgare*. Er zijn diploïde planten die ofwel het cytoplasma van *H. vulgare* hebben (nummers HP en P) of dat van *H. bulbosum* (nummers HA en A), terwijl er verder een tetraploïde plant is met het plasma van *H. bulbosum* (HA 4003). Het karyotype van deze tetraploïd is beschreven aan de hand van de tetraploïde nakomelingschap van de oorspronkelijke plant. De karyotypen van de diploïden zijn gedeeltelijk aan de hand van de oorspronkelijke planten beschreven (bij de nummers HP 2004 en HA 2010) en voor het overige aan de hand van de nakomelingschap. In het totaal zijn de chromosomen gemeten van 28 cellen van acht diploïde nummers: HA 2001 (1 cel), HA 2003 (5 cellen), HP 2004 (4 cellen),

Tabel 16. Beschrijving van het karyotype van de tetraploïde hybriden uit reciproke kruisingen tussen *H. vulgare* (4x) en *H. bulbosum* (4x). Chromosomenmeting in 12 cellen. Voor verklaring zie tabel 12 (één genoom B + één genoom V = 100 %). De aanduiding van de chromosomennummers is dezelfde als in de oudersoorten.

Chromosoom nr.	Lange arm	Korte arm	Totale lengte	Index
H. bulbosum				
1	4,09	3,48	7,57	0,85
2	4,37	3,08	7,46	0,70
3	3,74	3,06	6,79	0,82
4	3,43	2,80	6,23	0,82
5	3,45	2,33	5,79	0,68
6	3,12	2,82	5,94	0,91
7	4,41	2,23	6,64	0,51
H. vulgare				
1	4,70	3,72	8,42	0,79
2	4,30	3,85	8,15	0,89
3	3,86	3,70	7,56	0,96
4	4,19	3,25	7,44	0,78
5	3,82	2,64	6,45	0,69
6	3,71	2,32	6,03	0,62
6⁺		3,71	7,42	1,00
7	4,88	2,28	7,17	0,47
7⁺		3,27	8,15	0,67

Chromosome nr.	Long arm	Short arm	Total length	Index

	H. bulbosum							*H. vulgare*								
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	6⁺	7	7⁺
H. bulbosum																
1		–	+	.	.	.	+	.	–	–	–	–	.	.	.	.
2	.		.	.	.	.	–	+	–	.	–	.	.	.	.	.
3	.	–		+	–	.	.	.	.	–	.	–	–	–	.	.
4	.	.	.		–	+	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.
5	.	.	.	.		+	.	.	.	.	.	+	–	–	.	.
6	.	.	.	–	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	–	.		+	–	.	–	.	.	.	.	.
H. vulgare																
1	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	–	–
2	.	.	.	.	.	.	.	+		.	–	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.	.	–	.		+	–	–	–	.	.
4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		+	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		–	–	.	.
6	.	.	.	.	–	.	–	.	.	.	.	.		.	.	.
6⁺	.	.	.	.	.	.	.	–	.	–	.	.	.		.	.
7	.	.	.	.	–	.	–	.	.	.	.	.	–	.		.
7⁺	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	

	H. bulbosum							*H. vulgare*								
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	6⁺	7	7⁺
H. bulbosum																
1		–	.	.	.	.	.	.	.	–	–	.		–	.	.
2	.		.	.	.	.	.	.	.	–	–	.	.	–	.	.
3	–	.		.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	–	.	–		.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
5	.	–	.	.		–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	–	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	+	.	.	.	.
H. vulgare																
1	.	.	–	–	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.
2	+	.	.	.	.	–	.	.		.	.	.	.	.	.	–
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.		–	.	.	–	.	.
4	.	.	+	+	.	.	.	–	.	.		.	.	–	.	.
5	.	–	.	.	–	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.
6⁺	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.		.	.
7	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.		.
7⁺	.	–	.	.	–	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	

Table 16. Description of the karyotype of tetraploid hybrids from reciprocal crosses between *H. vulgare* (4x) and *H. bulbosum* (4x). Measurement of chromosomes in 12 cells. For explanation, see table 12 (one genome B + one genome V = 100 %). The numbering of the chromosomes is the same as in the parental species.

Tabel 17. Beschrijving van het karyotype van een diploïde plant met hybride eigenschappen die is verkregen uit een tetraploïde hybride na vegetatieve eliminering van chromosomen. Chromosomenmeting in acht cellen. Voor verklaring zie tabel 12 (één genoom B + één genoom V = 100 %). De aanduiding van de chromosomennummers is dezelfde als in de oudersoorten.

Chromosoom nr.	Lange arm	Korte arm	Totale lengte	Index
H. bulbosum				
1	4,11	3,55	7,65	0,86
2	4,36	3,18	7,54	0,73
3	3,84	3,04	6,88	0,79
4	3,46	2,67	6,13	0,77
5	3,50	2,28	5,78	0,65
6	3,26	2,85	6,11	0,87
7	4,43	2,22	6,65	0,50
H. vulgare				
1	4,68	3,69	8,37	0,79
2	4,26	3,77	8,03	0,89
3	3,83	3,58	7,42	0,93
4	4,28	3,29	7,57	0,77
5	4,01	2,58	6,59	0,64
6	3,72	2,14	5,86	0,58
6⁺		3,49	7,22	0,94
7	4,82	2,24	7,06	0,46
7⁺		3,24	8,06	0,67

Chromosome nr.	Long arm	Short arm	Total length	Index

	H. bulbosum							*H. vulgare*								
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	6⁺	7	7⁺
H. bulbosum																
1		+	+	.	.	.	.	.	−	+	−	−	.	.	.	.
2	.		.	.	.	.	−	.	−	.	−	.	.	.	.	.
3	.	−		.	.	.	.	.	.	−	.	−	−	−	.	.
4	.	.	.		−	−	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.
5	.	.	.	.		−	.	.	.	.	.	.	−	−	.	.
6	.	.	−	−	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	−	.		+	−	.	−	.	.	.	.	.
H. vulgare																
1	−	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	−	−
2	+	.	.	.	.	.	.	−		.	−	+	.	.	.	.
3	−	.	.	.	.	.	.	−	−		.	−	−	−	.	.
4	+	−	+	.	.	.	.	.	.	.		+	.	.	.	.
5	.	.	.	−	.	.	.	.	.	.	.		+	+	.	.
6	.	.	.	.	−	.	−	.	.	.	.	.		.	.	.
6⁺	−	.	.	.	.	.	.	−	.	−	−	.	.		.	.
7	.	.	.	.	−	.	−	.	.	.	.	.	−	.		.
7⁺	.	−	−	.	.	.	.	.	.	.	−	.	.	+	.	

	H. bulbosum							*H. vulgare*								
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	6⁺	7	7⁺
H. bulbosum																
1		−	.	.	.	.	.	.	+	−	−	.	.	+	.	+
2	.		.	.	.	.	.	.	.	−	−	.	.	−	.	.
3	+	−		.	.	.	−	.	.	.	.	−	.	−	−	.
4	.	−	−		+	−	.	.	.	.	.	.	−	.	.	.
5	.	.	.	.		−	.	.	.	.	.	.	−	.	.	.
6	−	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	−	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	−	.	.	+	.
H. vulgare																
1	+	−	−	−	.	.	.		−	.	.	.	.	.	.	−
2	−	.	.	.	.	−	.	.		.	.	.	.	.	.	−
3	+	.	.	.	.	−	.	.	−		−	.	.	−	+	.
4	.	−	−	−	.	.	.	−	.	.		.	.	+	.	.
5	.	.	.	.	−	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.
6	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	−		.	.	.
6⁺	.	.	.	.	.	+	.	.	−	−	.	.	.		−	.
7	.	.	.	.	.	.	−	.	.	.	.	.	.	.		.
7⁺	.	−	.	.	−	.	.	.	.	.	.	−	.	.	.	

Table 17. Description of the karyotype of a diploid plant with hybrid characters which was obtained from a tetraploid hybrid after vegetative elimination of chromosomes. Measurement of chromosomes in eight cells. For explanation, see table 12 (one genome B + one genome V = 100 %). The numbering of the chromosomes is the same as in the parental species.

HP 2005 (6 cellen), HA 2010 (4 cellen), A 2001 (4 cellen), P 2001 (3 cellen) en P 2002 (1 cel), alsmede van acht cellen van de tetraploïde HA 4003. Er zijn, behoudens enkele uitzonderingen, geen significante verschillen tussen de karyotypen van de diploïde nummers gevonden. Hierbij is speciale aandacht besteed aan de vergelijking van de nummers met het cytoplasma van *H. vulgare* enerzijds en die met het cytoplasma van *H. bulbosum* anderzijds, maar ook hier konden geen verschillen in de relatieve waarden worden aangetoond. Daarom zijn de gegevens tenslotte samengevoegd tot één beschrijving van het karyotype van de diploïden en één van het karyotype van de tetraploïd. De beschrijvingen zijn weergegeven in tabel 18. Het blijkt dat veel overeenkomst bestaat met het karyotype van *H. vulgare* zodat wordt geconcludeerd dat door vegetatieve eliminering van chromosomen uit de tetraploïde hybriden planten zijn ontstaan met uitsluitend chromosomen van *H. vulgare*. Het ontstaan van de op *H. vulgare* lijkende tetraploïd kan slechts worden verklaard door aan te nemen dat na de eliminering van de chromosomen van *H. bulbosum* een spontane verdubbeling van de overgebleven chromosomen van *H. vulgare* heeft plaatsgevonden.

Vergelijking van de karyotypen

Als gevolg van de toegepaste methode, waarbij de afmetingen van de chromosomen worden weergegeven in relatieve waarden, kan alleen worden gezegd of de chromosomen ten opzichte van elkaar veranderen. Een eventuele verandering in de mate van contractie, die op alle chromosomen van een genoom in relatieve zin hetzelfde effect heeft, kan op deze wijze niet worden waargenomen. Het is echter mogelijk na te gaan of de chromosomen van de beide ouders in dezelfde onderlinge verhoudingen terugkomen in de hybriden. Daartoe zijn de relatieve waarden omgerekend op eenzelfde vergelijkingsbasis, zodanig dat de totale lengte van de zeven chromosomen van een genoom steeds 50 % bedraagt. Deze omgerekende waarden zijn weergegeven in de tabellen 19 tot en met 21; in tabel 22 wordt een samenvatting gegeven van de indexen. Het blijkt dat de overeenkomst tussen de karyotypen van de verschillende objecten zeer goed is, zodat wordt geconcludeerd dat de relatieve lengteverdeling binnen een genoom niet wordt beïnvloed door hybridisatie. De hybridisatie heeft wel invloed op het zichtbaar zijn van de satellieten en wel zodanig dat in alle hybriden de satelliet van chromosoom 6 van *H. bulbosum* niet te zien is doordat de secundaire insnoering niet optreedt. De beide satellieten van *H. vulgare* worden in de hybriden teruggevonden.

Tenslotte kan de lengteverhouding tussen de chromosomen van *H. vulgare* en die van *H. bulbosum* in de hybriden worden berekend. De genoomindex (totale chromosomenlengte van een genoom van *H. bulbosum* gedeeld door die van een genoom van *H. vulgare*) bedraagt voor de diploïde, triploïde en tetraploïde hybriden respectievelijk 0,89, 0,84 en 0,87, en voor de vegetatieve nakomeling met hybride eigenschappen (type 1) 0,88. Deze waarden komen goed met elkaar overeen, hoewel opvalt dat in de triploïde hybride een iets afwijkende waarde wordt

Tabel 18. Beschrijving van de karyotypen van diploïde en tetraploïde, op *H. vulgare* lijkende planten die zijn verkregen uit tetraploïde hybriden na vegetatieve eliminering van chromosomen en uit reciproke kruisingen tussen *H. vulgare* (4x) en *H. bulbosum* (4x), vermoedelijk eveneens na vegetatieve eliminering van chromosomen. Chromosomenmeting in 28 diploïde cellen en in 8 tetraploïde cellen van de oorspronkelijke planten of van hun nakomelingen. Voor verklaring zie tabel 12 (één genoom V = 100 %). De aanduiding van de chromosomennummers is dezelfde als in *H. vulgare*.

Chromosoom nr.	Lange arm	Korte arm	Totale lengte	Index
Diploïd				
1	8,63	6,85	15,48	0,79
2	8,01	7,11	15,12	0,89
3	7,44	6,67	14,11	0,90
4	7,84	6,18	14,01	0,79
5	7,11	5,25	12,36	0,74
6	6,83	4,42	11,24	0,65
6⁺		7,13	13,96	1,04
7	8,79	4,32	13,11	0,49
7⁺		6,17	14,96	0,70
Tetraploïd				
1	8,84	6,86	15,70	0,78
2	8,09	7,04	15,12	0,87
3	7,38	6,68	14,06	0,90
4	7,75	6,21	13,96	0,80
5	7,05	5,50	12,55	0,78
6	6,92	4,37	11,29	0,63
6⁺		6,94	13,86	1,00
7	8,68	4,30	12,98	0,49
7⁺		6,07	14,75	0,70

Chromosome nr.	Long arm	Short arm	Total length	Index

Diploïd (alle eigenschappen / all characters)

	1	2	3	4	5	6	6⁺	7	7⁺
1		.	.	.	.	.	.	–	–
2	.		.	+	.	.	.	.	.
3	+	.		.	.	.	.	.	.
4	.	.	.		.	.	.	.	.
5	.	.	.	.		.	.	.	.
6	.	.	.	.	.		.	.	.
6⁺	.	.	.	.	.	.		.	.
7	.	.	.	.	.	–	.		.
7⁺	.	.	.	.	.	.	.	.	

	1	2	3	4	5	6	6⁺	7	7⁺
1		.	.	.	.	.	.	.	.
2	.		.	.	.	.	.	.	–
3	.	–		–	.	.	–	.	.
4	–	.	.		.	.	–	.	.
5	.	.	.	.		.	.	.	.
6	.	.	.	.	.		.	.	.
6⁺	.	–	.	.	.	.		.	.
7	.	.	.	.	.	.	.		.
7⁺	.	.	.	–	.	.	.	.	

Tetraploïd (alle eigenschappen / all characters)

	1	2	3	4	5	6	6⁺	7	7⁺
1		.	.	.	.	.	.	–	–
2	+		.	.	.	.	.	.	.
3	–	.		.	.	.	.	.	.
4	.	.	.		.	.	.	.	.
5	.	.	.	.		–	–	.	.
6	.	.	.	.	.		.	.	.
6⁺	–	–	+	.	.	.		.	.
7	.	.	.	.	.	–	.		.
7⁺	.	.	.	–	.	.	.	.	

	1	2	3	4	5	6	6⁺	7	7⁺
1		.	.	.	.	.	.	.	.
2	.		.	.	.	.	.	.	+
3	.	–		–	.	.	–	.	.
4	–	.	.		.	.	–		
5	–	.	.	–		.	.	+	.
6	.	.	.	.	.		.	.	.
6⁺	.	.	.	.	.	.		.	.
7	.	.	.	.	.	.	.		.
7⁺	.	.	.	.	.	.	.	.	

Table 18. Description of the karyotypes of diploid and tetraploid plants which resemble *H. vulgare* and which were obtained from tetraploid hybrids by vegetative elimination of chromosomes and from reciprocal crosses between *H. vulgare* (4x) and *H. bulbosum* (4x), probably also after vegetative elimination of chromosomes. Measurement of chromosomes in 28 diploid cells and in 8 tetraploid cells of the original plants or of their progeny. For explanation, see table 12 (one genome V = 100 %). The numbering of the chromosomes is the same as in *H. vulgare*.

Tabel 19. Vergelijking van de lange armen van chromosomen van de oudersoorten, de hybriden en de planten die zijn verkregen na vegetatieve eliminering van chromosomen. De gegevens van de tabellen 12 tot en met 18 zijn herberekend op eenzelfde vergelijkingsbasis waarbij één genoom B = 50 % en één genoom V = 50 %. Type 1 en type 2 van de overige nakomelingen zijn de planten waarvan het karyotype is beschreven in de tabellen 17 respectievelijk 18.

Chromosoom nr.	Oudersoorten	Hybriden			Overige nakomelingen		
		2x	3x	4x	type 1	type 2 (2x)	type 2 (4x)
H. bulbosum							
1	4,32	4,37	4,30	4,41	4,40		
2	4,71	4,67	4,63	4,71	4,66		
3	4,10	4,00	4,11	4,03	4,11		
4	3,75	3,81	3,72	3,69	3,70		
5	3,70	3,70	3,66	3,72	3,74		
6	3,43	3,39	3,45	3,36	3,49		
7	4,86	4,75	4,82	4,75	4,74		
H. vulgare							
1	4,52	4,40	4,49	4,39	4,39	4,32	4,42
2	4,13	4,05	4,15	4,01	4,00	4,01	4,04
3	3,78	3,62	3,81	3,60	3,60	3,72	3,69
4	3,95	3,84	3,78	3,91	4,02	3,92	3,88
5	3,62	3,61	3,53	3,56	3,76	3,55	3,53
6	3,47	3,55	3,54	3,46	3,49	3,41	3,46
7	4,53	4,38	4,37	4,55	4,53	4,39	4,34
Chromosome nr.	Parental species	2x	3x	4x	type 1	type 2 (2x)	type 2 (4x)
		Hybrids			Remaining progenies		

Table 19. Comparison of the long arms of chromosomes of the parental species, hybrids, and plants obtained after vegetative elimination of chromosomes. The data of tables 12 to 18 are recalculated to make the data comparable: one genome B = 50 % and one genome V = 50 %. Types 1 and 2 of the remaining progenies are the plants whose karyotype has been described in tables 17 and 18, respectively.

gevonden, terwijl dit de enige vorm is met een afwijkende genomenverhouding. Het is echter de vraag of dit relatief kleine verschil reëel is.

Onderzoekingen aan nucleoli

Toen uit de bestudering van de morfologie van de chromosomen was gebleken dat in de hybriden amfiplastie optrad, is besloten na te gaan in hoeverre dit verschijnsel was terug te vinden in het aantal nucleoli per cel. Hierbij is uitgegaan van de hypothese dat alle satellietchromosomen in staat moeten worden geacht een nucleolus te vormen. Het maximum aantal nucleoli per cel moet dan overeenkomen met het aantal satellietchromosomen. Dit maximum zal echter veelal niet worden bereikt doordat waarschijnlijk niet alle satellietchromosomen steeds

Tabel 20. Vergelijking van de korte armen van chromosomen van de oudersoorten, de hybriden en de planten die zijn verkregen na vegetatieve eliminering van chromosomen. Voor verklaring zie tabel 19.

Chromosoom nr.	Oudersoorten	Hybriden			Overige nakomelingen		
		2x	3x	4x	type 1	type 2 (2x)	type 2 (4x)
H. bulbosum							
1	3,75	3,71	3,80	3,75	3,80		
2	3,21	3,26	3,26	3,32	3,40		
3	3,24	3,32	3,31	3,30	3,25		
4	3,06	3,00	2,94	3,02	2,86		
5	2,49	2,59	2,52	2,51	2,44		
6	3,20	3,02	3,05	3,04	3,05		
7	2,17	2,41	2,43	2,40	2,37		
H. vulgare							
1	3,50	3,50	3,55	3,47	3,46	3,42	3,43
2	3,49	3,52	3,54	3,59	3,54	3,55	3,52
3	3,39	3,42	3,47	3,45	3,36	3,34	3,34
4	3,01	3,07	3,02	3,03	3,09	3,09	3,10
5	2,53	2,49	2,40	2,46	2,42	2,62	2,75
6	2,12	2,10	2,15	2,16	2,01	2,21	2,18
6+	3,28	3,44	3,31	3,46	3,28	3,56	3,47
7	2,02	2,15	2,07	2,13	2,10	2,16	2,15
7+	2,80	3,12	3,03	3,05	3,04	3,08	3,04
Chromosome nr.	Parental species	2x	3x	4x	type 1	type 2 (2x)	type 2 (4x)
		Hybrids			Remaining progenies		

Table 20. Comparison of the short arms of chromosomes of the parental species, hybrids, and plants obtained after vegetative elimination of chromosomes. For explanation, see table 19.

een nucleolus vormen en doordat gedurende de ontwikkelingscyclus van een cel, van deling tot deling, nucleoli kunnen versmelten. Teneinde van deze waarschijnlijk variabele situatie een betrouwbare indruk te verkrijgen is per worteltopje een groot aantal cellen geanalyseerd en zijn per object, op deze wijze, tien topjes bekeken (zie pagina 74). Er is naar gestreefd de verschillende behandelingen van plantopkweek en fixatie zoveel mogelijk op overeenkomstige wijze uit te voeren.

Uit de analyses van de preparaten zijn twee gegevens per object verkregen die daarna onderling zijn vergeleken. In de eerste plaats het gemiddeld aantal nucleoli per cel (tabel 23) en ten tweede de frequentieverdeling van cellen met een bepaald aantal nucleoli per cel, uitgedrukt in procenten van het totaal aantal cellen (figuur 26). Uit de figuren is eveneens het maximum aantal nucleoli per cel af te lezen zoals dat voor ieder object werd waargenomen.

Naast enkele herkomsten van ouderplanten en enkele hybriden, beide op verschillende ploïdie-niveaus, zijn drie op *H. vulgare* lijkende nakomelingen uit krui-

Tabel 21. Vergelijking van de totale lengten van chromosomen van de oudersoorten, de hybriden en de planten die zijn verkregen na vegetatieve eliminering van chromosomen. Voor verklaring zie tabel 19.

Chromosoom nr.	Oudersoorten	Hybriden			Overige nakomelingen		
		2x	3x	4x	type 1	type 2 (2x)	type 2 (4x)
H. bulbosum							
1	8,07	8,08	8,10	8,15	8,18		
2	7,92	7,93	7,89	8,04	8,07		
3	7,34	7,31	7,42	7,31	7,36		
4	6,81	6,80	6,66	6,71	6,56		
5	6,19	6,29	6,18	6,24	6,18		
6	6,63	6,41	6,50	6,40	6,54		
7	7,03	7,17	7,25	7,15	7,11		
H. vulgare							
1	8,02	7,90	8,04	7,86	7,86	7,74	7,85
2	7,62	7,57	7,69	7,60	7,54	7,56	7,56
3	7,17	7,03	7,28	7,05	6,97	7,06	7,03
4	6,96	6,91	6,80	6,94	7,11	7,01	6,98
5	6,15	6,10	5,93	6,02	6,19	6,18	6,28
6	5,60	5,65	5,69	5,63	5,50	5,62	5,64
6+	6,75	6,99	6,85	6,92	6,78	6,98	6,93
7	6,55	6,53	6,44	6,69	6,63	6,56	6,49
7+	7,32	7,50	7,40	7,60	7,57	7,48	7,38
Chromosome nr.	Parental species	2x	3x	4x	type 1	type 2 (2x)	type 2 (4x)
		Hybrids			Remaining progenies		

Table 21. Comparison of the total lengths of chromosomes of the parental species, hybrids, and plants obtained after vegetative elimination of chromosomes. For explanation, see table 19.

singen tussen tetraploïde cytotypen van de oudersoorten bestudeerd, evenals de haploïde *H. vulgare* uit de kruising *H. vulgare* (2x) × *H. bulbosum* (4x). Bij de haploïd en de hybriden zijn de waarnemingen verricht aan worteltopjes van de uit de kruising verkregen plant; bij de diploïden zijn kiemwortels gebruikt: voor object A 2000 van zaden geoogst op de planten A 2001 tot en met A 2003, voor P 2000 van zaden geoogst op de planten P 2001 tot en met P 2006 en voor HP 2005 van zaden geoogst op nakomelingen van HP 2005.

Uit de resultaten blijkt dat, behoudens bij de triploïde hybriden, het maximum aantal nucleoli steeds overeenkomt met het aantal satellietchromosomen. Bij de triploïde hybriden worden in 0,2 % van de cellen drie nucleoli gevonden. Voorts blijkt dat in de oudersoorten een verdubbeling van het aantal chromosomen steeds leidt tot een verdubbeling van het maximum aantal nucleoli per cel en min of meer tot een verdubbeling van het gemiddeld aantal nucleoli per cel. De haploïd heeft echter een hoger gemiddeld aantal nucleoli per cel dan de helft van het aantal in

Tabel 22. Vergelijking van de indexen van chromosomen van de oudersoorten, de hybriden en de planten die zijn verkregen na vegetatieve eliminering van chromosomen. Samenvatting van de gegevens van de tabellen 12 tot en met 18. Type 1 en type 2 van de overige nakomelingen zijn de planten waarvan het karyotype is beschreven in de tabellen 17 respectievelijk 18.

Chromosoom nr.	Oudersoorten	Hybriden			Overige nakomelingen		
		2x	3x	4x	type 1	type 2 (2x)	type 2 (4x)
H. bulbosum							
1	0,87	0,85	0,89	0,85	0,86		
2	0,68	0,70	0,71	0,70	0,73		
3	0,79	0,83	0,81	0,82	0,79		
4	0,82	0,79	0,79	0,82	0,77		
5	0,67	0,70	0,69	0,68	0,65		
6	0,93	0,89	0,89	0,91	0,87		
7	0,45	0,51	0,51	0,51	0,50		
H. vulgare							
1	0,78	0,80	0,80	0,79	0,79	0,79	0,78
2	0,84	0,87	0,85	0,89	0,89	0,89	0,87
3	0,90	0,94	0,91	0,96	0,93	0,90	0,90
4	0,77	0,80	0,80	0,78	0,77	0,79	0,80
5	0,70	0,69	0,68	0,69	0,64	0,74	0,78
6	0,61	0,59	0,61	0,62	0,58	0,65	0,63
6+	0,95	0,97	0,94	1,00	0,94	1,04	1,00
7	0,45	0,49	0,48	0,47	0,46	0,49	0,49
7+	0,62	0,71	0,70	0,67	0,67	0,70	0,70
Chromosome nr.	Parental species	2x	3x	4x	type 1	type 2 (2x)	type 2 (4x)
		Hybrids			Remaining progenies		

Table 22. Comparison of the indices of chromosomes of the parental species, hybrids, and plants obtained after vegetative elimination of chromosomes. Data from tables 12 to 18. Types 1 and 2 of the remaining progenies are the plants whose karyotype has been described in the tables 17 and 18, respectively.

de diploïde *H. vulgare*. Zeer opvallend is de overeenkomst tussen haploïde *H. vulgare* en diploïde *H. bulbosum* en tussen diploïde *H. vulgare* en tetraploïde *H. bulbosum*. Dit zou er op kunnen wijzen dat in de beide soorten de relatie tussen satellietchromosomen en nucleoli op dezelfde wijze tot uitdrukking komt.

In de diploïde en de triploïde hybriden lijkt een duidelijke invloed van de chromosomen van *H. bulbosum* te bestaan. Volgens het chromosomenbeeld zouden deze hybriden zich evenzo moeten gedragen als de haploïde *H. vulgare* maar er zijn meer nucleoli. In de tetraploïde hybriden zijn eveneens meer nucleoli aanwezig dan bij diploïde *H. vulgare*, maar dit verschil is veel geringer. De tetraploïde hybride gedraagt zich dus niet, zoals bij de oudersoorten, als een eenvoudige verdubbeling van de diploïde hybride. Hierbij kan echter hetzelfde effect dat bij de vergelijking van haploïde en diploïde *H. vulgare* werd gevonden een rol spelen,

Tabel 23. Gemiddeld aantal nucleoli per cel in somatisch weefsel.

