NN 8201 no 438

PLASMATISCHE MANNELIJKE STERILITEIT EN FERTILITEITSHERSTEL BIJ DE PETUNIA

Cytoplasmic male sterility and restoring fertility in the garden petunia

G. A. M. VAN MARREWIJK

BIBLIOTHEEK
DER
LANDBOUWHOGESCHOOL
WAGENINGEN.

NN08201.438

635.939.514:631.522.42

PLASMATISCHE MANNELIJKE STERILITEIT EN FERTILITEITSHERSTEL BIJ DE PETUNIA

Cytoplasmic male sterility and restoring fertility in the garden petunia

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 20 DECEMBER 1968 TE 16 UUR

DOOR

G. A. M. VAN MARREWIJK

H. VEENMAN & ZONEN N.V. - WAGENINGEN

STELLINGEN

I

De ontwikkeling van haploïden uit stuifmeelkorrels vormt een belangrijke aanvulling op de reeds eerder ontwikkelde methoden van haploïdenproductie.

GUHA, S. and S. C. MAHESWARI; Nature **204** (1964): 497.

II

De door NIEUWHOF voorgestelde benutting van temperatuurgevoelige mannelijk steriele vormen van *Brassica oleracea* in de hybridenteelt heeft geen practische betekenis.

NIEUWHOF, M., Euphytica **17** (1968): 265–273.

III

De reeds in 1949 door GABELMAN ontwikkelde, doch nimmer duidelijk weersproken, theorie betreffende de reproductie en de distributie van cytoplasmatische factoren voor mannelijke steriliteit bij mais is onbevredigend.

GABELMAN, W. H., Proc. Nat. Acad. Sci. **35**: 634–640.

IV

De stellingname van SAX met betrekking tot eventuele opbrengstverhogende effecten van behandeling van zaden of vegetatieve plantendelen met lichte doses ioniserende stralen is enigszins bevooroordeeld.

SAX, K., Radiation Bot. **3** (1963): 179–186.

V

Het standpunt van ATANASOFF, dat plasmatische mannelijke steriliteit bij de petunia op een virus-infectie berust, is onvoldoende gefundeerd.

ATANASOFF, D., Z. Pflanzenz. **51** (1964): 197–214.

VI

De opvatting van VIRNICH, dat de stuifmeeldegeneratie bij plasmatisch mannelijk steriele *Allium cepa* L. 'Zittauer Gelbe' wordt veroorzaakt door het onvermogen van de microsporen om de door het tapetum geleverde voedingssubstantie op te nemen, is onjuist.

VIRNICH, H., Z. Pflanzenz. **58** (1967): 216–226.

Proefschrift van G. A. M. VAN MARREWIJK,
Wageningen, 20 december 1968.

VII

De Nederlandse kwekers van vaste planten en potplanten verrichten te weinig kweekwerk ter vernieuwing en verbetering van het bestaande sortiment.

VIII

De opvoeding van de gebruikers van bestrijdingsmiddelen ten aanzien van de daaraan verbonden gevaren, is onvoldoende.

IX

In het lager onderwijsprogramma van de Surinaamse plattelandsdistricten moet elementair landbouwkundig onderricht een belangrijker plaats krijgen.

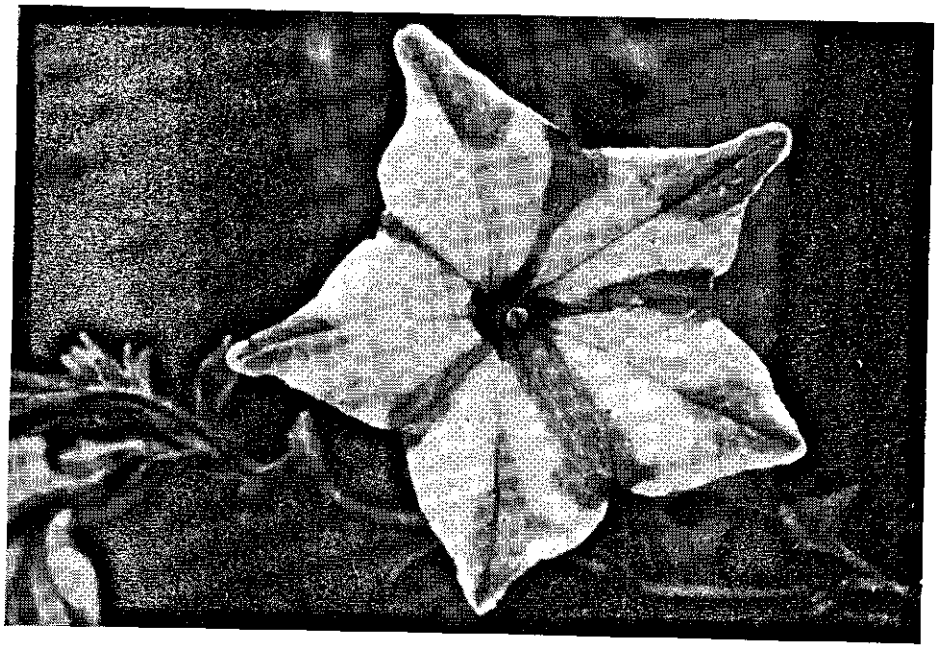
X

De aandacht die door de producenten van melkproducten wordt besteed aan de kwaliteit hiervan komt niet tot haar recht door het huidige distributiesysteem.

XI

De anatomische onvolmaaktheden van de wisent met jong, afgebeeld op de zomerpostzegel 30 + 9 cent uitgegeven in 1964, zijn mogelijk een gevolg van het feit, dat dit dier in ons land reeds lang is uitgestorven.

Speciale Catalogus N.V.P.H. 1968: 171.



Aan Els en Saskia

‚Dankbaarheid is meestal een spierinkje, uitgegooid om een nieuwe kabeljauw te vangen'

JEAN DE BOISSON, 1919 –

Het hoeft, naar ik hoop, geen betoog dat bovenstaand citaat geenszins van toepassing is op de behoefte die ik gevoel, om bij het afsluiten van dit proefschrift allen die direct of indirect aan de totstandkoming ervan hebben bijgedragen te bedanken. Allereerst dank ik mijn ouders, die mij de studie aan de Landbouwhogeschool hebben mogelijk gemaakt. U vergeve het mij, dat niet een Uwer nobele kasgewassen, doch een nederige sierplant uit Uw bloemperk mij tot het schrijven van dit proefschrift heeft geïnspireerd.

Hooggeleerde Sneep, hooggeachte promotor, ik ben U zeer erkentelijk dat U mij, nu vier jaar geleden, als vreemdeling in het Jeruzalem van de Plantenveredeling toch de kans hebt gegeven om aan Uw Afdeling te komen werken. Meer nog echter voor de levendige belangstelling en de nuttige adviezen, waarmee U mijn onderzoek steeds hebt begeleid. Met bezwaard hart gedenk ik daarbij de vele Havana miskleuren, die tijdens onze gesprekken in Uw rookvrije kamer werden verast.

Hooggeleerde Prakken, hooggeachte co-promotor, Uw gedegen colleges hebben bij mij de belangstelling voor erfelijkheidsverschijnselen gewekt. Zij zijn mij, naast Uw talrijke vaak kritische opmerkingen tijdens onze discussies, van zeer groot nut geweest bij mijn onderzoek en bij de voorbereiding van het manuscript. Ik ben U hiervoor zeer dankbaar.

Hooggeleerde Wellensiek, Hooggeleerde Doorenbos, op Uw Afdeling heeft het grootste gedeelte van mijn wetenschappelijke vorming plaats gevonden. Voor het vele, dat U beiden daartoe hebt bijgedragen, ben ik U zeer erkentelijk. Dat een belangrijk deel van de in dit proefschrift beschreven experimenten in het phytotron van het Laboratorium voor Tuinbouwplantenteelt kon worden uitgevoerd, stemt mij extra dankbaar.

Hooggeleerde Venema, met genoegen denk ik terug aan het werk, dat ik op Uw Afdeling heb mogen verrichten. Door dit werk kreeg ik meer oog voor het detail en leerde ik, noodgedwongen, zelfs een beetje tekenen.

Zeergeleerde Ferwerda, het onderwerp van mijn proefschrift beschouw ik als een stukje van Uw wetenschappelijke erfenis. Graag memoreer ik de haast vaderlijke wijze, waarop U mij in de materie hebt ingeleid, waarbij ik ook de steun van Mej. Y. J. Heinsius niet onvermeld wil laten.

Een woord van dank gaat uit naar mijn collega's van het I.V.P. en de S.V.P. voor hun belangstelling en suggesties. Voorts naar Mej. B. Rabikowska, A. Hulsewé, P. Marusinec, P. Stam en M. Verkroost, die als student aan het onderzoek hebben meegewerkt, naar Th. Meindersma en J. Dros met hun personeel voor hun hulp bij de kas- en veldwerkzaamheden, naar K. Steensma en overige fytotronassistenten, naar W. C. Niemandsverdriet en zijn staf voor hun lankmoedigheid bij mijn overtredingen van de bibliotheek-verordeningen, naar Mej. L. Stedehouder en Mej. J. E. van Voorthuysen voor het tikken van het

manuscript, naar W. D. J. van der Vliet voor het verzorgen van de tekeningen en naar J. Post sr. voor het maken van de foto's, naar G. Franken voor zijn hulp bij het samenstellen van de Engelse tekst, en zeer in het bijzonder naar Mej. D. van der Hoek voor haar trouwe assistentie bij de talrijke kas- en veldwaarnemingen.

Veel dank ben ik ook verschuldigd aan Ir. T. S. Ie van de Afd. Virologie van de Landbouwhogeschool, en aan Prof. Dr. F. Bianchi en Drs. H. Wiering van het Genetisch Instituut van de Gemeentelijke Universiteit van Amsterdam voor hun bijdrage aan het onderzoek.

I am greatly indebted to Dr. R. Frankel, Rehovot, and to Dr. B. A. Hamilton, Rutger's State University, for providing material and information.

Lieve Els, het is onmogelijk om in enkele formele zinnen mijn dank tot uitdrukking te brengen voor de steun, die ik van jou heb ondervonden. Vele uren hebben we samen in kas en veld doorgebracht voor het verzamelen van gegevens – al fluisterden boze tongen, dat daarbij ook andere dingen aan de orde kwamen –. Vooral het laatste jaar moet je je wel bijna een onbestorven weduwe hebben gevoeld, maar je had steeds volledig begrip voor mijn situatie. Hiervoor, en voor nog zoveel meer, ben ik je intens dankbaar en ik draag dan ook graag dit proefschrift aan jou op.

INHOUD

1. ALGEMENE INLEIDING 1
   1.1. Mannelijke steriliteit 1
   1.2. Overerving van mannelijke steriliteit 2
   1.3. Fertiliteitsherstel bij plasmatisch steriele vormen 4
   1.4. Mannelijke steriliteit en veredeling 7
   1.5. Overdracht van plasmatische steriliteit door middel van enting 9

2. MATERIAAL EN METHODEN 12

3. ALGEMENE WAARNEMINGEN EN BESCHOUWINGEN OMTRENT MANNELIJKE STERILITEIT BIJ DE PETUNIA 15
   3.1. Aard en oorsprong van mannelijke steriliteit bij de petunia 15
   3.2. Histologische verschillen tussen de helmknoppen van plasmatisch steriele en normaal fertiele vormen van petunia 15
   3.3. Overige morfologische en fysiologische verschillen tussen steriele en fertiele vormen van petunia 17
   3.4. Toepassing van plasmatische mannelijke steriliteit bij de petunia 18
   3.5. Enkele waarnemingen en opvattingen aangaande de oorzaak van stuifmeeldegenetatie bij mannelijk steriele planten 19

4. FERTILITEITSHERSTEL BIJ DE PETUNIA 21
   4.1. Inleiding 21
   4.2. Herkomst van het eigen herstellermateriaal 21
   4.3. Kruisingsexperimenten met het herstellermateriaal 21
   4.3.1. Samenstelling van het in 1965 beschikbare materiaal 21
   4.3.2. Waarnemingen aan en bestuivingen in het uitgangsmateriaal van 1965 22
   4.3.3. Aard en methodiek van de veldwaarnemingen in 1966 en 1967 24
   4.3.4. Bespreking van het gedrag van de verschillende nakomelingschapstypen . . . 27
   4.3.4.1. R ⊗ en pR ⊗ 27
   4.3.4.2. pR × R 31
   4.3.4.3. MS × R en MS × pR 31
   4.3.4.4. R × F en pR × F 35
   4.3.4.5. Controle-kruisingen 37
   4.3.5. Toetsing van de betrouwbaarheid van de indeling in fertiliteitsklassen 38
   4.4. Fertiliteitsexpressie en milieu 44
   4.5. Verband tussen helmknopinhoud en kwaliteit van het stuifmeel bij planten uit het herstellermateriaal 46
   4.6. Samenvatting en discussie 49

5. EXPERIMENTEN MET HET HERSTELLERMATERIAAL ONDER BEHEERSTE OMSTANDIGHEDEN 51
   5.1. Inleiding 51
   5.2. De invloed van temperatuur en daglengte op de fertiliteit. 51
   5.2.1. Constante temperatuur 51
   5.2.2. Wisselende temperatuur 61
   5.2.3. Daglengte 62
   5.3. Vaststelling van het ontwikkelingsstadium van bloem en meeldraad, waarbij de fertiliteitsinductie door de temperatuur plaats vindt 63
   5.4. Hoedanigheid van het bij verschillende temperaturen gevormde stuifmeel . . 66
   5.5. Discussie 69
   5.6. Samenvatting 72

6. GENETISCHE ANALYSE VAN ENIGE SPLITSINGSGEGEVENS 74
6.1. Inleiding 74
6.2. Analyse van de F_2-nakomelingschap $Pt_{67}V9$ onder beheerste omstandigheden . 74
6.3. Vergelijking van de classificatie van $Pt_{67}V9$ op grond van waarnemingen te velde met de classificatie in het fytotron 80
6.4. Toetsing van de ontwikkelde hypothese aan een aantal met $Pt_{67}V9$ verwante veldnakomelingschappen 82
6.5. Samenvattende bespreking 83

7. KOPPELING TUSSEN BLOEMKLEURFACTOREN EN FERTILITEIT-HERSTELLENDE GENEN 85
7.1. Inleiding 85
7.2. Bloemkleurgenen bij de petunia 87
7.3. Bloemkleursplitsingen en -genotypen in het eigen materiaal 88
7.4. Fertiliteit van het materiaal in 1967 89
7.5. Verdeling der fertiliteitsklassen over de bloemkleurtypen B_2. en b_2b_2; koppelingsanalyse. 89
7.6. Samenvattende beschouwing 94

8. ONDERZOEK NAAR DE MOGELIJKE VIRUSNATUUR VAN DE STERILITEITSVERWEKKER 95
8.1. Inleiding 95
8.2. Electronenmicroscopisch onderzoek 95
8.3. Pogingen tot mechanisch overbrengen van het steriliteit verwekkend agens . . 95
8.4. Inactivering van de steriliteitsverwekker via warmteschokbehandeling 97
8.5. Discussie 97

9. OVERDRACHT VAN STERILITEIT DOOR MIDDEL VAN ENTING 99
9.1. Inleiding 99
9.2. Bespreking van de entcombinaties 99
9.2.1. Opzet van de entproeven 99
9.2.2. Overzicht van de entingen en waarnemingen omtrent het verloop ervan . . . 100
9.2.3. Waarnemingen aan de bloeiende entcombinaties 102
9.3. Onderzoek van de fertiliteitsexpressie bij nakomelingschappen van entcomponenten 102
9.3.1. Zelf- en kruisbestuiving van entcomponenten 102
9.3.2. Macroscopische waarnemingen aan de nakomelingschappen 103
9.3.3. Onderzoek naar de hoedanigheid van het stuifmeel van onvolledig fertiele F-Rosy Morn-planten 112
9.4. Discussie 113

SAMENVATTING 117

SUMMARY 119

GERAADPLEEGDE LITERATUUR 124

1. ALGEMENE INLEIDING

1.1. MANNELIJKE STERILITEIT

Het begrip mannelijke steriliteit is te omschrijven als het onvermogen van bloeiende planten tot het vormen dan wel het vrijlaten van functionerend stuifmeel. De begrenzingen van de door deze definitie omvatte verschijnselen vormen enerzijds de vrouwelijke planten van tweehuizigen, waarbij de mannelijke geslachtsorganen geheel ontbreken of sterk gereduceerd zijn (hop, hennep, spinazie, asperge), aan de andere kant de gevallen waar normaal functionerend stuifmeel in de helmhokjes wordt gevormd, doch onwerkzaamheid van het openingsmechanisme het vrijlaten van stuifmeel verhindert. Het laatste verschijnsel wordt algemeen aangeduid als ‚functionele steriliteit' en komt o.a. voor bij de tomaat (CRANE, 1915; ROEVER, 1948; LARSON en PAUR, 1948).

Tussen de beide uitersten staan de normaliter tweeslachtige soorten die als gevolg van onregelmatigheden in een bepaald stadium van de ontwikkeling van het androecium of van het stuifmeel mannelijke steriliteit vertonen.

In verschillende species komen erfelijke vormen van duidelijk zichtbare onderdrukking van de mannelijke geslachtsorganen voor (Eng.: male sex suppression). Deze kunnen bestaan in atrofiëring van de helmknoppen (KOOPMANS, 1951, 1952; OEHLKERS, 1952), reductie van de meeldraden tot staminodieën of nog sterker rudimentaire organen (SAUNDERS en STEBBINS, 1938; OEHLKERS, 1938; e.a.), tot in het geheel ontbreken van de meeldraden (KARPER en STEPHENS, 1936; RICK, 1945; RAEBER en BOLTON, 1955). Omvorming van de mannelijke organen tot vrouwelijke (pistillodie of carpelloidie) komt eveneens niet zelden voor (CHITTENDEN, 1914; SIRKS, 1924; CORRENS, 1926; WEATHERWAX, 1925; DAHLGREN, 1932; KOOPMANS, 1952; STOREY, 1953; KIHARA en TSUNEWAKI, 1962). Dit laatste verschijnsel staat bekend als geslachtsomkering (Eng.: sex reversal).

In een groot aantal andere gevallen worden de helmknoppen wel normaal gevormd, maar leiden onregelmatigheden tijdens de microsporogenese of de pollenmitoses tot abortie van het stuifmeel. Het stadium, waarin de degeneratie van het sporogene weefsel plaats vindt, of liever waarin deze zich manifesteert, vertoont van geval tot geval verschillen. Het stadium van overgang van tetraden in jonge microsporen lijkt een uitgesproken kritisch moment te zijn (verg. pag. 19). Er zijn echter ook ontwikkelingsdéraillementen waargenomen in vroegere en latere stadia van de stuifmeelontwikkeling (RICK, 1948; WELZEL, 1954; JAIN, 1959).