Materiaal genoom formule	nummer	Soorten en kruisingen	Gemiddeld aantal nucleoli/cel
V		Balder (2x) × BBBB 4029	1,04
VV	Jumbo (2x)	*H. vulgare* (2x)	1,91
	Atlas (2x)	*H. vulgare* (2x)	1,87
	Balder (2x)	*H. vulgare* (2x)	1,85
VV	A 2000	BBBB × Jumbo (4x)	1,95
	P 2000	Atlas (4x) × BBBB	1,87
	HP 2005	Atlas (4x) × BBBB 4047	1,95
VVVV	Jumbo (4x)	*H. vulgare* (4x)	3,83
	Atlas (4x)	*H. vulgare* (4x)	3,83
	Balder (4x)	*H. vulgare* (4x)	3,83
BB	BB 2032	*H. bulbosum* (2x)	1,08
BBBB	BBBB 4006	*H. bulbosum* (4x)	2,03
	BBBB 4046	*H. bulbosum* (4x)	1,91
	BBBB 4095	*H. bulbosum* (4x)	2,08
VB	HY 2001	BB 2027 × Jumbo (2x)	1,40
	HY 2003	BB 2027 × Jumbo (2x)	1,24
	HY 2004	BB 2032 × Jumbo (2x)	1,25
VBB	HY 3038	Balder (2x) × BBBB 4095	1,33
	HY 3052	BBBB 4046 × Balder (2x)	1,25
VVBB	HY 4001	BBBB 4070 × Atlas (4x)	2,08
	HY 4005	Atlas (4x) × BBBB 4047	1,99
	HY 4008	Atlas (4x) × BBBB 4006	1,99
genome symbol	nr.		Average number of nucleoli/cell
Material		Species and crosses	

Table 23. Average number of nucleoli per cell in somatic tissue.

maar dit effect lijkt niet de oorzaak te kunnen zijn van het gehele verschil; vooral de chromosomen van *H. bulbosum* zullen hierbij hun invloed doen gelden. De op *H. vulgare* lijkende nakomelingen van kruisingen tussen de tetraploïde cytotypen van de oudersoorten gedragen zich geheel als *H. vulgare*.

Het is denkbaar dat het cytoplasma invloed heeft op de nucleolusvorming, maar de resultaten zijn tegenstrijdig, zodat eventuele beïnvloeding niet blijkt. Bij de tetraploïde hybriden heeft die met het plasma van *H. bulbosum*, HY 4002, iets meer nucleoli dan de overige twee, maar bij de triploïden is het juist andersom, daar heeft de hybride met het plasma van *H. bulbosum*, HY 3052, minder nucleoli dan de andere. Ook bij de op *H. vulgare* lijkende diploïde planten blijkt niets van

in de M I uit te drukken in een getal. Meestal wordt hiervoor de chiasmafrequentie gebruikt, maar het was in dit materiaal niet mogelijk deze nauwkeurig te bepalen omdat in sommige gevallen pseudo-chiasmata optraden en omdat het veelal niet mogelijk was te zien of een verbinding door één of meer chiasmata tot stand was gekomen. Daarom is uit de configuraties het aantal gebonden armen per cel berekend, dat wil zeggen, het aantal armen, dat aan een andere chromosoomarm was gebonden. Bij veel configuraties komt dit getal overeen met tweemaal het minimum aantal chiasmata dat nodig is om deze configuratie te vormen. Het is een kunstmatig getal dat slechts dient om een indruk te geven van de mate van associatie. Bij de bepaling van dit getal is buiten beschouwing gelaten of een verbinding tot stand kwam door een chiasma of door een pseudo-chiasma.

De ouders

Het gedetailleerde onderzoek van de reductiedeling van de ouders is beperkt tot de M I, de resultaten zijn samengevat in tabel 24. Bij diploïde *H. vulgare* werden bijna steeds 7 II gevormd en slechts enkele univalenten. Het merendeel van de bivalenten bestond uit ringbivalenten, terwijl in ruim 20 % van de cellen één of

Tabel 24. Associatie van chromosomen in de eerste metafase (M I) van diploïde en tetraploïde *H. vulgare* en *H. bulbosum*, uitgedrukt in gemiddelde configuratiefrequentie per cel en aantal gebonden armen per cel. I = univalent, II = bivalent, III = trivalent en IV = quadrivalent.

Genoom formule	Materiaal	Aantal cellen	Configuraties/cel I	II	III	IV	Gebonden armen/cel
VV	Jumbo (2x)	2026	0,007	7,00	—	—	27,32
	Wong (2x)	949	—	7,00	—	—	27,52
	Riniker (2x)	350	0,006	7,00	—	—	27,53
	Proctor (2x)	200	—	7,00	—	—	27,59
	totaal / total	3525	0,005	7,00	—	—	27,41
VVVV	Jumbo (4x)	82	0,15	6,91	0,07	3,45	52,22
	Hâtif Bonte (4x)	17	0,94	5,13	0,82	3,59	48,47
	totaal / total	99	0,28	6,61	0,20	3,47	51,58
BB	mengsel / mixture	1560	0,004	7,00	—	—	27,32
BBBB	mengsel / mixture	160	0,17	5,90	0,14	3,90	52,59
Genome symbol	Material	Number of cells	I Configurations/cell	II	III	IV	Bound arms/cell

Table 24. Association of chromosomes in metaphase I (M I) of diploid and tetraploid *H. vulgare* and *H. bulbosum*, expressed as average frequency of configurations per cell and number of bound arms per cell. I = univalent, II = bivalent, III = trivalent and IV = quadrivalent. Bound arms refers to arms with any chiasmata.

zelden meer staafbivalenten werden gevormd. Uit het aantal gebonden armen per cel valt op te maken dat in het ras Jumbo iets vaker staafbivalenten optraden dan in de andere rassen. Het verdere verloop van de reductiedeling was zeer regelmatig. De diploïde *H. bulbosum* vertoonde eenzelfde beeld als de diploïde *H. vulgare* (figuur 27).

De beide tetraploïde ouders vertoonden eveneens een overeenkomstig beeld. De associatie van chromosomen in de M I was goed, maar niet zo sterk als in de diploïden, hetgeen blijkt uit het aantal gebonden armen per cel, dat minder dan twee maal zoveel was als dat van de diploïden. Het aantal univalenten per cel was hoger dan het aantal trivalenten, waaruit blijkt dat univalenten niet alleen tot stand kwamen doordat in plaats van een quadrivalent een trivalent en een univalent werd gevormd, maar eveneens doordat twee univalenten ontstonden in plaats van een bivalent. De A I verliep minder regelmatig dan in de diploïden. De univalenten konden een oorzaak zijn van aneuploïde cellen; ze bleven achter in de equator en gingen dan vaak vervroegd beginnen aan de tweede deling. Soms gingen multi-

Figuur 27. Meiose in oudersoorten (1400 ×). 1. *H. vulgare* (2x): 7 II; 2. *H. bulbosum* (2x): 7 II; 3. *H. vulgare* (4x): 4 II + 5 IV; 4. *H. bulbosum* (4x): 6 II + 4 IV.

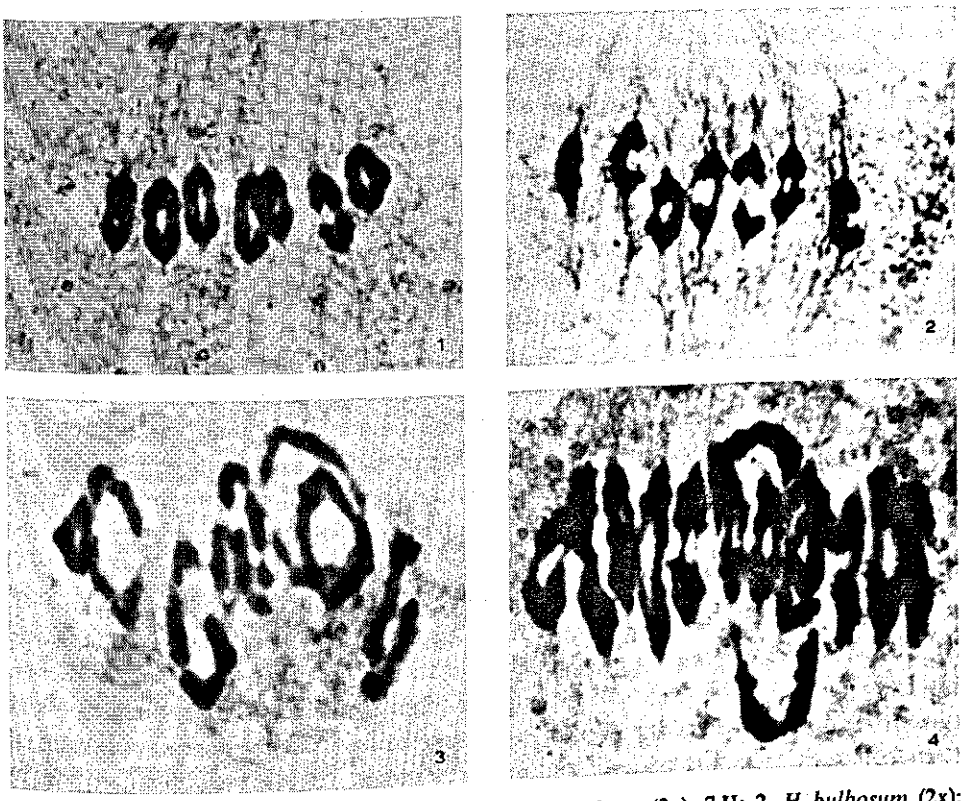


Figure 27. Meiosis in parental species (× 1400). 1. *H. vulgare* (2x): 7 II; 2. *H. bulbosum* (2x): 7 II; 3. *H. vulgare* (4x); 4 II + 5 IV; 4. *H. bulbosum* (4x): 6 II + 4 IV.

valenten niet regelmatig uiteen waardoor eveneens aneuploïde cellen konden ontstaan. Over het algemeen was de situatie bij *H. bulbosum* beter dan bij *H. vulgare*. De tweede deling verliep meestal normaal, hoewel ook hier onregelmatigheden optraden, die het gevolg konden zijn van de afwijkingen in de eerste deling en die veelal resulteerden in microkernen of micropollen.

Bij *H. bulbosum* is de aanhechting van de nucleolus bestudeerd. In de diploïd werd in de diakinese steeds één nucleolus per cel gevonden die was vastgehecht aan één chromosomenpaar. In de tetraploïd is vrijwel steeds één nucleolus per cel waargenomen die was vastgehecht aan een quadrivalent of aan twee bivalenten (zelden aan één bivalent). Ten opzichte van de diploïd was in de tetraploïd de nucleolus iets eerder verdwenen.

De hybriden

De diploïde, triploïde en tetraploïde hybriden vertoonden alle een beeld dat in meer of mindere mate was verstoord, zodat niet kan worden volstaan met het eenvoudig weergeven van de frequentie van de verschillende configuraties. Er waren voornamelijk twee typen storingen. De eerste storing bestond uit het optreden van aneuploïde cellen, met als waarschijnlijk eraan gekoppeld verschijnsel het voorkomen van insluitsels in de cellen. De tweede storing was het uitblijven van chiasmata in chromosomen die in de vroege stadia van de meiose gepaard waren. De chromosomen bleven min of meer geassocieerd tot in de diakinese, waarna ze òf van elkaar loslieten òf bij elkaar bleven in de vorm van pseudobivalenten of zelden pseudo-multivalenten. Doordat de pseudo-chiasmata vaak niet waren te onderscheiden van normale chiasmata was deze storing moeilijk te analyseren. Daarbij komt nog dat de mate waarin de storingen optraden van plant tot plant verschilde en zelfs binnen één plant nog sterk varieerde, hetgeen tot gevolg had dat aan de hand van het cijfermateriaal weliswaar een algemene beschrijving van de meiose kan worden gegeven, maar dat het cijfermateriaal met het nodige voorbehoud zal moeten worden gehanteerd. Als gevolg van het feit dat de chromosomenassociaties ontstaan door chiasmata of pseudo-chiasmata veelal niet van elkaar waren te onderscheiden zal bij de hierna volgende beschrijvingen van de hybriden de normale nomenclatuur voor de configuraties worden gehanteerd, waarbij de aard van de verbinding in het midden wordt gelaten.

Van de diploïde hybriden zijn twee planten onderzocht, HY 2002 en HY 2003, beide met dezelfde kruisingsouders (BB 2027 × Jumbo). Er bestond ondanks de overeenkomstige afstamming een duidelijk verschil tussen beide planten. De meiose in deze hybriden was niet zo sterk gesynchroniseerd als bij de ouders, zodat bijvoorbeeld in één meeldraad pachyteen en metafase naast elkaar voorkwamen.

In het pachyteen waren de chromosomen, voor zover waarneembaar, in sterke mate gepaard. De paring bleef aanwezig tot in de diakinese (figuur 28). In dit stadium was de associatie echter al niet meer volledig en ook niet zeer sterk: de

chromosomen lagen veelal naast elkaar. Tussen de diakinese en de metafase ging de associatie van de chromosomen nog verder verloren, maar verscheidene chromosomen bleven met elkaar verbonden. Beide reeds genoemde typen van verbinding leken naast elkaar voor te komen, waarbij de verbindingen als gevolg van de pseudo-chiasmata leken te overheersen. Zeer illustratief voor de desynapsis die optrad in de tijd tussen de diakinese en de metafase zijn waarnemingen in twee preparaten van HY 2003 waarin diakinese en metafase naast elkaar voorkwamen. Zeventien diakinese-cellen hadden gemiddeld 1,18 univalenten, 1,94 staafbivalenten, 4,06 ringbivalenten, 0,12 trivalenten en 0,12 quadrivalenten per cel, terwijl 36 metafase-cellen gemiddeld 2,25 univalenten, 3,17 staafbivalenten, 2,67 ringbivalenten en 0,03 trivalenten per cel hadden.

In de diakinese is ook nog de aanhechting van de nucleolus onderzocht. Er was steeds één grote nucleolus per cel en in verscheidene cellen was daarnaast nog één kleine nucleolus. Eénmaal werd een cel gevonden met drie kleine nucleoli naast de grote nucleolus. De grote nucleolus was meestal verbonden met één paar geassocieerde chromosomen, soms echter was nog een tweede paar chromosomen eraan gebonden. Zelden traden univalenten in de plaats van bivalenten en éénmaal werd een verbinding tussen een quadrivalent en een nucleolus waargenomen. De kleine nucleoli waren steeds aan één paar geassocieerde chromosomen verbonden.

De configuratiefrequenties in de M I staan vermeld in tabel 25, waarin zowel euploïde als aneuploïde cellen zijn opgenomen. Hier blijkt duidelijk het verschil tussen de beide planten. In HY 2002 waren vrijwel alle chromosomen in de euploïde cellen in bivalenten gebonden. Het aantal univalenten varieerde van 0-6 per cel met een daarbij passende spreiding voor de bivalenten van 7-4 per cel. Het percentage staafbivalenten was relatief hoog, 2,20 per cel, met een spreiding van 0-6, de ringbivalenten varieerden van 1-7 per cel. HY 2003 was onregelmatiger: er waren gemiddeld meer univalenten met een spreiding van 0-10 per cel, het aantal staafbivalenten was groter, 3,08 per cel, met een spreiding van 0-7, terwijl de ringbivalenten varieerden van 0-5 per cel (figuur 28).

Over het algemeen was de metafase niet fraai doordat de chromosomen zelden in een equator waren gerangschikt en doordat de spoelfiguur vaak zijdelings tegen de celwand was gedrukt. De chromosomen lagen meer verspreid door de spoelfiguur waarbij vooral de univalenten en de pseudo-bivalenten niet in de equator waren terecht gekomen. Er waren zowel pseudo-staafbivalenten als pseudo-ringbivalenten terwijl ook de multivalenten pseudo-chiasmata leken te hebben, hoewel het aantal te gering was om hierover zekerheid te verkrijgen.

Een ander verschil tussen de beide planten was de mate van aneuploïdie. In HY 2003 zijn meer aneuploïde cellen gevonden en de afwijkingen van het euploïde aantal waren groter. De cellen met 15 chromosomen vertoonden minder associatie dan de euploïde cellen. Ook de hypoploïde cellen vertoonden minder associatie, waarbij het aantal gebonden armen sterker verminderde dan door het verlies van één of meer chromosomen verwacht zou kunnen worden. Dit wijst er op dat alleen al het aneuploïd zijn van een cel een storende invloed heeft op het verloop van

Tabel 26. Aantal euploïde en aneuploïde (hyperploïde en hypoploïde) cellen van diploïde hybriden met en zonder insluitsels; cellen in M I.

Plant nummer	Totaal aantal cellen	Hyperploïd		Euploïd		Hypoploïd	
		met	zonder	met	zonder	met	zonder
HY 2002	99	0	2	0	89	7	1
HY 2003	207	6	21	13	87	41	39
Plant nr.	Total number of cells	with	without	with	without	with	without
		Hyperploid		Euploid		Hypoploid	

Table 26. Number of euploid and aneuploid (hyperploid and hypoploid) cells of diploid hybrids with and without inclusions. Cells in M I.

percentage aneuploïde cellen was, overeenkomstig de metafase, in HY 2003 veel hoger dan in HY 2002. In de aneuploïde cellen kwamen relatief minder chromosomen in de polen terecht dan in de euploïde cellen. Er is onderscheid gemaakt tussen chromosomen die in de polen terecht kwamen en chromosomen die naast de polen terecht kwamen, hoewel ze duidelijk aan de anafase-beweging hadden deelgenomen. De chromosomen uit de tweede categorie werden veelal niet opgenomen in de telofase-kern. Een derde categorie zijn de chromosomen die in het midden van de cel achterbleven. Deze chromosomen en soms ook die uit de tweede categorie vertoonden het verschijnsel van het uiteenvallen in de chromatiden. Soms kwam een dergelijke chromatide nog in een pool terecht. Een laatste onregelmatigheid waren verbindingen tussen chromatiden. Hiervan zijn twee typen gevonden: (1) een verbinding tussen twee verschillende chromosomen, waarbij één chromatide van het ene chromosoom was verbonden met één chromatide van een ander chromosoom en (2) een verbinding tussen de twee chromatiden van hetzelfde, gedeelde chromosoom. De verbindingen waren veelal sterk uitgerekt en soms leek een verbinding de oorzaak van het niet naar de polen gaan van de chromosomen (figuur 29).

De verdeling in de A I van de chromosomen over de polen was zeer onregelmatig. In de 35 euploïde cellen van HY 2002 kwam in 8 cellen een verdeling 7-7 voor, terwijl, afgezien van de losse chromatiden en naast de polen liggende chromosomen, in deze plant in 25 van de 74 polen een groep van 7 chromosomen terecht kwam. In HY 2003 is niet één cel gevonden met een verdeling 7-7, terwijl slechts in 14 van de 56 polen een groep van 7 chromosomen terecht kwam. Voor het overige kwamen, behoudens enkele uitzonderingen, in beide planten steeds minder dan 7 chromosomen in de polen. De chromosomen en chromatiden die op het tijdstip van de vorming van de kernwand niet in de polen waren vormden veelal microkernen, terwijl ze soms los in het cytoplasma bleven liggen. In enkele

Tabel 27. Analyse van de eerste anafase van diploïde hybriden.

Totaal aantal	HY 2002		HY 2003			Total number of
	euploïd	hypoploïd	hyperploïd	euploïd	hypoploïd	
cellen	35	2	6	13	9	cells
chromosomen	490	26	93	182	115	chromosomes
chromosomen in polen	418	23	71	164	97	chromosomes at poles
chromosomen naast polen	27	—	4	3	6	chromosomes near poles
chromosomen bij de equator	45	3	18	15	12	chromosomes near the equator
gedeelde chromosomen	13	1	5	4	3	divided chromosomes
verbindingen tussen chromatiden van verschillende chromosomen	9	—	1	2	3	connections between chromatids of different chromosomes
verbindingen tussen chromatiden van hetzelfde chromosoom	1	—	2	—	—	connections between chromatids of the same chromosome

Table 27. Analysis of the first anaphase of diploid hybrids.

Figuur 30. Meiose in triploïde hybride (1-3: 1400 ×; 4: 600 ×). 1. profase; 2. metafase I: 7 I + 7 II; 3. metafase I: 5 I + 5 II + 2 III; 4. tetrade met microkernen en microcel.

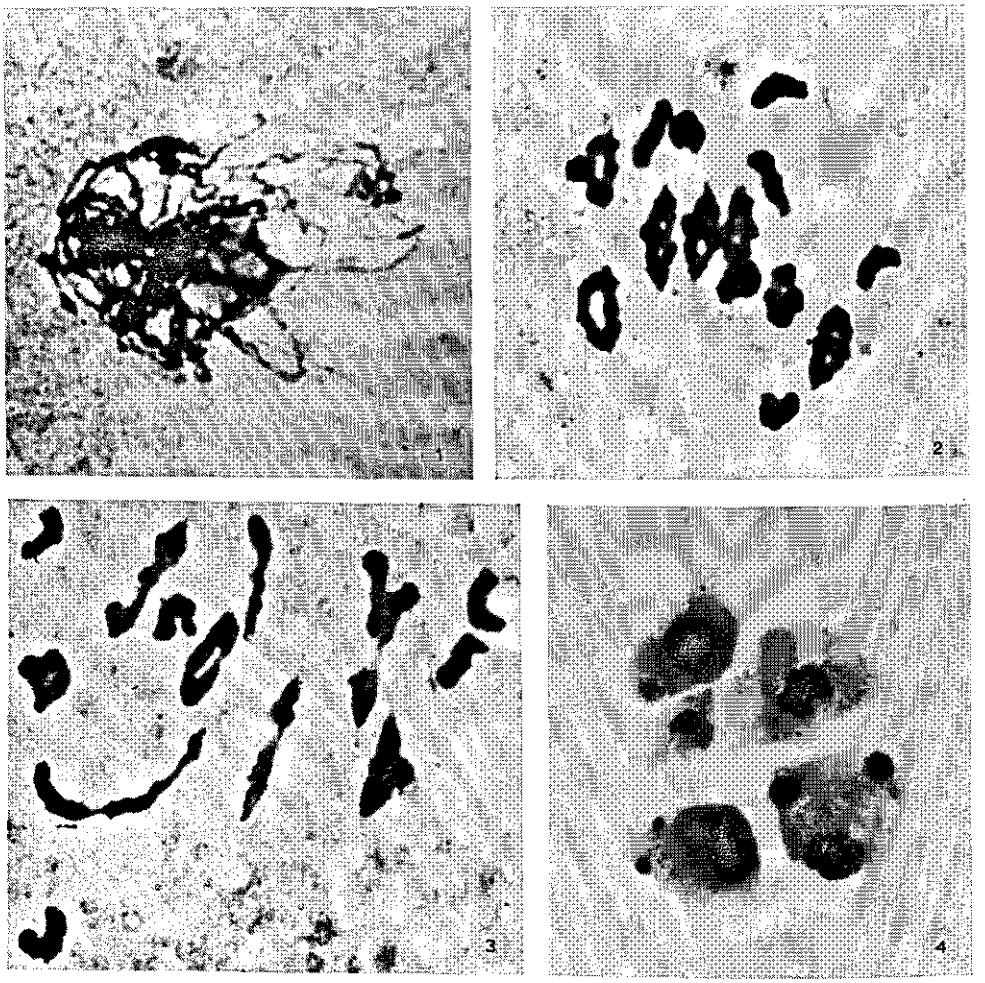


Figure 30. Meiosis in triploid hybrid (1-3 × 1400; 4 × 600). 1. Prophase; 2. Metaphase I: 7 I + 7 II; 3. Metaphase I: 5 I + 5 II + 2 III; 4. Tetrad with micronuclei and microcell.

grote spreiding. Zo varieerde het aantal univalenten van 3-11 per cel en het aantal bivalenten van 8-4 per cel. Het aantal staafbivalenten was laag: gemiddeld 0,83 per cel. Hoewel is vastgesteld dat er een zekere mate van desynapsis plaats vond tussen diakinese en M I, kon niet met zekerheid worden bepaald of in de metafase nog verbindingen als gevolg van pseudo-chiasmata aanwezig waren. In sommige configuraties leek het erop, hoewel dit zelden voorkwam. Het verschil tussen de configuraties in diakinese en eerste metafase is een aanwijzing dat wel verbindingen als gevolg van pseudo-chiasmata voorkwamen, maar deze zijn dan waarschijnlijk voor het merendeel reeds vóór de eerste metafase uiteengevallen.

Tabel 28. Associatie van chromosomen in de M I van triploïde hybriden (euploïde cellen). Voor verklaring zie tabel 25.

Plant nummer	Aantal cellen	Configuraties/cel I	II	III	IV	Gebonden armen/cel
HY 3019	20	6,50	6,40	0,50	0,05	25,90
HY 3022	79	6,53	6,47	0,44	0,05	26,20
HY 3025	39	6,28	6,15	0,77	0,03	25,85
HY 3031	40	6,35	6,35	0,65	—	26,13
HY 3033	32	5,84	5,53	1,28	0,06	24,94
HY 3037	34	6,32	6,26	0,68	0,03	26,18
HY 3038	39	6,74	6,74	0,26	—	26,64
HY 3040	76	6,39	6,41	0,47	0,09	27,14
HY 3041	35	6,71	6,71	0,29	—	27,17
HY 3044	40	6,60	6,60	0,40	—	26,40
HY 3048	30	6,80	6,83	0,13	0,03	26,60
HY 3052	90	6,47	6,47	0,53	—	26,68
HY 3054	50	6,18	6,56	0,38	0,14	27,20
HY 3056	13	6,85	6,85	0,15	—	27,08
HY 3059	12	6,67	6,67	0,33	—	25,67
HY 3061	102	6,67	6,41	0,45	0,04	25,92
HY 3063	78	6,47	6,13	0,71	0,04	25,46
HY 3071	6	6,83	6,50	0,17	0,17	26,67
Plant nr.	Number of cells	I Configurations/cell	II	III	IV	Bound arms/cell

Table 28. Association of chromosomes in M I of triploid hybrids (euploid cells). For explanation, see table 25.

Het aantal aneuploïde cellen was laag, terwijl soms celinsluitsels werden gevonden. De resutaten van de M I-analyse zijn samengevat in tabel 29, waarbij van drie planten de gegevens per plant zijn weergegeven en van de overige planten een samenvatting is gemaakt. Gemiddeld gezien waren er meer gebonden armen wanneer het aantal chromosomen meer dan 21 was en minder indien er minder dan 21 chromosomen waren. In relatieve zin was echter de associatie in de hyperploïde cellen laag en die in de hypoploïde cellen hoog.

De A I van de triploïde hybriden is bestudeerd in 82 euploïde cellen van vier planten (HY 3030, HY 3037, HY 3044 en HY 3061); daarnaast zijn nog enkele aneuploïde cellen geanalyseerd. De verdeling van de chromosomen over de polen was vrij regelmatig, waarbij bijna steeds in iedere pool zeven of meer chromosomen waren te vinden. Gemiddeld bereikten 16,16 chromosomen per cel de polen, met een spreiding van 12-21 per cel. De overige chromosomen bleven achter in de equator, waar vele al waren begonnen aan de tweede deling. Het verschijnsel dat chromosomen naast de polen terecht kwamen werd in de triploïden niet

Tabel 31. Associatie van chromosomen in de M I van tetraploïde hybriden (euploïde en aneuploïde cellen). Voor verklaring zie tabel 25.

Plant nummer	Aantal chromosomen	Aantal cellen	Configuraties/cel I	II	III	IV	Gebonden armen/cel
HY 4002	29	2	1,50	12,00	0,50	0,50	50,50
	28	62	0,42	11,02	0,19	1,24	49,00
	27	25	1,28	10,64	0,36	0,84	45,16
	26	2	1,50	9,50	0,50	1,00	44,00
	25	1	1,00	10,00	—	1,00	44,00
HY 4005	29	2	3,50	11,00	0,50	0,50	41,00
	28	4	2,50	11,00	0,50	0,50	44,75
	27	14	2,43	10,29	0,57	0,57	41,64
	26	12	3,08	10,00	0,75	0,17	37,75
	25	10	3,90	9,10	0,70	0,20	34,20
	24	7	4,29	7,43	0,86	0,57	31,29
	23	10	5,20	8,60	0,20	—	27,00
	22	6	3,67	7,17	0,67	0,50	30,00
	21	1	7,00	7,00	—	—	28,00
	20	3	3,67	6,33	0,33	0,67	24,00
	19	3	3,00	8,00	—	—	25,33
	18	2	2,50	7,00	0,50	—	25,00
	17	3	3,00	7,00	—	—	22,00
	16	1	2,00	7,00	—	—	26,00
HY 4008	27	4	2,00	11,50	—	0,50	41,00
	26	7	4,86	7,00	1,43	0,71	33,14
	25	3	4,00	6,00	1,67	1,00	30,00
	24	5	5,40	7,20	1,40	—	28,00
	23	6	3,83	8,17	0,50	0,33	31,67
	22	5	3,80	6,20	0,60	1,00	27,60
	21	3	2,67	5,33	1,67	0,67	28,00
	20	5	3,00	6,40	1,40	—	26,60
	19	2	3,00	6,00	—	1,00	27,00
	18	2	1,50	7,50	0,50	—	25,00
	16	4	1,50	6,50	0,50	—	23,50
Plant nr.	Number of chromosomes	Number of cells	I	II	III	IV	Bound arms/cell
			Configurations/cell				

Table 31. Association of chromosomes in M I of tetraploid hybrids (euploid and aneuploid cells). For explanation, see table 25.

maximaal twee trivalenten of vier quadrivalenten per cel zijn waargenomen. Het aantal staafbivalenten in euploïde cellen van HY 4002 en HY 4005 was gemiddeld respectievelijk 2,37 en 2,25 per cel. Bij de aneuploïde cellen varieerden de aantallen univalenten en bivalenten sterker. Zo zijn bijvoorbeeld bij uitzondering in een cel met 23 chromosomen 14 univalenten gevonden. In het totaal zijn in slechts 32 van de 216 cellen minder dan zeven bivalenten gevonden, waarbij in bijna al deze 32 cellen één of meer multivalenten voorkwamen, zodat het totaal aantal configuraties per cel meestal zeven of meer was. Er waren in alle planten, maar vooral in HY 4005 en HY 4008 bivalenten en multivalenten die het gevolg leken te zijn van pseudo-chiasmata. Mede hierdoor was de metafase niet zeer regelmatig en was de coöriëntatie in de metafaseplaat in veel cellen niet goed tot stand gekomen (figuur 31).

Het aantal gebonden armen per cel was in de hypoploïde cellen gemiddeld kleiner dan in de euploïde cellen. Bij afnemend chromosomenaantal verminderde het aantal gebonden armen aanvankelijk relatief sterk, maar beneden het chromosomenaantal 24 trad een zekere stabilisatie van de associatie van chromosomen op, waardoor het aantal gebonden armen per cel relatief minder sterk ging afnemen. Dit effect komt in de paragraaf 'Vergelijking van de meiosen' nog nader ter sprake. Evenals bij de diploïde hybriden ging aneuploïdie veelal gepaard met allerlei celinsluitsels. Bij de tetraploïde hybriden waren de insluitsels eveneens al zichtbaar in de profase, ze waren dan buiten de kern gesitueerd. Er werden dezelfde typen insluitsels gevonden en ook het verband tussen het chromosomenaantal en de aanwezigheid van insluitsels, zoals is weergegeven in tabel 32, is geheel vergelijkbaar met dat in de diploïde hybriden.

Het verdere verloop van de reductiedeling was zeer onregelmatig. In de anafase werden alle verschijnselen waargenomen die voor de diploïde hybriden reeds zijn beschreven: chromosomen in de polen, chromosomen naast de polen, achterblijvende chromosomen die vroegtijdig in hun chromatiden uiteenvielen en verbindingen tussen chromatiden van hetzelfde chromosoom of van verschillende chromosomen. In de diaden waren microkernen en losliggende chromosomen te vinden en in enkele gevallen werd na de eerste reductiedeling een triade gevormd. De tweede deling van de meiose was eveneens zeer gestoord, hetgeen resulteerde in tetraden met microkernen en micropollen. Zo zijn in 200 tetraden van HY 4005 795 microkernen en 146 micropollen gevonden, met maxima van 14 microkernen respectievelijk 5 micropollen per tetrade.

Uit de gegevens kan worden geconcludeerd dat de meiose van de tetraploïde hybriden een sterke overeenkomst vertoonde met die van de diploïde hybriden. Het aantal hyperploïde cellen was zeer gering, alleen HY 4002 had veel euploïde cellen, terwijl in HY 4005 vrijwel uitsluitend en in HY 4008 uitsluitend hypoploïde cellen worden gevonden. In HY 4005 en HY 4008 is hetzelfde verband gevonden tussen het chromosomenaantal en het gemiddeld aantal gebonden armen per cel. Van 27 tot 24 chromosomen was er een snelle afname van het aantal gebonden armen, terwijl bij lagere chromosomenaantallen de daling van het aantal gebonden

Tabel 33. Associatie van chromosomen in de M I van haploïde en dihaploïde, op *H. vulgare* lijkende, na vegetatieve eliminering van chromosomen verkregen nakomelingen van soortkruisingen, in vergelijking met diploïde rassen van *H. vulgare*. Voor verklaring zie tabel 24.

Plant nummer	Kruising	Aantal cellen	Configuraties/cel I	II (staaf)	II (ring)	Gebonden armen/cel
Haploïd	Balder (2x) × BBBB 4029	135	6,51	0,21	0,04	0,58
P 2001	Atlas (4x) × BBBB 4044	100	0,04	0,56	6,42	26,80
P 2002	Atlas (4x) × BBBB 4047	100	0,04	0,73	6,25	26,46
P 2004	Atlas (4x) × BBBB 4047	100	0,04	0,60	6,38	26,72
P 2005	Atlas (4x) × BBBB 4072	100	—	0,34	6,66	27,32
P 2006	Atlas (4x) × BBBB 4082	100	—	0,18	6,82	27,64
HP 2005	Atlas (4x) × BBBB 4047	100	—	0,31	6,69	27,38
A 2001	BBBB 4046 × Jumbo (4x)	100	—	0,48	6,52	27,04
A 2002	BBBB 4046 × Jumbo (4x)	100	—	0,31	6,69	27,38
A 2003	BBBB 4020 × Jumbo (4x)	100	—	0,32	6,68	27,36
HA 2001	BBBB 4046 × Jumbo (4x)	100	—	0,36	6,64	27,28
HA 2003	BBBB 4094 × Atlas (4x)	112	—	0,47	6,53	27,06
Balder (2x)		196	—	0,18	6,82	27,64
Jumbo (2x)		138	—	0,45	6,55	27,10
Atlas (2x)		143	—	0,32	6,68	27,36
Plant nr.	Cross	Number of cells	I	II (rod)	II (ring)	Bound arms/cell
			Configurations/cell			

Table 33. Association of chromosomes in M I of haploid and dihaploid plants which resemble *H. vulgare* and which were obtained from interspecific crosses by vegetative elimination of chromosomes. The last three varieties are diploid *H. vulgare* for comparison. For explanation, see table 24.

bivalenten waren veelal niet normaal en leken op pseudo-bivalenten (figuur 32). Daarnaast was de meiose nog afwijkend doordat aneuploïde cellen en cellen met insluitsels zijn gevonden. Naast de 135 in de tabel genoemde euploïde cellen waren er nog tien euploïde cellen met één of twee insluitsels. Voorts zijn negen hyperploïde cellen gevonden met acht, negen of tien chromosomen per cel; twee van deze cellen hadden een insluitsel. Tenslotte waren er 17 hypoploïde cellen met zes, vijf of vier chromosomen per cel: deze cellen hadden, op één uitzondering na, één of twee insluitsels. In deze afwijkende cellen kwamen eveneens bivalenten voor, terwijl in de hyperploïde cellen drie maal een trivalent is gevonden. De insluitsels hadden hetzelfde uiterlijk als die, welke in de hybriden zijn gevonden, meest bolletjes en niet volledig gecontraheerde fragmenten en enkele microkernen.

Het verdere verloop van de reductiedeling van de haploïde plant was in sterke mate verstoord. In de A I leken de chromosomen volgens toeval naar de polen te gaan, terwijl verscheidene chromosomen in het midden van de cel achterbleven

Figuur 32. Meiose in haploïde *H. vulgare* uit de kruising VV × BBBB en dihaploïde *H. vulgare* uit de kruising BBBB × VVVV (1400 ×). 1. metafase I in haploïd: 7 I; 2. metafase I in haploïd: 5 I + 1 II; 3. anafase I in haploïd; 4. metafase I in dihaploïd: 7 II.

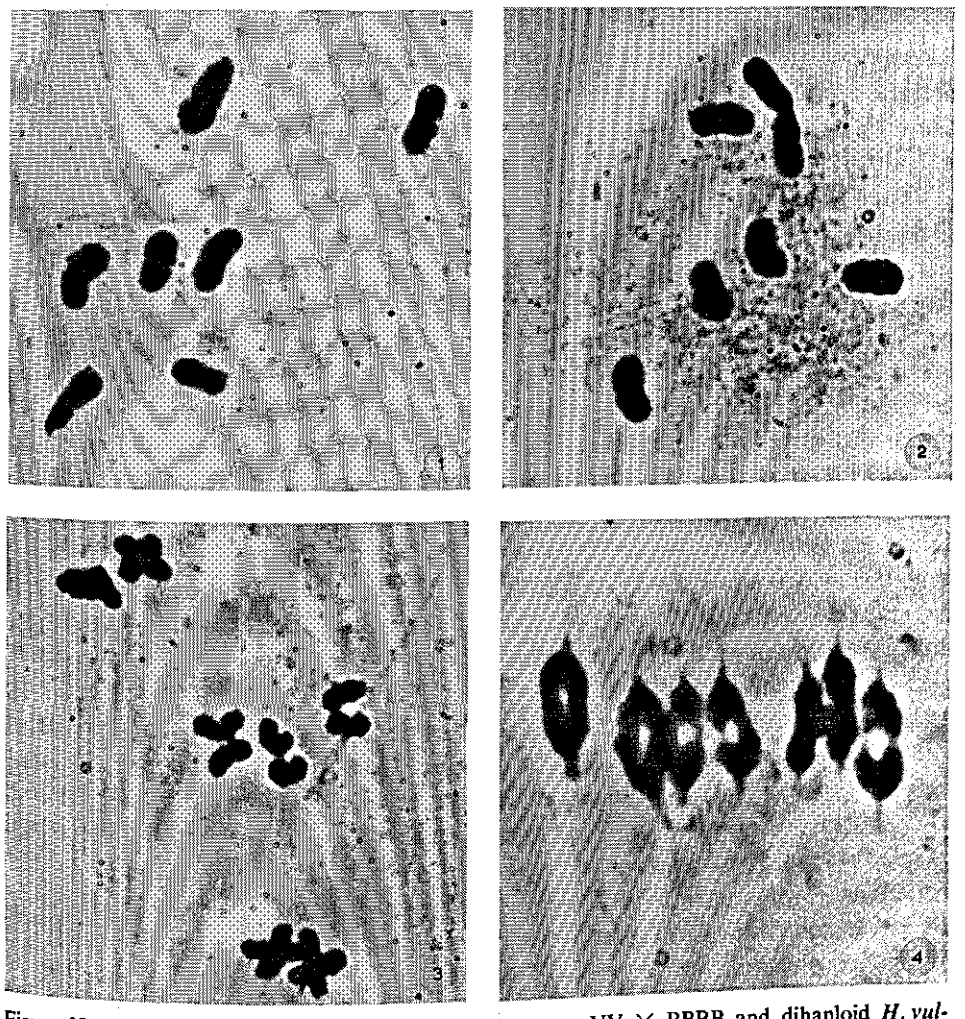


Figure 32. Meiosis in haploid *H. vulgare* from the cross VV × BBBB and dihaploid *H. vulgare* from the cross BBBB × VVVV (× 1400). 1. Metaphase I in haploid: 7 I; 2. Metaphase I in haploid: 5 I + 1 II; 3. Anaphase I in haploid; 4. Metaphase I in dihaploid: 7 II.

en dan soms vervroegd begonnen aan de tweede deling, waardoor in de diade al microkernen voorkwamen. De tweede deling vond wel plaats maar was zeer onregelmatig en niet te analyseren. In de tetraden werden vaak microkernen gevonden en de normale tetrade-kernen en -cellen waren ongelijk van grootte, zodat een onderscheid tussen de normale kern en een microkern vaak niet was te maken. Maximaal werden in een tetrade acht kernen gevonden.

De diploïde planten hadden zonder uitzondering een zeer regelmatige en normale meiose. Het aantal gebonden armen per cel was hoog en meestal goed in overeen-

stemming met het diploïde cytotype van het gerstras waarvan het tetraploïde type in de oorspronkelijke kruising was gebruikt. De nummers P 2001, P 2002 en P 2004 weken iets af door een lager aantal gebonden armen per cel en door het daarbij optreden van univalenten. De verschillen waren echter gering en een mogelijke oorzaak was niet aanwijsbaar. De nummers A en HA waren zeer regelmatig hetgeen erop wijst dat het cytoplasma van *H. bulbosum*, dat in deze planten aanwezig was, geen invloed had op het verloop van de meiose (figuur 32).

Vergelijking van de meiosen

Teneinde de waarnemingen van de reductiedeling van ouders en hybriden onderling met elkaar te vergelijken zijn de waarden voor het aantal gebonden armen per cel in een grafiek uitgezet tegen de chromosomenaantallen (figuur 33). Doordat in de hybriden niet slechts euploïde, maar ook veel verschillende aneuploïde cellen zijn bestudeerd, ontstaat voor ieder type hybride een curve, in tegenstelling tot de oudersoorten die slechts euploïde cellen hadden en daarom als punt in de grafiek zijn terug te vinden. Van de waarnemingen die in de tabellen 24, 25, 28, 29 en 31 reeds zijn gepresenteerd is per oudertype of hybride-type per chromosomenaantal het gemiddelde berekend en in de grafiek opgenomen, terwijl tevens het aantal gebonden armen in de euploïde cellen van haploïde *H. vulgare* (tabel 33) in de grafiek is vermeld. Hoewel vooral bij de diploïde en tetraploïde hybriden duidelijke verschillen tussen de planten zijn gevonden is toch één curve van het gemiddelde gemaakt, hetgeen mogelijk was doordat de curves voor de verschillende planten, voor zover ze in hetzelfde traject van de chromosomenaantallen lagen, voornamelijk verschilden in niveau, terwijl het verloop vrijwel analoog was. Het gevonden aantal gebonden armen per cel in de reeds beschreven diploïde aar van HY 4005 is eveneens in de figuur opgenomen. Verder zijn in de figuur nog enkele maxima en minima aangegeven, die zijn verbonden met een stippellijn. Het betreft de volgende aantallen: 28 en 14 chromosomen met alle armen gebonden, 14 en 7 chromosomen met geen armen gebonden, en 21 chromosomen waarbij van 14 chromosomen alle armen en van 7 chromosomen geen armen zijn gebonden.

De ouderplanten benaderden het maximum aantal gebonden armen per cel, de beide soorten verschilden niet veel terwijl de diploïden dichter bij het maximum kwamen dan de tetraploïden. De diploïde hybriden vertoonden een matige associatie in de euploïde cellen, terwijl in de aneuploïde cellen het aantal gebonden armen per cel snel verminderde, waarbij uit het verloop van de curve niet valt af te lezen of er enige selectiviteit bestond ten aanzien van de soort chromosomen die zijn verdwenen.

De triploïde hybriden bereikten in de euploïde cellen vrijwel het maximum dat in de figuur wordt aangegeven voor het chromosomenaantal 21, waarbij van 14 chromosomen alle armen zijn gebonden en van 7 chromosomen geen armen zijn gebonden. De hyperploïde cellen van deze hybriden vertoonden, in tegenstelling tot die van de andere hybriden, een iets groter aantal gebonden armen per cel

Figuur 33. Gemiddeld aantal gebonden armen per cel in euploïde en aneuploïde cellen van diploïde, triploïde en tetraploïde hybriden en in de oudersoorten. Samenvatting van gegevens uit tabellen 24, 25, 28, 29, 31 en 33. De onderbroken lijnen verbinden maxima in cellen met 28 en 14 chromosomen met minima in cellen met 14 en 7 chromosomen en het maximum in cellen met 21 chromosomen waarbij 7 chromosomen ongebonden zijn.

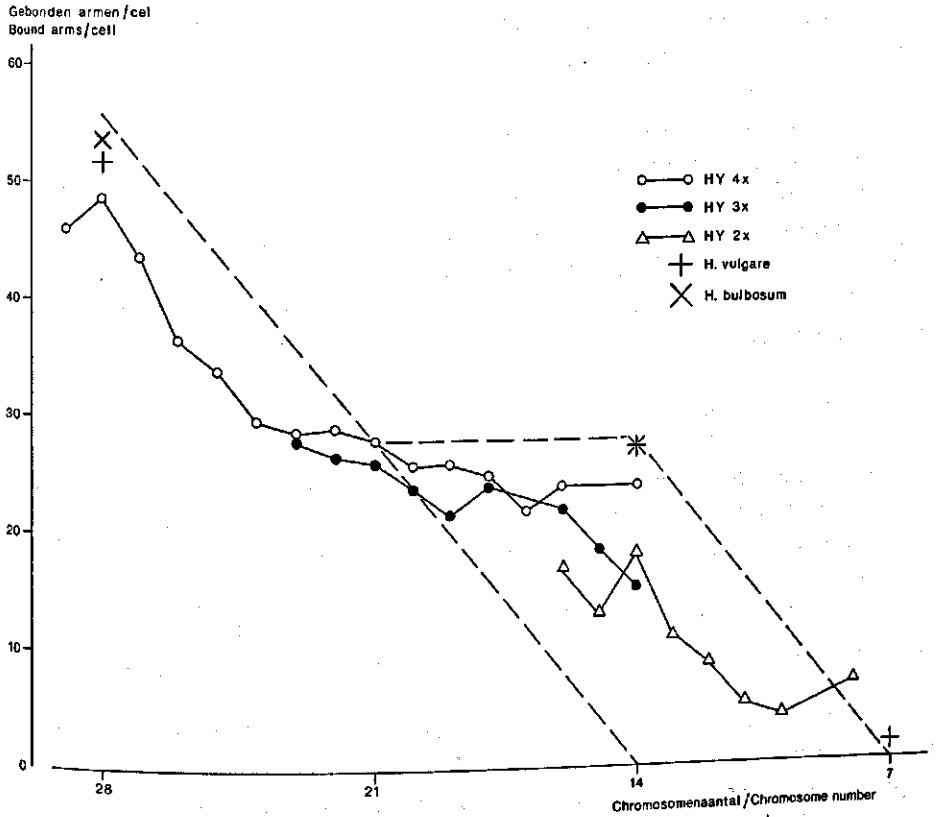


Figure 33. Average number of bound arms per cell in euploid and aneuploid cells of diploid, triploid and tetraploid hybrids and in parental species. Summary of data from tables 24, 25, 28, 29, 31 and 33. The dotted lines connect maxima in cells with 28 and 14 chromosomes with minima in cells with 14 and 7 chromosomes and the maximum in cells with 21 chromosomes in which 7 chromosomes are not bound.

dan in de euploïde cellen. In de hypoploïde cellen was er bij afnemend chromosomenaantal een langzame afname van het aantal gebonden armen per cel tot aan het niveau dat door de diploïde hybriden werd bereikt. Uit de configuratiefrequentie was reeds gebleken dat de associatie in sterke mate de verwachting 7 I + 7 II benaderde, waarbij mag worden aangenomen dat de bivalenten hoofdzakelijk door de chromosomen van *H. bulbosum* worden gevormd. Een afname van het aantal gebonden armen per cel bij afnemend chromosomenaantal suggereert dan, dat in de hypoploïde cellen voornamelijk chromosomen van *H. bulbosum* zullen zijn verdwenen.

De tetraploïde hybriden bleven onder het maximum dat bij dit chromosomenaantal bereikt zou kunnen worden. Het aantal gebonden armen per cel in de aneuploïde cellen was kleiner dan dat in de euploïde cellen, terwijl het in de hypoploïde cellen snel verminderde bij afname van het chromosomenaantal tot 24. Hier maakt de curve een knik, waarna de verdere afname van het aantal gebonden armen per cel langzamer verliep, met een eindwaarde in een diploïde aar die slechts iets lager was dan de waarde van de diploïde oudersoorten, maar aanzienlijk hoger dan die van de diploïde hybriden. Hieruit zou kunnen worden geconcludeerd dat in de hypoploïde cellen van de tetraploïde hybriden de chromosomen niet volgens het toeval zijn verdwenen maar dat er een zekere selectiviteit bestond, zodanig dat van één van de ouders de chromosomen eerder in aanmerking kwamen te verdwijnen dan van de andere ouder. Wordt deze conclusie gevoegd bij die welke uit het verloop van de curve van de triploïde hybriden is getrokken, dan lijkt het aannemelijk dat het ook in dit geval voornamelijk chromosomen van *H. bulbosum* zijn die in de hypoploïde cellen zijn verdwenen.

Onderzoekingen aan de pollen

Teneinde een indruk te verkrijgen van het uiteindelijke resultaat van de microsporogenese zijn van een aantal ouders, hybriden en overige nakomelingen de pollen bestudeerd. Er is aandacht besteed aan twee eigenschappen: de kleurbaarheid van de pollen en de diameter van de bij de kleuring als goed aangemerkte pollen. De kleuring geschiedde in een mengsel van 100 ml lactofenol en 8 ml zure fuchsine (1 %) in water (Sass, 1964). De resultaten zijn samengevat in tabel 34.

Het materiaal is op het veld verzameld, behalve van de diploïde en tetraploïde hybriden, welke in de kas stonden. Van *H. bulbosum* en van de hybriden zijn de originele klonen gebruikt, evenals van de diploïde hybride die is verkregen uit een tetraploïde hybride. Voor het overige waren de planten gekweekt uit zaad; van *H. vulgare* normaal rasmateriaal en van de overige nakomelingen de door zelfbevruchting verkregen nakomelingschap van de oorspronkelijke plant of, bij HP 2005 en HA 2001, de door herhaalde zelfbevruchting verkregen tweede generatie. Voor de bepaling van het percentage 'goede' pollen zijn ruim 500 pollen geteld, waarbij goed gekleurde, gevulde, ronde pollen als goed zijn aangemerkt. De slechte pollen waren ongekleurd of verschrompeld of slecht gekleurd of het waren micropollen. De bepaling van de gemiddelde pollendiameter is verricht aan 50 pollen, behalve bij HY 3038 en HY 3052 waarbij met veel moeite 30 goede pollen konden worden gevonden.

De verschillende herkomsten van de oudersoorten hadden alle een hoog percentage kleurbare pollen, waarbij de diploïde cytotypen van *H. vulgare* het beste waren. De pollendiameter vertoonde soms nogal wat spreiding. Binnen de herkomsten was bij de tetraploïde cytotypen van *H. vulgare* deze spreiding relatief groot. Bij *H. bulbosum* zijn grote verschillen tussen de herkomsten gevonden, zo-

Tabel 34. De kwaliteit van de pollen van ouders, hybriden en na vegetatieve eliminering van chromosomen verkregen nakomelingen van soortkruisingen. Percentage goede pollen bepaald aan ruim 500 pollen; pollendiameter zo mogelijk bepaald aan 50 pollen.

Genoom-formule	Plant nummer	Soorten en kruisingen	Perc. goede pollen	Pollendiameter (μm) gem.	s
VV	Atlas (2x)	*H. vulgare* (2x)	99,4	48,5	2,39
	Jumbo (2x)	*H. vulgare* (2x)	98,0	48,0	2,72
	Balder (2x)	*H. vulgare* (2x)	94,5	43,7	2,97
VVVV	Atlas (4x)	*H. vulgare* (4x)	85,9	64,8	7,72
	Jumbo (4x)	*H. vulgare* (4x)	82,4	55,6	7,23
	Balder (4x)	*H. vulgare* (4x)	92,4	55,1	6,52
BB	BB 2032	*H. bulbosum* (2x)	89,1	50,5	4,66
	BB 2082	*H. bulbosum* (2x)	83,8	48,5	4,05
BBBB	BBBB 4006	*H. bulbosum* (4x)	92,1	59,5	5,24
	BBBB 4046	*H. bulbosum* (4x)	81,8	53,7	5,67
	BBBB 4095	*H. bulbosum* (4x)	92,6	51,9	3,05
VB	HY 2001	BB 2027 × Jumbo (2x)	0,0	—	—
	HY 2003	BB 2027 × Jumbo (2x)	0,0	—	—
	HY 2004	BB 2032 × Jumbo (2x)	0,0	—	—
VBB	HY 3019	Jumbo (2x) × BBBB 4006	6,5	43,2	6,30
	HY 3038	Balder (2x) × BBBB 4095	< 0,1	47,9	14,4
	HY 3040	Balder (2x) × BBBB 4095	6,6	44,8	8,4
	HY 3052	BBBB 4046 × Balder (2x)	0,3	47,9	12,0
	HY 3061	Balder (2x) × BBBB 4029	0,0	—	—
	HY 3063	Balder (2x) × BBBB 4029	5,8	49,6	7,07
VVBB	HY 4002	BBBB 4070 × Atlas (4x)	60,2	50,4	6,37
	HY 4005	Atlas (4x) × BBBB 4047	1,3	51,3	12,2
	HY 4008	Atlas (4x) × BBBB 4006	15,1	49,6	8,4
VV	P 2001	Atlas (4x) × BBBB 4044	98,2	49,7	3,47
	P 2002	Atlas (4x) × BBBB 4047	99,6	49,8	2,34
	P 2004	Atlas (4x) × BBBB 4047	98,8	49,5	3,93
VV	HP 2005	Atlas (4x) × BBBB 4006	98,8	47,8	2,68
	HP 2007	Atlas (4x) × BBBB 4006	96,3	48,8	3,58
VV	A 2001	BBBB 4046 × Jumbo (4x)	98,2	46,5	3,82
	A 2002	BBBB 4046 × Jumbo (4x)	98,4	47,3	2,43
	A 2003	BBBB 4020 × Jumbo (4x)	99,0	46,6	3,05
VV	HA 2001	BBBB 4046 × Jumbo (4x)	99,0	46,8	3,50
	HA 2003	BBBB 4094 × Atlas (4x)	99,6	45,7	2,57
VVVV	HA 4003	BBBB 4094 × Atlas (4x)	87,4	54,4	4,98
VB	Diploïd uit / diploid from				
	HY 4006	BBBB 4124 × Jumbo (4x)	0,0	—	—
Genome symbol	Plant nr.	Species or cross	Perc. good grains	average Diameter (μm)	s

Table 34. The quality of the pollen grains of parents, hybrids and offspring obtained from interspecific crosses by vegetative elimination of chromosomes. Percentage good pollen grains counted from more than 500 grains; diameter of grains if possible from 50 grains.

danig zelfs dat de tetraploïde herkomst BBBB 4095 gemiddeld nauwelijks grotere pollen had dan de diploïde herkomst BB 2032.

De diploïde hybriden hadden geen kleurbare pollen, evenmin als de diploïde hybride plant die was verkregen uit de tetraploïde hybride HY 4006. De pollen waren veelal verschrompeld of slechts gedeeltelijk gevuld. Ook werden micropollen gevonden, waarvan in HY 2003 het percentage hoger was dan in de andere planten. De triploïde hybriden hadden zeer weinig kleurbare pollen, terwijl deze goede pollen een sterke spreiding in diameter vertoonden. De slechte pollen

Figuur 34. Pollen (170 ×). 1. *H. vulgare* (2x); 2. *H. vulgare* (4x); 3. *H. bulbosum* (2x); 4. *H. bulbosum* (4x); 5. diploïde hybride (VB); 6. triploïde hybride (VBB); 7. tetraploïde hybride (VVBB); 8. dihaploïde *H. vulgare* nr. P 2001; 9. dihaploïde *H. vulgare* nr. A 2003 (zie tabel 34).