Scherpe scheidslijnen tussen de zojuist besproken, als ‚pollensteriliteit' te omschrijven verschijnselen, en de eerst genoemde gevallen van sterkere onderdrukking van de mannelijke geslachtsorganen zijn niet te trekken. Pollensteriliteit gaat namelijk veelal met geringe of sterkere afwijkingen van de antheren gepaard (verg. pag. 17).

Samenvattend kan gesteld worden, dat onder mannelijke steriliteit dienen te worden begrepen alle volgende gevallen:

1. Vrouwelijke individuen van tweehuizige soorten.
2. Planten van normaliter tweeslachtige soorten, waarbij:
a. De meeldraden geatrofieerd zijn, ontbreken, of door vrouwelijke organen zijn vervangen.
b. De meeldraden normaal zijn ontwikkeld, doch gestoorde sporemoedercel-, microspore-, of stuifmeelontwikkeling resulteert in het geheel of gedeeltelijk ontbreken of niet kiemkrachtig zijn van de stuifmeelkorrels (pollensteriliteit).
c. De meeldraden normaal stuifmeel bevatten, doch niet openspringen, zodat het stuifmeel niet vrij komt (functionele steriliteit).

In het vervolg zullen hier met de term ‚mannelijke steriliteit' of kortweg ‚steriliteit' uitsluitend de onder punt 2b samengevatte vormen worden aangeduid, tenzij uitdrukkelijk anders vermeld. Wanneer slechts een deel van het stuifmeel gedegenereerd is, worden wel de termen ‚partieel fertiel' (pF; lichte degeneratie) en ‚partieel steriel' (pS; sterke degeneratie) gebruikt. VAN DER KLEY (1954) spreekt van volledige steriliteit, wanneer de hoeveelheid functionerend stuifmeel $< 0{,}5\%$ van de normale productie bedraagt. JAIN (1959) meent evenwel, dat voor practische doeleinden een productie van 5% nog als steriel mag worden beschouwd. In het eigen onderzoek wordt alleen van absolute of volledige steriliteit gesproken bij het volledig ontbreken van stuifmeel bij beoordeling van geopende helmknoppen met het blote oog of (in twijfelgevallen) met een handloep, vergroting 5 ×.

1.2. OVERERVING VAN MANNELIJKE STERILITEIT

Mannelijke steriliteit is in een groot aantal plantensoorten aangetroffen, waaronder ook een aantal cultuurgewassen. Door VAN DER KLEY (1954) werden 40 gevallen bij 34 verschillende species vermeld. Sindsdien is, mede als gevolg van intensief doorzoeken van cultuurgewassen, het aantal bekende gevallen sterk toegenomen.

In het merendeel van de door VAN DER KLEY en latere auteurs (JAIN, 1959; DUVICK, 1966) samengevatte gevallen berust het steriliteitskenmerk op één, bij uitzondering enkele, recessieve genen. Dominante overerving is zelden aangetroffen.

Bij een aantal gevallen van mannelijke steriliteit bleek het plasma van de moederplant een beslissende rol te spelen. Reeds in 1908 vond CORRENS bij de gynodioecische soort *Satureja hortensis*, dat de nakomelingen van vrouwelijke planten steeds voor honderd procent de geslachtsexpressie van de moeder bezaten, ook wanneer er herhaald met hermaphrodiete planten werd teruggekruist. VON WETTSTEIN (1924) stelde ter verklaring van dit verschijnsel de hypothese op, dat de aard van het cytoplasma de antheren-ontwikkeling bij de vrouwelijke planten en hun nakomelingen onderdrukt. In latere jaren werden meer gevallen bekend, waarin het cytoplasma een beslissende invloed heeft op de expressie van mannelijke steriliteit (overzicht bij EDWARDSON, 1956).

Op grond van hun aard van overerving worden de besproken typen van steriliteit in het algemeen onderscheiden in ‚genetische' resp. ‚(cyto)plasma-

tische' steriliteit. Deze terminologie werkt verwarring in de hand, aangezien de term ‚genetisch' in het spraakgebruik de betekenis van ‚erfelijk' heeft, en dus zou kunnen suggereren, dat ‚plasmatische' steriliteit niet erfelijk is.

Vervanging van de term ‚genetisch' door ‚chromogenetisch' of ‚chromosomaal' is niet aan te bevelen. Deze termen houden onvoldoende rekening met de verdere onderscheiding in door aneuploïdie of structurele chromosoomveranderingen en in door bepaalde genen veroorzaakte vormen van steriliteit. In de Engelstalige litteratuur wordt voor deze laatste gevallen vrij algemeen de term 'genic' gebezigd. Hoewel in het Nederlands het woord ‚genisch' tot nu toe niet gebruikt wordt, lijkt ‚genische steriliteit' hier de aangewezen term.

Met het oog op het belang voor het eigen onderzoek wordt op het verschijnsel plasmatische steriliteit hier nader ingegaan. Plasmatische steriliteit is aangetroffen bij een aantal cultuurgewassen, met name bij vlas (BATESON en GAIRDNER, 1921), ui (MONOSMITH, 1926; JONES en EMSWELLER, 1937), mais (RHOADES, 1933; JOSEPHSON en JENKINS, 1948; e.a.), biet (OWEN, 1945), wortel (WELCH en GRIMBALL, 1947) en sorghum (STEPHENS en HOLLAND, 1954). EDWARDSON (1956) maakte onderscheid tussen de gevallen van plasmatische steriliteit, welke kennelijk spontaan binnen populaties van een soort voorkomen, en de gevallen verkregen na bepaalde kruisingen, al dan niet binnen de soort.

Spontaan voorkomende plasmatische steriliteit is o.a. aangetroffen bij ui, mais, biet, wortel en paprika. Het is daarbij gebleken, dat in de meest uiteenlopende rassen en herkomsten van een gewas hetzelfde steriliserende plasma kan worden aangetroffen, zij het met wisselende frequentie. In enkele gevallen werd meer dan één type steriliserend plasma gevonden, o.a. bij mais.

Het door OWEN (1945) als eerste beschreven type van plasmatische steriliteit bij *Beta vulgaris* kwam bij het door hem onderzochte materiaal van het suikerbietenras US 1 in 2% van de planten voor en bij een hieruit gewonnen selectie zelfs bij 6%. Het steriliserend plasma werd ook aangetroffen bij sommige Poolse en Nederlandse bietenrassen (BANDLOW, 1964; CLEY en KLOEN, 1963).

Ook bij *Daucus carota* is steriliserend plasma algemeen verbreid. Reeds in 1886 werd het voorkomen van gedegenereerde antheren in wilde wortel door BEYERINCK (gecit. door THOMPSON, 1961) waargenomen. Zijn bevindingen werden door latere onderzoekers herhaaldelijk bevestigd. WELCH en GRIMBALL (1947) en BRAAK en KHO (1954) beschreven het voorkomen van plasmatische steriliteit in cultuurvariëteiten. Bij *Allium cepa* L. werd in 1925 een plasmatisch steriele plant aangetroffen in het ras 'Italian Red' (JONES en EMSWELLER, 1937). Het kenmerk werd eveneens gevonden bij met 'Italian Red' onverwante Amerikaanse en Westeuropese rassen (PETERSON en FOSKETT, 1953; BANGA en PETIET, 1958; KOBABE, 1958). Volgens VIRNICH (1967) zouden de steriliserende plasmata in Amerikaanse en Europese rassen echter verschillend zijn. Bij *Zea mays* zijn inderdaad verschillende vormen van steriliserend plasma bekend geworden. Het door RHOADES (1933) gevonden steriliserend plasma is verloren gegaan, doordat het niet practisch toepasbaar bleek. Nieuwe vormen van plasmatische steriliteit werden in latere jaren opgespoord (JOSEPHSON en JENKINS, 1948; SCHWARTZ, 1951; RHOADES, 1950; ROGERS en EDWARDSON, 1952). Hiervan

vonden twee typen, het USDA of S-plasma en vooral het Texas- of T-plasma algemene toepassing in de practijk van de heterose-teelt.

Andere gevallen van plasmatische steriliteit traden op na bepaalde kruisingen al dan niet binnen de soort. MICHAELIS (1954) nam waar, dat kruisingen tussen bepaalde herkomsten van *Epilobium hirsutum* in één of in beide richtingen leidden tot steriliteit in de nakomelingschap. Een klassiek voorbeeld is de kruising 'procumbent' × 'tall' bij *Linum usitatissimum* (BATESON en GAIRDNER, 1921). Hier is gebleken, dat de homozygote 'tall'-vorm volledig steriel is in het plasma van de 'procumbent'-ouder (CHITTENDEN en PELLEW, 1927). GAJEWSKI (1937) was van mening, dat de 'procumbent'-vorm behoorde tot de soort *Linum floccosum*, zodat hier sprake zou zijn van een soortkruising. Bij *Sorghum vulgare* werd een analoog verschijnsel aangetroffen. Combinatie van het ,milo'-type van cytoplasma met het genoom van ,kafir'-variëteiten leidde tot toenemende steriliteit, naarmate meer ,milo'-chromosomen door die van ,kafir' werden gesubstitueerd (STEPHENS en HOLLAND, 1954).

Ook sommige soortkruisingen reageren op vervanging van plasma-eigen genen door genen van de vadersoort met toenemende steriliteitsexpressie. Het verschijnsel deed zich voor bij soortkruisingen binnen de geslachten *Nicotiana* (EAST, 1932; CLAYTON, 1950; BURK, 1960) en *Solanum* (LAMM, 1953; KOOPMANS, 1952, 1954, 1955, 1959). Het geslacht *Triticum* levert verschillende voorbeelden van plasmatische steriliteit verkregen na kruising tussen verre verwanten. Deze is opgetreden in de kruisingen *T. durum* × *T. vulgare* (SAVTCHENKO en LASTOVITCH, 1964; gecit. door SALESSES, 1965) en *T. timopheevi* × *T. vulgare* 'Bison' (WILSON en ROSS, 1961). Steriliteit is ook voorgekomen na geslachtskruisingen tussen *Aegilops* en *Triticum*, met name bij *Ae. caudata* × *T. vulgare* (KIHARA, 1951) en *Aegilotricum* (een amphidiploïd met genomen van *Aegilops ovata* en *Triticum durum* in *ovata*-plasma) × *T. vulgare* (FUKASAWA, 1953). Nieuwe bronnen van steriliteit werden in later jaren onder meer gevonden door OEHLER en INGOLD (1966) en MAAN en LUCKEN (1967).

1.3. FERTILITEITSHERSTEL BIJ PLASMATISCH STERIELE VORMEN

Bij plasmatisch steriele planten berust de abnormale ontwikkeling van het androecium of van het stuifmeel primair op aard en werking van het cytoplasma. Plasmatypen met de eigenschap van steriliteitsopwekking worden aangeduid als ,steriliserend plasma' of ,(S)-plasma'. Niet-steriliserende plasmata heten ,normaal plasma' of ,(N)-plasma'.

Plasmatische overerving impliceert, dat alle nakomelingen voor de betreffende eigenschap identiek zijn aan de moederplant, aangezien het door de mannelijke gameet meegevoerde plasma doorgaans te verwaarlozen is. In formule:

(S)A (steriel) × (N)B (fertiel) → (S)AB (steriel) F_1
(S)AB (steriel) × (N)B (fertiel) → (S)ABB (steriel) Tk_1
enz.

Bij een groot aantal gevallen van plasmatische steriliteit is evenwel, in sommige kruisingen, toch een invloed van het vaderlijk genotype op de steriliteits-

expressie van de nakomelingen gevonden. Gebleken is, dat bepaalde genen het vermogen bezitten de steriliserende werking van het cytoplasma geheel of gedeeltelijk te compenseren. De betreffende genen worden aangeduid als ‚fertiliteit-herstellende genen' of ‚herstellergenen' (Eng. Restorer genes = Rf-genes). Steriliteit berust in deze gevallen op het samengaan van (S)-plasma met de (meestal recessieve) niet herstellende allelen van de herstellerfactor(en), zodat we dat moeten spreken van ‚plasmatisch-genisch' bepaalde steriliteit. Uitgaande van een geval van monogene, intermediaire overerving van fertiliteitsherstel, kunnen we de volgende idiotypen onderscheiden:

(N)... = normaal fertiel
(S)rfrf = steriel
(S)Rfrf = partieel hersteld fertiel
(S)RfRf = hersteld fertiel

Het genotype van (N)... is niet zonder meer te bepalen, aangezien de werking van het genenpaar Rf-rf in het normale plasma niet tot uiting komt. In kruisingen met steriele en hersteld fertiele planten als moeder komt het genotype van (N)... echter wel tot uiting. De resultaten na kruising van de homozygoten (N)rfrf resp. (N)RfRf als vader met de drie genotypen in steriliserend plasma worden hier weergegeven:

(S)rfrf	× (N)rfrf	→	(S)rfrf	(steriel)
(S)Rfrf	× (N)rfrf	→	½ (S)Rfrf	(partieel hersteld fertiel)
			½ (S)rfrf	(steriel)
(S)RfRf	× (N)rfrf	→	(S)Rfrf	(partieel hersteld fertiel)
(S)rfrf	× (N)RfRf	→	(S)Rfrf	(partieel hersteld fertiel)
(S)Rfrf	× (N)RfRf	→	½ (S)RfRf	(hersteld fertiel)
			½ (S)Rfrf	(partieel hersteld fertiel)
(S)RfRf	× (N)RfRf	→	(S)RfRf	(hersteld fertiel)

Meestal echter berust fertiliteitsherstel op de werking van meer dan één gen. De overerving is vaak gecompliceerd door verschillende werkingstypen van de herstellergenen, interacties tussen deze genen, additionele werking van fertiliteit-versterkende of -onderdrukkende modificerende genen, en milieu-invloeden. Pogingen tot verklaring van de overerving van fertiliteitsherstel zijn gedaan bij ui (JONES en CLARKE, 1943; BARHAM en MUNGER, 1950; BANGA en PETIET, 1958; KOBABE, 1958; LICHTER en MUNDLER, 1961; PETERSON en FOSKETT, 1953), biet (OWEN, 1945, 1950; BANDLOW, 1964; ROHRBACH, 1965 [b, c]; BLISS en GABELMAN, 1965; HOGABOAM, 1957; OLDEMEYER, 1957), paprika (PETERSON, 1958), wortel (THOMPSON, 1961; HANSCHE en GABELMAN, 1963 [a, b]; BANGA et al., 1964), mais (BUCHERT, 1961; JONES et al., 1957 [a, b]; DUVICK, 1956, 1959 [a, b], 1966; TATE, 1966; BECKETT, 1966), sorghum (STEPHENS en HOLLAND, 1954; MILLER en PICKETT, 1964; KIDD, 1961; CRAIGMILES, 1961, 1962; ERICHSEN en ROSS, 1963; MAUNDER en PICKETT, 1959) en tarwe (LIVERS, 1964; ANDERSEN, 1964; FUKASAWA, 1955). In bijna geen van deze gevallen bestaat volledige overeenkomst tussen de opvattingen van de verschillende auteurs over aantal en werkingstype van de bij het herstel van fertiliteit betrokken genen. Dit moet worden toegeschreven aan de verschillen in genetische

samenstelling van het door de diverse onderzoekers gebruikte materiaal (verschillen in omvang en herkomst), ongelijke maatstaven bij de onderscheiding van fertiele, partieel fertiele en steriele planten, en verschillen in de mate waarin milieuinvloeden vertroebelend werkten.

In het voorgaande is onderscheid gemaakt tussen de gevallen van steriliteit waarbij alleen genische factoren werkzaam zijn, en de gevallen waarbij steriliteit mede wordt veroorzaakt door de aard van het cytoplasma. Enkele auteurs opperden de mogelijkheid, dat we bij de verschijnselen fertiliteit en steriliteit steeds te maken zouden hebben met een wisselwerking tussen cytoplasma en chromosomale genen (KOHEL en RICHMOND, 1963; BOND et al., 1964; HERMSEN, 1965). In de gevallen, dat alleen nog maar de werking van genische factoren is gevonden, zou dit kunnen berusten op een te geringe verscheidenheid van de bestudeerde plasmatypen. Bij een stelselmatig onderzoek aan uitgebreid rassenmateriaal van zoveel mogelijk onverwante herkomst zullen misschien plasmatypen gevonden worden, waarin de betreffende steriliteitsallelen niet werkzaam zijn. Een dergelijk plasma wordt door HERMSEN (1965) aangeduid als ‚fertiliserend plasma' (F-cytoplasm), als tegenhanger van het tot dan toe bekende normale plasma, nu als ‚steriliserend plasma' (S-cytoplasm) aan te duiden. Het fertiliserend plasma komt overeen met het (N)-plasma bij de tegenwoordige plasmatische steriliteit. Hij besprak een schema om F-plasmatypen op te sporen. Hierbij wordt uitgegaan van kruisingen tussen heterozygoot fertiele vaderplanten (in het kader van deze theorie (S)Rfrf) en vele verschillende fertiele moederplanten. Bij verwaarlozing van eventuele heterozygoten, kunnen de moederplanten de constitutie (S)RfRf, (F)RfRf en (F)rfrf bezitten. De F_1 zal in alle gevallen volledig fertiel zijn. In de F_2 zal bij aanwezigheid van het normale, steriliserende plasma 50% van de nakomelingschappen splitsen in 3 fertiele planten op 1 steriele:

F_1 (S)RfRf × (S)Rfrf → 1 (S)RfRf + 1 (S)Rfrf (alle fertiel)

F_2 { (S)RfRf ⊗ → (S)RfRf (fertiel)
(S)Rfrf ⊗ → 3 (S)Rf. (fertiel) + 1 (S)rfrf (steriel)

Indien echter (F)-plasma voorhanden is, zal de dubbel-recessief rfrf zich niet kunnen manifesteren, weshalve dan alle F_2-nakomelingschappen volledig fertiel zullen zijn.

Het besproken schema was reeds toegepast door KOHEL en RICHMOND (1963) bij katoen, en door BOND et al. (1964) bij *Vicia faba*. Beide onderzoekersteams toetsten een groot aantal verschillende rassen met een genisch-overervende steriliteitsfactor. Steriliteit onderdrukkende plasmatypen werden bij deze onderzoekingen niet gevonden. Enigszins gewijzigde modellen voor de opsporing van (F)-plasma werden besproken door RUTGER en JENSEN (1967) en door HERMSEN (1968).

De hier weergegeven hypothese wordt mogelijk gesteund door de opvallend grote overeenkomst in de ontwikkelingsstoornissen bij vele pollensteriele vormen van genische en van plasmatisch-genische aard (verg. pag. 20).