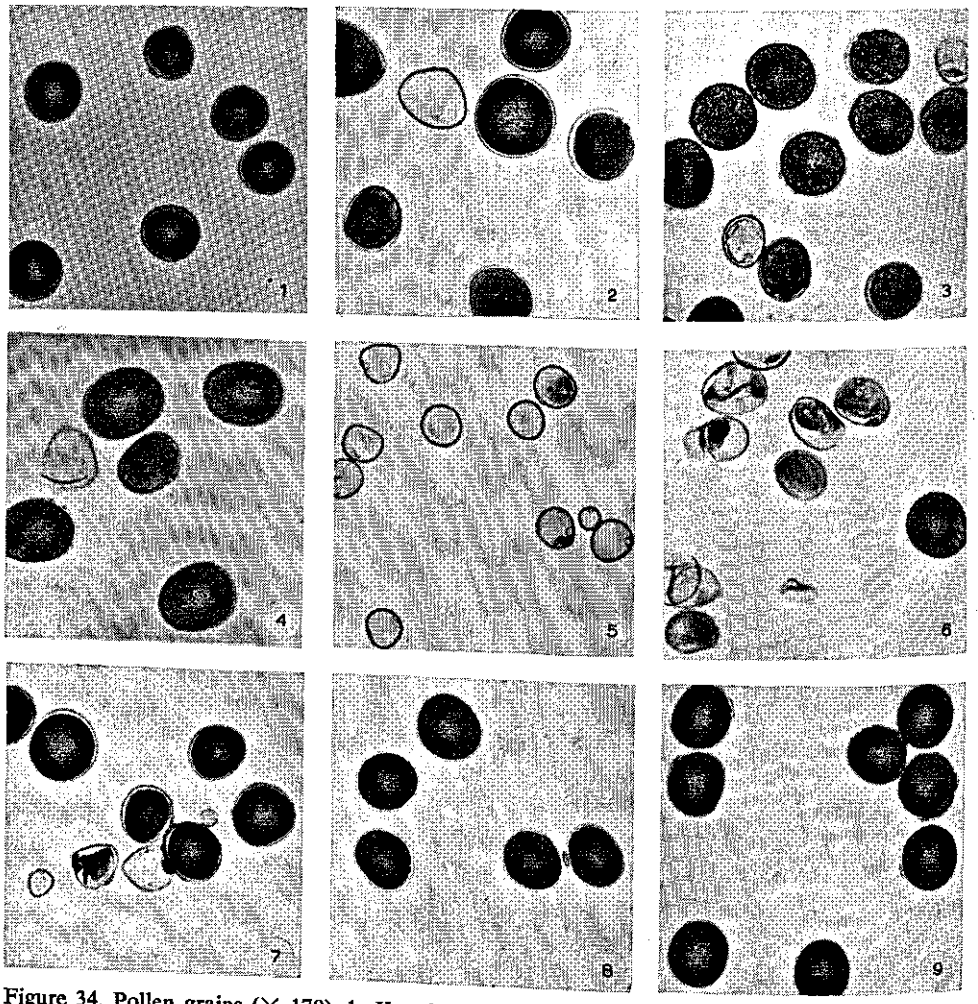


Figure 34. Pollen grains (× 170). 1. *H. vulgare* (2x); 2. *H. vulgare* (4x); 3. *H. bulbosum* (2x); 4. *H. bulbosum* (4x); 5. Diploid hybrid (VB); 6. Triploid hybrid (VBB); 7. Tetraploid hybrid (VVBB); 8. Dihaploid *H. vulgare* No P 2001; 9. Dihaploid *H. vulgare* No A 2003 (see table 34).

waren overeenkomstig die van de diploïde hybriden en ook hier werden micropollen gevonden. Meestal was het percentage micropollen laag (tot ± 8 %), behalve in HY 3052, waarin het percentage bijna 23 % was. De pollen van de tetraploïde hybriden waren zeer variabel. Tussen de drie onderzochte planten bestonden grote verschillen ten aanzien van het percentage kleurbare pollen, terwijl in alle drie planten de pollendiameter zeer sterk varieerde. In vergelijking met de tetraploïde ouders was de diameter van de pollen kleiner, hetgeen ook bij de triploïde hybriden het geval was. Het percentage micropollen was ongeveer 26 % bij HY 4005 en 11 % bij de andere twee tetraploïde hybriden (figuur 34).

De overige nakomelingen vertoonden, zoals werd verwacht, een beeld dat een sterke overeenkomst vertoonde met dat van *H. vulgare*. Er was steeds een hoog percentage kleurbare pollen dat zowel voor de diploïde typen als voor de tetraploïde HA 4003 in dezelfde orde van grootte lag als dat van de diploïde respectievelijk tetraploïde gerst. Wanneer de nummers P en HP worden vergeleken met het ras Atlas (2x) (het ras waarvan het tetraploïde cytotype in de kruising waaruit de nummers P en HP zijn verkregen is gebruikt), dan zijn er soms geringe verschillen in de pollendiameters. De waarnemingen zijn echter steeds aan één plant uit één zaaisel verricht en ze konden niet op dezelfde dag worden uitgevoerd, zodat mag worden aangenomen dat deze verschillen niet van wezenlijke betekenis zijn. Hetzelfde geldt voor de vergelijking van de pollendiameters van de nummers A en HA met de uitgangsrassen Jumbo en Atlas, zodat kan worden geconcludeerd dat de kwaliteit van de pollen van de op *H. vulgare* lijkende nakomelingen van de soortkruisingen een grote mate van overeenkomst vertoonde met die van de pollen van de uitgangsrassen van *H. vulgare*.

Discussie

Uit de resultaten van het onderzoek aan soortkruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* is eens te meer gebleken dat het produceren van hybriden uit deze kruisingen moeilijk gaat. Hoewel met behulp van embryocultuur van verscheidene kruisingscombinaties levensvatbare hybriden zijn verkregen, blijkt uit het zeer grote aantal kruisingen en het kleine aantal verkregen hybriden dat de kruisingsbarrière zeer sterk is. Een uitzondering vormt de kruising tussen diploïde *H. vulgare* en tetraploïde *H. bulbosum*, hoewel ook hier nog een vrij sterke kruisingsbarrière aanwezig is.

Kruisingsbarrière en embryocultuur

Bij het zich manifesteren van de kruisingsbarrière zijn drie hoofdzaken te onderscheiden: de slechte zaadzetting, de abnormale ontwikkeling van de caryopsis en de verminderde vitaliteit van de hybride, welke reeds in het embryonale stadium tot uiting komt en daarna bij de ontwikkeling van de plant blijft bestaan.

De zaadzetting

Vanwege het grote aantal kruisingen dat moest worden uitgevoerd en vanwege de vele verschillende herkomsten van de ouderplanten zijn bij dit onderzoek geen exacte tellingen verricht over de zaadzetting. Uit de literatuur zijn enkele gegevens bekend, waarbij Davies (1956) wel het meest volledig is, omdat hij alle acht mogelijke kruisingscombinaties tussen de diploïde en tetraploïde cytotypen van de soorten heeft onderzocht. Uit zijn resultaten (zie tabel 1), welke helaas zijn gebaseerd op vrij weinig herkomsten van de ouderplanten, bleek dat de zetting veel beter was wanneer *H. vulgare* als moederplant werd gebruikt. Dit geldt voor alle ploïdie-niveaus, waarbij evenwel grote verschillen tussen de kruisingscombinaties zijn gevonden. Worden de resultaten van Davies vergeleken met de kruisingsresultaten van tabel 6, waarbij het aantal embryocultures als maatstaf voor de zetting kan worden genomen, dan blijkt hetzelfde verschil tussen de reciproke kruisingen op te treden, alleen op een ander niveau als gevolg van de verschillende criteria die zijn aangelegd voor de zaadzetting. De verschillen tussen de kruisingscombinaties hebben bij Davies en bij het hier besproken materiaal niet geheel dezelfde volgorde, waarbij wederom het verschil in criterium de oorzaak zal zijn, omdat de embryo's van de kruisingen tussen diploïde *H. vulgare*

en tetraploïde *H. bulbosum* gemiddeld beter waren dan die van alle andere kruisingen. Tenslotte kan nog worden opgemerkt dat de zettingspercentages van Davies over het algemeen zeer hoog zijn.

Over de directe oorzaak van de gevonden verschillen is niets bekend, omdat niet is onderzocht of de pollenkieming, de groei van de pollenbuis of de bevruchting wordt verstoord. Davies (1956) veronderstelde dat de groei van de pollenbuis wordt geremd, mede omdat uitwendige omstandigheden deze groei kunnen beinvloeden. Een invloed van de uitwendige omstandigheden op de zaadzetting is door Kuckuck (1934) en in het hier beschreven onderzoek eveneens gevonden: dezelfde kruisingen leverden in verschillende jaren andere resultaten op.

De werkelijke oorzaak van de verschillen in zaadzetting zijn eveneens moeilijk te achterhalen. De genomenverhouding stijl/pollen zou van belang kunnen zijn, maar de resultaten maken deze mogelijkheid niet erg aannemelijk. De verschillen tussen de reciproke kruisingen zijn een aanwijzing dat de pollen van *H. bulbosum* op de een of andere manier moeilijkheden ondervinden bij het bevruchten van de andere soort. Het zou mogelijk kunnen zijn dat het auto-incompatibiliteitssysteem van *H. bulbosum* (Lundqvist, 1962) hierbij een rol speelt, maar het lijkt waarschijnlijker dat het hier gaat om een kruisingsincompatibiliteit, welke in één richting sterker is. Tenslotte is enkele malen melding gemaakt van een invloed van de als moeder gebruikte gerstrassen op de zaadzetting (Kuckuck, 1934; Konzak *et al.*, 1951). Ook bij de hier beschreven kruisingen zijn zekere invloeden van rassen of herkomsten geconstateerd, waarbij van een verschil tussen winter- en zomergerst, zoals dat door Kuckuck was gevonden, maar door Konzak *et al.* niet kon worden bevestigd, geen sprake was. De verschillen in zaadzetting hebben waarschijnlijk een genetische basis, maar over de aard ervan is verder niets bekend.

Hoewel de verschillen in zaadzetting op zichzelf een interessant probleem vormen, is de soms geringe zaadzetting geen absolute belemmernig voor de soortkruisingen. In alle beproefde combinaties wordt enig zaad gevormd, maar dit is van slechte kwaliteit doordat het niet normaal ontwikkelt en in een jong stadium aborteert. Er lijkt geen verband te bestaan tussen de zaadzetting en de zaadontwikkeling. Veel auteurs noemden dan ook de moeilijkheden die optraden bij de ontwikkeling van het zaad de belangrijkste factor van de kruisingsbarrière. De juistheid van deze stelling blijkt uit tabel 1: slechts vier hybriden zijn zonder hulp van embryocultuur verkregen, terwijl evenzo nog zeven alloplasmatische hybriden zijn geproduceerd.

De zaadontwikkeling

Bij de bestudering van de ontwikkeling van het zaad is de embryogenese van grote betekenis. Hieraan is dan ook grote aandacht besteed, waaruit ondermeer is gebleken dat de abortie van het zaad enerzijds een gevolg is van een abnormale ontwikkeling van het niet embryonale weefsel, waarbij vooral het endosperm een grote rol speelt, maar dat anderzijds ook het embryo afwijkingen vertoont die niet

steeds aan buiten het embryo gelegen factoren kunnen worden toegeschreven en die mede de oorzaak lijken te zijn van de verminderde vitaliteit van de hybriden.

In tegenstelling tot de beschrijving van de waarnemingen bij de zaadontwikkeling zullen nu eerst het niet-hybride moederlijke weefsel en de antipoden worden besproken en daarna het hybride endosperm en embryo. De bespreking is hoofdzakelijk gebaseerd op de resultaten van de onderzoekingen aan drie kruisingscombinaties (VV × BB, VV × BBBB en VVVV × BBBB), maar in de algemene beschouwingen zullen de overige kruisingscombinaties waar nodig worden opgenomen.

Na de bevruchting gaat het moederlijke weefsel vrij snel groeien, waardoor vergroting van de caryopsis in alle richtingen, maar vooral in de lengte optreedt. De groei verloopt trager of sneller al naar gelang de ontwikkeling van het embryo en het endosperm. De verschillende onderdelen van het moederlijke weefsel ontwikkelen zich bij soortkruising in principe op dezelfde wijze als bij intraraskruising van *H. vulgare*, maar veelal lijkt de ontwikkeling door de abortie van het zaad vroegtijdig te worden onderbroken. Verschillende gebeurtenissen, die samenhangen met de vorming van de stevige korrelwand beginnen soms vroeger en kunnen veelal niet worden afgemaakt. Er is speciale aandacht geschonken aan de ontwikkeling van de vaatbundel en de placenta omdat de voedseltoevoer naar het endosperm en het embryo via deze organen wordt verzorgd. Hierbij zijn geen aanwijzingen gevonden dat abnormaliteiten optreden die een rol spelen bij de abortie, zodat alle gevonden afwijkingen een gevolg lijken van de abortie. In de kruisingscombinaties met het ras Proctor werden bij kruising met diploïde of tetraploïde *H. bulbosum* in de dwarsgerichte cellen ellipsoïde, soms sterk kleurende insluitsels gevormd, die bij intraraskruising niet optraden. De aard en de herkomst van deze insluitsels is niet vastgesteld. Odenbach (1965) vond bij zelfbevruchting van gerst en bij de kruising gerst × rogge in de dwarsgerichte cellen opslag van zetmeelkorrels die later weer oplosten. Deze zetmeelkorrels konden in het hier beschreven materiaal niet worden aangetoond, maar wel is aangetoond dat de bij de soortkruisingen gevonden insluitsels geen zetmeel bevatten.

De antipoden ontwikkelen zich bij soortkruising of bij intraraskruising op vrijwel overeenkomstige wijze, evenwel met geringe verschillen, vooral in de tijd. De degeneratie van de cellen zet soms eerder en soms later in, waarbij meestal bij de soortkruisingen een grotere variabiliteit kan worden waargenomen en waarbij tevens sommige cellen minder snel degenereren. De verschillende op endomitose wijzende structuren die steeds kunnen worden waargenomen lijken bij de soortkruisingen in de cellen die niet zo snel degenereren beter te zijn ontwikkeld. Hierbij is de indruk verkregen dat de grotere variabiliteit van de cellen is geïnduceerd door de abnormale ontwikkeling van de caryopses, met als gevolg dat sommige endomitotische kernen meer kansen kregen zich te ontwikkelen, doordat ze niet voor die tijd al waren gedegenereerd. Dat de antipoden bij het ras Balder anders zijn dan bij het ras Proctor, doordat bij Balder minder cellen en soms meerkernige cellen voorkomen, is een bijkomstigheid die niet van invloed lijkt te

zijn op de soortkruisingen.

Over het algemeen vertoont de hier beschreven ontwikkeling van de antipoden goede overeenkomst met de door Thompson & Johnston (1945) en Odenbach (1965) beschreven ontwikkeling bij kruising van gerst met rogge. De verschijnselen die Cooper & Brink (1944) en Brink & Cooper (1944) hebben waargenomen bij de kruising van *H. jubatum* met rogge, en die later ook door Beaudry (1951) werden gevonden bij een kruising tussen *Elymus virginicus* en *Agropyron repens*, konden niet worden bevestigd. Dit leidt ertoe dat de hypothese van Brink & Cooper, waarin aan de antipoden een centrale plaats wordt toebedacht bij de tot stand koming van de abortie, niet van toepassing is voor de hier onderzochte kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum*.

Het endosperm ontwikkelt zich bij de soortkruisingen in hoge mate abnormaal. De drie onderzochte kruisingscombinaties gedragen zich, behoudens enige verschilpunten, op overeenkomstige wijze, vooral wanneer ze worden vergeleken met de intraraskruising. De kerndelingen verlopen trager; de celvorming komt soms later op gang en verloopt veel trager. Er zijn veel typen abnormale kernen. Reuzekernen lijken te ontstaan door endomitose en doordat bij de celvorming meer kernen per cel worden ingesloten, die dan waarschijnlijk tijdens een delingscyclus versmelten. Microkernen lijken te ontstaan doordat kerndelingen zijn gestoord waarbij chromosomen niet normaal meedoen in de metafase of de anafase en daardoor niet worden opgenomen in de dochterkernen. De gestoorde delingen kunnen de oorzaak zijn van chromatinebruggen die na de kerndeling twee dochterkernen bijeen houden waardoor een soort restitutie-kern ontstaat. Het aantal chromosomen per cel is soms minder dan werd verwacht, waarbij euploïde aantallen de voorkeur lijken te hebben. De nucleoli kunnen abnormaal zijn, zeer groot of vrijwel leeg, doordat ze lijken te zijn gevuld met een grote vacuole, of met een groter aantal kleinere vacuolen. In vroeger of later stadium gaan de kernen degenereren, waarbij twee typen degeneratie zijn waargenomen: ten eerste desintegreren van de kerninhoud en ten tweede een vervloeien van de kerninhoud die daarbij zeer sterk kleurt en later verdwijnt.

Alle abnormaliteiten zijn, zij het in verschillende mate, in alle drie kruisingscombinaties gevonden. Binnen een kruisingscombinatie bestaat eveneens een grote variabiliteit, maar ondanks dat kan het globale verloop van de ontwikkeling worden vastgesteld. Het uiteindelijke resultaat is steeds een volledige degeneratie van het endosperm waarbij het wordt vervormd tot een heldere massa met vaak nog zetmeelkorrels erin. Alvorens nader in te gaan op de oorzaak van de endospermabnormaliteiten zal nu eerst de ontwikkeling van het embryo worden besproken.

Het embryo vertoont in alle onderzochte kruisingscombinaties een trage ontwikkeling. De celdelingen zijn aanvankelijk normaal, maar er treden na verloop van tijd abnormaliteiten op in de kerndelingen die vooral resulteren in microkernen. In de diploïde en de tetraploïde embryo's treden de onregelmatigheden in een vroeg stadium op, soms met een vrij hoge frequentie. De triploïde embryo's blijven langer vrij van storingen, maar omstreeks het begin van de orgaandifferentiatie

treden ook hier onregelmatigheden op. Het is zeer waarschijnlijk dat de microkernen ontstaan uit chromosomen die na de kerndeling niet zijn opgenomen in de dochterkernen, zodat moet worden aangenomen dat deze dochterkernen, of tenminste één van de twee, aneuploïd zijn. De gestoorde delingen in het embryo treden steeds later op dan de abnormaliteiten in het endosperm, maar het is niet mogelijk vast te stellen of hiertussen verband bestaat. Het is aannemelijk dat een toenemende mate van aneuploïdie niet bevorderlijk is voor de ontwikkeling van het embryo.

De embryo's gaan in een vroeger of later stadium degenereren waarbij verschillen tussen de onderzochte kruisingscombinaties optreden. De diploïde en de tetraploïde embryo's degenereren relatief snel, de diploïde veelal na een specifieke groepsgewijze rangschikking van de cellen, waarbij de groepen vaak zijn gevormd rond een meristematisch centrum, en de tetraploïde na de vorming van veel microkernen in vrijwel alle cellen. In de diploïde en de tetraploïde embryo's is nooit orgaandifferentiatie waargenomen. Bij de triploïde embryo's gaat de ontwikkeling over het algemeen langer door voordat de degeneratie begint. Veelal heeft aanvankelijk een min of meer normale orgaandifferentiatie plaatsgevonden, maar na enige tijd worden de organen abnormaal. Er worden slechts weinig wortels aangelegd en het vegetatiepunt is vaak misvormd. Soms heeft een embryo òf alleen wortelaanlegsels òf alleen een spruitaanlegsel. Het scutellum kan allerlei lobvormige uitstulpingen krijgen die soms ook aan de coleorrhiza optreden.

Bij alle kruisingscombinaties bestaat een grote variabiliteit tussen de embryo's, maar over het algemeen vindt de degeneratie van het embryo later plaats dan die van het endosperm. Dit leidt tot de conclusie dat de abnormaliteiten in het embryo enerzijds worden veroorzaakt door moeilijkheden, die tot uiting komen in gestoorde delingen en die waarschijnlijk tevens bij de triploïden leiden tot een niet normale orgaandifferentiatie. Anderzijds bestaat, waarschijnlijk als gevolg van het feit dat de voedseltoevoer voor het embryo voornamelijk via het endosperm wordt gerealiseerd, verband tussen de ontwikkeling van het embryo en die van het endosperm: wanneer er veel endosperm is, dan is ook het embryo relatief goed ontwikkeld, en degenereert het endosperm, dan wordt dit vrijwel meteen gevolgd door een degeneratie van het embryo. Deze afhankelijkheid doet veronderstellen dat de abnormaliteiten in het endosperm niet worden veroorzaakt door het embryo. Het lijkt aannemelijker dat zowel de storingen in het endosperm als die in het embryo worden veroorzaakt door hetzelfde mechanisme, waarbij de endospermabnormaliteiten, als gevolg van de belangrijke plaats die het endosperm inneemt bij de ontwikkeling van het zaad, de uiteindelijke abortie van het zaad veroorzaken. In de literatuur over soortkruisingen bij grassen is nooit melding gemaakt van storingen bij de delingen in het embryo, meestal zijn slechts de antipoden en het endosperm genoemd. Daarbij kwamen verscheidene auteurs tot de conclusie dat de endospermabnormaliteiten de directe oorzaak zijn van de zaadabortie, maar steeds bleef de vraag: waarom treden deze abnormaliteiten op?

In de literatuur zijn verscheidene hypothesen naar voren gebracht. Kihara & Nishiyama (1933) meenden uit de resultaten van reciproke kruisingen tussen een

diploïde en een hexaploïde soort van het geslacht *Avena* te moeten concluderen dat de mannelijke gameet een stimulans geeft aan het endosperm, waarbij de stimulans van de diploïd te zwak en die van de hexaploïd te sterk was. Uit verschillende nadien gepubliceerde artikelen en ook uit het hier beschreven onderzoek zijn geen aanwijzingen te putten dat het nu juist de mannelijke gameet is die het patroon van de verdere ontwikkelingen bepaalt. Reusch (1959 b) stelde vast dat het tijdstip van de celvorming in het endosperm van belang is voor de uiteindelijke hoeveelheid endosperm. Deze redenering lijkt in het algemeen wel juist, omdat een cellulair endosperm trager nieuwe cellen vormt dan een niet-cellulair endosperm nieuwe kernen. Maar wanneer een endosperm van meet af aan al een zeer trage kerndeling vertoont of wanneer er veel abnormaliteiten in optreden, dan kan een laat optredende celwandvorming, of zelfs het uitblijven van celwandvorming, niet of nauwelijks bijdragen tot de uiteindelijke hoeveelheid endosperm.

Omdat bij kruisingen tussen diploïde en tetraploïde cytotypen van dezelfde soort bij de endospermvorming abnormaliteiten optreden die sterk doen denken aan de voor soortkruisingen beschreven afwijkingen (Håkansson & Ellerström, 1950; Cooper, 1951; Håkansson, 1953), is een hypothese naar voren gebracht dat gewijzigde verhoudingen tussen de genomenaantallen in het embryo, endosperm en moederlijke weefsel een rol spelen bij de inductie van de abnormaliteiten. Reusch (1959 a en b) ging nog verder door aan lijnen van *Lolium perenne* en *Festuca pratensis* een zogenaamde genetische waarde toe te kennen en daarbij aan te nemen dat de afwijkingen van de genetische waarden die bij kruising optreden mede verantwoordelijk zijn voor de inductie van de abnormaliteiten. Reusch vermeldt niet op welke wijze de genetische waarde van een genoom of genotype zich manifesteert: de term is slechts gebaseerd op de veronderstelling dat er sprake is van een genetisch effect waarbij een genoom of genotype ten opzichte van een ander genoom of genotype een grotere waarde of sterkte heeft, die niet nader is gedefinieerd. De term suggereert daarom meer dan aan de hand van de waarnemingen mag worden aangenomen. Omdat echter geen nadere, verklarende feitenkennis bekend is zal in het hierna volgende de term, met het nodige voorbehoud, worden gebezigd. In het materiaal van Reusch zou de genetische waarde van *L. perenne* ongeveer tweemaal zo groot zijn als die van *F. pratensis*, waardoor de overeenkomst met kruisingen tussen diploïde en tetraploïde cytotypen van eenzelfde soort wordt verklaard. De verhouding van de genetische waarden van het embryo en endosperm zou volgens Reusch van minder belang zijn dan die van het endosperm en moederlijke weefsel.

De resultaten van Landes (1939) lijken in tegenspraak met deze hypothese. Zij vond bij zelfbestuiving van rogge dat veelal de bevruchting uitbleef, als gevolg van auto-incompatibiliteit; vond bevruchting echter wel plaaats dan aborteerden de meeste zaden, waarbij dezelfde endospermabnormaliteiten werden gevonden, zonder dat er sprake was van gewijzigde genomenverhoudingen. Het is echter niet uitgesloten dat in rogge de zeer sterke gevoeligheid voor inteelt bij deze abortie een rol speelt, waardoor de resultaten van Landes minder goed met die in soort-

kruisingen of kruisingen tussen diploïden en tetraploïden kunnen worden vergeleken.

Hoewel Reusch (1959 b) de gevonden reciproke verschillen en andere verschillen van geringere importantie verklaart door de aangenomen verhoudingen van de genetische waarden, acht hij deze verhoudingen niet de hoofdoorzaak van de abnormaliteiten. Hiervoor neemt hij aan dat een disharmonie tussen de kern en het plasma bestaat, welke zich manifesteert in een verstoord DNA-metabolisme. Odenbach (1965) nam eveneens aan dat het DNA-metabolisme is verstoord, maar hij veronderstelde dat deze verstoring wordt geïnduceerd door bepaalde genen en dat de genomenverhoudingen geen rol spelen. Tenslotte heeft Stebbins (1958) in een overzichtsartikel als algemeen verklarende oorzaak aangenomen dat er waarschijnlijk in al deze kruisingen sprake is van een niet-gebalanceerde gendosering.

Wanneer deze hypothesen worden betrokken op de kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* dan blijkt allereerst dat de gewijzigde genomenverhoudingen waarschijnlijk geen rol spelen, want de kruisingen tussen de diploïde cytotypen en die tussen de tetraploïde cytotypen hebben alle de goede genomenverhoudingen 2 : 3 : 2 voor embryo : endosperm : moederlijk weefsel. maar de ontwikkeling is slechter dan bij de kruising tussen diploïde *H. vulgare* en tetraploïde *H. bulbosum*. Wordt echter aangenomen dat een genoom van *H. vulgare* een tweemaal zo grote genetische waarde heeft als een genoom van *H. bulbosum*, dan blijken de reciproke kruisingen tussen de diploïde *H. vulgare* en de tetraploïde *H. bulbosum* de goede verhouding van de genetische waarden te hebben, terwijl de reciproke kruisingen tussen de tetraploïde *H. vulgare* en de diploïde *H. bulbosum* het sterkst afwijken. Deze veronderstelling zou, evenals Reusch (1959 a en b) heeft opgemerkt, de gevonden verschillen tussen de kruisingscombinaties kunnen verklaren, maar is toch onvoldoende als verklaring van alle abnormaliteiten.

Daarom moet de oorzaak van de abnormaliteiten worden gezocht òf binnen het embryo en het endosperm òf in een interactie tussen embryo en endosperm òf in een buiten het embryo en endosperm gesitueerde invloed op beide weefsels. De resultaten van het onderzoek doen vermoeden dat de eerste mogelijkheid het waarschijnlijkst is. De storingen in beide weefsels vertonen duidelijke overeenkomst. Alle storingen die in het embryo zijn waargenomen worden ook in het endosperm aangetroffen, terwijl in het endosperm daarnaast nog een paar typen abnormaliteiten voorkomen, waarvan de reuzekernen het meest opvallen. Zowel het endosperm als het embryo hebben een hybride karakter, zodat er sprake zou kunnen zijn van een disharmonie tussen de genomen die samen in de kern voorkomen of tussen de genomen, samen of afzonderlijk, en het cytoplasma. Omdat planten zijn geproduceerd waarin genomen van *H. vulgare* optreden in het cytoplasma van *H. bulbosum* (HA- en A-nummers; Davies, 1956 en 1958) en omdat bij de geproduceerde triploïde en tetraploïde hybriden geen opvallende verschillen bestaan tussen de planten die zijn verkregen uit reciproke kruisingen, moet worden aangenomen dat een eventuele disharmonie tussen de kern en het cytoplasma niet of

in geringe mate mede verantwoordelijk is voor de onregelmatigheden.

Op deze wijze is aannemelijk gemaakt dat de oorzaak van de storingen die in het embryo en het endosperm optreden is gelocaliseerd binnen de kern. Hierbij zou de onderlinge verhouding van de aantallen ouderlijke genomen of van de genetische waarden van de ouderlijke genomen binnen een hybride kern van belang kunnen zijn. Gezien de resultaten lijkt het onwaarschijnlijk dat de verhouding van de aantallen ouderlijke genomen in een kern een invloed uitoefent. Bij de genetische waarden is het echter opvallend dat, indien wederom wordt aangenomen dat de genetische waarde van een genoom van *H. vulgare* tweemaal zo groot is als die van een genoom van *H. bulbosum*, in de geproduceerde triploïde embryo's de verhouding tussen de genetische waarden van de ouderlijke genomen 1 : 1 is. Bij alle andere typen embryo's is deze verhouding in meer of mindere mate hiervan afwijkend. Wordt deze gedachtengang echter doorgetrokken naar de verhoudingen binnen de kernen van het endosperm, dan zou in sommige kruisingen waarbij *H. bulbosum* als moederplant is gebruikt, eveneens de verhouding 1 : 1 worden bereikt, waarbij dan dienovereenkomstig de ontwikkeling van het weefsel minder sterk gestoord zou moeten zijn. Hoewel deze kruisingen niet in detail zijn onderzocht is bij de prepareerwerkzaamheden ten behoeve van de embryocultuur niet de indruk verkregen dat het endosperm van deze kruisingen beter was. Daarom kan de mate van de delingsstoring wel enigszins worden beïnvloed door de verhouding van de genetische waarden binnen een kern, maar deze verhouding zal niet de hoofdoorzaak van de storingen zijn.

Uit deze gegevens wordt geconcludeerd dat de abortie van het zaad wordt veroorzaakt door storingen in de ontwikkeling van het endosperm en het embryo. De storingen worden door hetzelfde mechanisme teweeg gebracht, waarbij in het endosperm een groter aantal typen storingen zijn waargenomen.. Het tijdstip van de abortie lijkt in hoge mate te worden bepaald door ontwikkeling en degeneratie van het endosperm. Hierbij dient echter nog opgemerkt te worden dat Reusch (1959 c) een invloed heeft waargenomen van de uitwendige omstandigheden op de ontwikkeling van het endosperm. Vooral een lage temperatuur veroorzaakte een vertraging van de beginontwikkeling van het endosperm die in de latere ontwikkelingsstadia wordt weerspiegeld. Gezien de verschillen tussen de jaren waarin de kruisingen zijn uitgevoerd, welke verschillen zich niet alleen in de zaadzetting maar ook in de embryo-opbrengst manifesteerden, lijkt het niet onwaarschijnlijk dat ook bij de hier beschreven kruisingen een invloed van de uitwendige omstandigheden een rol speelt. Schooler (pers. med.) meende eveneens een invloed van de temperatuur op het slagingsperscentage van kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* te kunnen onderkennen. Hoe deze invloed tot uiting komt is echter niet bekend.

Hoewel het onderzoek naar de ontwikkeling van het zaad al veel heeft bijgedragen tot de verklaring van de zaadabortie, is de kernvraag naar de oorzaak van de storingen nog onbeantwoord gebleven. Het lijkt erop dat andere aspecten, die bij het onderzoek van de hybriden naar voren zijn gekomen, mede verband houden

met de genoemde storingen, zodat later nog nader op de verklaring van de zaadabortie zal worden teruggekomen, waarbij de genoemde hypothesen van specifieke genwerking en niet-gebalanceerde gendosering eveneens nader ter sprake zullen komen.

De embryocultuur

Veelal wordt aangenomen dat, wanneer een levensvatbare plant wordt verkregen met behulp van embryocultuur uit een kruising, waarbij normaliter het zaad vroeger of later aborteert, het embryo het lijdend voorwerp is bij de abortie en daarbij op zichzelf volkomen normaal is (zie onder andere Brink *et al.*, 1944). Dat deze stelling in zijn algemeenheid niet opgaat is hierboven aannemelijk gemaakt. Er kunnen abnormaliteiten in een embryo optreden, maar deze hoeven niet altijd een gunstig verloop van de embryocultuur te belemmeren. Het zou kunnen zijn dat juist in die embryo's die in de cultuurbuis zijn uitgegroeid tot een levensvatbare plant geen abnormaliteiten zijn opgetreden, maar dit lijkt onwaarschijnlijk.

Wanneer in tabel 6 het aantal embryocultures wordt vergeleken met het aantal daaruit gegroeide planten, blijkt dat de meeste embryocultures mislukken. Hiervoor zijn verschillende oorzaken aan te wijzen. Ongeveer 15 % van de cultures gaat verloren door infectie met schimmels en bacteriën. De herkomst van deze organismen zal hoofdzakelijk moeten worden gezocht in een niet volledige uitwendige ontsmetting door het calciumhypochloriet. Dit ontsmettingsmiddel is vrij zwak, hetgeen noodzakelijk is teneinde beschadiging van de caryopses te voorkomen. Bij de bestudering van de microtoompreparaten is gebleken dat soms binnen de caryopses micro-organismen kunnen voorkomen, welke door uitwendige ontsmetting niet zullen worden gedood.

Een andere belangrijke reden voor het mislukken van de embryocultures is dat veel embryo's te klein zullen zijn geweest om op het voedingsmedium te gaan groeien. De toevoeging van 7 % suiker in plaats van 2 % suiker heeft ongetwijfeld een gunstig effect op de ontwikkeling van de embryo's. Desondanks zijn er veel embryo's die aanvankelijk goed groeiden maar later in de cultuurbuis dood gingen. Ook zijn er embryo's die zich abnormaal ontwikkelen, doordat allerlei storingen in de differentiatie optreden. Norstog (1961) vond bij gerst dat door zelfbevruchting verkregen zeer kleine embryo's, waarin nog geen orgaandifferentiatie was opgetreden, na isolering een abnormale differentiatie konden vertonen. Dit verschijnsel kan ook op de hier beschreven hybride embryo's van toepassing zijn, maar daarnaast waren er vaak grote embryo's die abnormaal uitgroeiden. Konzak *et al.* (1951) en Davies (1956 en 1960) ondervonden eveneens moeilijkheden bij de embryocultuur en schreven dit toe aan de onnatuurlijke omstandigheden waarin het embryo wordt geplaatst en aan beschadigingen tijdens het prepareren. Nu is bij de bestudering van de microtoompreparaten waargenomen dat in de hybride embryo's *in vivo* onregelmatigheden optreden in de celdelingen en tevens onregelmatigheden kunnen voorkomen bij de orgaandifferentiatie. Wordt nu een embryo

dat abnormaliteiten bevat geïsoleerd en overgebracht naar onnatuurlijke omstandigheden, dan kan niet worden verwacht dat deze abnormaliteiten verdwijnen. Het lijkt waarschijnlijker dat door de omstandigheden de abnormaliteiten sterker tot uiting zullen komen. Gezien het feit dat door zelfbevruchting verkregen embryo's van gerst op het medium goed uitgroeien, mag worden aangenomen dat de abnormaliteiten bij de ontwikkeling van de hybride embryo's *in vitro* niet door het medium worden geïnduceerd. Voorts is bij de embryocultuur het uitprepareren met grote zorg geschied, zodat beschadigingen op grote schaal uitgesloten moeten worden geacht. Daarom kunnen verscheidene van de moeilijkheden bij de embryocultuur worden verklaard door aan te nemen dat de interne storingen in het embryo een normaal uitgroeien in de weg kunnen staan.

Samengevat betekent dit dat het mislukken van veel embryocultures moet worden toegeschreven aan infectie met schimmels en bacteriën, het isoleren van voor de cultuur te kleine embryo's en het optreden van storingen in de celdelingen en de orgaandifferentiatie, welke storingen veroorzaakt worden door binnen het embryo gelocaliseerde factoren.

Hybride planten

De hybriden hebben een overeenkomstige morfologie en vertonen tevens veel overeenkomst met *H. bulbosum*; ze zijn echter kleiner dan *H. bulbosum*, hebben een verminderde vitaliteit en zijn vrijwel geheel steriel. De diploïde en tetraploïde hybriden zijn in de literatuur niet beschreven, terwijl de triploïde hybriden zijn beschreven door Kuckuck (1934), Konzak *et al.* (1951), Morrison & Rajhathy (1959) en Davies (1956 en 1960). Zowel door deze auteurs als in het hier beschreven materiaal zijn enkele morfologische verschilpunten tussen de hybriden en *H. bulbosum* waargenomen, waarin veelal een invloed van *H. vulgare* is te herkennen, zoals bijvoorbeeld naalden op de buitenste kroonkafjes van de zijdelingse aartjes en kortere helmknoppen (zie tabel 7). Er is geen of zeer weinig verschil tussen hybriden die zijn verkregen uit reciproke kruisingen van dezelfde kruisingscombinatie. Er is wel een grote variabiliteit die waarschijnlijk wordt veroorzaakt door genetische verschillen binnen de oudersoorten, want zowel tussen de rassen en herkomsten van *H. vulgare* als tussen de herkomsten van *H. bulbosum* bestaan in het gebruikte materiaal grote verschillen. Daarbij komt dat *H. bulbosum* als kruisbevruchter in sterke mate heterozygoot zal zijn, hetgeen een verklaring is voor verschillen tussen hybriden die zijn ontstaan uit kruisingen tussen dezelfde kruisingsouders.

De verminderde vitaliteit van de hybriden komt tot uitdrukking doordat verscheidene planten voor de eerste bloei al dood gingen en doordat ondanks het duidelijke, van *H. bulbosum* afkomstige meerjarige karakter, steeds nog planten doodgaan, waarbij het tijdstip van het afsterven niet is geconcentreerd in de periode na het groeiseizoen, zoals bij een neiging tot éénjarigheid te verwachten zou zijn. Dan is er nog de specifieke bruine vlekvorming in het blad die bij veel hybriden

voorkomt en waarvan de oorzaak onbekend is.

Een bijzonder aspect van de verminderde vitaliteit is de cytologische instabiliteit. Bij het onderzoek naar de zaadabortie is reeds gebleken dat in de embryo's gestoorde delingen en microkernen voorkomen, waarbij de microkernen worden beschouwd als een gevolg van de delingsstoringen. In dat verband is de veronderstelling naar voren gebracht dat verscheidene kernen in de embryo's een aneuploïd aantal chromosomen hebben. Nu zijn in alle typen hybriden eveneens microkernen aangetroffen. Tevens worden in het vegetatieve weefsel cellen met een aneuploïd aantal chromosomen gevonden: bij de diploïden minder frequent dan bij de tri- en tetraploïden. Hieruit blijkt dat de storingen in de delingen niet zijn gebonden aan het embryonale stadium van de hybriden. Bij de diploïde en triploïde hybriden zijn de afwijkingen van het euploïde aantal meestal niet groot; één respectievelijk één of twee chromosomen, waarbij hyper- en hypoploïde cellen beide voorkomen. Bij de tetraploïde hybriden zijn de afwijkingen van het euploïde aantal veelal groter, zodanig dat terugval naar het diploïde niveau vaker voorkomt dan constant tetraploïd blijven, terwijl soms ook hyperploïde cellen zijn gevonden. De cytologische instabiliteit komt zeer sterk tot uiting in de premeiotische delingen, waarvan in het algemeen wordt aangenomen dat ze minder stabiel zijn dan mitosen in het vergetatieve weefsel (Rees, 1961). Als gevolg van deze instabiliteit zijn veel pollenmoedercellen aneuploïd, hetgeen reeds uitgebreid ter sprake is gekomen (tabellen 25, 29 en 31). Tevens worden in de pollenmoedercellen allerlei insluitsels in het cytoplasma gevonden die vermoedelijk een chromosomale oorsprong hebben (tabellen 26 en 32). Eén en ander zal nader worden besproken.

De karyotypen en de nucleoli

Uit het onderzoek naar de morfologie van de chromosomen is gebleken dat de onderlinge verhoudingen van de chromosomenlengten binnen de genomen in de hybriden dezelfde is als binnen de oudersoorten. De vraag of de reële chromosomenlengte verandert kan aan de hand van dit onderzoek niet worden beantwoord. De genoomindex in de drie typen hybriden is vrijwel gelijk, zodat, indien er veranderingen zijn opgetreden, dit in alle typen hybriden in dezelfde mate zal zijn geschied.

In alle soorten hybriden is amfiplastie vastgesteld waarbij steeds van de satellietchromosomen van *H. bulbosum* de secundaire insnoering niet zichtbaar was. Tevens is het aantal nucleoli in de hybriden lager dan de som van het aantal nucleoli in de ouders gedeeld door twee. Maar het is hoger dan de helft van het aantal nucleoli in de herkomst van *H. vulgare* die als ouder heeft gediend, zodat moet worden aangenomen dat in de hybriden een activiteit uitgaat van de genomen van *H. bulbosum*, waardoor meer nucleoli aanwezig zijn.

Het verschijnsel amfiplastie is meermalen waargenomen maar niet verklaard (Navashin, 1928; Heneen, 1962 en 1963; Keep, 1962). Het is niet duidelijk of het niet-optreden van de nucleolus de oorzaak of het gevolg is van het niet zicht-

baar zijn van de secundaire insnoering, of dat beide gebeurtenissen worden veroorzaakt door het onderdrukken van de nucleolus-activiteiten in het bepaalde chromosoom. Tevens zijn er verschillende hypothesen voor het niet-optreden van de nucleolus: competitie om nucleolair materiaal of genetische, structurele of cytoplasmatische onderdrukking van de nucleolus-activiteit (Heneen, 1962; Keep 1962).

Uit het hier beschreven materiaal zou de conclusie getrokken kunnen worden dat satellietchromosomen van *H. bulbosum* in de soorthybriden, ondanks het niet zichtbaar zijn van de secundaire insnoeringen, in staat moeten worden geacht nucleoli te vormen, zij het in verminderde mate. Het blijft dan echter de vraag waarom in de tetraploïde hybriden eigenlijk nauwelijks extra nucleoli aanwezig zijn, zoals blijkt uit de vergelijking van de aantallen nucleoli in HY 4005 en HP 2005 (een diploïde, op *H. vulgare* lijkende, na vegetatieve eliminering van chromosomen ontstane nakomeling van HY 4005), en waarom in de diploïde hybriden gemiddeld even veel extra nucleoli aanwezig zijn als in de triploïde hybriden.

Wordt daarentegen aangenomen dat een chromosoom zonder secundaire insnoering normaliter niet in staat is een nucleolus te vormen, dan zouden de verschijnselen kunnen worden verklaard door aan te nemen dat de genomen van *H. bulbosum* in de hybriden de nucleolusvorming van de genomen van *H. vulgare* beïnvloeden. Deze beïnvloeding zou bijvoorbeeld kunnen worden geëffectueerd via het ritme van verschijnen, versmelten en verdwijnen van de nucleoli, waardoor de indruk kan worden verkregen dat meer nucleoli aanwezig zijn. Maar ook een rechtstreekse beïnvloeding van het aantal nucleoli dat door de genomen van *H. vulgare* wordt gevormd is mogelijk, waarbij ter verklaring van het overeenkomstige gedrag van de diploïde en triploïde hybriden zou kunnen worden aangenomen dat de sterkte van de invloed onafhankelijk zou zijn van het aantal genomen van *H. bulbosum* dat de invloed uitoefent. Waarom echter in de triploïde hybriden zeer zelden meer nucleoli per cel worden gevonden dan er maximaal verwacht kunnen worden blijft onbegrijpelijk. Het optreden van hyperploïde cellen met een extra satellietchromosoom van *H. vulgare* zou een mogelijkheid kunnen zijn, want er zijn wel eens cellen met 22 chromosomen, waarvan drie met satellieten, gevonden. Dat hetzelfde verschijnsel niet ook in de diploïde hybriden wordt aangetroffen zou kunnen berusten op het feit dat in deze hybriden de hyperploïde cellen minder vaak voorkomen.

Wanneer de aantallen nucleoli in de profase en diakinese van de reductiedeling worden bekeken, dan blijkt in de ouders en in de hybriden een hoge mate van nucleolus-versmelting op te treden. In diploïde gerst worden meestal één en zelden twee nucleoli gevonden (zeer zelden meer dan twee), waarbij per cel nooit meer dan twee bivalenten met de nucleoli waren geassocieerd (Inouye, 1933; Burnham *et al.*, 1954; Tsuchiya, 1960 en 1964). Uit het onderzoek van Tsuchiya, waarbij trisomen waren betrokken, is gebleken dat in de trisomen van de chromosomen 1-5 iets meer nucleoli aanwezig zijn dan in de euploïden, maar er waren geen aanwijzingen dat de chromosomen 1-5 met de nucleoli waren geassocieerd.

In de trisomen van de chromosomen 6 en 7 waren vaker meer nucleoli aanwezig, waarbij het percentage cellen met extra nucleoli bij de trisoom van chromosoom 6 groter was dan bij die van chromosoom 7. De nucleoli leken uitsluitend te zijn geassocieerd met deze twee chromosomen. Hieruit is geconcludeerd dat onder invloed van een extra chromosoom meer nucleoli worden gevormd. Het associatiepatroon en de verschillen tussen chromosomen 1-5, chromosoom 6 en chromosoom 7 verschaffen aanwijzingen dat de invloed waarschijnlijk niet verloopt via het fusie-patroon maar via een vergroting van het aantal nucleoli dat door de chromosomen 6 en 7 wordt gevormd, waarbij chromosoom 6 de grootste nucleolusactiviteit lijkt te hebben.

In diploïde *H. bulbosum* wordt steeds één nucleolus gevonden die is geassocieerd met één bivalent. In de tetraploïde *H. bulbosum* worden meestal één en zelden twee nucleoli aangetroffen, waarbij per cel nooit meer dan één quadrivalent of twee bivalenten met de nucleoli zijn geassocieerd. Hieruit kan de conclusie worden getrokken dat in *H. bulbosum* één chromosoom verantwoordelijk is voor de vorming van de nucleolus. Dit zal chromosoom 6 zijn, want in de diakinese kon de satelliet vaak als zodanig worden waargenomen.

In de hybriden worden meestal één en zelden twee nucleoli aangetroffen (éénmaal meer dan twee). Als gevolg van de pseudo-chiasmata is de vaststelling van het verband tussen nucleoli en chromosomen nogal moeilijk. Uit de waarnemingen kan echter geconcludeerd worden dat in de diploïde en de triploïde hybriden waarschijnlijk niet meer dan één of twee chromosomen met de nucleolus zijn verbonden, maar dat aan deze chromosomen nog andere chromosomen geassocieerd kunnen zijn. In de tetraploïde hybriden zijn meestal één bivalent of zelden twee bivalenten of één multivalent met de nucleoli geassocieerd. Hieruit blijkt dat in de hybriden de nucleoli waarschijnlijk worden gevormd door niet meer dan twee chromosomen of chromosomenparen. Het ligt voor de hand te veronderstellen dat chromosomen 6 en 7 van *H. vulgare* deze twee chromosomen zijn.

Worden de resultaten van het onderzoek in vegetatief en generatief weefsel gecombineerd dan kan de volgende conclusie worden getrokken: in de hybriden wordt de nucleolus-activiteit van chromosoom 6 van *H. bulbosum* waarschijnlijk geheel onderdrukt, zodat alle nucleoli door de chromosomen 6 en 7 van *H. vulgare* worden gevormd. Onder invloed van de genomen van *H. bulbosum* vormen deze chromosomen meer nucleoli, waarbij deze invloed in de hybriden waarin slechts één genoom van *H. vulgare* voorkomt sterker tot uiting komt.

De oorzaak van de onderdrukking van de nucleolus-activiteit van chromosoom 6 van *H. bulbosum* is niet cytoplasmatisch, want er is geen verschil tussen de reciproke kruisingen. Het lijkt het meest waarschijnlijk dat de primaire oorzaak van de onderdrukking een genetisch effect is, waarbij in het midden gelaten moet worden of dit effect tot uiting komt via het onderdrukken van de secundaire insnoering of dat het wegblijven van de insnoering het gevolg is van het feit dat de 'nucleolus organizer' is geïnactiveerd. De weinige uitzonderingen die zijn gevonden kunnen voor een gedeelte worden verklaard door aneuploïdie, andere

moeten onverklaard blijven, waarbij echter opgemerkt kan worden dat in het materiaal van Inouye (1933) eveneens zelden meer nucleoli voorkwamen dan werden verwacht.

De eliminering van chromosomen

Verscheidene malen is reeds naar voren gebracht dat in hybride weefsels verschijnselen kunnen optreden die leiden tot veranderingen in het aantal chromosomen. Tevens zijn uit verscheidene van de onderzochte soortkruisingscombinaties planten verkregen met uitsluitend chromosomen van *H.vulgare*, waarbij het chromosomenaantal vrijwel steeds de helft was van dat van het cytotype van *H. vulgare* dat in de kruising was gebruikt. Daar in deze kruisingen *H. vulgare* als moeder- en als vaderplant is gebruikt, is verondersteld dat al deze planten zijn ontstaan uit een hybride zygote, waarbij in het embryonale stadium of kort daarna een splitsing heeft plaats gevonden, zoals die ook is gevonden in het vegetatieve weefsel van volgroeide tetraploïde hybriden. Deze veronderstelling zal in de paragraaf 'Overige nakomelingen' van dit hoofdstuk nader ter sprake komen. Alle verschijnselen waarbij chromosomenaantallen veranderen zullen nu worden besproken en met elkaar worden vergeleken, waarbij hoofdzakelijk aandacht zal worden besteed aan de eliminering van chromosomen, omdat dit het meeste voorkomt. De in het endosperm gevormde reuzekernen en de hyperploïde cellen van vegetatief en generatief weefsel zullen in dit verband buiten beschouwing blijven.

In het endosperm en in de embryo's zijn storingen in de delingen gevonden waarbij chromosomen niet normaal meedoen aan de bewegingen in metafase en anafase. In de metafase liggen deze chromosomen buiten de spoelfiguur in het cytoplasma of schijnbaar los in de spoelfiguur maar dan duidelijk niet in de equator. Soms zijn chromosomen waargenomen die minder sterk zijn gecontraheerd dan de overige chromosomen in dezelfde cel. In de anafase zijn eveneens chromosomen gevonden die ergens los in de cel liggen en niet naar de polen gaan en daarnaast zijn er chromosomen die achterblijven in de equator. Soms lijkt het erop dat chromosomen gefragmenteerd zijn maar dit is in microtoompreparaten veelal moeilijk met zekerheid vast te stellen. Een andere anafase-storing is het optreden van chromatinebruggen die soms zeer lang stand kunnen houden. Het aantal chromatinebruggen per cel is zeer variabel. De aard van deze storingen maakt het aannemelijk dat de microkernen die in deze weefsels worden gevonden zullen zijn ontstaan uit de chromosomen die na de kerndeling niet zijn opgenomen in de dochterkernen. Een opvallend verschijnsel is nog dat bij tellingen van chromosomenaantallen in het endosperm vrij veel aneuploïde cellen zijn gevonden, waarbij in de kruisingen tussen diploïde *H. vulgare* en diploïde en tetraploïde *H. bulbosum* in het endosperm verscheidene malen ook cellen zijn geteld met precies 14 chromosomen. Reeds eerder is aannemelijk gemaakt dat de oorzaak van de storingen moet worden gezocht binnen de hybride kernen en tevens dat deze storingen verantwoordelijk zijn voor de abortie van het zaad.

De afwijkingen van het euploïde aantal chromosomen in het vegetatieve weefsel van diploïde en triploïde hybriden zijn niet groot. Bij de tetraploïde hybriden zijn daarentegen veel grotere afwijkingen gevonden, zodanig dat planten of delen van planten diploïd werden. Uit de bestudering van de morfologie van deze planten of delen van planten en aan de hand van de karyotypen die zijn bepaald aan deze planten of aan de nakomelingen ervan, is komen vast te staan dat in één geval de tetraploïde hybride is veranderd in een diploïde hybride, en dat in alle overige gevallen de tetraploïde hybriden zijn veranderd in diploïde vormen van *H. vulgare* of in vormen die daar sterk op leken.

Kortgeleden is een geval van vegetatieve splitsing beschreven dat waarschijnlijk berustte op semi-gamie (Turcotte & Feaster, 1967). Nakomelingen van kruisingen in het geslacht *Gossypium* hadden een chimere structuur met sectoren vaderlijk respectievelijk moederlijk weefsel. Hierbij wordt aangenomen dat de mannelijke gameet de eicel binnendringt maar niet versmelt met de vrouwelijke gameet waardoor een binucleaire 'zygote' ontstaat. In een vroeg stadium wordt tussen de mannelijke en vrouwelijke kern een celwand gevormd, al of niet na spontane verdubbeling van het chromosomenaantal. Beide cellen vormen vervolgens een sector van de plant.

Het is niet waarschijnlijk dat de vegetatieve splitsing in de hier beschreven tetraploïde hybriden wordt veroorzaakt door semi-gamie. In de eerste plaats zijn in de planten die vegetatieve splitsing vertoonden tetraploïde kernen gevonden waarin de chromosomen van beide ouders door elkaar in één kern voorkomen. In de tweede plaats is een tetraploïde hybride veranderd in een diploïde hybride, waarbij geen sprake is van splitsing in ouderlijke bestanddelen. En in de derde plaats is bij een splitsing nooit een sector gevonden met uitsluitend chromosomen van *H. bulbosum*.

Gezien het feit dat in alle typen hybride planten, evenals in alle typen embryo's die zijn bestudeerd, microkernen zijn aangetroffen, kan worden aangenomen dat de afwijkingen van de oorspronkelijke chromosomenaantallen in het vegetatieve weefsel van de hybride planten worden veroorzaakt door hetzelfde mechanisme dat in de embryo's werkzaam is. Hierbij worden chromosomen spontaan geëlimineerd als gevolg van gestoorde kerndelingen.

In de literatuur is spontane somatische eliminering van chromosomen bij planten in verschillend verband naar voren gebracht. Cauderon & Cauderon (1956) hebben twee hybriden beschreven tussen *H. bulbosum* (4x) en *H. secalinum* (4x), die beide instabiel waren en wel zodanig dat één hybride een chromosomenaantal had dat varieerde rond de 28 chromosomen, terwijl in de andere hybride de beide genomen van *H. secalinum* geleidelijk werden geëlimineerd. Li & Tu (1947) hebben in verband met afwijkingen van het normale aantal chromosomen in de amfiploïd van *Triticum timopheevi* en *Aegilops bicornis* een hypothese geformuleerd waarin een bij de kerndeling optredende onvolledige synchronisatie van de chromosomen van de verschillende genomen verantwoordelijk wordt gesteld voor de afwijkingen. Vaarama (1949) heeft in vegetatieve en generatieve tetraploïde nakomelingen van met colchicine behandelde *Ribes nigrum* eveneens afwijkingen

van het normale aantal chromosomen waargenomen, die werden veroorzaakt doordat in één cel naast elkaar twee spoelfiguren optraden die ieder de vorming van twee dochterkernen tot gevolg hadden. De verschijnselen worden verklaard door aan te nemen dat de colchicine een blijvende verandering in de chromosomen heeft bewerkstelligd die de abnormale kerndelingen tot gevolg heeft. Andere auteurs hebben in planten, die na colchicine-behandeling een hoog aantal chromosomen per cel bevatten, aanwijzingen gevonden voor somatische eliminering van chromosomen. Rajhathy (1963) beschreef een teruglopen van het chromosomenaantal van octoploïde *H. murinum* en Lindström (1965) vond aanwijzingen in octoploïde *Secale cereale* en in octoploïde *Triticale*, waarbij in de meiose van de octoploïde rogge tevens cytomixis werd gevonden. Geen van deze auteurs is echter van mening dat hierbij sprake is van een na-effect van de colchicine. Het lijkt eerder zo dat de polyploïden minder stabiel zijn, waardoor afwijkingen van het chromosomenaantal ontstaan en waarbij tevens, als gevolg van de polyploïdie, minder selectie tegen aneuploïde cellen bestaat.