1.4. MANNELIJKE STERILITEIT EN VEREDELING

Mannelijke steriliteit heeft in de plantenveredeling uitgebreide toepassing gevonden bij het creëren van hybriden voor de heterose-teelt. Een mannelijk steriele plant is bij uitstek geschikt als moederplant in een kruisingsprogramma. Het gebruiken ervan maakt tijdrovende en kostbare emasculatieprocedures overbodig. De eerste schema's voor toepassing van mannelijke steriliteit werden beschreven door JONES en EMSWELLER (1937) voor ui, en door STEPHENS (1937) voor sorghum. Meer algemene principes voor toepassing op commerciële schaal gaf VAN DER KLEY (1954).

Genische steriliteit (bijna steeds recessief) biedt weinig perspectieven voor practisch gebruik. Hier ontstaan moeilijkheden bij het maken van de voor hybride-zaad productie benodigde steriele moederstammen. Dit moet gebeuren door kruising van steriele met heterozygoot fertiele planten. De nakomelingschap bestaat hierbij steeds uit 50% fertiele naast 50% steriele planten, welke pas tijdens de bloei kunnen worden onderscheiden. Selectie tegen de ongewenste fertiele segreganten is dus pas op een zeer laat tijdstip mogelijk en is bovendien tijdrovend. Gunstiger ligt de situatie, wanneer de steriele nakomelingen door pleiotrope werking van de steriliteitsfactor, of door sterk eraan gekoppelde signaalkenmerken, in een vroeg stadium kunnen worden herkend. Een interessant voorbeeld is de door WIEBE (1960, 1964) gesignaleerde koppeling van een ms-factor bij gerst met het recessieve allel ddt voor DDT-resistentie. Hier kunnen in de nakomelingschappen, verkregen na bevruchting van msms-planten door (willekeurige) fertiele planten, de ongewenste fertiele planten in een vroeg stadium van de ontwikkeling worden geëlimineerd door behandeling met DDT. Het vrij hoge overkruisingspercentage, de sterke milieugevoeligheid en de stadium-afhankelijkheid vormen echter een ernstige belemmering voor practische toepassing. Bij *Brassica oleracea* werd koppeling tussen steriliteit en een kleurkenmerk van de zaailingen beschreven door SAMPSON (1966).

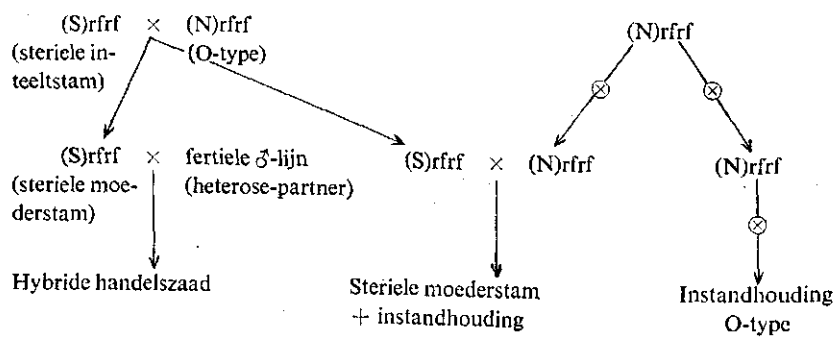
RAMAGE (1965) heeft het gebruik van een 'balanced tertiary trisomic' voorgesteld bij de productie van hybride gerst. De term tertiair trisoom geeft aan, dat het extra chromosoom bestaat uit gedeelten van twee niet homologe chromosomen. De tertiair trisome vorm heet 'balanced', aangezien hij een recessief gen voor steriliteit op de normale homologe chromosomen bezit en het dominante allel van dit gen op het extra chromosoom. Normaal diploïde nakomelingen van de trisoom zullen dus altijd steriel zijn, trisome individuen daarentegen vormen stuifmeel. Het extra chromosoom gaat niet met het stuifmeel over, terwijl ook in de eicellen enige selectie ertegen plaats vindt. De nakomelingschap van de trisoom bestaat daardoor gemiddeld uit 70% diploïden (steriel) en 30% trisomen (fertiel). In werkelijkheid bestaat ca. 1% van de nakomelingen uit primaire trisomen, die evenals de normaal diploïde planten steriel zijn. Wanneer de beide normale chromosomen van het tweede chromosomenpaar dat vertegenwoordigd is in het extra chromosoom, het recessieve allel van een signaalkenmerk (b.v. groene kleur = r) bezitten, en het extra chromosoom het bijbehorende allel R voor rode kleur draagt, dan zijn

fertiele en steriele nakomelingen gemakkelijk te onderscheiden. In het na zelfbevruchting van de trisoom verkregen mengsel van fertiele en steriele planten worden de zaden van de fertiele planten met de hand geoogst. Deze leveren het volgend jaar opnieuw een mengsel van fertiele trisomen en steriele diploïden en dienen dus voor instandhouding. De zaden van de steriele planten worden machinaal geoogst en leveren het volgend jaar de steriele moederplanten voor de hybride-kruising. De beschreven methode is alleen bruikbaar als de tertiaire trisomen voldoende stuifmeel produceren en de omstandigheden zodanig zijn, dat het stuifmeel (van de trisoom en van de fertiele kruisingsouder bij de hybride-zaad productie) met de wind op de steriele planten wordt overgebracht.

In de totnutoe beschreven gevallen is steeds sprake van heterogeen materiaal, waaruit de gewenste steriele planten moeten worden geselecteerd. Homogeen steriel materiaal kan verkregen worden door vegetatieve vermeerdering van steriele planten, of door zelfbevruchting van steriele planten na tijdelijke opheffing van de steriliteit door middel van bespuiting met fertiliteit-inducerende agentia (b.v. gibberellinen). Het zo verkregen steriele materiaal dient zowel als moederstam voor de hybride-zaad productie als voor de eigen instandhouding.

Ook functionele steriliteit leent zich goed voor het verkrijgen van homogeen steriel materiaal. Hier kan zelfbevruchting kunstmatig worden bewerkt door mechanisch openen van de helmknoppen. De nakomelingen zijn weer alle functioneel steriel en kunnen dus als moederplanten voor hybride-zaad productie fungeren.

Enigszins anders ligt de situatie bij plasmatisch-genische steriliteit. Productie van steriele moederstammen en steriel instandhoudingsmateriaal geschiedt hier door herhaalde terugkruising van steriele planten met niet-herstellende bestuiverlijnen, de zgn. O-typen (OWEN, 1945), volgens het schema:



Uit het schema blijkt, dat we ook hier homogeen steriele nakomelingschappen verkrijgen, maar dat het noodzakelijk is om (S)rfrf en (N)rfrf apart in stand te houden.

Voor het benutten van plasmatische steriliteit in de heterose-teelt is het voorkomen van O-typen blijkens het voorgaande van groot belang. In dit opzicht bestaan grote verschillen tussen diverse gewassen. Bij de meeste zijn O-typen algemeen voorkomend en herstellergenen dus zeldzaam. Bij de biet echter blijken O-typen voor het door OWEN (1945) gevonden steriliserende plasma vrij zeldzaam te zijn (PETERSON, 1952; CLEY en KLOEN, 1963; BANDLOW, 1964).

Bij gewassen als ui of biet, waar de hybride wordt geteeld om de vegetatieve delen behoeven herstellergenen niet aanwezig te zijn in de fertiele heterose-partner (en dus in de hybride). Het ontbreken ervan kan zelfs gunstig zijn, met name bij siergewassen, want het uitblijven van bevruchtingsprocessen bij de (hier mannelijke steriele) hybriden verlengt de bloeiperiode van de individuele bloemen en van de gehele plant soms aanzienlijk.

Geheel anders is de situatie bij het produceren van hybride-zaad van gewassen, waarbij de vruchten of de zaden het te oogsten product vormen, zoals bij granen. Wanneer daar in de bestuiverlijnen voor heterose-zaad productie geen herstellergenen aanwezig zouden zijn, zou het kruisingsproduct geheel uit volledig steriele hybriden bestaan, zodat zaadzetting volledig achterwege zou blijven. Derhalve zal de fertiele heterose-ouder daar in het bezit moeten zijn van stabiel werkende fertiliteit herstellende genen. Zijn deze niet voorhanden, dan moeten andere voorzieningen worden getroffen om de bevruchting in het bestand te verzekeren. Dit kan gebeuren door menging van ‚normaal fertiel' en ‚steriel' hybride zaad in een vooraf empirisch bepaalde verhouding. Dit systeem van menging werd aanvankelijk bij mais toegepast (DUVICK, 1960). In later jaren werd bij dit gewas gebruik gemaakt van inteeltlijnen met herstellergenen, afkomstig uit Zuidamerikaanse rassen (EDWARDSON, 1955).

1.5. OVERDRACHT VAN PLASMATISCHE STERILITEIT DOOR MIDDEL VAN ENTING

Een nieuw element in het onderzoek naar de toepassingsmogelijkheden van plasmatische steriliteit brachten de waarnemingen van FRANKEL (1956, 1962, 1964) bij de petunia. Na reciproke enting van plasmatisch steriele en normaal fertiele planten vond hij in de nakomelingschap (E_2) van zelfbevruchte en onderling gekruiste bloemen van fertiele entcomponenten (E_1) soms een splitsing in fertiele en steriele planten. Hij concludeerde hieruit, dat overdracht van een steriliteit verwekkend agens via de entplaats naar de fertiele entpartner moest hebben plaatsgevonden.

Steriliteitsverschijnselen kwamen nimmer in de entgeneratie zelf tot uiting (FRANKEL: fenotypische autonomie van de entcomponenten), en werden ook slechts bij ca. 20% van de E_2's gevonden, waarbij het geen verschil maakte of de fertiele entcomponent als ent dan wel als onderstam had gefungeerd. Steriele segreganten zouden doorgaans alleen voorkomen, indien beide kruisingsouders

tijdens de bestuiving geënt waren met een steriele partner. De mate van ‚steriliteitsinductie', uitgedrukt in het percentage steriele nakomelingen, werd volgens Frankel door beide ouders beïnvloed. ‚Steriliteitsoverdracht' werd bij 4 of 5 entcombinaties gevonden. In op één na alle gevallen (2 cf 3 entcombinaties tussen F-Northern Star en een steriele vorm; 1 combinatie tussen F-Rosy Morn en MS-Rosy Morn) vertoonden de steriele nakomelingen van de fertiele entcomponenten een volledig moederlijke overerving, gelijk aan die in de steriele entpartner. Bij één enting tussen F-Rosy Morn en MS-Rosy Morn echter gaven steriele segreganten van de fertiele entcomponent na bevruchting met fertiele segreganten in de volgende generatie (E_3) een splitsing te zien in fertiele en steriele planten, die deed denken aan monogene mendelsplitsing (1:1). In het betreffende geval splitsten ook zelfbevruchte fertiele E_2-planten in fertiele en steriele nakomelingen (3:1).

De resultaten van Frankel werden door latere onderzoekers slechts ten dele bevestigd. EDWARDSON en CORBETT (1961) troffen in de E_2-generatie naast een groot aantal volledig fertiele planten slechts enkele onvolledig steriele aan. De onvolledig steriele planten waren gekenmerkt door het naast elkaar voorkomen van fertiele, partieel fertiele en steriele bloemen. Pas in de E_3 werden sporadisch volledig steriele planten gevonden. De steriliteit leek via selectie in opeenvolgende generaties toe te nemen. Ook BIANCHI (1963) meende oorspronkelijk enige overdracht van steriliteit te hebben verkregen. Bij herhaald onderzoek, met het Rosy Morn-materiaal van Frankel, werd het eerst verkregen positieve resultaat echter niet bevestigd (BIANCHI, 1966, pers. meded.).

Transmissie van het steriliteitsagens zou volgens CORBETT en EDWARDSON (1964) zelfs ook plaatsvinden via een tussenstam van *Nicotiana tabacum*. De tussenstam zelf bleek ongevoelig voor de inwerking van het steriliserend agens.

Afgezien van het theoretisch belang van steriliteitsoverdracht via enting, zou dit verschijnsel van onschatbare betekenis kunnen zijn voor de hybridenproductie en heterose-teelt. Indien de methode algemeen toegepast zou kunnen worden, zouden gewenste genotypen zonder uitgebreid terugkruisingsprogramma in hun steriele vorm kunnen worden getransformeerd.

Negatieve rusultaten bij pogingen tot overdracht van plasmatische steriliteit via enting bij andere soorten dan *Petunia* werden verkregen bij *Capsicum* (OHTA, 1961), *Crotalaria* (EDWARDSON, 1967), *Nicotiana* (SAND, 1960), *Zea* (RHOADES, 1933), *Vicia* (BOND et al., 1966), *Triticum* (ZEVEN, 1967) en *Beta* (CLEY, 1967). Alleen CURTIS (1967) meende overdracht van steriliteit te hebben verkregen bij reciproke entcombinaties tussen plasmatisch steriele planten en O-typen bij de biet. Zowel uitwisseling van zich ontwikkelende bloeistengels als enting in het zaailingstadium resulteerde volgens hem in een sterke mate van steriliteitsinductie. In een groot aantal gevallen manifesteerde de steriliteit zich al in de entgeneratie zelf; soms trad alsnog steriliteit op in de E_2. Nakomelingen van zelfbevruchte bloemen aan zichtbaar beïnvloede entcomponenten vertoonden slechts in uitzonderingsgevallen terugslag naar volledige fertiliteit.

LACADENA (1967[a, b]) faalde bij een poging om steriliteitsinductie te verkrijgen door middel van reciproke embryo-endosperm transplantaties tussen fertiele

en steriele tarwe. Ook entingen tussen *Lycopersicum esculentum* en *Solanum penellii* veroorzaakten geen steriliteitsreactie (ANDERSEN, 1965). In dit geval waren beide entpartners fertiel; *S. penellii* echter bezit een voor ‚esculentum'-plasma gevoelig genotype, aangezien het genoom ervan in ‚*esculentum*'-plasma volledige mannelijke steriliteit geeft.

2. MATERIAAL EN METHODEN

Plantmateriaal

Alle experimenten werden uitgevoerd met verschillende rassen, families en lijnen van *Petunia* × *hybrida* (Hook.) Vilm., de gewone tuinpetunia, in het vervolg aan te duiden als petunia. Het materiaal omvatte:

a. Plasmatisch steriele stammen verkregen in 1954 van D. F. Jones, New Haven, in stand gehouden door herhaalde terugkruising met de normaal fertiele rassen Snowball en Blue Bedder en daarom aangeduid als MS-Snowball resp. MS-Blue Bedder; alsmede de bijbehorende fertiele instandhouderlijnen van Snowball (=F-Snowball).

b. Uit massa-oogst verkregen populaties van fertiele Snowball en Blue Bedder, afkomstig van N.V. Sluis en Groot's Koninklijke Zaadteelt en Zaadhandel, aangeduid als Snowball S. en G. resp. Blue Bedder S. en G..

c. Autotetraploïde planten, verkregen door colchicinebehandeling van fertiel materiaal uit a. en b., aangeduid als F-Snowball$_{4x}$ enz.

d. Plasmatisch steriele planten van het ras First Lady (MS-First Lady), afkomstig van N.V. Sluis en Groot.

e. Een plasmatisch steriele inteeltstam van Rosy Morn (MS-Rosy Morn) en de bijbehorende fertiele instandhouderlijn (F-Rosy Morn), afkomstig van R. Frankel, Rehovot.

f. Hersteld fertiele inteeltlijnen (R-lijnen), ontwikkeld op het Instituut voor Plantenveredeling der Landbouwhogeschool, Wageningen, door FERWERDA (1963) en LANGE (1962), plus kruisingsproducten hiervan met steriele en normaal fertiele planten.

Opkweken van planten

Alle zaadpartijtjes werden in de verwarmde kas afzonderlijk uitgezaaid in aarden zaaipannen om besmetting door vreemd zaad tegen te gaan. Na 3 tot 4 weken werden de zaailingen verspeend in een mengsel van doorvroren zwartveen en zandige enggrond, op onderlinge afstanden van 5 cm. De ook verder in kasproeven te gebruiken planten werden enkele weken later overgepoot in aarden potten met het bovengenoemde grondmengsel en ingegraven in met turfmolm opgevulde tabletten. Voor buitenexperimenten bestemde planten werden geleidelijk afgehard, eerst in de dichte, later in de open bak. Zodra nachtvorstgevaar geweken was, ongeveer vanaf half mei, werden de planten in het veld uitgezet in proefveldjes van 4 × 10 planten op onderlinge afstanden van 50 cm.

Stekken

Vegetatieve vermeerdering door middel van stekken was een vrij eenvoudige procedure. Bij voorkeur jonge, vegetatieve scheuten van 5 tot 10 cm werden juist onder een knoop afgesneden en in vochtige aarde gestoken. Een hoge graad van luchtvochtigheid werd in stand gehouden door een met plastic over-

trokken raamwerk (couveuse) over de stekken te plaatsen. Bij sterke zonnestraling werd geschermd met bevochtigde jute of papier. Groeistoffen (rhizopon A en AA) bevorderden de wortelgroei, doch waren niet noodzakelijk voor de wortelvorming. Na ongeveer drie weken waren de meeste stekken voldoende beworteld voor groei in normaal milieu.

Enten

Alle entingen werden uitgevoerd volgens de spleetentingsmethode. De entingen gebeurden reciprook, tenzij anders vermeld. In de meeste gevallen werden de entingen verricht aan jonge, nog volledig vegetatieve planten. In een aantal entcombinaties werd evenwel gebruik gemaakt van door vegetatieve vermeerdering in stand gehouden reeds generatieve planten. Entscheuten van omstreeks 3 tot 5 cm werden op de getopte hoofdstengel en op een of twee zijscheuten geplaatst. De entverbinding werd afgedekt met 1 cm brede loodstrips. De entcombinaties werden vervolgens in een couveuse geplaatst als beschreven onder ‚Stekken'. Omdat de vochtige warme conditie in de couveuse weelderige groei van de onderstam veroorzaakte, was het nodig deze enkele malen terug te snoeien. Tijdig luchten was nodig om aantasting door schimmels te voorkomen; te vroeg wegnemen van de couveuse veroorzaakte echter uitdrogen van nog onvoldoende vergroeide enten.

Generatieve vermeerdering

Geslachtelijke vermeerdering geschiedde door zelf- en kruisbevruchting. Vooral in het veld bestond hierbij groot gevaar voor besmetting van de stempels door vreemd stuifmeel via windtransport of insectenbezoek. Daarom werd bij alle bestuivingen een aantal beveiligingsmaatregelen getroffen. Volledig gesloten bloemknoppen aan te bestuiven moederplanten werden, ca. twee dagen voor het opengaan, met een schoon pincet geopend. In geval van kruisbestuiving werden de nog gesloten helmknoppen weggenomen. Juist opengesprongen helmknoppen van de gewenste vaderplant werden vervolgens met het pincet voorzichtig over de stempel van de te bestuiven bloemen uitgewreven. De kroon van de aldus behandelde bloem werd met een loodstripje dicht gebonden om ongewenste nabestuiving te verhinderen. Een lichte zwelling van het vruchtbeginsel na ongeveer een week wees op een geslaagde bevruchting. Onder warme en vochtige milieuomstandigheden werden de verwelkende kroonresten dan verwijderd om overbrenging van de schimmel *Botrytis cinerea* via de kroon op de ontwikkelende zaaddoos te verhinderen. Afhankelijk van de klimaatsomstandigheden rijpten de zaaddozen 4 tot 6 weken na de datum van bestuiving af.