Vrij regelmatig wordt in de literatuur melding gemaakt van hypoploïde pollenmoedercellen, waarbij aannemelijk wordt gemaakt dat deze aneuploïdie wordt veroorzaakt door storingen in de premeiotische delingen. Love (1938) vond dergelijke aneuploïdie in op *Triticum vulgare* (6x=42) lijkende planten met 39, 40, 41 en 42 chromosomen die waren verkregen uit kruisingen tussen *T. vulgare* (6x) en *T. durum* (4x). De chromosomenaantallen in de afwijkende pollenmoedercellen varieerden van 15-34 (één cel had 61 chromosomen). Sachs (1952) beschreef verschillende afwijkingen in pollenmoedercellen van een grote groep amfiploïden tussen vertegenwoordigers van de geslachten *Triticum*, *Aegilops* en *Agropyron*. Er was in dit materiaal geen correlatie tussen het percentage aneuploïde cellen en de mate van paring in de euploïde cellen. In de aneuploïde cellen werd een hoog percentage univalenten gevonden waaruit werd geconcludeerd dat de eliminering volgens toeval plaats vond, een conclusie die als zodanig betwistbaar is, want er kunnen meer mechanismen een rol spelen bij de vorming van univalenten. De aneuploïde gameten konden soms functioneel zijn. Hertzsch & Nitzsche (1966) leidden uit de bestudering van nakomelingen van dodecaploïde *Festuca arundinacea* af dat na storingen in de meiose of in de premeiotische delingen functionele gameten waren ontstaan met een verminderd aantal chromosomen. De resultaten toonden echter aan, dat gameten met een chromosomenaantal dat een veelvoud van het grondtal was, òf meer voorkwamen òf beter functioneerden dan de aneuploïde gameten.

In het hier beschreven onderzoek zijn in de pollenmoedercellen eveneens grote afwijkingen van de euploïde chromosomenaantallen vastgesteld. Wanneer deze afwijkingen worden vergeleken met die in het vegetatieve weefsel dan blijkt dat bij diploïde en triploïde hybriden de afwijkingen in de pollenmoedercellen groter zijn dan die in het vegetatieve weefsel, terwijl bij de tetraploïde hybriden in pollenmoedercellen en vegetatief weefsel bijna alle aantallen tussen 28 en 14 chromosomen worden gevonden, met in de pollenmoedercellen echter een veel hogere

frequentie van aneuploïde cellen. Hieruit kan de conclusie worden getrokken dat de premeiotische delingen waarschijnlijk sterker zijn gestoord dan de overige mitotische delingen. In de pollenmoedercellen zijn tevens allerlei insluitsels aangetroffen, die voornamelijk optraden in de diploïde en tetraploïde hybriden. Deze twee typen hybriden hebben een veel hoger percentage aneuploïde pollenmoedercellen dan de triploïde hybriden, hetgeen een aanwijzing kan zijn dat de insluitsels iets met de aneuploïdie te maken hebben. Wordt deze aanwijzing gevoegd bij de resultaten die in de tabellen 28 en 34 zijn weergegeven, waaruit blijkt dat de meeste insluitsels voorkomen in hypoploïde cellen, dan kan daaruit worden geconcludeerd dat de insluitsels vermoedelijk ontstaan uit chromosomen die in gestoorde delingen niet in de dochterkernen worden opgenomen. Er bestaat zodoende een duidelijk verband tussen de storingen in de mitotische delingen van vegetatief en generatief weefsel. Het feit dat in het vegetatieve weefsel relatief minder storingen voorkomen en dat slechts microkernen als insluitsels worden gevonden terwijl in de pollenmoedercellen juist andere typen insluitsels het meest voorkomen is moeilijk te verklaren. Mogelijk houdt dit verband met verschillen die bestaan tussen een vegetatief en een generatief meristeem. Volgens Stebbins (1965) is een belangrijk verschil tussen deze twee typen meristemen de tijd die verloopt tussen twee opeenvolgende celdelingen. In het vegetatieve meristeem is die tijd voldoende om een geleidelijke toename van de celgrootte te laten plaatsvinden. In het generatieve meristeem is daarentegen de opvolging van de celdelingen zo snel dat de cellen even groot blijven of kleiner worden. De overgang in een meristeem van vegetatieve naar generatieve fase gaat gepaard met de volgende gebeurtenissen: (1) toename van DNA-synthese, (2) verhoging van tempo van het mitotische ritme, (3) verandering van de oriëntatie van de mitosen in één vlak tot oriëntatie in drie vlakken en (4) toename van RNA-synthese. Vooral de versnelling van het mitose-ritme zou een oorzaak kunnen zijn van het verschil in de frequentie van de storingen en van het gewijzigde karakter van de insluitsels. Het is in dit verband opmerkelijk dat Stebbins vermeldt dat in het vegetatieve meristeem groepen cellen, vooral op momenten van actieve differentiatie, tijdelijk het karakter van een generatief meristeem kunnen aannemen.

De aneuploïde pollenmoedercellen zijn opgenomen in het meiose-onderzoek teneinde een indruk te verkrijgen van de associatieverhoudingen. De resultaten van dit onderzoek zijn weergegeven in het hoofdstuk 'Cytogenetische onderzoekingen' en zijn nader toegelicht in de paragraaf 'Vergelijking van de meiosen' van dat hoofdstuk. Daarbij is aannemelijk gemaakt dat bij de triploïde en de tetraploïde hybriden een zekere neiging bestaat tot selectiviteit bij de eliminering van de chromosomen. De chromosomen van *H. bulbosum* lijken vaker te worden geëlimineerd dan die van *H. vulgare*. Uit het onderzoek valt niet met zekerheid op te maken of uitsluitend chromosomen van *H. bulbosum* worden geëlimineerd. De resultaten doen eerder vermoeden dat chromosomen van beide soorten worden geëlimineerd, waarbij die van *H. bulbosum* meer kans lopen bij de storingen te worden betrokken. Deze resultaten zijn in tegenspraak met die van Sachs (1952), omdat

deze auteur een eliminering volgens toeval veronderstelde, waarbij echter reeds is opgemerkt dat deze veronderstelling betwistbaar is.

Uit al deze gegevens kan derhalve worden geconcludeerd dat in kernen waarin chromosomen van *H. vulgare* en *H. bulbosum* voorkomen het normale verloop van de kerndeling kan worden verstoord. Bij deze storingen kunnen chromosomen worden geëlimineerd, waarbij waarschijnlijk de chromosomen van *H. bulbosum* vaker niet in de dochterkernen worden opgenomen dan de chromosomen van *H. vulgare*. De storingen worden geheel of gedeeltelijk verantwoordelijk gesteld voor het niet normaal ontwikkelen van het endosperm, voor de verminderde vitaliteit van embryo's en hybride planten, voor de vegetatieve splitsing in de tetraploïde hybriden, voor het ontstaan van haploïde en dihaploïde vormen van *H. vulgare* uit kruisingen waarin diploïde respectievelijk tetraploïde *H. vulgare* als één van de ouders is gebruikt en tenslotte voor de soms sterke mate van aneuploïdie in de pollenmoedercellen van de hybriden, hetgeen één van de oorzaken is van de steriliteit. De vraag naar de werkelijke oorzaak van deze storingen is hiermee van grote betekenis geworden. Deze zal in de slotbeschouwing ter sprake komen, waarbij nu al kan worden opgemerkt dat de cytologische waarnemingen en de herkomst van het materiaal aanleiding geven de hypothese van Vaarama (1949) niet van toepassing te achten op de hier beschreven situatie.

De steriliteit en de meiose

In tabel 8 is reeds naar voren gebracht dat alle typen hybriden in hoge mate steriel zijn. De diploïde hybriden leverden bij kruising met *H. vulgare* vier zaden op die nog nader moeten worden onderzocht. Op de triploïde hybriden zijn bij vrije afbloei 38 zaden geoogst waaruit drie planten zijn verkregen. Er zijn aanwijzingen dat in deze planten eveneens eliminering van chromosomen plaatsvindt, maar de resultaten van het onderzoek laten hierover nog geen duidelijke uitspraak toe. In dit verband kan nog worden opgemerkt dat uitgebreide pogingen zijn ondernomen met behulp van colchicine het aantal chromosomen van de triploïde hybriden te verdubbelen, teneinde zodoende de steriliteit te doorbreken. De meeste colchicine-behandelingen hebben geen resultaat gehad, in 1967 zijn echter op verschillende behandelde planten enkele zaden geoogst bij vrije afbloei op het veld. In de uit deze zaden gegroeide planten zijn geen hexaploïden gevonden en voor het overige moeten de planten nog nader worden onderzocht. De resultaten van dit onderzoek zullen in een latere publikatie worden vermeld. Van de tetraploïde hybriden hebben tot nu toe alleen tot diploïde *H. vulgare* teruggelopen sectoren zaad opgeleverd, behoudens 30 zaden die uit kruisingen met diploïde *H. vulgare* zijn verkregen en die nog nader moeten worden onderzocht.

Uit de onderzoekingen aan de pollen waarbij de kleurbaarheid van de pollen als maat voor de steriliteit is genomen, is eveneens gebleken dat de hybriden in hoge mate steriel zijn (tabel 34). De diploïden hadden geen kleurbare pollen, de triploïde hybriden hadden veelal een zeer laag percentage kleurbare pollen en de

tetraploïde hybriden waren variabeler, zodat bij deze planten nog enige fertiliteit verwacht zou kunnen worden. Alle auteurs die triploïde hybriden van *H. vulgare* (2x) en *H. bulbosum* (4x) hebben bestudeerd vermeldden een volledige steriliteit; Konzak *et al.* (1951) hebben echter eenmaal tot 23 % kleurbare pollen gevonden. Bij de hier beschreven hybriden lijkt geen verband te bestaan tussen het cytoplasma in de hybriden en de mate van steriliteit.

De oorzaak van de steriliteit is tenminste tweeledig. In de eerste plaats zijn bij de diploïde en vooral bij de tetraploïde hybriden vrij veel pollenmoedercellen aneuploïd, hetgeen een onregelmatige meiose tot gevolg heeft. In de aneuploïde cellen worden relatief meer univalenten gevormd, hetgeen tot meer aneuploïde gameten leidt. Voorts bestaat er enig verband tussen het percentage aneuploïde pollenmoedercellen in een plant en het verloop van de meiose in de euploïde cellen van die plant. Hoe hoger het percentage aneuploïde cellen, des te lager het aantal gebonden armen per cel in de euploïde cellen. Deze correlatie geldt niet voor de triploïde hybriden, omdat bij deze planten het percentage aneuploïde cellen over het algemeen zeer laag is.

De tweede oorzaak van de steriliteit is het onregelmatige verloop van de reductiedeling, afgezien van de aneuploïdie. Bij alle typen hybriden is vastgesteld dat in meer of mindere mate desynapsis optreedt tussen de diakinese en de metafase en er zijn aanwijzingen dat de paring in de profase vrijwel volledig is. Overblijfselen van deze profase-paring worden in de eerste metafase teruggevonden als pseudo-bivalenten. De eerste anafase wordt verstoord door univalenten die veelal in de equator achterblijven en soms vervroegd uiteenvallen in chromatiden. Voorts zijn er chromosomen die naast de polen terechtkomen en verbindingen tussen chromosomen of chromatiden. Bij de triploïde hybriden worden vrijwel alleen storingen als gevolg van univalenten aangetroffen. Al deze onregelmatigheden hebben tot resultaat dat de tweede deling van de meiose in sterke mate is verstoord, waardoor uiteindelijk in de tetraden veel microkernen en micropollen voorkomen. Het is niet bekend of het hoge percentage aneuploïde kernen dat ongetwijfeld in de tetraden zal voorkomen de enige oorzaak is van de steriliteit. Gezien de ruim 60 % kleurbare pollen bij één van de tetraploïde hybriden zou verwacht kunnen worden dat deze plant enigszins fertiel is, maar dit is niet het geval. Daarom moet misschien worden aangenomen dat naast de aneuploïdie en de meiotische instabiliteit nog een andere factor steriliteit bewerkstelligt.

Ten aanzien van paring en associatie van de chromosomen zijn een aantal interessante waarnemingen verricht die nu nader zullen worden besproken. Uit de literatuur is bekend dat bij haploïde *H. vulgare* in de metafase soms bivalenten worden gevonden (Tometorp, 1939; Clavier & Cauderon, 1951). Ter verklaring wordt aangenomen dat in niet-homologe chromosomen kleine homologe gedeelten voorkomen waarin chiasmata kunnen worden gevormd. Tot op zekere hoogte stemmen deze literatuurgegevens overeen met de resultaten die bij de hier beschreven haploïde *H. vulgare* zijn verkregen (tabel 33). Bij deze haploïd worden eveneens bivalenten aangetroffen, zelfs in een iets hogere frequentie, maar deze hebben

vaak het uiterlijk van pseudo-bivalenten of lijken omdat ze niet steeds goed zijn georiënteerd en ook wel eens een top-aan-zij verbinding hebben in plaats van een top-aan-top verbinding, op 'sticky' univalenten. Tevens worden aneuploïde cellen gevonden, al of niet met insluitsels. Deze waarnemingen doen vermoeden dat de bivalenten meer moeten worden beschouwd als overblijfselen van profase-paring dan als echte bivalenten en dat de premeiotische delingen enigszins zijn gestoord.

Bij de diploïde hybriden is een sterke profase-paring waargenomen, die slechts gedeeltelijk stand houdt tot in de metafase. Deze paring kan tussen niet-homologe chromosomen binnen de genomen van beide soorten plaatsvinden (niet-homologe autosyndese), maar er kan ook sprake zijn van paring tussen chromosomen van de soorten (allosyndese). Hierbij wordt voorlopig aangenomen dat als gevolg van de verwantschap tussen de soorten een zekere mate van homologie aanwezig zal zijn. Gezien de algemene ervaringen met haploïden (Kimber & Riley, 1963) kan worden aangenomen dat de situatie met betrekking tot niet-homologe autosyndese in *H. bulbosum* weinig anders zal zijn dan die in *H. vulgare*. Daarom kan de vorming van echte bivalenten het beste worden verklaard door aan te nemen dat homeologe chromosomen van *H. vulgare* en *H. bulbosum* paren en dat daarbij chiasmata worden gevormd. De pseudo-bivalenten zullen het gevolg zijn van overblijfselen van de profase-paring, waarbij tussen de gepaarde chromosomen pseudo-chiasmata zijn opgetreden. Het lijkt waarschijnlijk dat naast de allosyndese enige niet-homologe autosyndese is opgetreden. Dit zou tot gevolg hebben dat enkele van de pseudo-bivalenten zijn ontstaan uit niet-homologe autosyndese. Wordt daarnaast verondersteld dat één chromosoom gedeeltelijk is gepaard in allosyndese en gedeeltelijk in niet-homologe autosyndese dan kan hieruit het voorkomen van de multivalenten worden verklaard. Deze verklaring is te meer aannemelijk omdat in de multivalenten veelal één van de verbindingen het karakter van een pseudo-chiasma lijkt te hebben.

De configuratieverhoudingen die bij de triploïde hybriden zijn gevonden stemmen redelijk overeen met de in de literatuur beschreven resultaten van onderzoekingen aan overeenkomstige hybriden (vergelijk de tabellen 11 en 28). In de literatuur worden iets hogere aantallen trivalenten en iets lagere aantallen bi- en univalenten vermeld dan in de hier beschreven hybriden is gevonden. Alle auteurs (Konzak *et al.*, 1951; Morrison & Rajhathy, 1959; Davies, 1956 en 1960) nemen aan dat de bivalentvorming het gevolg is van homologe autosyndese van de chromosomen van *H. bulbosum*, dat de trivalenten veelal worden gevormd uit twee chromosomen van *H. bulbosum* en één van *H. vulgare* en dat de quadrivalenten het gevolg zijn van een reciproke translocatie in *H. bulbosum*. Davies (1960) voegt hier nog aan toe dat evenals in haploïde *H. vulgare* in de triploïde hybride niet-homologe autosyndese zou kunnen optreden in het genoom van *H. vulgare*. Deze wijze van verklaring is niet geheel bevredigend. In het hier beschreven materiaal zijn verscheidene cellen aangetroffen met meer dan zeven univalenten (maximaal elf per cel), hetgeen erop wijst dat de associatie tussen de twee genomen van *H. bulbosum* in de

hybride niet zo sterk is als in de diploïde soort. Daarnaast is, ondanks het feit dat in de hybriden gemiddeld meer dan veertien chromosomen per cel de bi- en multivalenten vormen, het aantal gebonden armen per cel iets lager dan in de diploïde *H. bulbosum*, hetgeen mede verband houdt met het hoger aantal staafbivalenten per cel. Dit zou kunnen worden verklaard door aan te nemen dat de homologe autosyndese tussen de chromosomen van *H. bulbosum* wordt verstoord door allosyndese of doordat de chiasmafrequentie als gevolg van het samengaan van de genomen van de twee soorten wordt verlaagd. De cellen met meer dan zeven univalenten zijn dan een gevolg van het verschijnsel dat chromosomen die in de profase waren gepaard in de metafase zijn uiteen gevallen doordat geen chiasmata zijn gevormd. Tenslotte moet worden aangenomen dat in de triploïde hybriden niet-homologe autosyndese tussen chromosomen van *H. vulgare* optreedt, waarvoor de cellen met meer dan zeven bivalenten een aanwijzing zijn. Het lijkt daarom aannemelijk het voorkomen van quadrivalenten te verklaren door een samenspel van allosyndese, homologe autosyndese en niet-homologe autosyndese, waarbij bijvoorbeeld twee vermoedelijk homologe chromosomen van *H. bulbosum* en twee niet-homologe chromosomen van *H. vulgare* in één quadrivalent voorkomen. De hypothese van een reciproke translocatie in *H. bulbosum* wordt hiermee verworpen, te meer daar een dergelijke translocatie in de tetraploïde *H. bulbosum* de vorming van configuraties met meer dan vier chromosomen tot gevolg zou moeten hebben en deze configuraties nooit zijn gevonden.

De configuratieverhoudingen in de tetraploïde hybriden kunnen op dezelfde manier worden verklaard als die in de triploïde hybriden. Hierbij treedt echter meer homologe autosyndese op omdat ook tussen de genomen van *H. vulgare* dergelijke associatie zal voorkomen. De resultaten duiden erop dat vrij veel chromosomen allosyndetisch paren; de multivalenten zijn hiervoor een aanwijzing. Het feit dat meer univalenten dan trivalenten in de euploïde cellen voorkomen kan wederom worden verklaard door aan te nemen dat de chiasmafrequentie als gevolg van het samengaan van de genomen wordt verlaagd. In hoeverre niethomologe autosyndese optreedt is niet te zeggen, maar doordat in de euploïde cellen alle chromosomen een homologe partner hebben lijkt dit soort associatie in die cellen vrij onwaarschijnlijk.

Uit deze gegevens kan worden geconcludeerd dat in de hybriden tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* veelal drie soorten paring naast elkaar voorkomen: allosyndese (waarbij wordt aangenomen dat deze meestal plaats vindt tussen homeologe chromosomen), homologe autosyndese en niet-homologe autosyndese. De allosyndese en de niet-homologe autosyndese kunnen aanleiding geven tot de vorming van pseudo-chiasmata. De multivalenten komen waarschijnlijk tot stand door een samenspel van allosyndese en homologe en niet-homologe autosyndese.

Ter verklaring van het ontstaan van de in het hier beschreven materiaal voorkomende typen pseudo-chiasmata zijn in de literatuur tenminste twee hypothesen te vinden. Walters (1954) veronderstelt dat de chromosomen door matrixverbindingen bijeen blijven, een hypothese die door Wagenaar (1959 en 1960) wordt

ondersteund, terwijl Riley & Chapman (1957) denken aan fusie van heterochromatische delen van de chromosomen. Het hier beschreven materiaal bevat helaas geen aanwijzingen die tot keuze uit de twee hypothesen leiden.

De lage chiasmafrequentie die het gevolg lijkt te zijn van het samengaan van de genomen van *H. vulgare* en *H. bulbosum* zou in verband kunnen staan met allosyndese, waarbij dan structurele verschillen tussen de chromosomen het niet-optreden van chiasmata tot gevolg hebben. Nu is echter in de tetraploïde hybriden een verminderde chiasmafrequentie waargenomen, ondanks het feit dat alle chromosomen een homologe partner hebben. Dit is een aanwijzing dat de verminderde chiasmafrequentie genetisch is bepaald, zoals dat door Stebbins (1958) en Wagenaar (1959 en 1960) voor ander materiaal aannemelijk is gemaakt.

Overige nakomelingen

Deze categorie omvat haploïde en dihaploïde planten met uitsluitend genomen van *H. vulgare*, die zijn ontstaan bij verschillende soortkruisingscombinaties (VV × BB, BB × VV, VV × BBBB, VVVV × BBBB en BBBB × VVVV). Deze planten kunnen zijn ontstaan door parthenogenese of gynogenese in die combinaties waarin *H. vulgare* de moederplant was, door androgenese in die combinaties waarin *H. vulgare* de vaderplant was, door semi-gamie, of door geleidelijke eliminering van de chromosomen van *H. bulbosum* gedurende of kort na het embryonale stadium. Na alles wat is medegedeeld over de eliminering van chromosomen lijkt de laatst genoemde verklaringswijze de beste. Vooral de geleidelijke eliminering van chromosomen die in de tetraploïde hybriden is gevonden en de delingsstoringen die in de embryo's zijn waargenomen zijn duidelijke aanwijzingen. Hierbij kan nog worden opgemerkt dat spontane haploïden in *H. vulgare* (2x) zeer zelden voorkomen. Voor verscheidene ervan is aangetoond dat ze tot stand kwamen als gevolg van tweelingzaden, maar omdat alle hier beschreven haploïden via embryocultuur zijn verkregen moeten tweelingzaden worden uitgesloten, die waren ongetwijfeld als zodanig herkend. In *H. vulgare* (4x) vond Sandfaer (pers. med.) bij het ras Kenia ongeveer 0,2 ‰ diploïde planten. Hoewel vermenging nooit volledig kan worden uitgesloten had Sandfaer de indruk dat deze planten door spontane terugval naar het diploïde niveau waren ontstaan, waaruit blijkt dat evenals bij de haploïden het optreden van spontane dihaploïden zeer zelden voorkomt. Tenslotte is bij de bespreking van de vegetatieve splitsing reeds naar voren gebracht dat semi-gamie in dit materiaal niet waarschijnlijk lijkt.

In de literatuur van soortkruisingen in het geslacht *Hordeum* is tweemaal melding gemaakt van resultaten die met de hier beschrevene vergelijkbaar zijn, terwijl de resultaten van Schooler (1964 en pers. med.) doen vermoeden dat soms eveneens vergelijkbare gebeurtenissen hebben plaats gevonden, maar zoals gemeld heeft deze auteur nog geen details en verklarende analyse gepubliceerd. Davies (1956 en 1958) heeft uit kruisingen tussen tetraploïde *H. bulbosum* en tetraploïde *H. vulgare* drie diploïde op *H. vulgare* lijkende planten verkregen. Het ontstaan

van deze planten wordt verklaard door aan te nemen dat de mannelijke gameet parthenogenetisch is uitgegroeid tot een embryo. Gezien de letterlijke betekenis van het woord parthenogenesis moet bezwaar worden aangetekend tegen deze formulering, maar daarentegen geeft de formulering duidelijk weer hoe de gedachtengang van Davies is geweest; hij heeft ermee willen zeggen dat geen versmelting tussen de mannelijke en de vrouwelijke gameet heeft plaatsgevonden, in tegenstelling tot hetgeen bij androgenese gebeurt. Twee van de drie planten leken vrij sterk op *H. vulgare*, terwijl de derde enige afwijkingen vertoonde in de jeugdfase en soms in de bloemmorfologie. Alle planten vertoonden een niet verklaarbare vertakking van de stengel boven het laatste internodium. Davies schrijft de verschillen tussen de planten toe aan de invloed van het plasma van *H. bulbosum*, waarbij hij aanneemt dat kwantitatieve verschillen in zogenaamde plasmagenen hierbij een rol spelen. Deze veronderstelling is op zijn minst twijfelachtig. In de eerste plaats is het de vraag of vooral de verschillen in bloemmorfologie door het plasma kunnen worden bepaald, en in de tweede plaats zijn die verschillen, gezien de hier beschreven resultaten, beter te verklaren door aan te nemen dat de planten van Davies eveneens zijn ontstaan als gevolg van vegetatieve eliminering van chromosomen in een vroeg stadium van de ontwikkeling, waarbij dan in de ene afwijkende plant niet overal alle chromosomen van *H. bulbosum* zouden zijn geëlimineerd. Hierbij moet worden opgemerkt dat het plasma van *H. bulbosum* wel invloed heeft op de ontwikkeling van de planten, die echter niet zozeer in de morfologische eigenschappen tot uitdrukking komt.

Het tweede geval waarbij uit soortkruisingen in het geslacht *Hordeum* de oudertypen weer werden verkregen is beschreven door Hamilton *et al.* (1955). Drie nakomelingen van kruisingen tussen *H. leporinum* (4x = 28) en *H. vulgare* (2x = 14) vertoonden alle een vegetatieve splitsing waarbij allerlei op één van de ouders lijkende typen uitsplitsten, maar waarbij steeds enkele eigenschappen van de andere ouder eveneens werden aangetroffen. Op deze wijze zijn onder andere diploïde, fertiele, op *H. vulgare* lijkende planten verkregen, met brosse aarspil en met resistentie tegen meeldauw, beide eigenschappen van *H. leporinum*. De nakomelingschap van deze planten splitste enorm uit, terwijl eveneens is aangetoond dat deze eigenschappen van *H. leporinum* niet door plasmatische overerving tot stand waren gekomen. Het is de auteurs niet gelukt een sluitende verklaring voor de verschijnselen te geven, en evenmin is het gelukt de resultaten te reproduceren. De feiten zijn niettemin van belang want de aldus verkregen resistentie tegen meeldauw en het opmerkelijke, erecte groeitype van de planten worden nu gebruikt in de gerstveredeling (Slootmaker, pers. med.).

In het hoofdstuk 'Cytogenetische onderzoekingen' is vastgesteld dat het karyotype van één van de haploïde planten en dat van de dihaploïde planten goede overeenkomst vertoont met dat van *H. vulgare*. Voor de dihaploïden is het aantal nucleoli per cel vrijwel gelijk aan dat van gerst, terwijl ook het verloop van de meiose en de kwaliteit van de pollen niet van die van *H. vulgare* (2x) zijn te onderscheiden. Daar dit alles zowel van toepassing is op dihaploïden met het

cytoplasma van *H. vulgare* (P-nummers) als op de alloplasmatische dihaploïden (A-nummers), terwijl het eveneens van toepassing is op de dihaploïden die uit tetraploïde hybriden zijn verkregen na vegetatieve eliminering van chromosomen (HP- en HA-nummers), moet worden aangenomen dat het cytoplasma van *H. bulbosum* dat in de A- en HA-nummers aanwezig zal zijn geen invloed uitoefent op de morfologie van de chromosomen en op de aantallen nucleoli, hetgeen bij de hybriden reeds was vastgesteld. Tevens heeft dit vreemde cytoplasma geen invloed op de meiose en de pollenvorming.