Tetraploïdisering

De in het onderzoek gebruikte autotetraploïde planten werden verkregen door behandeling van droge en van voorgekiemde zaden met verschillende concentraties (0,025–0,2%) colchicine in water. De ploïdiegraad werd vastgesteld door cytologisch onderzoek aan worteltopjes en groeipunten. In verband met de mogelijke aanwezigheid van periclinaal-chimaeren werd de ploïdiegraad van

de tunica-lagen ook bepaald via onderzoek van de huidmondjes (aantal en grootte der sluitcellen; aantal plastiden per sluitcel) en beoordeling van het stuifmeel (grootte, aantal kiemporiën).

Helmknopontwikkeling

Voor het onderzoek naar de ontwikkeling van helmknoppen en stuifmeel bij MS-First Lady werd gebruik gemaakt van ca. 12 μ dikke microtoomsneden, gekleurd volgens de safranine-fast green contrastkleuringsmethode als beschreven door SASS (1961).

Fytotronproeven

Proeven onder beheerste omstandigheden werden uitgevoerd in de klimaatkamers van het fytotron van het Laboratorium voor Tuinbouwplantenteelt van de Landbouwhogeschool. Tijdens de fotoperiode stonden de planten onder kunstlicht (Philips TL40W/55), max. intensiteit 48.000 erg/cm^{2}sec. De planten stonden op wagentjes en konden dus zeer eenvoudig naar de donkere afdelingen en afdelingen met andere temperaturen worden verreden.

3. ALGEMENE WAARNEMINGEN EN BESCHOUWINGEN OMTRENT MANNELIJKE STERILITEIT BIJ DE PETUNIA

3.1. AARD EN OORSPRONG VAN MANNELIJKE STERILITEIT BIJ DE PETUNIA

Het voorkomen van erfelijke mannelijke steriliteit bij de cultuurpetunia werd voor het eerst uitvoerig beschreven door WELZEL (1954). In het door hem bestudeerde materiaal veroorzaakte elk van de beide recessieve genen ms_1 en ms_2 volledige steriliteit. Beide genen bleken op een zeer bepaald tijdstip op de microsporenontwikkeling in te grijpen, ms_1 in het diploteen, ms_2 eerst na het vrijkomen van de microsporen uit het tetradenverband.

Plasmatisch steriele vormen werden door EVERETT en GABELMAN ontwikkeld uit kruisingen tussen enkele wilde soorten –vermoedelijk *P. axillaris, P. integrifolia*, en/of *P. parodii*– en cultivars van *P.* × *hybrida* (DUVICK, 1959[b], 1966). Plasmatisch steriele planten zouden alleen zijn verkregen, als de wilde soorten als moeder werden gebruikt. Het is echter niet in detail bekend, in welke kruisingscombinatie(s) steriele nakomelingen zijn opgetreden.

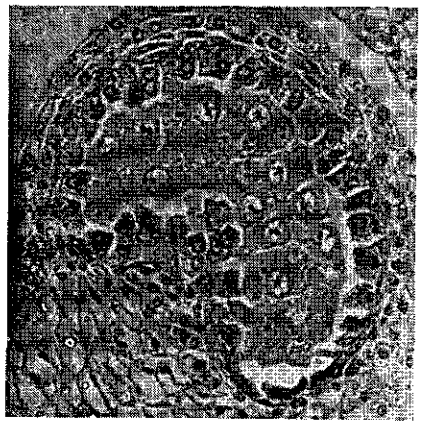
Op het eerste gezicht lijkt het dus, alsof we bij plasmatisch steriele petunia te doen hebben met een kruising tussen soorten, zoals bij de plasmatisch steriele vormen van verwante geslachten, met name *Nicotiana* en *Solanum*, ook het geval is. Bij petunia doet zich evenwel de omstandigheid voor, dat de cultuurvorm, *P.* × *hybrida*, zelf een betrekkelijk jonge bastaard is, waarin elementen van de twee eerste der bovengenoemde species voorkomen (FERGUSON en OTTLEY, 1932; BIANCHI, 1959). Voegen we hierbij de conclusie van LAMPRECHT (1966), dat de verschillende species van het geslacht *Petunia* alle moeten worden beschouwd als ‚gedifferentiëerde variëteiten van een en dezelfde soort', dan wordt het interspecifieke karakter van de MS-planten toch wel zeer onwaarschijnlijk. Er zij in dit verband op gewezen, dat bij tenminste één ander Solanaceeën-geslacht *(Capsicum)* het voorkomen van plasmatisch steriele vormen binnen de soort is aangetoond (PETERSON, 1958).

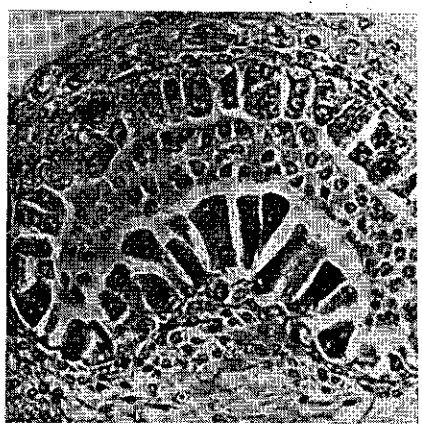
Verschillende onderzoekers (FRANKEL, 1956, 1962, 1963, 1964; EDWARDSON en CORBETT, 1961; CORBETT en EDWARDSON, 1964; BIANCHI, 1963, 1964; FERWERDA, 1963), voerden experimenten uit met plasmatisch steriele vormen van de petunia. Weliswaar zijn er sterke aanwijzingen, dat al het daarbij gebruikte materiaal uit de Verenigde Staten afkomstig was, doch het is niet onmogelijk, dat zich daaronder verschillende steriliteitsbronnen bevonden. In de eigen onderzoekingen wordt daarom onderscheid gemaakt tussen het steriliserend plasma aanwezig in MS-Snowball en MS-Blue Bedder, dat in MS-First Lady en dat in MS-Rosy Morn (verg. pag. 12).

3.2. HISTOLOGISCHE VERSCHILLEN TUSSEN DE HELMKNOPPEN VAN PLASMATISCH STERIELE EN NORMAAL FERTIELE VORMEN VAN PETUNIA

De ontwikkeling van de helmknop bij plasmatisch steriele petunia werd na-

gegaan bij twee steriele vormen. FERWERDA (1963) vergeleek de ontwikkeling van helmknoppen bij de normaal fertiele en de steriele vormen van het ras Snowball. Het eigen onderzoek werd verricht aan MS-First Lady. Beider waar-





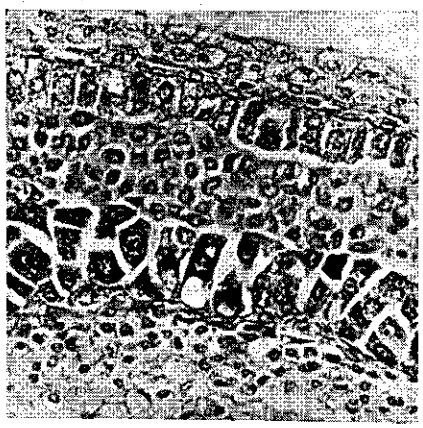


Foto 1, 2, 3. Ontwikkeling van de helmknop bij MS-Rosy Morn:
1. Profase I (dwars). Stuifmeelmoedercellen en tapetum normaal; 160 ×.
2. Tetradenstadium (dwars). Tussenwanden der tetraden onderling vervloeiend; sterke uitgroei van het binnentapetum; 160 ×.
3. Verdere degeneratie (overlangs). Sterke vacuolisatie en willekeurige delingen in het binnentapetum; tetraden verschrompelend; 160 ×.

Plates 1, 2, 3. Development of the anther of MS-Rosy Morn:
1. Prophase I (cross-section). Pollen mother cells and tapetum normally developed; × 160.
2. Tetrad stage (cross-section). Tetrad walls becoming blurred; marked outgrowth of the inner part of the tapetum; × 160.
3. Further stage of degeneration (longit. section). Strong vacuolization and irregular divisions of the inner part of the tapetum; tetrads shriveling; × 160.

nemingen stemden volledig overeen en worden derhalve niet afzonderlijk besproken.

Tot en met de reductiedeling treden bij de steriele planten geen waarneembare ontwikkelingsstoornissen op. In de dunwandige, plasmarijke pollenmoedercellen zijn normale meiotische delingsfiguren zichtbaar (foto 1). De tapetumcellen zijn zowel bij de fertiele als de steriele antheren enigszins palissadevormig uitgegroeid. Vooral in het buitentapetum is meerkernigheid regel; soms komen polyvalente kernen voor (verg. MASCRÉ, 1921). De eerste sporen van degeneratie bij steriele antheren worden in het tetradenstadium zichtbaar. De afzonderlijke microsporen ronden zich niet af, maar blijven binnen de gemeenschappelijke wand van de stuifmeelmoedercel besloten. De wanden van de moedercellen lijken onderling te vervloeien, zodat de tetradenmassa in een sterk kleurbaar stroma ligt ingebed (foto 2). Terzelfdertijd groeit vooral het axiale of binnentapetum sterk uit. De afzonderlijke cellen worden knotsvormig en groeien diep in de loculi naar binnen. De cellen van het buitentapetum behouden aanvankelijk hun palissadevorm, ofschoon ook hier enige uitgroei valt waar te nemen. In een iets later stadium delen de meerkernige axiale tapetumcellen zich geheel willekeurig. In de cellen vormen zich grote vacuolen (foto 3), terwijl plaatselijk sterke kleurstofophopingen te zien zijn. De microsporen verschrompelen meer en meer, eveneens onder toenemende kleurstofophoping. De losgeraakte tapetumresten zwermen uit in de loculiholten en gaan tenslotte, tezamen met de microsporenresten, op in een ondefinieerbare, sterk gekleurde slijmerige massa. De 3 tot 4 cellagen van endothecium en exothecium blijven parenchymatisch, en zijn bij de opening van de bloem nog geheel intact. In de fertiele bloemen echter groeien de endotheciumcellen in radiale richting uit en er vormen zich wandverdikkingen, die, naar algemeen wordt aangenomen, een rol spelen bij de opening van de helmhokjes.

3.3. OVERIGE MORFOLOGISCHE EN FYSIOLOGISCHE VERSCHILLEN TUSSEN STERIELE EN FERTIELE VORMEN VAN PETUNIA

Helmknoppen van plasmatisch steriele planten zijn op het oog duidelijk te onderscheiden van die van normaal fertiele planten. Normaal fertiele bloemen bezitten vrij grote, ovaalronde, groenblauwe of gele helmknoppen, welke rijkelijk met stuifmeel zijn gevuld en kort na het ontvouwen van de bloemkroon opengaan. De helmknoppen van steriele individuen zijn klein, spiesvormig, aanvankelijk lichtbeige of wit, doch na het openen van de bloem donkerbruin verkleurend. Ze openen zich niet of in een zeer laat stadium en krijgen een wat verschrompeld uiterlijk. Opengemaakte helmhokjes blijken steeds geheel leeg te zijn (foto 4).

Begeleidende vormafwijkingen van de bloemen werden in sommige rassen aangetroffen. Bij MS-Snowball was de bloemvorm iets afwijkend van die in de fertiele versie, doordat de bloemzoom dieper was ingesneden. Bij zowel MS-Snowball als MS-Blue Bedder was de steriele bloem wat kleiner dan de fertiele. Het is echter nog onzeker in hoeverre deze verschijnselen rechtstreeks verband

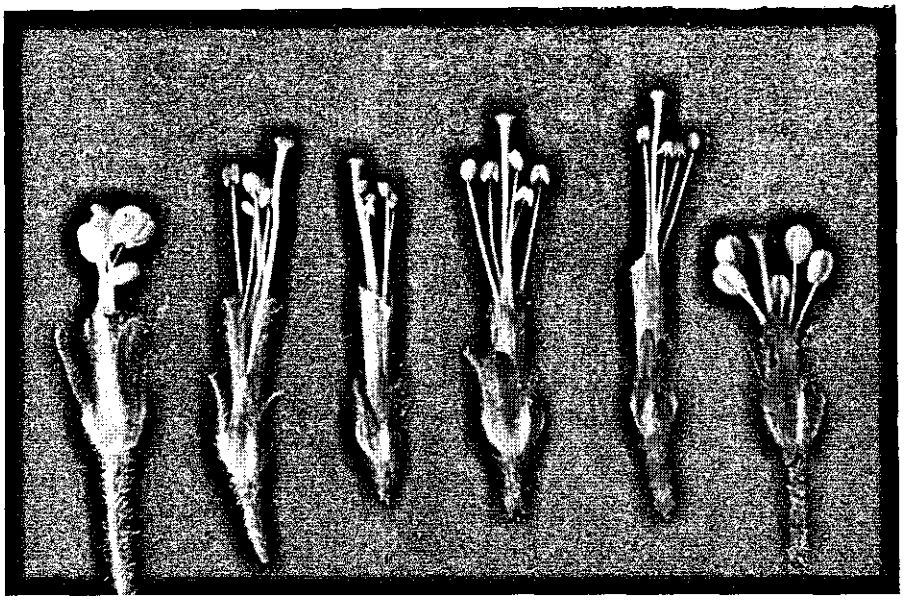


FOTO 4. Helmknoppen van normaal fertiele (rechts en links) en van plasmatisch steriele planten (midden) van resp. Blue Bedder S. en G. en MS-Blue Bedder vlak vóór het openen van de bloem.

Plate 4. Anthers of normal fertile (on the right and on the left) and of cytoplasmic male sterile plants (in the middle) of resp. Blue Bedder S. en G. and MS-Blue Bedder just before anthesis.

houden met de steriliserende werking van het plasma.

Van meer belang lijkt het verschijnsel van de ‚bloemverstikking' (Eng. blindness), dat, afhankelijk van variëteit en milieu, in steriele planten soms optreedt (DUVICK, 1959[b]; HAMILTON, 1965). Hierbij worden wel bloemknoppen gevormd, maar deze aborteren voortijdig, zodat bijna volledig bloemloze planten ontstaan. In het eigen materiaal werd bloemverstikking in ernstige vorm gewoonlijk alleen aangetroffen in enkele populaties van MS-Blue Bedder, in het bijzonder bij lage temperatuur. Men vergelijke verder pag. 61.

Zowel bij MS-Snowball als bij MS-Blue Bedder begon de bloei duidelijk later dan bij de fertiele instandhouderlijnen. Te velde bloeiden de fertiele planten gemiddeld 10 tot 14 dagen eerder dan de steriele. Steriele planten bloeien gemiddeld langer dan fertiele. Dit geldt zowel voor de afzonderlijke bloemen als voor de gehele plant, en hangt samen met het uitblijven van de energie-verslindende zaadontwikkeling, die bij fertiele planten na zelf- of kruisbevruchting plaats vindt.

3.4 TOEPASSING VAN PLASMATISCHE MANNELIJKE STERILITEIT BIJ DE PETUNIA

Aan de hybridenproductie met behulp van plasmatisch steriele moederplanten zijn, naast de algemene voordelen van heterose-teelt (sterke groeikracht en

uniformiteit voor bloemkleur en plantvorm), zowel voor de kweker als voor de verbruiker bijkomende voordelen verbonden. De kweker kan afzien van tijdrovende en kostbare emasculatie van de moederplanten, terwijl nateelt van het steriele handelsproduct onmogelijk is. In de V.S. wordt daarom bij het produceren van handelszaad van de petunia op vrij grote schaal uitgegaan van steriele moederstammen (HAMILTON, 1967; pers. meded.). In Nederland vindt de zaadproductie nog grotendeels langs de weg van emasculatie van de moederplanten plaats. Voor de verbruiker is, naast de uniformiteit, de lange bloeitijd, zowel van de individuele bloemen als van de gehele plant, een belangrijk positief punt.

De ernstigste belemmering voor de toepassing van plasmatische steriliteit bij de petunia vormt het optreden van bloemverstikking. Het is gebleken, dat dit verschijnsel zich zowel bij de, door herhaalde terugkruising van de verkozen inteeltlijn op de steriele vorm verkregen, moederstam kan voordoen, als bij het, na kruising van de steriele moederstam met een tweede inteeltlijn verkregen, handelsproduct. Het optreden van bloemverstikking is onvoorspelbaar, d.w.z. een inteeltlijn, welke voorheen bij kruisingen met steriele partners nimmer bloemverstikking heeft veroorzaakt, kan bij een bepaalde nieuwe hybride onverwacht toch bloemverstikking doen optreden. Onderzoek naar de achtergronden van dit verschijnsel is in voorbereiding (HAMILTON, 1967; pers. meded.).

3.5. ENKELE WAARNEMINGEN EN OPVATTINGEN AANGAANDE DE OORZAAK VAN STUIFMEELDEGENERATIE BIJ MANNELIJKE STERIELE PLANTEN

Het verloop van de microsporenontwikkeling en -degeneratie in de aanwezigheid van (S)-plasma werd ook voor een groot aantal andere gewassen dan de petunia beschreven, o.a. voor biet (ARTSCHWAGER, 1947; ROHRBACH, 1962), wortel (ZENKTELER, 1962), ui (MONOSMITH, 1926; KOBABE, 1958), tarwe (FUKASAWA, 1953; CHAUHAN en SINGH, 1966; JOPPA et al., 1966). Door verschillende onderzoekers werd het optreden van hypertrofiëring of plasmodiale uitgroei van het tapetum waargenomen (ARTSCHWAGER, 1947; ZENKTELER, 1962; MONOSMITH, 1926; JOHNSON, 1958; FUKASAWA, 1953). De tapetumwoekering ving in alle bestudeerde gevallen aan tijdens het tetradenstadium of direct na het vrijkomen van de microsporen uit het tetradenverband, en ging steeds gepaard met volledige degeneratie van het stuifmeel. In een aantal andere gevallen evenwel werd niet een vroegtijdige tapetumwoekering waargenomen, doch een vertraagde oplossing van het tapetumweefsel (SINGH en HADLEY, 1961; DUBEY en SINGH, 1965[b]; ERICHSEN en ROSS, 1963; VIRNICH, 1967; ALAM en SANDAL, 1967; JOPPA et al. 1966). In deze gevallen kwamen de microsporen nog vrij uit het tetradenverband, doch verkommerden daarna.

De twee typen van degeneratie lijken niet essentieel verschillend te zijn. Zowel bij biet (ARTSCHWAGER, 1947), als bij tarwe (CHAUHAN en SINGH, 1966) en vlas (DUBEY en SINGH, 1965[b]) werden beide verwordingstypen naast elkaar aangetroffen, soms aan dezelfde plant. Volgens CHAUHAN en SINGH (1966) kwamen in de drie afzonderlijke bloemen van één bloempakje bij het hexa-

ploïde tarweras 'Norin' in cytoplasma van *Aegilops ovata* ook drie verschillende degeneratietypen voor. De middelste bloem vertoonde degeneratie van het tapetum en het sporegene weefsel in een stadium vóór de meiotische delingen. Het sporeweefsel in het ene zijbloempje degenereerde na periplasmodiumvorming door het tapetum tegen het einde van de meiose, dat in het andere na vertraagde tapetumdegeneratie in het microsporenstadium. Het lijkt er hier sterk op, dat in een bepaald ontwikkelingsstadium het gehele aartje tegelijk degenereert, waardoor de bloempjes in verschillende stadia worden getroffen.

De verschijnselen bij degeneratie van een aantal genisch overervende of nog niet op hun overerving onderzochte gevallen van steriliteit, vertoonden grote overeenkomst met de boven besproken verwordingstypen bij plasmatische steriliteit. Dit werd onder meer waargenomen bij luzerne (CHILDERS, 1952), petunia (WELZEL, 1954), spinazie (KOBABE, 1967, gerst (KAUL en SINGH, 1966), en tomaat (RICK, 1948).

Het abnormale gedrag van de tapetumlaag wordt door de meeste auteurs gezien als directe oorzaak van de onderbroken microsporenontwikkeling. Zij baseren deze mening op de algemeen aanvaarde functie van het tapetum als voedingsweefsel voor de zich ontwikkelende stuifmeelkorrels. Bij steriele planten zou de toevoer van voedingsstoffen vanuit het tapetum naar de microsporen gestopt worden, zodat de laatste zich niet volledig kunnen ontwikkelen; de tapetumwoekering zou dan een gevolg kunnen zijn van een ophoping van voedingsstoffen in het tapetum. Ook andere verklaringen zijn mogelijk. Zo menen BOND et al. (1966), dat de tapetumwoekering optreedt als gevolg van de geringe tegendruk van het degenererende pollenweefsel. VIRNICH (1967) weer neemt aan, dat de stuifmeeldegeneratie een gevolg is van het onvermogen van de microsporen bij steriele planten om de door het tapetum uitgescheiden voedingssubstantie op te nemen. ROHRBACH tenslotte (1962, 1965) is van mening, dat zowel de gebeurtenissen in het tapetum als de stuifmeeldegeneratie een gevolg zijn van gestremde voedseltoevoer elders in het anthere-weefsel. Als argumenten hiervoor noemde hij de abnormale ontwikkeling van andere helmknopweefsels (endothecium), de afwijkende vrije aminozuursamenstelling van de steriele helmknop en het ontbreken van bepaalde voedingssubstanties in de tapetumcellen bij steriele bieten. De waarneming van JOPPA et al. (1966), dat de vaatbundels in het helmbindsel bij steriele tarwe zeer onvolledig ontwikkeld zijn, geeft steun aan de hypothese van Rohrbach. De zojuist besproken, vermoedelijk gelijktijdige degeneratie van de drie aardbloempjes bij het tarweras 'Norin' in plasma van *Aegilops ovata* (CHAUHAN en SINGH, 1966), lijkt er op te wijzen, dat hier de oorzaak van de stuifmeel- en tapetumdegeneratie zelfs buiten de helmdraad gezocht moet worden.

Verschillen in de samenstelling van de vrije aminozuren in de helmknoppen van fertiele en steriele planten werden bij verschillende gewassen geconstateerd, o.a. bij mais (KHOO en STINSON, 1957), biet (HOSOKAWA en TSUDA, 1963) en petunia (EDWARDSON en CORBETT, 1961).

4. FERTILITEITSHERSTEL BIJ DE PETUNIA

4.1. Inleiding

In talrijke kruisingen tussen mannelijk steriele vormen en fertiele planten van verschillende cultivars en wilde soorten van *Petunia* vond Frankel (1962) een zuiver moederlijke overerving van de eigenschap steriliteit. Ook Bianchi (1963) vond geen enkele invloed van vaderlijke genen na kruising van steriele planten met vijftien verschillende fertiele cultivars. Goldsmith (gecit. in Duvick, 1959[b]) echter vond, dat fertiliteit herstellende genen bij de petunia toch voorkomen. Fertiliteitsherstel zou volgens hem berusten op een polygeen stelsel van dominante factoren. Ook Hamilton (1962, 1965) vermoedde een gecompliceerd herstelmechanisme. Hij beschreef het gedrag van twee herstellerlijnen onder verschillende milieuomstandigheden. De ene lijn was bij 21 °C bijna volledig fertiel; bij 30 °C waren de meeste planten echter steriel en slechts aan enkele werden soms partieel fertiele bloemen gevonden. De andere lijn vertoonde een minder sterke temperatuurreactie. Ook hier nam bij 30 °C de fertiliteit af, doch naast steriele bloemen werden aan alle planten ook nog al dan niet volledig fertiele bloemen aangetroffen. Edwardson en Warmke (1967) troffen in hun materiaal monogene, dominante overerving van fertiliteitsherstel aan.

4.2. Herkomst van het eigen herstellermateriaal

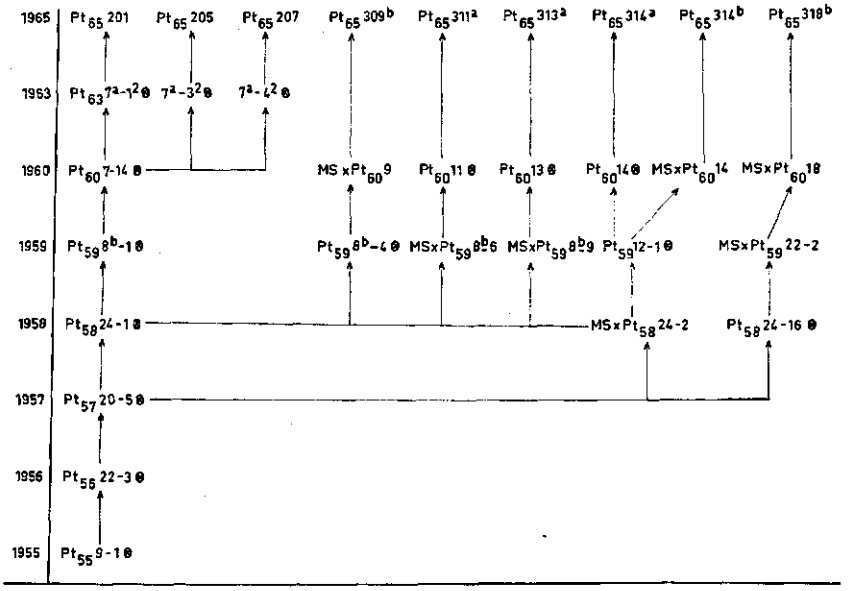
Tijdens jarenlang voortgezette kruisingsexperimenten tussen planten met het steriliserend plasma afkomstig van D. F. Jones (verg. pag. 12) en verschillende fertiele instandhouderrassen op het Instituut voor Plantenveredeling, Wageningen, vond Ferwerda (1963) slechts eenmaal een geval van fertiliteitsherstel. In 1955 nl. trof hij in de nakomelingschap van een kruising van een steriele moederplant met een onbekende stuifmeelleverancier één enigszins fertiele plant naast 46 steriele aan. Deze fertiele plant werd het uitgangsmateriaal voor een van 1955 tot 1963 voortgezet onderzoek naar de genetische achtergrond van het fertiliteitsherstel door Ferwerda (1963) en Lange (1962). Zij vonden, dat fertiliteitsherstel in sterke mate door het milieu wordt beïnvloed, waardoor een nauwkeurige genetische analyse op grond van hun gegevens niet mogelijk bleek. Wel concludeerden ze, dat bij herstel van fertiliteit meer dan één genenpaar betrokken is.

4.3 Kruisingsexperimenten met het herstellermateriaal

4.3.1. *Samenstelling van het in 1965 beschikbare materiaal*

Het onderzoek naar het fertiliteitsherstel bij de petunia werd van 1965 af door schrijver dezes voortgezet. De samenstelling van het uitgangsmateriaal kan worden afgelezen uit afb. 4.1, welke een voorstelling geeft van de ontwikkeling van herstellernakomelingschappen uit de oorspronkelijke enigszins fer-

tiele plant in steriel plasma, $Pt_{55}9$–1. De lijnen $Pt_{65}201$, 205 en 207 ontstonden door 7 × herhaalde zelfbevruchting na selectie op fertiliteit, zodat de in de oorsprongsplant aanwezige herstellerfactoren hierin waarschijnlijk homozygoot aanwezig waren. Zowel binnen als tussen de lijnen 201, 205 en 207 waren derhalve geen noemenswaardige verschillen in fertiliteit te verwachten.



AFB. 4.1. Afstamming van het hersteller uitgangsmateriaal van 1965.
Fig. 4.1. Parentage of the restorer starting material of 1965.

Aangezien in 1965 van deze drie lijnen slechts 14 planten werden verkregen, werd, om het risico van algeheel verlies te ontlopen en tevens om te grote verenging van het materiaal te vermijden, teruggegrepen op zaad uit 1960. Wegens de geringe kiemkracht van dit vijf jaar oude zaad werd de oogst van afzonderlijke bevruchtingen niet apart uitgezaaid, maar werden steeds verschillende zaadpartijtjes gemengd. De a-nummers ($Pt_{65}311^a$, 313^a en 314^a) waren opgebouwd uit mengsels van zaad verkregen van zelfbevruchte zusterplanten uit resp. $Pt_{60}11$, 13 en 14. De b-nummers ($Pt_{65}309^b$, 314^b en 318^b) ontstonden na samenvoeging van het zaad verkregen uit kruisingen van verschillende steriele moederplanten (MS) met een aantal planten uit resp. $Pt_{60}9$, 14 en 18 (verg. afb. 4.1). Op grond van hun afstamming –direct dan wel een of twee generaties eerder ontstaan uit kruisingen MS × herstellerplant– was in de b- en a-nummers meer of minder sterke heterozygotie voor fertiliteit herstellende genen te verwachten.

4.3.2. *Waarnemingen aan en bestuivingen in het uitgangsmateriaal van* 1965

Tijdens de bloei in de kas werden alle planten drie tot vijf maal beoordeeld

op het al of niet aanwezig zijn van stuifmeel in de helmhokjes van juist geopende bloemen. De beoordeling geschiedde met het blote oog (en in twijfelgevallen met een handloep, vergr. 5×). Op elke waarnemingsdatum werden per plant minimaal drie bloemen beoordeeld. De individuele planten werden bij elke waarneming geclassificeerd als steriel (alle bloemen zonder stuifmeel), als partieel fertiel (geringe hoeveelheid stuifmeel in alle bloemen, of naast elkaar bloemen met en zonder stuifmeel) of als fertiel (vrij veel stuifmeel in alle bloemen). Op grond van alle (3 tot 5) beoordelingen werden de planten als volgt geclassificeerd (zie tab. 4.1):

R = hersteld fertiel (restored); plant op alle waarnemingsdata fertiel.
pR = partieel (hersteld) fertiel; plant op één of meer waarnemingsdata fertiel of partieel fertiel, op de overige data steriel.
MS = mannelijk steriel; plant op alle waarnemingsdata steriel.

De lijnen $Pt_{65}201$, 205 en 207 waren, overeenkomstig de verwachting, op alle beoordelingsdata in hun geheel fertiel (alle planten R). In de a-nummers werden naast elkaar planten aangetroffen van alle drie de categorieën MS, pR en R. In de b-nummers was het merendeel van de planten steeds steriel (MS), enige planten bezaten op één of enkele waarnemingsdata min of meer fertiele bloemen (pR), terwijl planten met stuifmeel op alle waarnemingsdata geheel ontbraken. Het voorkomen van planten, die bij de ene beoordeling wel, doch bij een volgende beoordeling geen stuifmeel hadden gevormd, wees op een invloed van het milieu op het herstelmechanisme.

TABEL 4.1. Fertiliteit van het herstellermateriaal in de kas in 1965. Bespreking in tekst.

Nr. 1965/ *No. 1965*	Aantal planten beoordeeld als:/*Number of plants estimated as:* Steriel/ *Sterile* (MS)	Partieel fertiel/ *Partially fertile* (pR)	Hersteld fertiel/ *Restored fertile* (R)
$Pt_{65}201$	–	–	6
$Pt_{65}205$	–	–	5
$Pt_{65}207$	–	–	3
$Pt_{65}311^a$	1	2	1
$Pt_{65}313^a$	5	6	3
$Pt_{65}314^a$	–	1	12
$Pt_{65}309^b$	–	1	–
$Pt_{65}314^b$	45	4	–
$Pt_{65}318^b$	13	3	–

Table 4.1. Fertility of the restorer material in the greenhouse in 1965. MS = *plants without pollen on all observation dates;* pR = *plants showing pollen on some but not all observation dates;* R = *plants showing pollen on all observation dates.*

In het verdere onderzoek werd getracht een antwoord te vinden op de volgende vragen:

1. Hoeveel factorenparen zijn bij het herstel van fertiliteit betrokken en hoe is hun werking en interactie?

2. Komen (cryptomere) herstellerfactoren voor in steriele en in normaal fertiele planten, en bestaan er met betrekking tot de aanwezigheid van zulke factoren verschillen binnen en tussen rassen?
3. Hoe is de invloed van uitwendige omstandigheden op de fertiliteitsexpressie bij planten met herstellergenen in steriliserend plasma, en welke milieufactoren spelen hierbij de belangrijkste rol?

In het kader van deze probleemstelling werd het volgende bestuivingsschema opgezet:

	Nakomelingschapstype
1. Zelfbestuiving van fertiele en van partieel fertiele planten uit het herstellermateriaal (par. 4.3.4.1.).	R ⊗ en pR ⊗
2. Kruisingen tussen partieel fertiele en fertiele planten uit het herstellermateriaal (par. 4.3.4.2.).	pR × R
3. Kruisingen van steriele moederplanten met fertiele en partieel fertiele planten uit het herstellermateriaal (par. 4.3.4.3.), nl.:	MS × R en MS × pR
A. Steriele planten van MS-Snowball, MS-Blue Bedder, MS-First Lady en MS-Rosy Morn.	
B. Steriele planten uit het herstellermateriaal.	
4. Kruisingen van fertiele en partieel fertiele planten uit het herstellermateriaal met normaal fertiele planten van F-Snowball en Blue Bedder S. en G. (par. 4.3.4.4.).	R × F en pR × F
5. Bestuivingen in het controle-materiaal (par. 4.3.4.5.):	
5.1. Zelfbestuiving van F-Snowball, Blue Bedder S. en G. en F-Rosy Morn.	F ⊗
5.2. Instandhoudingskruisingen van MS-Snowball, MS-Blue Bedder en MS-Rosy Morn met de bijbehorende F-lijnen.	MS × F
5.3. F-Snowball × fertiele planten uit het herstellermateriaal.	F × R

4.3.3. *Aard en methodiek van de veldwaarnemingen in 1966 en 1967*

Ongeveer 100 nakomelingschappen (meestal ca. 80 planten, soms minder) werden in 1966 te velde op fertiliteit beoordeeld. Zodra de eerste bloemen zich openden werd begonnen met de macroscopische beoordeling van de fertiliteit. Deze berustte op een schatting, met het blote oog (en in twijfelgevallen met een handloep, vergr. 5×) van de inhoud van de helmknoppen van juist open bloemen. De graad van fertiliteit of ‚fertiliteitswaarde' van de helmknop (en van de bloem) werd uitgedrukt met behulp van de cijfers 0...8:

0 = leeg
1 = vermoedelijk leeg, of in elk geval uiterst geringe inhoud
2 en 3 = geringe, doch met het blote oog zichtbare, inhoud

4 en 5 = matig grote inhoud
6 = bijna normale inhoud
7 en 8 = normale resp. overvloedige inhoud.

Als standaard gold de inhoud van helmknoppen van normaal fertiele, niet ingeteelde planten (Blue Bedder S. en G.).

Geringe verschillen in fertiliteitswaarde tussen de helmknoppen van een bloem kwamen veelvuldig voor. In zulke gevallen werd steeds het hoogste waarderingscijfer voor de betreffende bloemen aangehouden. Alleen, wanneer naast min of meer gevulde ook geheel lege helmknoppen voorkwamen, werd dit naast het waarderingscijfer vermeld.

Verschillen in fertiliteitswaarde tussen de bloemen van dezelfde plant op dezelfde waarnemingsdag kwamen eveneens algemeen voor. In de meeste gevallen betrof het hier matige graduele verschillen, doch sporadisch kwamen ook extreme waarden, b.v. 0 met 6, 7 of 8, naast elkaar voor. Bloemen met verschillende fertiliteitswaarden bleken steeds willekeurig over een plant verdeeld te zijn; localisatie van fertiliteitswaarden in aparte sectoren werd nooit aangetroffen.

Vele planten vertoonden op verschillende waarnemingsdata een zeer uiteenlopende fertiliteit. In het bijzonder bij die nakomelingschappen, waarbij het aantal herstellergenen door kruising van een herstellergenotype met steriele moederplanten dan wel met normaal fertiele vaderplanten was ‚verdund', werden, zelfs binnen zeer kort tijdsbestek, grote veranderingen van de fertiliteit aangetroffen. In enkele gevallen trad een bijna volledige omslag van gehele nakomelingschappen op van ‚steriel' (alle bloemen fertiliteitswaarde 0 of 1) naar ‚fertiel' (tenminste één bloem met fertiliteitswaarde 2 of hoger) en vice versa; zie tabel 4.2. Een meer kwantitatieve benadering van de verschillen in fertiliteitsexpressie, voor dezelfde nakomelingschappen en op dezelfde waarnemingsdata als in tabel 4.2, geeft tabel 4.3, waarin de ‚gemiddelde fertiliteitswaarde' van gehele nakomelingschappen op de aparte waarnemingsdata is weergegeven, en wel als gemiddelde der waarden van alle op een bepaalde datum beoordeelde bloemen. Uit tabel 4.3 blijkt, dat zelfs de homozygote herstellerlijn $Pt_{65}205$–3⊗ nog gevoelig was voor milieuinvloeden; de gemiddelde fertiliteitswaarde hiervan varieerde van 5,81 op 4-VIII-1966 tot 2,32 op 25-VII-1966.