Ondanks al deze overeenkomsten zijn in het experiment, waarin de P-, HP-, A- en HA-nummers zijn vergeleken met diploïde gerstrassen waarvan de tetraploïde cytotypen zijn gebruikt in de soortkruisingen, verschillen tussen de dihaploïden en de controlerassen naar voren gekomen. Alle typen dihaploïden wijken af van de gerstrassen, maar de A- en HA-nummers in veel sterkere mate, hetgeen erop wijst dat het plasma van *H. bulbosum* een algemene invloed heeft op de ontwikkeling van de planten. Uit hetzelfde experiment is echter gebleken dat nog een andere factor in het spel is, want de P- en HP-nummers wijken, tegen de verwachting in, eveneens iets af van het controleras, hoewel minder dan de A- en HA-nummers. Het verschil tussen P- en HP-nummers en controleras zal waarschijnlijk eveneens optreden tussen A- en HA-nummers en controleras, maar dan worden overschaduwd door de invloed van het vreemde cytoplasma. Ter verklaring van deze verschillen zou kunnen worden aangenomen dat door somatische overkruising of door verwisseling van homeologe chromosomen genetisch materiaal van *H. bulbosum* in de dihaploïden is terecht gekomen. Dit lijkt echter niet waarschijnlijk gezien het feit dat in alle onderzochte plantnummers overeenkomstige verschillen optreden, die dan zouden moeten worden verklaard door aan te nemen dat een overeenkomstig chromosoom of deel van een chromosoom is uitgewisseld. Het lijkt daarom waarschijnlijker dat de diploïde en tetraploïde cytotypen van gerst die dezelfde rasnaam dragen genetisch niet meer identiek zijn. Hiervoor zijn verschillende oorzaken aan te wijzen: natuurlijke en kunstmatige selectie in het materiaal, mutatie, zaadvermeerdering op het veld zonder inhullen, dus kans op kruisbevruchting, enzovoort.

Samenvattend kan worden gezegd dat uit reciproke kruisingen tussen tetraploïde cytotypen van *H. vulgare* en van *H. bulbosum* diploïde planten kunnen worden verkregen met de chromosomen van *H. vulgare*. De planten ontstaan waarschijnlijk doordat de chromosomen van *H. bulbosum* worden geëlimineerd. De planten zijn niet geheel identiek met diploïde cytotypen van het gerstras waarvan het tetraploïde cytotype in de kruising is gebruikt door divergeren van het genetische materiaal in de diploïde en tetraploïde gerst en, wanneer *H. bulbosum* de moederplant was, door invloed van het vreemde cytoplasma.

Slotbeschouwing

Uit het onderzoek naar kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* is gebleken dat vele van de ondervonden moeilijkheden kunnen worden toegeschreven aan storingen die optreden bij de deling van de hybride kernen. De storingen kunnen resulteren in een eliminering van chromosomen, die waarschijnlijk min of meer selectief is, waarbij de chromosomen van *H. bulbosum* relatief vaker worden geëlimineerd. Het is aannemelijk gemaakt dat de oorzaak van de storingen moet worden gezocht in het samengaan van de genomen van de beide soorten. Dit samengaan heeft tevens tot gevolg dat de satellieten van de genomen van *H. bulbosum* worden onderdrukt en dat waarschijnlijk door de genomen van *H. bulbosum* geen nucleoli worden gevormd. Tenslotte is, afgezien van de aneuploïdie, de meiose gestoord doordat de chromosomen wel kunnen paren in de profase waarbij allosyndese, niet-homologe autosyndese en homologe autosyndese naast elkaar voorkomen, maar daarna gedeeltelijk weer uiteenvallen als gevolg van een lage chiasmafrequentie, hoewel als gevolg van het optreden van pseudo-chiasmata deze desynapsis niet zo sterk lijkt als ze in werkelijkheid is.

Stebbins (1958) vermeldt in een overzichtsartikel over soortkruisingen dat de bij deze kruisingen optredende moeilijkheden verschillende oorzaken kunnen hebben. Met betrekking tot de kruisingsbarrière onderscheidt deze auteur drie oorzaken voor de moeilijkheden: (1) onverenigbaarheid tussen ouderlijke chromosomen of genen, welke tot uitdrukking kan komen in eliminering van chromosomen, hetgeen veelal gebeurt in een kritieke fase van de ontwikkeling; (2) onverenigbaarheid tussen cytoplasma en genomen en (3) moeilijkheden bij de ontwikkeling van het endosperm waardoor het overigens normale embryo aborteert. Deze laatstgenoemde moeilijkheden zouden meestal worden veroorzaakt door een niet nader omschreven niet-gebalanceerde gendosering, terwijl voor de onverenigbaarheid tussen ouderlijke chromosomen of genen eveneens een genetisch bepaalde invloed wordt verondersteld, waarbij slechts in enkele gevallen specifieke genen konden worden aangetoond. Een voorbeeld hiervan is de kruisbaarheid tussen tarwe en rogge: Lein (1943) toonde aan dat deze kruisbaarheid wordt belemmerd door de dominante factoren Kr_1 en Kr_2 van tarwe, hetgeen door Riley & Chapman (1967) is bevestigd, waarbij tevens is aangetoond dat deze factoren zijn gelocaliseerd op de chromosomen 5B respectievelijk 5A van tarwe.

Zoals reeds eerder naar voren is gebracht zijn in de hier beschreven kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* geen aanwijzingen gevonden dat het cytoplasma en de genomen onverenigbaar zijn. Voorts is aannemelijk gemaakt dat de extreme vormen van onverenigbaarheid tussen ouderlijke chromosomen, de androgenese, gynogenese en semi-gamie, evenmin van toepassing zijn bij deze soortkruisingen. Anderzijds treden wel moeilijkheden op bij de ontwikkeling van het endosperm en bestaan tevens moeilijkheden die zich manifesteren in mitotische instabiliteit, waarbij naar voren is gebracht dat de abnormaliteiten in het endosperm en in de somatische delingen in embryo's en hybride planten waarschijnlijk door hetzelfde mechanisme

worden veroorzaakt.

Deze overwegingen leiden tot de hypothese dat bij de kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* genen of interacties tussen genen een zodanige invloed uitoefenen dat de mitotische delingen in verschillende weefsels worden verstoord. De verschillen die zijn gevonden in de mate en de aard van de storingen in het endosperm, het vegetatieve weefsel en het premeiotische generatieve weefsel kunnen een gevolg zijn van verschillen die tussen deze weefsels bestaan, bijvoorbeeld met betrekking tot de delingssnelheid, en ze kunnen mede bepaald worden door de gendosering. Hierbij kan enerzijds de dosering binnen de hybride kernen een rol spelen en kan anderzijds, bij de ontwikkeling van de caryopsis, de doseringsverhouding tussen het embryo, endosperm en moederlijke weefsel van belang zijn. De gepresenteerde beschouwingen over de genetische waarden van de genomen zouden op deze wijze kunnen worden geïnterpreteerd als een simplificatie van dit dosiseffect.

Het is in dit verband interessant in herinnering te brengen dat afgezien van soortkruisingen het buitengewone karakter van het endosperm reeds is gebleken bij kruisingen tussen diploïde en tetraploïde cytotypen van dezelfde soort (Håkansson & Ellerström, 1951; Cooper, 1951; Håkansson, 1953) en bij zelfbevruchtingen van rogge (Landes, 1939). Voorts heeft Rees (1957) aangetoond dat storingen in de premeiotische delingen bij inteeltlijnen van rogge, welke storingen leidden tot aneuploïde pollenmoedercellen, genetisch worden bepaald.

In verband met storingen in de ontwikkeling van het endosperm bij soortkruisingen en met eliminering van chromosomen zijn in de literatuur enkele veronderstellingen geuit waarbij deze storingen in verband worden gebracht met de DNA-synthese. Reusch (1959 b) en Odenbach (1965) schrijven abnormaliteiten in de ontwikkeling van het endosperm toe aan een verstoord DNA-metabolisme. Zowel de reuzekernen als de gestoorde mitosen zouden hierdoor worden veroorzaakt. Gupta (1968) veronderstelt dat de eliminering van een centrisch fragment van *Nicotiana plumbaginifolia* in *N. tabacum* een gevolg zou kunnen zijn van een verschil in ritme van DNA-synthese. Maar deze veronderstelling wordt vrij onwaarschijnlijk doordat Collins (1968) heeft aangetoond dat de DNA-synthese in deze beide *Nicotiana* soorten en in hun F_1 volgens hetzelfde patroon verloopt. Li & Tu (1947) hebben waargenomen dat in een amfiploïde soortbastaard de chromosomen van de respectievelijke oudersoorten een verschil in contractie vertonen, hetgeen eveneens in verband gebracht zou kunnen worden met de DNA-synthese. Al deze veronderstellingen zijn vaag, zodat een toepasbaarheid ervan op de hier beschreven kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* voorlopig in het midden moet worden gelaten.

Een ander interessant aspect is nog de vorming van de nucleolus. Jain (1966) heeft aangetoond dat de nucleolus een onmisbaar bestanddeel van de kern uitmaakt. Tevens is daarbij gebleken dat de contractie van bepaalde chromosomen door afwezigheid van de 'nucleolus organizer' in sterke mate kon worden beïnvloed.

Deze waarnemingen kunnen van belang zijn in verband met de amfiplastie die is gevonden bij de kruisingen tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum*. Hierbij is gebleken dat de satelliet van chromosoom 6 van *H. bulbosum* niet als zodanig zichtbaar is en dat tevens de nucleolus-vorming van dit chromosoom is geïnactiveerd. Wanneer wordt aangenomen dat de nucleolus min of meer specifieke stoffen vormt die bij de kerndeling of DNA-synthese van belang zijn, dan zou de afwezigheid van de nucleoli van de genomen van *H. bulbosum* een aanleiding kunnen zijn voor het feit dat chromosomen van *H. bulbosum* in de hybriden relatief vaker worden geëlimineerd dan die van *H. vulgare*.

Deze hypothese wordt ondersteund door waarnemingen die zijn verricht aan de soorthybride uit de kruising *H. bulbosum* (4x) × *H. secalinum* (4x), welke door Y. Cauderon ter beschikking is gesteld (zie voor beschrijving van deze hybride Cauderon & Cauderon, 1956). De hybride heeft twee satellietchromosomen, en in vegetatief weefsel, behoudens een zelden optredende uitzondering, maximaal twee nucleoli per cel. *H. bulbosum* (4x) en *H. secalinum* (4x) hebben respectievelijk vier en twee satellietchromosomen en een evengroot maximum aantal nucleoli per cel. Hieruit wordt geconcludeerd dat in de hybride amfiplastie optreedt, waarbij de satellieten van de genomen van *H. secalinum* worden onderdrukt met als gevolg dat deze genomen geen nucleoli vormen. Uit het onderzoek van Cauderon & Cauderon (1956) was gebleken dat deze hybriden een mitotische instabiliteit vertonen, waarbij de chromosomen van *H. secalinum* worden geëlimineerd. Hieruit blijkt dat de amfiplastie en de selectiviteit bij de eliminering van chromosomen misschien met elkaar in verband staan.

Mogelijkheden voor de veredeling

Het onderzoek heeft aangetoond dat, hoewel de hybriden tussen *H. vulgare* en *H. bulbosum* allerminst eenvoudig tot stand zijn te brengen en evenmin rechtstreeks zijn te gebruiken in een veredelingsprogramma, het niet uitgesloten moet worden geacht dat eigenschappen van *H. bulbosum* in *H. vulgare* kunnen worden geïntroduceerd. Teneinde dit te bereiken zijn verschillende mogelijkheden aanwijsbaar.

In de eerste plaats is gebleken dat waarschijnlijk enige overkruising tussen de chromosomen van de beide ouders in de hybriden optreedt. Tevens is gevonden dat sommige hybride planten niet volledig steriel zijn, zodat misschien uit de ter beschikking staande hybride planten door een uitgebreid terugkruisingsprogramma met *H. vulgare* nog gunstig resultaat verkregen kan worden.

Naast deze natuurlijke uitwisseling van chromosomenmateriaal in de meiose zou in somatisch weefsel dergelijke uitwisseling kunstmatig tot stand kunnen worden gebracht door met behulp van mutagentia translocaties tussen de chromosomen van de ouders te induceren. Dit zou het beste kunnen worden uitgevoerd in een zeer jong ontwikkelingsstadium van tetraploïde hybriden, waarbij dan de min of meer selectieve eliminering van chromosomen benut kan worden teneinde de ge-

wijzigde genomen van *H. vulgare* weer terug te winnen. Dit soort onderzoek kan slechts worden uitgevoerd indien zeer veel materiaal ter beschikking staat, omdat bij de inductie van translocaties het toeval een zo grote rol speelt. De methoden voor het verkrijgen van hybriden zouden dan echter moeten worden verbeterd. Een mogelijkheid hiertoe biedt misschien de *in vivo* toediening van gibberellazuur kort voor of na de bestuiving (Larter & Enns, 1960; Kruse, 1967). Een verdergaande verbetering van de methoden van embryocultuur lijkt eveneens tot de mogelijkheden te behoren.

In de derde plaats zou in verband met de genomenverhouding binnen een kern verondersteld kunnen worden dat, evenals de triploïde hybriden (VBB), hexaploïde hybriden (VVBBBB) een redelijke mitotische stabiliteit hebben. Een verdubbeling van het aantal chromosomen van de triploïde hybriden zou tevens kunnen leiden tot een doorbreking van hun steriliteit. Het is echter tot op heden nog niet gelukt een hexaploïde hybride te produceren, en de resultaten van uitgebreide nog niet gepubliceerde onderzoekingen doen vermoeden dat door het hoge aantal chromosomen een nieuwe mitotische instabiliteit wordt geïntroduceerd.

In de vierde plaats zouden de dihaploïde planten met het cytoplasma van *H. bulbosum* en de chromosomen van *H. vulgare* voor de veredeling van belang kunnen zijn. Momenteel wordt bij de Stichting voor Plantenveredeling onderzocht in hoeverre dit vreemde cytoplasma invloed uitoefent op de kouderesistentie van de planten of op het tot uitdrukking komen van de kouderesistentie van bepaalde genotypen. Tevens wordt onderzocht of het vreemde cytoplasma invloed uitoefent op de manifestering van bepaalde genen die in het cytoplasma van *H. vulgare* mannelijke steriliteit veroorzaken.

Voor een en ander zal nader onderzoek noodzakelijk zijn. Tevens lijkt een uitbreiding van de kennis van de biochemische achtergrond van de bij de soortkruising optredende moeilijkheden gewenst.

Samenvatting

Kruisingen tussen *H. vulgare* (gerst) en *H. bulbosum* kunnen van belang zijn, teneinde eigenschappen van *H. bulbosum*, zoals kouderesistentie en resistentie tegen ziekten, over te brengen naar *H. vulgare*. Uit de literatuur was bekend dat bij deze kruising moeilijkheden kunnen optreden: zaadabortie, waardoor voor de produktie van hybriden embryocultuur noodzakelijk is, en steriliteit van de hybriden, terwijl alle in de literatuur beschreven levensvatbare hybriden triploïd waren. Het hier beschreven onderzoek had tot doel de kennis over deze soortkruising te vergroten en zodoende te trachten een oplossing voor deze moeilijkheden te vinden. De ouders en hybriden zijn gemakshalve aangeduid met genoomformules: VV = *H. vulgare* (2x), BB = *H. bulbosum* (2x), enz. De resultaten van het onderzoek zijn per hoofdstuk samengevat.

Kruisingen en hybriden

Alle acht mogelijke soortkruisingscombinaties tussen diploïde en autotetraploïde cytotypen van de beide soorten zijn beproefd. De kruisingsrichting, de ouderplanten en de uitwendige omstandigheden leken invloed te hebben op het slagen van de kruisingen. De reciproke kruisingen tussen VV en BB leverden samen drie haploïde planten op met het genoom V en zes diploïde hybriden; de haploïden en twee van de hybriden gingen voor de eerste bloei dood. De kruising VV × BBBB leverde veruit het beste resultaat op: één haploïde plant met het genoom V en 145 triploïde hybriden, waarvan er 13 voor de eerste bloei doodgingen. Uit de reciproke kruising kwamen 12 triploïde hybriden voort. De reciproke kruisingen tussen VVVV en BB hebben geen resultaat opgeleverd, terwijl de reciproke kruisingen tussen VVVV en BBBB samen 18 dihaploïde planten opleverden met de genomen VV en 16 planten met meer dan 14 chromosomen en hybride eigenschappen. Van de dihaploïden zijn er negen voor de eerste bloei doodgegaan en van de hybride planten zes.

Alle typen hybriden leken vrij sterk op elkaar en waren in hoge mate steriel. In het algemeen vertoonden ze de habitus van *H. bulbosum* hoewel ze niet zo groot en vitaal waren. De tetraploïde hybriden waren meestal niet stabiel wat betreft hun chromosomenaantal. Er is als gevolg van vermoedelijk geleidelijke eliminering van chromosomen uit de tetraploïde hybriden één diploïde hybride ontstaan, terwijl zes planten op *H. vulgare* lijkende scheuten hebben afgesplitst welke meestal fertiel waren. De nakomelingen van deze scheuten waren diploïd, behalve één nakomelingschap die splitste in diploïde en, waarschijnlijk door spon-

tane verdubbeling van chromosomen ontstane, tetraploïde planten.

De dihaploïde planten leken sterk op diploïde *H. vulgare* en waren fertiel. Er wordt verondersteld dat deze planten en de genoemde haploïden eveneens door eliminering van chromosomen zijn ontstaan. De nakomelingen van de dihaploïden zijn samen met de nakomelingen van de fertiele scheuten van de tetraploïde hybriden vergeleken met *H. vulgare*. De nakomelingen met het cytoplasma van *H. vulgare* (oorspronkelijke kruising VVVV × BBBB) verschilden iets van *H. vulgare*, hetgeen wordt verklaard door aan te nemen dat de genetische opbouw van het dihaploïde deel van het in de kruising gebruikte tetraploïde gerstras niet meer precies hetzelfde is als die van het gelijknamige diploïde gerstras. De nakomelingen van dihaploïden met het cytoplasma van *H. bulbosum* (oorspronkelijke kruising BBBB × VVVV) weken veel sterker af, hetgeen wordt verklaard door naast het bovengenoemde verschil in genetische opbouw een cytoplasmatische invloed te veronderstellen.

Embryologische onderzoekingen

Teneinde inzicht te verkrijgen in het verloop van de zaadabortie is bij de kruisingscombinaties VV × BB, VV × BBBB en VVVV × BBBB de ontwikkeling van de caryopsis bestudeerd en vergeleken met die bij een intraraskruising VV × VV. Alle onderdelen van de caryopsis ontwikkelden zich bij soortkruising trager dan bij intraraskruising. Bij VV × BB en VVVV × BBBB aborteerde het zaad meestal binnen twee weken na de bestuiving; in het embryo had dan nog geen orgaandifferentiatie plaatsgevonden. Bij VV × BBBB aborteerde het zaad binnen drie à vier weken na de bestuiving, nadat meestal enige abnormale orgaandifferentiatie in het embryo was opgetreden.

Bij alle soortkruisingscombinaties traden vanaf een vroeg stadium in de ontwikkeling storingen op in de kern- en celdelingen van het endosperm. De storingen resulteerden veelal in microkernen, terwijl tevens multinucleaire cellen en reuzekernen voorkwamen, welke laatste ontstonden door endomitose of door kernversmelting in multinucleaire cellen, gevolgd door endomitose. Het abnormale endosperm ging vroeger of later degenereren en desintegreren, waarbij de indruk is verkregen dat dit de primaire oorzaak van de zaadabortie was. In de hybride embryo's zijn storingen in de kerndelingen waargenomen, waarbij microkernen werden gevormd. De storingen traden later op dan die in het endosperm en leken niet de directe oorzaak van de abortie van het embryo te zijn, hoewel ze waarschijnlijk de vitaliteit van het embryo nadelig beïnvloedden.

De antipoden bleven bij de soortkruisingen iets langer intact dan bij de intraraskruising, terwijl soms enkele cellen veel langer intact bleven, waarbij de kernen zich, waarschijnlijk door endomitose, ontwikkelden tot zeer grote reuzekernen.

Het moederlijke weefsel ontwikkelde zich bij soortkruisingen aanvankelijk overeenkomstig als bij de intraraskruising, maar trager. Als gevolg van de zaadabortie werd de ontwikkeling echter vroegtijdig onderbroken.

Cytogenetische onderzoekingen

Teneinde na te gaan of, en zo ja in hoeverre de morfologie van de chromosomen in de soorthybriden was veranderd, en teneinde de chromosomensamenstelling te bepalen van de na vegetatieve eliminering van chromosomen verkregen planten, zijn de karyotypen van oudersoorten, hybriden en verscheidene van de na vegetatieve eliminering van chromosomen verkregen planten beschreven en met elkaar vergeleken. Het bleek dat in de hybriden amfiplastie optrad, waarbij de satellieten van de genomen van *H. bulbosum* niet als zodanig zichtbaar waren. De relatieve lengten van de chromosomen binnen een genoom werd door de hybridisatie niet gewijzigd en de lengteverhouding tussen de genomen van *H. vulgare* en *H. bulbosum* was in alle typen hybriden ongeveer gelijk. De karyotypen van de na vegetatieve eliminering van chromosomen verkregen planten waren geheel volgens de verwachtingen.

Het maximum aantal nucleoli per cel in het vegetatieve weefsel kwam, met uitzondering van een aantal cellen in de triploïde hybriden, overeen met het aantal satellietchromosomen. Het gemiddeld aantal nucleoli per cel was echter in de diploïde en triploïde hybriden in sterke mate en in de tetraploïde hybriden in geringere mate groter dan werd verwacht volgens de gevonden aantallen in *H. vulgare*. Hieruit is geconcludeerd dat de aanwezigheid van chromosomen van *H. bulbosum* een vergroting van het aantal nucleoli per cel tot gevolg had.

In alle typen hybriden leek een volledige of vrijwel volledige paring van de chromosomen in het pachyteen op te treden, waarbij allosyndese, niet-homologe autosyndese en homologe autosyndese naast elkaar leken voor te komen. Daarna vielen verscheidene chromosomenassociaties weer uiteen als gevolg van een lage chiasmafrequentie. De overige chromosomen bleven geassocieerd door chiasmata en pseudo-chiasmata, die niet of nauwelijks van elkaar waren te onderscheiden. In de diploïde hybriden leken voornamelijk pseudo-chiasmata op te treden die soms tot aan de eerste anafase stand hielden. In de triploïde hybriden leek de associatie van de chromosomen in de eerste metafase in hoofdzaak tot stand te komen door gewone chiasmata, terwijl in de tetraploïde hybriden de beide typen chiasmata naast elkaar voorkwamen met iets minder pseudo-chiasmata dan normale chiasmata.

In alle typen hybriden werden tijdens de meiose in profase en diakinese één of zelden twee nucleoli per cel gevonden. De nucleolus was geassocieerd aan maximaal twee chromosomen of chromosomenconfiguraties.

In de diploïde en tetraploïde hybriden, en in geringere mate eveneens in de triploïde hybriden, kwamen aneuploïde cellen voor die voornamelijk hypoploïd waren. Daarnaast zijn in veel cellen insluitsels gevonden van verschillende aard, waarbij bleek dat de hypoploïde cellen relatief de meeste insluitsels hadden. De insluitsels en de aneuploïdie leken het gevolg te zijn van gestoorde premeiotische delingen waarbij niet alle chromosomen in de dochterkernen waren terecht gekomen.

De associatie van de chromosomen in de eerste metafase van aneuploïde cellen is bestudeerd. Bij de triploïde hybriden was deze afname minder sterk en in cellen

met ongeveer 14 chromosomen werd het associatieniveau van de diploïde hybriden bereikt, hetgeen suggereert dat voornamelijk chromosomen van *H. bulbosum* waren geëlimineerd. De tetraploïde hybriden vertoonden een relatief sterke afname van de associatie tot het chromosomenaantal 24, waarna een zekere stabilisatie optrad, waarbij het niveau iets boven dat van de aneuploïde cellen van de triploïden bleef. Dit zou een aanwijzing kunnen zijn voor een zekere selectiviteit bij de eliminering van chromosomen, waarbij waarschijnlijk de chromosomen van *H. bulbosum* meer kans lopen te worden geëlimineerd.

Als gevolg van univalenten, pseudo-chiasmata en aneuploïdie was de eerste metafase en het verdere verloop van de meiose in alle hybriden zeer onregelmatig. De tetraden bevatten microkernen en micropollen. In rijpe helmknoppen konden in de diploïde hybriden geen kleurbare pollen worden gevonden; de triploïde hybriden hadden weinig kleurbare pollen en een variabele pollendiameter, terwijl de tetraploïde hybriden een percentage kleurbare pollen hadden dat voor de verschillende onderzochte planten nogal uiteenliep; de pollendiameter was zeer variabel.

In de meiose van een haploïde plant met het genoom V werd een geringe neiging tot bivalentvorming gevonden, maar de bivalenten leken veelal pseudo-bivalenten. De dihaploïden met de genomen VV hadden alle een zeer regelmatige meiose die vergelijkbaar was met die van diploïde *H. vulgare*. De pollen van deze planten waren geheel overeenkomstig die van diploïde *H. vulgare*.

Discussie

Veel van de gevonden abnormaliteiten lijken te worden veroorzaakt door storingen in de deling van kernen waarin chromosomen van *H. vulgare* en *H. bulbosum* naast elkaar voorkomen. Dit geldt geheel of gedeeltelijk voor het niet normaal ontwikkelen van het endosperm, voor de verminderde vitaliteit van hybride embryo's en planten, voor de vegetatieve eliminering van chromosomen en voor het ontstaan van aneuploïde pollenmoedercellen. Er is verondersteld dat deze storingen het gevolg zijn van een onverenigbaarheid tussen chromosomen of genen van de oudersoorten. De verschillen in de mate en de aard van de storingen die zijn gevonden in verscheidene typen weefsels zijn misschien een gevolg van verschillen die tussen de weefsels bestaan, bijvoorbeeld ten aanzien van de delingssnelheid, en van verschillen in de gendosering.

Een andere storing die wordt gevonden in kernen waarin de chromosomen van de oudersoorten naast elkaar voorkomen is de amfiplastie, waarbij de secundaire insnoering van het satellietchromosoom van *H. bulbosum* niet zichtbaar is hetgeen waarschijnlijk tot gevolg heeft dat de nucleolus-activiteit van dit satellietchromosoom wordt onderdrukt. Deze storing staat misschien in verband met het feit dat bij de eliminering van chromosomen die van *H. bulbosum* meer kans lopen te worden geëlimineerd.

Tenslotte zijn er de storingen die, afgezien van de aneuploïdie, in de meiose op-

treden te weten: de desynapsis als gevolg van lage chiasmafrequentie en de vorming van pseudo-chiasmata. Hierbij is verondersteld dat de lage chiasmafrequentie genetisch is bepaald, terwijl de pseudo-chiasmata het gevolg kunnen zijn van matrix-verbindingen of van fusie van heterochromatine.

De perspectieven die dit onderzoek zou kunnen bieden voor de veredeling van gerst zijn kort besproken. Omdat het voorshands niet onmogelijk moet worden geacht dat overkruisingen tussen chromosomen van de oudersoorten in de meiose van de hybriden optreden en omdat de hybriden niet volledig steriel zijn, zouden langs deze weg eigenschappen van *H. bulbosum* in *H. vulgare* kunnen worden geïntroduceerd. Voorts zou overbrenging van eigenschappen in somatisch weefsel tot stand kunnen worden gebracht met behulp van inductie van interspecifieke translocaties in bijvoorbeeld tetraploïde hybriden, waarbij de min of meer selectieve eliminering van chromosomen gebruikt zou kunnen worden teneinde de gewijzigde genomen van *H. vulgare* weer terug te winnen. Eventueel nog te produceren hexaploïde hybriden VVBBBB kunnen misschien van nut zijn. De planten met het cytoplasma van *H. bulbosum* en de chromosomen van *H. vulgare* zouden van belang kunnen zijn bij het kweken van winterharde gerst en bij het onderzoek aan mannelijk steriele gerst. Voor dit alles zal nader onderzoek noodzakelijk zijn.

Summary

Crosses between barley *(Hordeum vulgare)* and bulbous barleygrass *(H. bulbosum)* could be valuable for the transfer of such properties as resistance to cold or diseases from *H. bulbosum* to *H. vulgare*. From the literature it was known that difficulties arose in the cross: seed abortion necessitating culture of the hybrid embryo, sterility of the hybrids, and all the viable hybrids mentioned in the literature were triploid. The purpose of my study was to enlarge knowledge of these interspecific crosses, and to try and solve the difficulties. For convenience parents and hybrids were denoted by genome symbols, e.g. VV = *H. vulgare* (2x), BB = *H. bulbosum* (2x). The results below are arranged as in the chapters.