In de tabellen 4.2 en 4.3. en in de afb. 4.2... 4.7 komt tot uiting, dat afwisselend gunstige en ongunstige data voor fertiliteitsexpressie voorkwamen. Uitermate gunstig waren de data 4-VIII en 20-IX-1966; zowel het aantal ‚fertiele' planten (tab. 4.2) als de gemiddelde fertiliteitswaarde (tab. 4.3) waren op die data optimaal. De data 30-VI, 18-VII en 25-VII-1966 waren daarentegen zeer ongunstig. In het algemeen bleek tegen het einde van het seizoen (september en oktober), zowel in 1966 als in 1967, de fertiliteit toe te nemen.

De sterke wisseling in fertiliteit onder invloed van de uitwendige omstandigheden maakte het noodzakelijk de planten vele malen te beoordelen. Daarom werden in 1966 bepaalde veldnummers, van de diverse nakomelingschapstypen (R ⊗, MS × R enz.), geselecteerd, om daaraan regelmatig fertiliteitsbeoordelingen te verrichten. Op deze wijze werd getracht een zo goed mogelijke in-

TABEL 4.2. Aantallen ‚steriele' en ‚fertiele' planten bij nakomelingschappen van verschillend type op willekeurige waarnemingsdata in 1966. ‚steriel' = alle bloemen van een plant met fertiliteitswaarde 0 of 1; ‚fertiel' = tenminste één bloem van een plant met fertiliteitswaarde 2 of hoger.

Veldnrs. 1966/ *Field Nos. 1966*	Ouderplant(en) 1965/ *Parent(s) 1965* ♀	♂	Nakomelingschapstype/ *Progeny type*	Aantal steriele versus fertiele planten op:/ *Number of sterile versus fertile plants on:* 8-VI	15-VI	30-VI	13-VII	18-VII	25-VII	4-VIII	10-VIII	20-VIII	10-IX	20-IX
Pt_{66} 26/27	205-3		R ⊗	14/35	-	2/47	0/50	0/74	0/40	0/40	0/35	-	-	-
Pt_{66} 2/3	314b-10	201-4	pR × R	9/36	0/77	-	-	7/73	-	0/39	0/80	0/39	10/69	-
Pt_{66} 4/5	314b-1	201-4	MS × R	3/10	6/62	-	11/69	15/65	-	2/38	3/77	0/40	26/54	-
Pt_{66} 35/36	ES-31a	205-3	MS-Snowball × R	48/1	31/10	63/0	27/53	37/3	51/29	16/64	58/22	-	-	10/70
Pt_{66} 24/25	256-1	201-6	MS-Blue Bedder × R	48/0	52/5	70/0	-	40/0	80/0	52/28	-	8/32	-	16/63
Pt_{66} 28/29	205-3	351-10	R × F-Snowball	52/4	21/26	66/0	18/61	40/0	63/17	0/40	23/17	-	-	3/56

Table 4.2. Numbers of 'sterile' and 'fertile' plants in progenies of different type on arbitrary observation dates in 1966. 'sterile' = all flowers of a plant having fertility value 0 or 1; 'fertile' = at least one flower of a plant having fertility value 2 or higher.

TABEL 4.3. Gemiddelde fertiliteitswaarde van dezelfde nakomelingschappen als in tabel 4.2 op dezelfde waarnemingsdata in 1966. Bespreking in tekst.

Veldnrs. 1966/ *Field Nos. 1966*	Ouderplant(en) 1965/ *Parent(s) 1965* ♀	♂	Nakomelingschapstype/ *Progeny type*	Gemiddelde fertiliteitswaarde op:/ *Average fertility value on:* 8-VI	15-VI	30-VI	13-VII	18-VII	25-VII	4-VIII	10-VIII	20-VIII	10-IX	20-IX
Pt_{66} 26/27	205-3		R ⊗	2,62	–	4,28	5,25	5,17	2,32	5,81	3,47	–	–	–
Pt_{66} 2/3	314b-10	201-4	pR × R	3,67	5,86	–	–	4,57	–	6,87	5,67	6,10	4,40	–
Pt_{66} 4/5	314b-1	201-4	MS × R	3,80	4,05	–	4,65	2,74	–	5,70	4,16	4,64	2,92	–
Pt_{66} 35/36	ES-31a	205-3	MS-Snowball × R	0,11	0,76	0,00	0,90	0,06	0,78	3,17	0,46	–	–	2,75
Pt_{66} 24/25	256-1	201-6	MS-Blue Bedder × R	0,00	0,40	0,00	–	0,00	0,00	0,41	–	1,04	–	1,25
Pt_{66} 28/29	205-3	351-10	R × F-Snowball	0,31	1,81	0,00	1,10	0,04	0,60	4,97	0,78	–	–	3,50

Table 4.3. Average fertility value of the same progenies as those in table 4.2, on the same observation dates in 1966. The 'average fertility value' of a progeny on a definite observation date = the sum of fertility values of all flowers estimated on that date, divided by the number of estimated flowers.

deling van deze nakomelingschappen in verschillende fertiliteitsklassen te verkrijgen. Deze indeling in fertiliteitsklassen gebeurde in twee stappen. Eerst werd de fertiliteit per plant per waarnemingsdatum vastgelegd in een codesysteem, gebaseerd op de gemiddelde fertiliteitswaarde van de beoordeelde bloemen en mede op het al of niet voorkomen van volledig steriele bloemen. Op grond van deze gecodeerde fertiliteit tijdens de gehele reeks van beoordelingsdata werden de planten vervolgens geplaatst in één van de tien fertiliteitsklassen 0...8 (zie tabel 4.4), waarbij extra gewicht werd toegekend aan het aantal data waarop een of meer volledig steriele bloemen aan een plant werden gevonden. Planten met volledig steriele bloemen op alle waarnemingsdata kwamen in klasse 0, of, wanneer ze op één of meer voor fertiliteit gunstige data niet waren beoordeeld, in klasse (0). Planten, die op geen enkele beoordelingsdatum volledig steriele bloemen bezaten, bleken op bijna alle data een tamelijk hoge gemiddelde fertiliteit te bezitten en werden in klasse 8 geplaatst; alleen op voor fertiliteit zeer ongunstige data werden soms ook bij deze planten lage gemiddelde waarden ($\leqslant$3,0) gevonden. De overige planten werden, naarmate het aantal data met een of meer volledig steriele bloemen toenam en de gemiddelde fertiliteit op de overige data afnam, in een van de klassen 7...1 geplaatst. Planten met een gelijkmatige (hoge of lage) fertiliteit werden niet gevonden.

4.3.4. *Bespreking van het gedrag van de verschillende nakomelingschapstypen*

4.3.4.1. R ⊗ en pR ⊗

Lijnen van planten uit de in 1965, onder kasomstandigheden, steeds als ‚fertiel' beoordeelde nummers Pt_{65}201, 205 en 207 waren op bijna alle waarnemingsdata in hun geheel en vrij uniform fertiel en bleken dus, als verwacht, alle homozygoot voor herstellergenen te zijn. Enkele voorbeelden zijn gegeven in tabel 4.4, groep R ⊗. Toch werd op enkele waarnemingsdata een vrij groot aantal bloemen met fertiliteitswaarde 1 en soms 0 aangetroffen, waardoor de gemiddelde fertiliteitswaarde van R-lijnen voor de betreffende data vrij laag werd (verg. tabel 4.3 en afb. 4.2).

Het bleek, dat ook de lijnen van planten uit $Pt_{65}314^a$ tamelijk uniform fertiel waren (tabel 4.4, groep R ⊗). De nakomelingen uit zelfbevruchting van de (onder kasomstandigheden in 1965) eveneens als steeds fertiel beoordeelde plant 313^a–10 vertoonden echter vrij grote verschillen in fertiliteit; vrijwel alle fertiliteitsklassen 0...8 waren vertegenwoordigd (tab. 4.4; groep R ⊗). De aantallen planten in de klassen 0...2 (17), 3...6 (29), en 7 + 8 (23) zouden kunnen wijzen op een 1:2:1 splitsing.

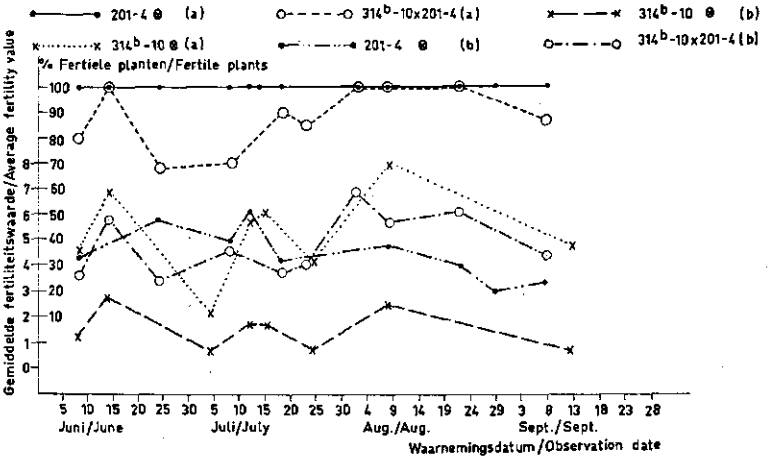
Het was opvallend, dat bloemen met zeer hoge fertiliteitswaarden (7 en 8) in de herstellerlijnen weinig voorkwamen, en dat op sommige waarnemingsdata de fertiliteit van vele planten uit kruisingen MS × R en R × F hoger was dan die van homozygoot hersteld fertiele planten. In enkele van de R-lijnen ging de relatief lage fertiliteit veelal vergezeld van abnormaliteiten (verschrompeling; bruinkleuring) van de helmknoppen. Bij microscopisch onderzoek bleek de in deze knoppen aanwezige stuifmeelmassa te bestaan uit degenererende naast

TABEL 4.4. Verdeling van planten over de fertiliteitsklassen 0...8 bij een aantal zaadnummers van verschillend type in 1966. In geval van twijfel over de indeling van planten in een bepaalde klasse zijn deze midden tussen de beide mogelijke klassen geplaatst. Bespreking in tekst.

Veldnrs. 1966/ *Field Nos. 1966*	Ouderplant(en) 1965/ *Parent(s) 1965* ♀	♂	Nakomelingschapstype/ *Progeny type*	Aantal planten in fertiliteitsklasse:/ *Number of plants in fertility class:* 0	(0)	1	2	3	4	5	6	7	8	Tot.
$Pt_{66}1$	201–4		R ⊗	–	–	–	–	–	–	–	1	3	11	15
$Pt_{66}26/27$	205–3		R ⊗	–	–	–	–	–	–	–	1	17	57	75
$Pt_{66}98/99$	314^{a}-4		R ⊗	–	–	–	–	–	5	–	6	16	53	80
$Pt_{66}115/116$	314^{a}-10		R ⊗	–	–	–	–	–	–	–	3	59		62
$Pt_{66}71/72$	313^{a}-10		R ⊗	6		–	11	2	21	4	2	18	5	69
$Pt_{66}129/130$	314^{b}-10		pR ⊗	21	–	–	18	8	16	–	6	5		74
$Pt_{66}136/137$	314^{b}-34		pR ⊗	29	1	2	21	3	13	1	2	4	1	77
$Pt_{66}140/41$	318^{b}-6		pR ⊗	42		–	15	5	8	2	5	–	2	79
$Pt_{66}145$	318^{b}-7		pR ⊗	3	–	–	2	–	3	2	–	2	–	12
$Pt_{66}2/3$	314^{b}-10	201-4	pR × R	–	–	–	–	1	13	9	10	12	35	80
$Pt_{66}31/32$	314^{b}-10	205-3	pR × R	–	–	–	–	6	26	12	3	6	25	78
$Pt_{66}107/108$	313^{a}-1	314^{a}-4	pR × R	–	–	–	8	1	9	4	16	30		68
$Pt_{66}105/106$	311^{a}-2	314^{a}-4	pR × R	2	–	–	3	15	25	25		8		78
$Pt_{66}35/36$	ES-31^{a}	205-3	MS-Snowball × R	8	–	5	24	24	19	–	–	–	–	80
$Pt_{66}37/38$	ES-43^{a}	205-3	MS-Snowball × R	2	–	10	17	39	5	–	–	–	–	73
$Pt_{66}39/40$	ES-44^{a}	205-3	MS-Snowball × R	–	1	–	12	67		–	–	–	–	80
$Pt_{66}110/111$	ES-33^{a}	314^{a}-4	MS-Snowball × R	18	–	6	43	11	–	–	–	–	–	78
$Pt_{66}112/113$	ES-43^{a}	314^{a}-4	MS-Snowball × R	14	–	7	47	12	–	–	–	–	–	80
$Pt_{66}124/125$	ES-33^{a}	314^{a}-10	MS-Snowball × R	33	2	19		23	–	–	–	–	–	77
$Pt_{66}80/81$	ES-43^{a}	313^{a}-10	MS-Snowball × R	39	–	30		2	–	–	–	–	–	71
$Pt_{66}134/135$	ES-50^{a}	314^{b}-10	MS-Snowball × pR	59		–		21	–	–	–	–	–	80

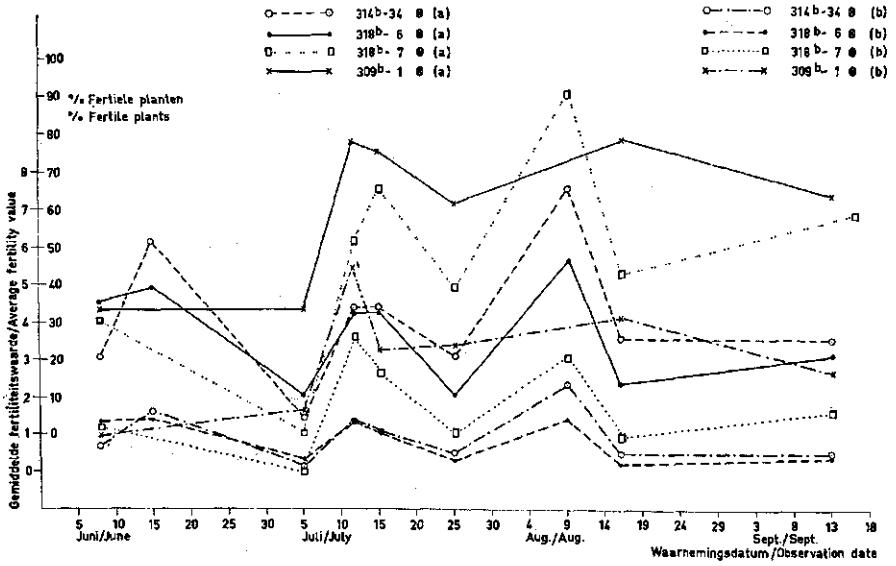
Pt_{66}143/144	ES-33[a]	318[b]-6	MS-Snowball × pR	64		–	15		–	–	–	–	–	79
Pt_{66}24/25	256-1	201-6	MS-Blue Bedder × R	3	–	40	37	–	–	–	–	–	–	80
Pt_{66}114	256-1	314[a]-4	MS-Blue Bedder × R	40		–	–	–	–	–	–	–	–	40
Pt_{66}4/5	314[b]-1	201-4	MS × R	–	1	–	8	4	20	18	6	10	13	80
Pt_{66}6/7	314[b]-3	201-4	MS × R	–	1	–	4	13	18	7	4	4	27	78
Pt_{66}8/9	314[b]-9	201-4	MS × R	–	1	–	16	17	21	15	1	1	7	79
Pt_{66}33/34	314[b]-30	205-3	MS × R	13	–	–	5	12	15	9	7	6	13	80
Pt_{66}78/79	314[b]-47	313[a]-10	MS × R	12	–	–	28	13	18	–	4	1	3	79
Pt_{66}76/77	313[a]-9	313[a]-10	MS × R	9	2	–	38	19	5	–	–	–	–	73
Pt_{66}146/147	313[a]-9	318[b]-7	MS × pR	42	–	–	33	3	14	–	–	–	–	92
Pt_{66}28/29	205-3	351-10	R × F-Snowball	–	2	1	22	45	10	–	–	–	–	80
Pt_{66}100/101	314[a]-4	243-5	R × F-Snowball	–	–	–	–	3	66	7	–	–	–	76
Pt_{66}73/74	313[a]-10	EF-8[a]	R × F-Snowball	36	–	6	34	2	–	–	–	–	–	78
Pt_{66}131/132	314[b]-10	EF-8[a]	pR × F-Snowball	76		–	4	–	–	–	–	–	–	80
Pt_{66}138/139	314[b]-34	243-4	pR × F-Snowball	66		–	7	–	–	–	–	–	–	73
Pt_{66}102/103	314[a]-4	C1-4	R × Blue Bedder S. en G.	17	–	6	19	12	2	–	–	–	–	56
Pt_{66}118	314[a]-10	C1-5	R × Blue Bedder S. en G.	–	–	15		5	17	–	–	–	–	37
Pt_{66}75	313[a]-10	C1-1	R × Blue Bedder S. en G.	34	–	–	–	–	–	–	–	–	–	34

Table 4.4. Distribution of plants over the fertility classes 0....8 in some seed numbers of different type in 1966. Plants in class 0 have never been found to be fertile; nor have those in class (0), but they have not been estimated on one or more observation dates favourable to fertility. According to increasing fertility throughout the whole series of observations the remaining plants were classified into the classes 1...8 (= plants always more or less fertile). The numbers were put between the two possible classes where the classification of plants in one class or another was not clear.



AFB. 4.2. Verloop van de fertiliteit, uitgedrukt in het percentage ‚fertiele' planten (a) en in de gemiddelde fertiliteitswaarde (b), bij de lijnen van een homozygoot hersteld fertiele plant (201-4) en van een partieel fertiele plant van het type MS × R (314^b-10), en bij hun kruisingsproduct (314^b-10 × 201-4), in 1966. Zie tekst.

Fig. 4.2. Course of the fertility, expressed as the percentage of 'fertile' plants (a) and as the average fertility value (b), in the lines of a homozygous restored plant (201-4) and of a partially fertile plant of the type MS × R (314^b-10), and in the product of the cross between them (314^b-10 × 201-4), in 1966. The fertility of 314^b-10 × 201-4 lies between those of the two parental lines.



AFB. 4.3. Verloop van de fertiliteit, uitgedrukt in het percentage ‚fertiele' planten (a) en in de gemiddelde fertiliteitswaarde (b), bij vier F_2's van het type (MS × R) ⊗, in 1966. Zie tekst.

Fig. 4.3. Course of the fertility, expressed as the percentage of 'fertile' plants (a) and as the average fertility value (b), in four F_2's of the type (MS × R) ⊗, in 1966.

normale stuifmeelkorrels. Een aantal planten vertoonde ook geringe groeikracht en stierf in de loop van de zomer af. Analoge verschijnselen werden ook aangetroffen bij inteeltlijnen van F-Snowball (verg. pag. 37), waar ze aan inteeltverzwakking werden toegeschreven.