Crossing and the hybrids

All eight possible crosses between diploid and autotetraploid cytotypes of the two species were tried. The direction of the cross, the parents and environmental conditions seemed to influence its success. Both crosses between VV and BB yielded three haploid plants with the genome V and six diploid hybrids. The haploids and two of the hybrids died before flowering. The cross VV × BBBB was most successful: one haploid plant with the genome V and 145 triploid hybrids, of which 13 died before flowering. The reciprocal cross yielded 12 triploid hybrids. Both crosses between VVVV and BB were unsuccessful, whereas the two crosses between VVVV and BBBB produced 18 dihaploids with the genome VV and 16 plants with more than 14 chromosomes and hybrid characteristics. Of the dihaploids nine died before flowering and of the hybrids six (tables 2 to 6).

All the hybrids resembled one another and were almost sterile (tables 7 and 8). Their general form was that of *H. bulbosum*, although they were not so large and vigorous. Chromosome number was usually unstable in the tetraploid hybrids; from one of them a diploid hybrid arose, presumably by gradual elimination of chromosomes, while six of the plants formed tillers, usually fertile, resembling *H. vulgare*. The progeny of these tillers were diploid with the exception of one which yielded diploid and tetraploid plants, presumably by spontaneous doubling up of the chromosomes.

The dihaploid plants closely resembled diploid *H. vulgare* and were fertile. They and the haploid must have arisen by elimination of chromosomes. Later generations from dihaploids and from fertile tillers of tetraploid hybrids were compared with *H. vulgare*. Progeny with cytoplasm of *H. vulgare* (from the cross VVVV ×

BBBB) differed slightly from diploid *H. vulgare*, probably because the genetic constitution of the two sets of chromosomes derived from the tetraploid is no longer identical with that of the diploid variety of barley. Offspring of dihaploids with the cytoplasm of *H. bulbosum* (from the cross BBBB × VVVV) differed more because there would be a cytoplasmic effect as well as the genetic effect (table 9).

Embryology

Development of the caryopsis from the crosses VV × BB, VV × BBBB and VVVV × BBBB was compared with intravarietal fertilization VV × VV. All parts of the caryopsis developed slower in interspecific crosses. Seed of the crosses VV × BB and VVVV × BBBB usually aborted within two weeks of pollination before any organs of the embryo had differentiated. Seed of VV × BBBB aborted within three or four weeks after organs of the embryo had started differentiating abnormally.

From early in development all interspecific crosses showed abnormalities in division of cells and nuclei in the endosperm. Besides many micronuclei, there were multinuclear cells and giant nuclei which arose by endomitosis or by nuclear fusion in the multinuclear cells followed by endomitosis. The abnormal endosperm degenerated, thus appearing to be the primary cause of seed abortion. In the hybrid embryo abnormalities were detected, from which micronuclei arose. They appeared later than in the endosperm and seemed not to be the direct cause of abortion of the embryo, even though they affect its vitality.

In the hybrid crosses the antipodal cells remained intact slightly longer than in the intravarietal cross and occasionally some cells remained intact much longer, giving rise to enormous giant nuclei, perhaps by endomitosis.

The maternal tissue in the hybrid crosses developed initially as in the intravarietal cross but more slowly. Seed abortion certainly curtailed this early.

Cytogenetics

The karyotypes of parental species, hybrids and various other progeny were described and compared, to see whether there was any change in chromosomal morphology and to find the chromosomal composition of plants after vegetative elimination of chromosomes. Amphiplasty occurred in the hybrid so that satellites of the *H. bulbosum* genome were not visible as such. The relative lengths of the chromosomes within a genome were not affected by hybridization and the ratio of lengths between the genomes of *H. vulgare* and *H. bulbosum* were about the same in all hybrids. The karyotypes obtained by vegetative elimination of chromosomes were entirely as expected (tables 12 to 22).

The maximum number of nucleoli per cell of vegetative tissue corresponded with the number of satellite chromosomes except in some cells of triploid hybrids. The average number of nucleoli per cell was in diploids and triploids much larger and

in tetraploids slightly larger than expected from the number in *H. vulgare*. Thus the presence of chromosomes of *H. bulbosum* increased the number of nucleoli per cel (table 23 and figure 26).

In all types of hybrid, chromosomes paired completely or almost completely during the pachytene stage of meiosis, by which allosyndetic, non-homologous autosyndetic and homologous autosyndetic pairing occurred simultaneously. Then some associations of chromosomes fell apart by desynapsis which was a result of low chiasma frequency. The other chromosomes remained joined by chiasmata or pseudochiasmata, which could hardly be distinguished from each other. In diploid hybrids most seemed to be pseudochiasmata and they sometimes lasted until the first anaphase. In the triploids most normal chiasmata gave rise to association of chromosomes in the first metaphase, while in tetraploids both types occurred together but with fewer pseudochiasmata than normal chiasmata (tables 24, 25, 28, 29, and 31).

In all types of hybrid there were one or rarely two nucleoli per cell during prophase and diakinesis of meiosis. The nucleolus was associated with two chromosomes or chromosomal configurations at most.

In diploids and tetraploids and to a lesser extent in triploids there were aneuploid cells, chiefly hypoploid. Many cells contained various inclusions; hypoploid cells contained the most. The inclusions and the aneuploidy could be ascribed to abnormal premeiotic division in which not all the chromosomes were distributed between the daughter cells (tables 26 and 32).

Association of chromosomes was studied in the first metaphase of aneuploid cells. In diploid hybrids, association decreased rapidly in hypoploid cells with declining chromosome number. In triploid hybrids this decrease was less marked and in cells with about 14 chromosomes association reached the rate found in the diploid hybrids, suggesting that it was chiefly the chromosomes of *H. bulbosum* which had been eliminated. In tetraploid hybrids association decreased rapidly until chromosome number reached 24 and then decreased slower slightly above the rate of association found in aneuploid cells of triploids. This indicates that there is some selectivity in the elimination of chromosomes, whereby the chromosomes of *H. bulbosum* stand more chance of being eliminated (figure 33).

Because of univalents, pseudochiasmata and aneuploidy, meiosis was very irregular from the first metaphase. The tetrads contained micronuclei and pollen micrograins. Ripe anthers of diploid hybrids contained no stainable grains; triploids contained little stainable grains and they were of variable diameter; in tetraploids there was a proportion of stainable grains which varied between plants and grain diameter was very variable (tables 27, 30 and 34).

In the haploid plant with the genome V there was a slight tendency to form bivalents in meiosis, but they mostly proved to be pseudobivalents. Dihaploids with the genome VV all had very regular meiosis similar to that of diploid *H. vulgare*. The pollen of these plants was identical with that of diploid *H. vulgare* (tables 33 and 34).

Discussion

Many of the abnormalities seem to be caused by faulty division of nuclei containing chromosomes from both *H. vulgare* and *H. bulbosum*. They included the abnormal development of endosperm, lack of vigour in the hybrid embryo and plant, vegetative elimination of chromosomes, and the occurrence of aneuploid pollen mother cells. The abnormalities could be the result of incompatibility between chromosomes or genes of the parental species. The observed differences in the amount and nature of abnormalities in several tissues probably ensue from existing differences between the tissues, e.g. in speed of mitoses, and by differences in gene dosage.

Another abnormality in the hybrid nucleus is amphiplasty, which was expressed as the suppression of the secondary constriction in the satellite chromosome of *H. bulbosum* and probably caused the suppression of nucleolus activity in the same chromosome. This abnormality is perhaps associated with the preferential elimination of the chromosomes of *H. bulbosum*.

Finally there are abnormalities in meiosis: besides aneuploidy, there are desynapsis as a result of low chiasma frequency and formation of pseudochiasmata. The low chiasma frequency probably is genetically determined, while the pseudochiasmata might be the result of matrix connections or fusion of heterochromatin.

The significance of the hybrids for barley breeding is briefly considered. As it is likely that in meiosis material is exchanged between chromosomes of the two parents and as the hybrids are not completely sterile, it may be possible to introduce characteristics of *H. bulbosum* into *H. vulgare*. In somatic tissue characteristics could be transferred by induction of interspecific translocations, for example in tetraploid hybrids, after which the preferential elimination of chromosomes could be used to recover changed genomes of *H. vulgare*. Perhaps hexaploid hybrids VVBBBB could be used. Plants with the cytoplasm of *H. bulbosum* and the chromosomes of *H. vulgare* could be of interest for breeding frost-resistant barley and in the study of male-sterile barley. The possibilities deserve further research.

Literatuur

ÅBERG, E. 1938 *Hordeum agriocrithon* nova sp., a wild six-rowed barley. *K. LantbrHögsk. Annlr 6:* 159-216.

ÅBERG, E. 1940 The taxonomy and phylogeny of *Hordeum* L. sect. *Cerealia* ANDS. With special reference to Thibethan barleys. *Symb. bot. upsal. 4 (2):* 156 pp.

ÅBERG, E. & G. A. WIEBE 1948 Taxonomic value of characters in cultivated barley. *Tech. Bull. U.S. Dep. Agric. 942:* 88 pp.

BEAUDRY, J. R. 1951 Seed development following the mating *Elymus virginicus* L. × *Agropyron repens* (L.) BEAUV. *Genetics, Princeton 36:* 109-133.

BERG, K. H. VON 1936 Autotetraploidie bei *Hordeum bulbosum* L. *Züchter 8:* 151-158.

BHATTACHARYYA, N. K., L. E. EVANS & B. C. JENKINS 1961 Karyotype analysis of the individual "Dakold" fall rye chromosome additions to "Kharkov" winter wheat. *Nucleus, Calcutta 4:* 25-38.

BONNETT, O. T. 1938 Seed setting and average seed weight as affected by two methods of opening barley flowers for emasculation. *J. Am. Soc. Agron. 30:* 501-506.

BOWDEN, W. M. 1959 The taxonomy and nomenclature of the wheats, barleys, and ryes and their wild relatives. *Can. J. Bot. 37:* 657-684.

BOWDEN, W. M. 1960 An experimental taxonomist examines the classification of grasses. *Revue can. Biol. 19:* 279-292.

BOWDEN, W. M. 1962 Cytotaxonomy of the native and adventive species of *Hordeum, Eremopyrum, Secale, Sitanion,* and *Triticum* in Canada. *Can. J. Bot. 40:* 1675-1711.

BOWDEN, W. M. 1965 Cytotaxonomy of the Eurasiatic and South American species of the barley genus, *Hordeum* L. *Can. J. Genet. Cytol. 7:* 394-399.

BOYES, J. W. & W. P. THOMPSON 1937 The development of the endosperm and embryo in reciprocal interspecific crosses in cereals. *J. Genet. 34:* 203-227.

BRADLEY, M. V. 1948 A method for making aceto-carmine squashes permanent without removal of the cover slip. *Stain Technol. 23:* 41-44.

BRINK, R. A. & D. C. COOPER 1944 The antipodals in relation to abnormal endosperm behaviour in *Hordeum jubatum* × *Secale cereale* hybrid seeds. *Genetics, Princeton 29:* 391-406.

BRINK, R. A. & D. C. COOPER 1947 The endosperm in seed development. *Bot. Rev. 13:* 423-541.

BRINK, R. A., D. C. COOPER & L. E. AUSHERMAN 1944 A hybrid between *Hordeum jubatum* and *Secale cereale*. *J. Hered. 35:* 66-75.

BURNHAM, C. R. & A. HAGBERG 1956 Cytogenetic notes on chromosomal interchanges in barley. *Hereditas 42:* 467-482.

BURNHAM, C. R., F. H. WHITE & R. LIVERS — 1954 — Chromosomal interchanges in barley. *Cytologia 19:* 191-202.

CAUDERON, Y. & A. CAUDERON — 1956 — Étude de l'hybride F_1 entre *Hordeum bulbosum* L. et *H. secalinum* SCHREB. *Annls Amél. Pl. 6:* 307-317.

CHANG, CH. W. — 1963 — Comparative growth of barley embryos *in vitro* and *in vivo. Bull. Torrey bot. Club 90:* 385-391.

CHIN, T. C. — 1941 — The cytology of some wild species of *Hordeum. Ann. Bot. 5:* 535-545.

CLAVIER, Y. & A. CAUDERON — 1951 — Un cas d'haploïdie chez l'orge cultivée. *Annls Amél. Pl. 1:* 332-335.

COLLINS, G. B. — 1968 — DNA synthesis in two species of *Nicotiana* and their hybrid. *J. Hered. 59:* 13-17.

COOPER, D. C. — 1951 — Caryopsis development following matings between diploid en tetraploid strains of *Zea mays. Am. J. Bot. 38:* 702-708.

COOPER, D. C. & R. A. BRINK — 1944 — Collapse of the seed following the mating of *Hordeum jubatum* × *Secale cereale. Genetics, Princeton 29:* 370-390.

DARLINGTON, C. D. — 1937 — Recent advances in cytology, Churchill Ltd. London (2e druk), 671 pp.

DAVIES, D. R. — 1956 — Cytogenetic studies in wild and cultivated species of *Hordeum.* PhD Thesis, Univ. Wales, 145 pp. (getypt).

DAVIES, D. R. — 1958 — Male parthenogenesis in barley. *Heredity, Lond. 12:* 493-498.

DAVIES, D. R. — 1960 — The embryo culture of inter-specific hybrids of *Hordeum. New Phytol. 59:* 9-14.

ESSAD, S., J. ARNOUX & NICOLE MAIA — 1966 — Contrôle de validité des caryogrammes. Application au caryotype de *Lolium perenne* L. *Chromosoma 20:* 202-220.

GUPTA, S. B. — 1968 — Chlorophyll variegation caused by unstable behaviour of an alien chromosome in hybrid derivatives of *Nicotiana* species. *Genetica 39:* 193-208.

HÅKANSSON, A. — 1953 — Endosperm formation after 2x, 4x crosses in certain cereals, especially in *Hordeum vulgare. Hereditas 39:* 57-64.

HÅKANSSON, A. & S. ELLERSTRÖM — 1950 — Seed development after reciprocal crosses between diploid and tetraploid rye. *Hereditas 36:* 256-296.

HAMILTON, D. G., S. SYMKO & J. W. MORRISON — 1955 — An anomalous cross between *Hordeum leporinum* and *H. vulgare. Can. J. agric. Sci. 35:* 287-293.

HENEEN, W. K. — 1962 — Karyotype studies in *Agropyron junceum, A. repens* and their spontaneous hybrids. *Hereditas 48:* 471-502.

HENEEN, W. K. — 1963 — Cytology of the intergeneric hybrid *Elymus arenarius* × *Secale cereale. Hereditas 49:* 61-77.

HERTZSCH, W. & W. NITZSCHE — 1966 — Chromosomenreduktion in den Nachkommenschaften von autopolyploidem Rohrschwingel *(Festuca arundinacea* SCHREB.). *Züchter 36:* 240-242.

HOFFMANN, W. — 1959 — Gerste *(Hordeum vulgare* L.). I. Systematik. In: Handbuch der Pflanzenzüchtung. II. Züchtung der Getreidearten. Paul Parey, Berlin und Hamburg: 276-296.

INOUYE, C. — 1933 — Meiotic mitosis in *Hordeum sativum. Bull. Miyazaki Coll. Agric. For. 5:* 77-96.

JAIN, H. K. — 1966 — The interaction of chromosomal and nucleolar synthesis. *Indian J. Genet. Pl. Breed. 26A:* 228-233.

KATZNELSON, J. & D. ZOHARY 1967 Diploid and tetraploid *Hordeum bulbosum* L. *Israel J. Bot. 16:* 57-62.

KEEP, ELIZABETH 1962 Satellite and nucleolar number in hybrids between *Ribes nigrum* and *R. grossularia* and in their backcrosses. *Can. J. Genet. Cytol. 4:* 206-218.

KENT, NANCY & R. A. BRINK 1947 Growth *in vitro* of immature *Hordeum* embryos. *Science, N.Y. 106:* 547-548.

KIHARA, H. & I. NISHIYAMA 1933 Different compatibility in reciprocal crosses of *Avena*, with special reference to tetraploid hybrids between hexaploid and diploid species. *Jap. J. Bot. 6:* 245-305.

KIMBER, G. & R. RILEY 1953 Haploid angiosperms. *Bot. Rev. 29:* 480-531.

KONZAK, C. F., L. F. RANDOLPH & N. F. JENSEN 1951 Embryo culture of barley species hybrids. Cytological studies of *Hordeum sativum* × *Hordeum bulbosum*. *J. Hered. 42:* 124-134.

KRUSE, A. 1967 Intergeneric hybrids between *Hordeum vulgare* L. ssp. *distichum* (v. Pallas, 2n = 14) and *Secale cereale* L. (v. Petkus, 2n = 14). Preliminary report. *Årsskr. K. Vet.-Landbohøjsk. (1967)*: 82-92.

KUCKUCK, H. 1934 Artkreuzungen bei Gerste. *Züchter 6:* 270-273.

LANDES, MARGARET 1939 The causes of self-sterility in rye. *Am. J. Bot. 26:* 567-571.

LANGE, W. 1965 Cytogenetisch onderzoek in gerst. *Jversl. Sticht. PlVered. 1964:* 82-88.

LARTER, E. N. & H. ENNS 1960 The influence of gibberellic acid on the development of hybrid barley ovules *in vivo*. *Can. J. Genet. Cytol. 2:* 435-441.

LEIN, A. 1943 Die genetische Grundlage der Kreuzbarkeit zwischen Weizen und Roggen. *Z. indukt. Abstamm.-u. VererbLehre 81:* 28-61.

LEIN, A. 1948 Natürliche Standorte von diploidem und tetraploidem *Hordeum bulbosum* L. *Züchter 19:* 6-9.

LEVAN, A., K. FREDGA & A. A. SANDBERG 1964 Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas 52:* 201-220.

LI, H. W. & D. S. TU 1947 Studies on the chromosomal aberrations of the amphidiploid *Triticum timopheevi* and *Aegilops bicornis*. *Bot. Bull. Acad. Sin. Shanghai 7:* 174-186. Referaat in: Lindström (1965).

LINDSTRÖM, J. 1965 Colchicine treatments of polyploids in the group Hordeae. *Hereditas 54:* 177-201.

LOVE, R. M. 1938 Somatic variation of chromosome numbers in hybrid wheats. *Genetics, Princeton 23:* 517-522.

LUNDQVIST, A. 1962 Self-incompatibility in diploid *Hordeum bulbosum* L. *Hereditas 48:* 138-152.

MCCLINTOCK, BARBARA 1934 The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 21:* 294-328.

MENABDE, V. L. 1938 Barleys of Georgia (Botanic-taxonomical outline). *Trudy tbilis. bot. Inst. 6:* 181-246. Referaat in: Smith (1951).

MERRY, J. 1941 Studies on the embryo of *Hordeum sativum*. I. The development of the embryo. *Bull. Torrey bot. Club 68:* 585-598.

MERRY, J. 1942 Studies on the embryo of *Hordeum sativum*. II. The growth of the embryo in culture. *Bull. Torrey bot. Club 69:* 360-372.

MORRISON, J. W. 1959 Cytogenetic studies in the genus *Hordeum*. I. Chromosome morphology. *Can. J. Bot. 37:* 527-538.

MORRRISON, J. W., A. E. HANNAH, R. LOISELLE & S. SYMKO 1959 Cytogenetic studies in the genus *Hordeum*. II. Interspecific and intergeneric crosses. *Can. J. Pl. Sci. 39:* 375-383.

MORRISON, J. W. & T. RAJHATHY 1959 Cytogenetic studies in the genus *Hordeum*. III. Pairing in some interspecific and intergeneric hybrids. *Can. J. Genet. Cytol. 1:* 65-77.

MORRISON, J. W. & T. RAJHATHY 1960 Chromosome behaviour in autotetraploid cereals and grasses. *Chromosoma 11:* 297-309.

NAVASHIN, M. S. 1928 "Amphiplastie" - eine neue karyologische Erscheinung. *Proc. int. Conf. Genet. 5 (1927):* 1148-1152.

NEVSKI, S. A. 1941 Beiträge zur Kenntnis der wildwachsenden Gersten im Zusammenhang mit der Frage über den Ursprung von *Hordeum vulgare* L. und *Hordeum distichon* L. (Versuch einer Monographie der Gattung *Hordeum). Trudy bot. Inst. Akad. Nauk SSSR, Ser. 1, 5:* 64-255 (Russisch met Duitse samenvatting en Latijnse plantbeschrijvingen).

NILAN, R. A. 1964 The cytology and genetics of barley 1951-1962. *Res. Stud. Wash. St. Univ. 32:* Monogr. Suppl. 3, 278 pp.

NORSTOG, K. J. 1956 The growth of barley embryos on coconut milk media. *Bull. Torrey bot. Club 83:* 27-29.

NORSTOG, K. J. 1961 The growth and differentation of cultured barley embryos. *Am. J. Bot. 48:* 876-884.

ODENBACH, W. 1965 Histologische und cytologische Untersuchungen der Entwicklungsvorgänge nach der Bestäubung von Gerste mit Roggen. *Z. PflZücht. 53:* 1-52.

RAJHATHY, T. 1963 Chromosome mosaics and the recovery of the original strain from octoploid *Hordeum murinum. Z. VererbLehre 94:* 269-279.

RANDOLPH, L. F. & L. G. COX 1943 Factors influencing the germination of *Iris* seed and the relation of inhibiting substances to embryo dormancy. *Proc. Am. Soc. hort. Sci. 43:* 284-300.

REES, H. 1957 Genotypic control of chromosome behaviour in rye. IV. The origin of new variation. *Heredity, Lond. 11:* 185-193.

REES, H. 1961 Genotypical control of chromosome form and behaviour. *Bot. Rev. 27:* 288-318.

RESNIČUK, S. P. 1939 Perennial rye. *Sots. zern. Khoz. 4:* 87-90. (Russisch, vertaald gelezen).

REUSCH, J. D. H. 1959a The nature of the genetic differentiation between *Lolium perenne* and *Festuca pratensis. S. Afr. J. agric. Sci. 2:* 271-283.

REUSCH, J. D. H. 1959b Embryological studies on seed development in reciprocal crosses between *Lolium perenne* and *Festuca pratensis. S. Afr. J. agric. Sci. 2:* 429-449.

REUSCH, J. D. H. 1959c Note on the nature of the effect of the environment on seed-viability in interspecific hybrids. *S. Afr. J. agric. Sci. 2:* 573-574.

RIJVEN, A. H. G. C. 1956 Glutamine and asparagine as nitrogen sources for the growth of plant embryos *in vitro:* a comparative study of 12 species. *Aust. J. biol. Sci. 9:* 511-527.

RILEY, R. & V. CHAPMAN 1957 Haploids and polyhaploids in *Aegilops* and *Triticum. Heredity, Lond. 11:* 195-207.

RILEY, R. & V. CHAPMAN 1967 The inheritance in wheat of crossability with rye. *Genet. Res. 9:* 259-267.

SACHS, L. 1952 Chromosome mosaics in experimental amphidiploids in the *Triticinae. Heredity, Lond. 6:* 157-170.

SASS, J. E. 1964 Botanical Microtechnique, Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa (3e druk), 228 pp.

SCHOOLER, A. B. 1960 The effect of Gibrel and gibberellic acid (K salt) in embryo culture media for *Hordeum vulgare. Agron. J. 52:* 411.

SCHOOLER, A. B. 1964 Wild barley crosses show disease resistance. *N. Dak. Fm Res. 23:* 13-15.

SCHWANITZ, F. & H. PIRSON 1955 Chromosomengrösse, Zellgrösse und Zellenzahl bei einigen diploiden Gigaspflanzen. *Züchter 25:* 221-229.

SMITH, D. C. 1942 Intergeneric hybridization of cereals and other grasses. *J. agric. Res. 64:* 33-47.

SMITH, L. 1951 Cytology and genetics of barley. *Bot. Rev. 17:* 1-51, 133-202, 285-355.

SPECKMANN, G. J. 1964 Voorbereidend onderzoek bij de polyploïdieveredeling. *Jversl. Sticht. PlVered. 1963:* 133-136.

STAUDT, G. 1960 Die Meiosis der F_1-Bastarde *Hordeum spontaneum* × *Hordeum agriocrithon. Naturwissenschaften 47:* 406-407.

STEBBINS, G. L. 1958 The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids. *Adv. Genet. 9:* 147-215.

STEBBINS, G. L. 1965 Some relationships between mitotic rhythm, nucleic acid synthesis, and morphogenesis in higher plants. *Brookhaven Symp. Biol. 18:* 204-221.

SUETSUGU, I. 1951 Developmental morphology of the embryo in barley, rye, and oats. *Bull. natn. Inst. agric. Sci., Tokyo 1D:* 49-87 (Japans met Engelse samenvatting).

SYBENGA, J. 1959 Some sources of error in the determination of chromosome length. *Chromosoma 10:* 355-364.

THOMPSON, W. P. & DOROTHY JOHNSTON 1945 The cause of incompatibility between barley and rye. *Can. J. Res. 23C:* 1-15.

TJIO, J. H. & A. HAGBERG 1951 Cytological studies on some X-ray mutants of barley. *An. Estac. exp. Aula Dei 2:* 149-167.

TJIO, J. H. & A. LEVAN 1950 The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *An. Estac. exp. Aula Dei 2:* 21-64.

TOMASZEWSKI, Z. 1958 Investigations on breeding of isolated buds in artificial conditions. *Hodowla Rośl. Aklim. Nasienn. 2:* 479-525.

TOMETORP, G. 1939 Cytological studies on haploid *Hordeum distichum. Hereditas 25:* 241-254.

TSCHERMAK, E. VON 1914 Die Verwertung der Bastardierung für phylogenetische Frage in der Getreidegruppe. *Z. PflZücht. 2:* 291-312.

TSUCHIYA, T. 1953 Fertility of autotetraploids and their hybrids in barley. I. Meiosis and fertility in some autotetraploids. *Rep. Kihara Inst. biol. Res. 6:* 46-52.

TSUCHIYA, T. 1960 Cytogenetic studies of trisomics in barley. *Jap. J. Bot. 17:* 177-213.

TSUCHIYA, T. 1964 Chromosome aberrations and their use in genetics and breeding in barley - trisomics and aneuploids. Barley genet. I. *Proc. int. Barley Genet. Symp. 1:* 116-150.

TURCOTTE, E. L. & C. V. FEASTER 1967 Semigamy in Pima cotton. *J. Hered. 58:* 55-57.

VAARAMA, A. 1949 Spindle abnormalities and variation in chromosome number in *Ribes nigrum. Hereditas 35:* 136-162.

VINOGRADOVA, N. M. 1946 Hybridization between cultivated barley and wild species of *Hordeum. Trudy Zonal. Inst. Zern. Khoz. Nechernozemnoi Polosy SSSR 13:* 134-137. Referaat in: *Biol. Abstr. 23 (1949):* 20293.

WAGENAAR, E. B. 1959 Intergeneric hybrids between *Hordeum jubatum* L. and *Secale cereale* L. *J. Hered. 50:* 194-202.

WAGENAAR, E. B. 1960 The cytology of three hybrids involving *Hordeum jubatum* L.: the chiasma distributions and the occurrence of pseudo ring-bivalents in genetically induced asynapsis. *Can. J. Bot. 38:* 69-85.

WALTERS, MARTHA S. 1954 A study of pseudobivalents in meiosis of two interspecific hybrids of *Bromus. Am. J. Bot. 41:* 160-171.

WITTMANN, W. 1965 Aceto-iron-haematoxilin-cloral hydrate for chromosome staining. *Stain Technol. 40:* 161-164.

ZIEBUR, NANCY K. & R. A. BRINK 1951 The stimulative effect of *Hordeum* endosperms on the growth of immature plant embryos *in vitro. Am. J. Bot. 38:* 253-256.

ZIEBUR, NANCY K., R. A. BRINK, L. H. GRAF & M. A. STAHMANN 1950 The effect of casein hydrolysate on the growth *in vitro* of immature *Hordeum* embryos. *Am. J. Bot. 37:* 144-148.