Hoewel de herstellerlijnen onderling sterk verwant waren (afb. 4.1), werd toch nagegaan of door onderlinge kruising van herstellerplanten uit verschillende lijnen een ten opzichte van de zuivere lijnen verhoogde stuifmeelproductie was te verkrijgen. Slechts in één geval bleek de gemiddelde fertiliteit van de reciproke kruisingsnakomelingschappen in 1967 hoger dan die van één van de bijbehorende inteeltlijnen; in de drie andere combinaties werden tussen kruisingsnakomelingschappen en inteeltlijnen geen duidelijke verschillen gevonden. Dit was mede te danken aan de omstandigheid, dat de in 1966 gesignaleerde helmknopafwijkingen zich bij geen van de nakomelingschappen voordeden, zodat bijna alle planten steeds zeer goed fertiel waren. Het lijkt niet onmogelijk, dat reeds in een vroeg groeistadium (vóór of bij uitplanting in het veld) selectie tegen planten van het betreffende type was opgetreden.

In de lijnen van de heterozygote, partieel fertiele planten $Pt_{65}314^{b}$–10, 314^{b}–34, 318^{b}–6 en 318^{b}–7 (tabel 4.4, groep pR ⊗; afb. 4.3) werd steeds splitsing gevonden in steriele, partieel fertiele en fertiele nakomelingen, waarbij soms vrijwel alle fertiliteitsklassen waren vertegenwoordigd. De aantalsverhouding in 314^{b}–10 ⊗ (21:42:11) doet denken aan een monofactoriële splitsing 1:2:1 (onvolledige dominantie of intermediaire werking van de betreffende herstellerfactor), doch ook heel andere verhoudingen komen voor.

4.3.4.2. pR × R

Kruisingen van het type pR × R (tabel 4.4, groep pR × R) leidden in alle gevallen tot nakomelingschappen, waarvan de fertiliteit lag tussen die van de lijnen van de beide ouderplanten. De situatie is, voor wat betreft de nakomelingschappen Pt_{65}201–4 ⊗, 314^{b}–10 ⊗ en 314^{b}–10 × 201–4, weergegeven in afb. 4.2.

Uit de verdeling over fertiliteitsklassen van de lijnen Pt_{65}201–4 ⊗ en 205–3 ⊗ blijkt, dat homozygoot hersteld fertiele planten bijna alle vielen in de klassen 7 en 8. Stellen we nu bij de kruisingen $Pt_{65}314^{b}$–10 × 201–4 en 314^{b}–10 × 205–3 de planten in klassen 7 en 8 tegenover alle overige planten (klassen 3...6) dan wordt een 1:1 splitsing zeer dicht benaderd (78 resp. 80 planten). Dit resultaat sluit goed aan bij de voor $Pt_{65}314^{b}$–10 ⊗ vermoede splitsing 1:2:1.

4.3.4.3. MS × R en MS × pR

A. Steriele controle-rassen

F_1's van kruisingen MS-Snowball × R (tab. 4.4 en 4.5, groep MS-Snowball × R) bleken uitermate milieugevoelig. Zowel in 1966 als in 1967 waren de F_1's op sommige waarnemingsdata uniform steriel (tab. 4.2 en afb. 4.4). Op de meeste dagen echter kwam een wisselend aantal min of meer fertiele naast volledig steriele planten voor. Uniform ‚fertiele' F_1's werden, althans in 1966, op geen enkele waarnemingsdag gevonden,

behalve in de kruisingen met ES-44^a als moederplant. Van de beide F_1's ES-44^a × 201–6 (niet in tabel opgenomen) en ES-44^a × 205–3 waren op één waarnemingsdatum (21–IX–1966) alle planten meer of minder sterk fertiel. Blijkbaar heeft ES-44^a een van de zusterplanten afwijkend genotype voor fertiliteitsherstel als gevolg van (een) cryptomeer aanwezige herstellerfactor(en). De F_1's van kruisingen MS-Snowball × R vertoonden een vrij geringe spreiding over fertiliteitsklassen. De meeste planten vielen in de klassen 2, 3 en 4. Het aantal volledig steriele planten was afhankelijk van de gebruikte vaderplant. Was deze afkomstig uit een van de lijnen Pt_{65}201, 205 of 207, dan was het aantal steriele nakomelingen gering, zoals in ES-31^a resp. ES-43^a × 205-3 (tabel 4.4). Werd echter een individu uit Pt_{65}314^a als bestuiver gebruikt dan bleek ofwel ca. een kwart (314^a–4) of ongeveer de helft (314^a–10) van de F_1-planten steriel. Analoge verschijnselen werden ook in 1967 gevonden. F_1's van kruisingen tussen MS-Snowball en de van 314^a–10 afgeleide herstellerplant Pt_{66}115–1 (tabel 4.5) bevatten meer steriele nakomelingen dan die tussen MS-Snowball en de van 205–3 afgeleide herstellerplanten Pt_{66}26–10, 27–3 en 27–25. Deze verschillen zijn alleen te verklaren door aan te nemen, dat in Pt_{65}314^a–10 een of meer allelen van herstellerfactoren ontbraken. Het kan hier echter slechts gaan om factoren met een geringe werking.

Indien nl. een hoofdgen voor fertiliteitsherstel zou hebben ontbroken, dan zou dit tot uiting gekomen zijn in splitsing voor fertiliteit in lijn Pt_{65}314^a–10 ⊗ (tabel 4.4, groep R ⊗) en ook in de hiervan afgeleide lijnen Pt_{66}115–1 ⊗ en 115–18 ⊗ (niet in tabel), doch deze waren uniform fertiel.

De F_1 van de kruising ES–43^a × 313^a–10 leek duidelijk een 1:1 splitsing in steriele en partieel fertiele planten te vertonen, hetgeen correspondeert met de monofactoriële splitsing voor een herstellerfactor, welke in de van de vaderplant verkregen lijn (zie tab. 4.4, groep R ⊗) aanwezig leek.

Bij de nakomelingschappen van kruisingen MS-Snowball × pR (tab. 4.4) was het merendeel van de planten bij alle beoordelingen steriel. De in tabel 4.4 vermelde kruisingen ES–50^a × 314^b–10 en ES–33^a × 318^b–6 waren Tk_1-generaties van het type MS × (MS × R). Bij monofactoriële overerving van fertiliteitsherstel was een 1:1 splitsing in steriele en partieel fertiele planten te verwachten. De actuele aantallen planten weken zo sterk van deze 1:1 verhouding af, dat moet worden aangenomen, dat herstel van fertiliteit hier op meer dan een genenpaar berust.

Kruisingen van het type MS-Blue Bedder × R uit 1965 (tabel 4,4, groep MS-Blue Bedder × R) resulteerden bijna alle in F_1's met uiterst geringe fertiliteit. Alleen op de voor fertiliteitsexpressie zeer gunstige waarnemingsdata 4-VIII en 20-IX-1966 werd bij een aantal planten enig stuifmeel aangetroffen. De gemiddelde fertiliteitswaarde van de F_1's was echter ook op deze data gering en duidelijk lager dan die van F_1's MS-Snowball × R (verg. ook tab. 4.2 en 4.3). In 1967 (tab. 4.5) lag het fertiliteitsniveau van F_1's MS-Blue Bedder × R aanzienlijk hoger dan in 1966. De verschillen in verdeling over fertiliteitsklassen van de F_1's Pt_{66}213–21 × 27–1 en 213–33 × 27–25 aan de ene kant en van 213–32 × 27–3 aan de andere kant wezen op verschillen in aantal cryptomeer

TABEL 4.5. Verdeling van planten over de fertiliteitsklassen 0...8 bij een aantal nakomelingschappen MS-Snowball × R, MS-Blue Bedder × R en MS-Rosy Morn × R in 1967. Men lette op het verschil in verdelingspatroon van MS-Rosy Morn × R t.o.v. de beide andere nakomelingschapstypen en de soms grote verschillen in verdeling bij nakomelingschappen van hetzelfde type. Bespreking in tekst.

Veldnr. 1967/ *Field No. 1967*	Ouderplanten 1966/ *Parents 1966*		Nakomelingschapstype/ *Progeny type*	Aantal planten in fertiliteitsklasse:/ *Number of plants in fertility class:*										
	♀	♂		0	(0)	1	2	3	4	5	6	7	8	Tot.
Pt_{67} V-59	158-37	26-10	MS-Snowball × R	4	3	2	19	38	10	1	–	–	–	77
Pt_{67} V-67	158-30	27-3	MS-Snowball × R	–	11	–	20	36	12	–	–	–	–	79
Pt_{67} V-66	158-6	27-25	MS-Snowball × R	–	4	5	10	–	–	–	–	–	–	19
Pt_{67} V-64	187-18	98-17	MS-Snowball × R	–	15	1	23	–	–	–	–	–	–	39
Pt_{67} V-61	162-6	115-1	MS-Snowball × R	18	18	6	33	5	–	–	–	–	–	80
Pt_{67} V-63	213-21	27-1	MS-Blue Bedder × R	6	25	10	12	18	7	–	–	–	–	78
Pt_{67} V-68	213-32	27-3	MS-Blue Bedder × R	–	1	–	6	55	18	–	–	–	–	80
Pt_{67} V-65	213-33	27-25	MS-Blue Bedder × R	5	26	3	11	22	9	–	–	–	–	76
Pt_{67} V-60	213-1	115-1	MS-Blue Bedder × R	38	19	9	8	3	–	–	–	–	–	77
Pt_{67} RM-1	RM-S-7	1-8	MS-Rosy Morn × R	18	1	7	11	15	17	6	4	–	–	79
Pt_{67} RM-2	RM-S-20	1-8	MS-Rosy Morn × R	13	10	4	25	9	9	6	3	1	–	80
Pt_{67} RM-3	RM-S-2	26-10	MS-Rosy Morn × R	12	4	6	22	11	16	3	2	3	–	79
Pt_{67} RM-4	RM-S-21	26-10	MS-Rosy Morn × R	12	3	8	24	16	15	1	1	–	–	80
Pt_{67} RM-5	RM-S-1	26-12	MS-Rosy Morn × R	2	1	–	6	15	23	13	14	6	–	80
Pt_{67} RM-6	RM-S-20	26-12	MS-Rosy Morn × R	25	3	4	20	8	12	2	2	3	–	79
Pt_{67} RM-13	RM-S-2	115-10	MS-Rosy Morn × R	26	19	3	18	5	8	–	–	–	–	79
Pt_{67} RM-14	RM-S-21	115-10	MS-Rosy Morn × R	29	14	7	22	6	–	1	–	–	–	79
Pt_{67} RM-15	RM-S-20	115-18	MS-Rosy Morn × R	29	21	2	14	10	1	–	1	1	–	79
Pt_{67} RM-16	RM-S-1	115-18	MS-Rosy Morn × R	12	6	1	15	10	12	9	7	4	–	76

Table 4.5. Distribution of plants over the fertility classes 0...8 in a number of progenies MS-Snowball × R, MS-Blue Bedder × R and MS-Rosy Morn × R in 1967. Note the difference in distribution pattern of MS-Rosy Morn × R with regard to the other two progeny types, and the sometimes great differences of the distribution of progenies of the same type. For discussion see text.

aanwezige herstellerfactoren bij MS-Blue Bedder. Het grote aantal steriele planten in de F_1 213–1 × 115–1 werd vermoedelijk mede veroorzaakt door de relatief geringe herstelwerking van de vaderplant (verg. pag. 32).

In 1965 werd een klein aantal kruisingen van het type MS-First Lady × R uitgevoerd, om vast te stellen of en in welke mate de voorhanden herstellergenen de werking van het in MS-First Lady aanwezige steriliserend plasma zouden beïnvloeden. De vier verkregen F_1's (niet in tabel) vertoonden weinig variatie en waren tamelijk fertiel. Tijdens negen beoordelingen, in het najaar en in de winter onder tamelijk constante milieuomstandigheden in de kas, werden slechts sporadisch volledig steriele bloemen aangetroffen. Mogelijke oorzaken voor de stabiele en relatief hoge fertiliteit van deze F_1's waren:

1. Het voor fertiliteitsexpressie gunstige milieu, als hiervoor besproken.
2. De aanwezigheid van cryptomere herstellergenen in MS-First Lady.
3. Een geringer steriliserend effect van het plasma van MS-First Lady, waardoor de R-genen van de herstellerouder groter effect hebben.

Op grond van de verkregen resultaten in de F_2 (zie pag. 44 en tab. 4.9) leek de eerste mogelijkheid van toepassing te zijn.

Plasmatisch steriele planten van het ras Rosy Morn, behorende tot één kruisingsnakomelingschap (436-1-MS × 434-30-F van Frankel) werden eveneens onderzocht op de mogelijkheid van fertiliteitsherstel door inkruising van herstellergenen. Herstel van fertiliteit werd inderdaad gevonden, zoals blijkt uit tabel 4.5, groep MS-Rosy Morn × R. De verdeling van planten over fertiliteitsklassen bij de F_1's MS-Rosy Morn × R week aanzienlijk af van die bij MS-Snowball × R en MS-Blue Bedder × R (tabel 4.5). In de laatstgenoemde F_1's vielen alle planten in de klassen 0...4 met meestal een sterke concentratie in de klassen 2 en 3. In veel F_1's MS-Rosy Morn × R waren naast de klassen 0...4 ook de klassen 5, 6 en 7 vertegenwoordigd. Deze grote spreiding over fertiliteitsklassen wees op een sterke mate van heterozygotie van de moederplanten voor cryptomere herstellerfactoren. De F_1's, waarin RM-S-1 als moederplant was gebruikt, waren duidelijk fertieler dan die, waarin andere MS-Rosy Morn planten waren benut. Het verschil kwam tot uiting in het grote aantal planten van klassen 6 en 7 en het nagenoeg ontbreken van steriele planten in de F_1 van de kruising RM-S-1 × 26–12. De op pag. 32 reeds besproken geringere herstelwerking van de planten uit lijn Pt_{66}115 werd ook hier gevonden. Men vergelijke b.v. de verdeling over fertiliteitsklassen van RM-S-20 × 1–8 en RM-S-20 × 26–12 met die van RM-S-20 × 115–18. In de kruising RM-S-1 × 115–18 leek de geringere herstelwerking van de vaderplant te worden gecompenseerd door de extra herstellerdosis van de moederplant. Het aantal planten in de fertiliteitsklassen 5, 6 en 7 was bij deze F_1 zelfs duidelijk groter dan bij de F_1's van alle overige RM-S-planten en de homozygote herstellers Pt_{66}1–8, 26–10 en 26–12. Dat zou er op kunnen wijzen, dat de compenserende herstellerfactor(en) in RM-S-1 een sterkere werking bezat(en) dan het/de in 115–18 ontbrekende gen(en). Het door RM-S-1 ingebrachte genenmateriaal bevatte mogelijk een of meer allelen van hoofdfactoren voor fertiliteitsherstel. Deze veronderstelling vond steun in de waarneming, dat in een controle-kruising MS-

Rosy Morn × F-Rosy Morn bij een aantal planten een enigszins van het standaardtype afwijkende helmknoppen werd waargenomen.

De afwijkende helmknoppen waren duidelijk groter en misten het kenmerkende spiesvormige uiterlijk van die bij de steriele standaardplanten. In enkele van de afwijkende helmknoppen werden geringe, soms zelfs vrij aanzienlijke hoeveelheden, met karmijnazijnzuur kleurbaar, stuifmeel aangetroffen (fertiliteitswaarden 2 en 3). Vermoedelijk door de sterke mate van zelfincompatibiliteit, die ook bij F-Rosy Morn voorkwam, leidde geen enkele van de zelfbestuivingen bij deze partieel fertiele planten tot bevruchting. Dat de hier beschreven afwijkingen niet reeds bij de MS-Rosy Morn ouderplanten werden gevonden, zou kunnen berusten op de minder scherpe controle op fertiliteit bij dit materiaal in 1966.

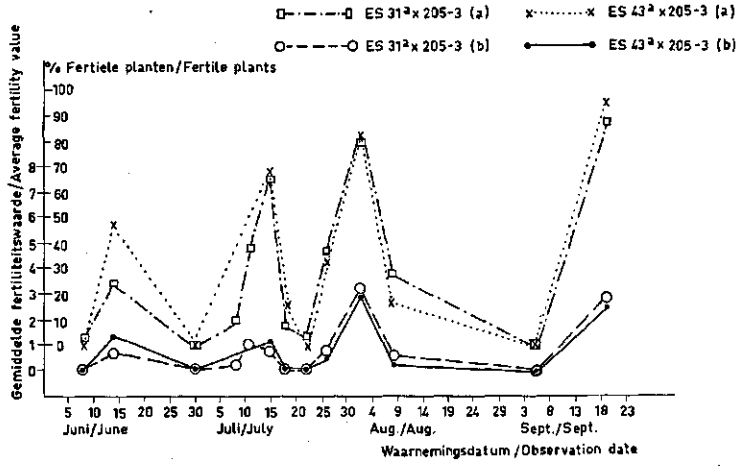
B. Steriele planten uit het herstellermateriaal

Kruising van een aantal steriele planten uit nummer $Pt_{65}314^b$ met de hersteld fertiele plant 201–4 als vader (tab. 4.4, groep MS × R) bracht aan het licht, dat onder de fenotypisch gelijke moederplanten vermoedelijk verschillende genotypen schuil gingen. De kruisingen van 314^b-1 en -3 resulteerden in nakomelingschappen met aanzienlijke aantallen planten in de fertiliteitsklassen 7 en 8; de nakomelingschap van 314^b-9 bezat een veel lager fertiliteitsniveau, ofschoon volledig steriele planten, evenals bij de kruisingen met 314^b-1 en -3 vrijwel geheel ontbraken. Een verdere afname van de fertiliteit, vooral tot uiting komend in het vrij grote aantal geheel steriele planten werd aangetroffen in de nakomelingschappen van 314^b-30 × 205–3 en 314^b–47 × 313^a–10. In het laatste geval werd de geringere fertiliteit ongetwijfeld mede veroorzaakt door de heterozygotie van de vaderplant voor een (of meer) herstellergenen (verg. pag. 27).

Alle nakomelingschappen van kruisingen tussen steriele planten uit nummer $Pt_{65}314^b$ en hersteld fertiele planten (R) vertoonden dus een geheel andere verdeling van de planten over fertiliteitsklassen (enige tot veel planten in klassen 7 en 8; vrij weinig of geen planten in klassen 0, (0) en 1) dan de hiervoor (in 4.3.4.3.A) besproken F_1's van kruisingen tussen steriele rassen en herstellerplanten. Dit betekent, dat het niveau van (in de kas in 1965) cryptomere herstellerfactoren in de steriele planten van 314^b hoger was dan in alle planten uit steriele rassen, met uitzondering van de MS-Rosy Morn-plant RM-S-1 (tabel 4.5). Dit resultaat was enigszins te verwachten, omdat nummer $Pt_{65}314^b$ was ontstaan uit kruisingen MS × R (verg. afb. 4.1) en hierin dus herstellergenen van de vaderplant heterozygoot aanwezig waren.

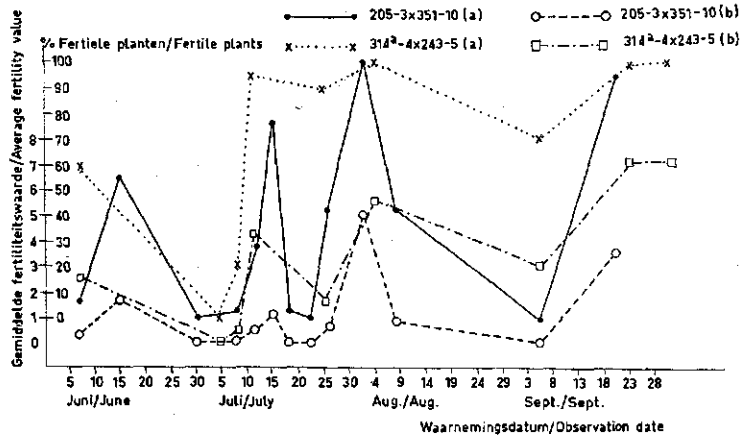
4.3.4.4. R × F en pR × F

Nakomelingschappen van de typen R × F en pR × F werden alleen verkregen van de rassen F-Snowball en Blue Bedder S. en G. (tab. 4.4, groep R × × F-Snowball e.v.). F_1's R × F-Snowball gedroegen zich in grote lijnen als F_1's MS-Snowball × R (afb. 4.5), doch het fertiliteitsniveau lag gemiddeld iets hoger. Het verschil kwam voornamelijk tot uiting tijdens beoordelingen van de F_1's op



AFB. 4.4. Verloop van de fertiliteit, uitgedrukt in het percentage ‚fertiele' planten (a) en in de gemiddelde fertiliteitswaarde (b), bij twee F_1's van het type MS-Snowball × R, in 1966. Zie tekst.

Fig. 4.4. Course of the fertility, expressed as the percentage of 'fertile' plants (a) and as the average fertility value (b), in two F_1's of the type MS-Snowball × R in 1966. A number of plants turned out to be sterile on all observation dates; cf. fig. 4.5.



AFB. 4.5. Verloop van de fertiliteit, uitgedrukt in het percentage ‚fertiele' planten (a) en in de gemiddelde fertiliteitswaarde (b), bij twee F_1's van het type R × F-Snowball, in 1966. Zie tekst.

Fig. 4.5. Course of the fertility, expressed as the percentage of 'fertile' plants (a) and as the average fertility value (b), in two F_1's of the type R × F-Snowball, in 1966. On days favourable to fertility (4-VIII and 30-IX) all plants were more or less fertile; cf. fig. 4.4.

voor fertiliteit gunstige data (4-VIII en 20-IX-1966; verg. tab. 4.2 en 4.3). De F_1's R × F-Snowball waren op die data nagenoeg uniform ‚fertiel', terwijl bij de meeste F_1's MS-Snowball × R steeds een aantal steriele planten werden aangetroffen (verg. pag. 31). Het gevondene zou aldus kunnen worden verklaard: De F-Snowball lijnen waren door strikte inteelt gedurende 8 generaties volledig

homozygoot voor hierin cryptomeer aanwezige herstellerfactoren. Kruising met de (eveneens homozygote) herstellerplanten leidde derhalve tot genotypisch uniforme F_1's (geringe spreiding over fertiliteitsklassen). De steriele terugkruisingsfamilies MS-Snowball × F-Snowball hadden meer kans een zekere mate van heterozygotie te handhaven; de meeste MS-Snowball planten (ES-31^a, -33^a en -43^a) leken inderdaad heterozygoot voor een (of meer) cryptomere herstellerfactor(en), terwijl ES-44^a vermoedelijk het homozygote genotype van F-Snowball bezat (zie tab. 4.4, groep MS-Snowball × R).

Zowel in de F_1 ES-43^a × 313^a-10 (tab. 4.4, groep MS-Snowball × R) als in de F_1 313^a-10 × EF-8^a (tab. 4.4, groep R × F-Snowball) werd een goede benadering van een 1:1 splitsing in steriele (klasse 0) en licht fertiele (klassen 1 tot 3) planten gevonden, terwijl de lijn 313^a–10 ⊗ leek te splitsen in niet of nauwelijks fertiele, matig fertiele, en goed fertiele planten in de verhouding 1:2:1 (verg. pag. 27). Het lijkt dus dat 313^a-10 heterozygoot was voor een herstellerfactor met vrij sterke werking.

F_1's van het type pR × F-Snowball waren bijna in hun geheel steriel; de weinige planten in klasse 2 bezaten op slechts een of twee waarnemingsdata enkele bloemen met min of meer gevulde helmhokjes (fertiliteitswaarden 3 tot 6).

De vaderplanten Blue Bedder S. en G. (tab. 4.4, groep R × Blue Bedder S. en G.) vertegenwoordigden vermoedelijk verschillende genotypen; de F_1 314^a-10 × C1-5 was duidelijk fertieler dan de beide F_1's 314^a–4 × C1-4 en 313^a-10 × C1-1, waarbij alleen in het laatste geval de geringere fertiliteit van de F_1 ten dele aan de minder sterke herstelwerking van de moederplant kon worden toegeschreven. Op grond van de verdeling van de F_1's over fertiliteitsklassen leek C1-5 het homozygote genotype van F-Snowball, en C1-4 het heterozygote genotype van de meeste MS-Snowball-planten te bezitten.

4.3.4.5. Controle-kruisingen

De resultaten van de controle-kruisingen werden niet in tabel 4.4 opgenomen. De inteeltlijnen van Blue Bedder S. en G. en F-Rosy Morn waren steeds volledig fertiel. Bij F-Snowball nam na droog of koud weer de fertiliteit sterk af, terwijl incidenteel ook abnormaal ontwikkelde helmknoppen met geen of geringe hoeveelheid stuifmeel werden gevonden. Deze verschijnselen werden, evenals de trage en gedrongen groei van F-Snowball planten, toegeschreven aan inteeltverzwakking; verg. ook pag. 104.

De nakomelingschappen van instandhoudingskruisingen MS-Snowball × F-Snowball en MS-Blue Bedder × Blue Bedder S. en G. vertoonden op geen enkele waarnemingsdag ook maar enig stuifmeel, evenals de meeste nakomelingschappen MS-Rosy Morn × F-Rosy Morn. In één nakomelingschap MS-Rosy Morn × F-Rosy Morn echter kwamen onvolledig steriele planten voor, zoals reeds op pag. 35 is vermeld. Bij enkele van de Blue Bedder nakomelingschappen werd in vrij sterke mate bloemverstikking (verg. pag. 18) waargenomen.

Nakomelingschappen van het type F-Snowball × R vormden overvloedig stuifmeel. Hoewel bij deze kruisingen ingeteelde planten van F-Snowball als moeder waren gebezigd, werd geen terugval van fertiliteit na droog of koud weer gevonden en bleken alle helmknoppen normaal te zijn ontwikkeld. Kennelijk was de inteeltverzwakking van F-Snowball door kruising met de onverwante herstellerplanten te niet gedaan.

4.3.5. *Toetsing van de betrouwbaarheid van de indeling in fertiliteitsklassen*

De indeling van de in 1966 beoordeelde nakomelingschappen in de fertiliteitsklassen 0...8 gaf een globale indruk van de fertiliteit bij verschillende nakomelingschapstypen en daarmee van de mate van aanwezig zijn van al dan niet cryptomere herstellerfactoren bij de ouderplant(en). In deze paragraaf zal worden getracht de relatieve invloed van genotype en milieu op de fertiliteitsexpressie te bepalen door de correlatie tussen ouders uit 1966 en nakomelingen in 1967 na te gaan.

De meeste bij de toetsing gebruikte nakomelingschappen waren verkregen na zelfbevruchting of onderlinge kruising van F_1-planten van de typen MS-Snowball × R (tabel 4.6) en R × F-Snowball resp. Blue Bedder S. en G. (tabel 4.7). De overige nakomelingschappen (tabel 4.8) waren afkomstig van zelfbevruchtingen en onderlinge kruisingen van planten uit de kruisingen $Pt_{65}314^b$-10 × 205-3 (pR × R) en 314^b-30 × 205-3 (MS × R). Alle ouderplanten waren in 1966 een voldoende groot aantal keren beoordeeld om plaatsing in een van de fertiliteitsklassen verantwoord te doen zijn.

In 1967 werden alle planten (voor zover bloeiend) tussen 30-V en 20-X niet minder dan veertien of vijftien maal, en alle telkens omstreeks dezelfde datum, op fertiliteit beoordeeld. De verdeling van de toets-nakomelingschappen over fertiliteitsklassen is weergegeven in de tabellen 4.6...4.8, en zal in de volgende alinea's nader worden besproken. Voor de overzichtelijkheid is in de tabellen 4.6...4.8 ook een vereenvoudigde classificatie opgenomen, nl. in drie groepen, aan te duiden als resp. steriel (klassen 0, (0) en 1), partieel fertiel (klassen 2, 3, 4 en 5) en hersteld fertiel (klassen 6, 7 en 8).

De F_2's van planten van klassen 2 en 3 (tabellen 4.6 en 4.7) vertoonden een grote spreiding over de fertiliteitsklassen, waarbij alle of bijna alle klassen waren vertegenwoordigd. De meeste van deze F_2's (Pt_{66}37-6 ⊗, 22-15 ⊗, 110-35 ⊗ , 110-38 ⊗, 111-13 ⊗, 111-20 ⊗ in tabel 4.6; 100-17 ⊗, en 102-38 ⊗ in tabel 4.7) bestonden bijna geheel uit (vaak ongeveer gelijke aantallen) steriele en partieel fertiele planten. Bij enkele F_2's van planten van klasse 3 (Pt_{66}22-35 ⊗, 35-10 ⊗, 35-11 ⊗ in tabel 4.6 en 28-12 ⊗ in tabel 4.7) was ongeveer de helft van de planten partieel fertiel, terwijl de overige planten ongeveer gelijkelijk waren verdeeld over de steriele en de hersteld fertiele groep (1:2:1 splitsing?). Deze zelfde verhouding werd ook gevonden bij een aantal F_2's van planten van klasse 4 (37-4 ⊗, 39-27 ⊗ in tabel 4.6; 100-2 ⊗ in tabel 4.7), zodat de betreffende ouderplanten van klassen 3 en 4 mogelijk hetzelfde genotype hadden.

Bij vele F_2's van planten van klasse 4 (Pt_{66}36-19 ⊗, 37-4 ⊗, 40-38 ⊗ in tabel

TABEL 4.6. Bepaling van de correlatie tussen ouders en nakomelingen: Verdeling van planten over de fertiliteitsklassen 0...8 bij een aantal nakomelingschappen, verkregen na zelfbevruchting en onderlinge kruising van F_1-planten van verschillende fertiliteitsklasse uit tabel 4.4, groep MS-Snowball × R, in 1967.

Nakomelingschap 1967/ *Progeny 1967*	Fertiliteitsklasse van de ouderplant(en)/ *Fertility class of the parent(s)*		Aantal planten in fertiliteitsklasse:/ *Number of plants in fertility class:*											Vereenvoudigde classificatie/ *Simplified classification*		
	♀	♂	0	(0)	1	2	3	4	5	6	7	8	Tot.	0...1	2...5	6...8
Pt_{66} 37-6 ⊗	2		13	13	4	7	10	19	8	4	0	1	79	30	44	5
Pt_{66} 22-15 ⊗	3		10	28	1	15	6	8	3	1	4	2	78	39	32	7
Pt_{66} 22-35 ⊗	3		5	18	1	13	14	14	3	3	13	1	85	24	44	17
Pt_{66} 35-10 ⊗	3		7	7	2	7	13	16	5	5	7	11	80	16	41	23
Pt_{66} 35-11 ⊗	3		8	7	–	7	10	13	7	9	8	5	74	15	37	22
Pt_{66} 110-35 ⊗	3		16	16	5	11	8	7	3	3	3	2	74	37	29	8
Pt_{66} 110-38 ⊗	3		5	5	1	3	3	4	2	1	–	–	24	11	12	1
Pt_{66} 111-13 ⊗	3		1	14	2	5	3	5	2	2	2	3	39	17	15	7
Pt_{66} 111-20 ⊗	3		4	18	2	7	2	3	2	–	–	–	38	24	14	–
Pt_{66} 36-19 ⊗	4		2	3	1	9	3	21	17	10	5	7	78	6	50	22
Pt_{66} 37-4 ⊗	4		1	5	4	14	12	15	7	7	5	7	77	10	48	19
Pt_{66} 39-27 ⊗	4		1	13	2	14	9	10	10	9	5	7	80	16	43	21
Pt_{66} 40-38 ⊗	4		–	6	–	4	10	16	13	11	5	11	76	6	43	27
Pt_{66} 110-39 × 110-38	0	3	19	28	3	10	5	5	2	5	2	1	80	50	22	8
Pt_{66} 111-14 × 111-13	0	3	5	17	3	7	4	1	–	2	1	–	40	25	12	3
Pt_{66} 110-34 × 110-35	1	3	33	20	5	11	5	2	1	–	–	–	77	58	19	–
Pt_{66} 111-9 × 111-20	1	3	10	13	–	9	1	3	–	2	2	–	40	23	13	4
Pt_{66} 35-9 × 35 -10	1	3	18	9	1	22	7	12	2	4	2	1	78	28	41	7
Pt_{66} 35-12 × 35-11	1	3	21	3	5	14	8	8	5	8	5	2	79	29	35	15
Pt_{66} 38-9 × 38-7	0	4	18	15	2	7	13	8	4	4	4	2	77	35	32	10
Pt_{66} 36-20 × 36-19	1	4	17	6	3	7	9	15	6	6	6	4	79	26	37	16
Pt_{66} 37-16 × 37-4	1	4	17	10	6	20	7	14	2	3	2	–	81	33	43	5
Pt_{66} 38-8 × 38-7	1	4	15	11	3	4	9	19	7	6	3	2	79	29	39	11

Table 4.6. Determination of the correlation between parents and offspring: Distribution of plants over the fertility classes 0...8 in a number of progenies, obtained after selfing or mutual crossing of F_1-plants of different fertility class of table 4.4, group MS-Snowball × R, in 1967.

TABEL 4.7. Bepaling van de correlatie tussen ouders en nakomelingen: Verdeling van planten over de fertiliteitsklassen 0...8 bij een aantal nakomelingschappen verkregen na zelfbevruchting en onderlinge kruising van F_1-planten van verschillende fertiliteitsklasse uit tabel 4.4, groepen R × F-Snowball (boven) en R × Blue Bedder S. en G. (onder) in 1967. Bespreking in tekst.

Nakomelingschap 1967/ *Progeny 1967*	Fertiliteitsklasse van de ouderplant(en)/ *Fertility class of the parent(s)*		Aantal planten in fertiliteitsklasse:/ *Number of plants in fertility class:*										Vereenvoudigde classificatie/ *Simplified classification*		
	♀	♂	0	(0)	1	2	3	4	5	6	7	8	Tot. 0...1	2...5	6...8
Pt_{66} 28-12 ⊗	3		8	7	4	10	9	11	4	5	10	3	71	19	34	18
Pt_{66} 29-9 ⊗	3		–	2	1	–	6	4	1	1	2	2	19	3	11	5
Pt_{66} 100-17 ⊗	3		15	24	5	7	9	4	4	6	1	3	78	44	24	10
Pt_{66} 28-13 ⊗	4		4	5	3	12	12	16	2	11	7	7	79	12	42	25
Pt_{66} 29-20 ⊗	4		3	7	1	11	7	16	11	11	8	11	86	11	45	30
Pt_{66} 100-1 ⊗	4		6	13	5	1	8	14	6	7	6	8	74	24	29	21
Pt_{66} 100-2 ⊗	4		6	7	2	3	8	20	13	5	7	9	80	15	44	21
Pt_{66} 117-3 ⊗	4		9	15	6	5	11	14	2	2	5	8	77	30	32	15
Pt_{66} 117-10 ⊗	4		8	17	7	4	5	14	5	4	11	5	80	32	28	20
Pt_{66} 102-32 ⊗	3		15	7	5	10	4	10	4	4	5	15	79	27	28	24
Pt_{66} 102-38 ⊗	3		17	16	3	6	7	10	5	4	4	6	78	36	28	14
Pt_{66} 118-4 ⊗	4		18	19	4	4	6	3	3	3	3	15	78	41	16	21
Pt_{66} 118-20 ⊗	4		16	5	5	4	4	8	4	3	6	25	80	26	20	34
Pt_{66} 118-32 ⊗	4		11	10	–	3	1	9	6	5	6	29	80	21	19	40
Pt_{66} 102-33 × 102-32	0	3	21	18	2	9	5	7	2	1	3	10	78	41	23	14
Pt_{66} 102-1 × 102-38	0	3	31	24	5	3	4	3	2	2	1	2	77	60	12	5
Pt_{66} 118-10 × 118-4	1	4	13	19	4	5	2	11	1	4	4	17	80	36	19	25
Pt_{66} 118-5 × 118-20	1	4	15	17	1	7	6	13	3	4	7	5	78	33	29	16

Table 4.7. Determination of the correlation between parents and offspring: Distribution of plants over the fertility classes 0...8 in a number of progenies obtained after selfing and mutual crossing of F_1-plants of different fertility class of table 4.4, groups R × F-Snowball (above) and R × Blue Bedder S. en G. (below) in 1967. The parents of fertility class 4 probably represent two different genotypes. The one genotype gives rise to a F_2 having fairly small numbers of 'sterile' (classes 0...1) and 'fertile' (classes 6...8) plants, and a large number of 'partially fertile' (classes 2...5) plants, e.g. 28-13 ⊗, 29-20 ⊗ and 100-2 ⊗. The other genotype results in a F_2 having large numbers of 'sterile' and 'fertile' plants and a fairly small number of 'partially fertile' plants, e.g. 118-4 ⊗, 118-20 ⊗ and 118-32 ⊗.

TABEL 4.8. Bepaling van de correlatie tussen ouders en nakomelingen: Verdeling van planten over de fertiliteitsklassen 0...8 bij een aantal nakomelingschappen verkregen na zelfbevruchting of onderlinge kruising van planten van verschillende fertiliteitsklasse uit tabel 4.4, groepen pR × R (boven) en MS × R (midden), en na kruising tussen planten van de typen (MS × R) en R ⊗ (onder), in 1967.

Nakomelingschap 1967/ *Progeny 1967*	Fertiliteitsklasse van de ouderplant(en)/ *Fertility class of the parent(s)*		Aantal planten in fertiliteitsklasse:/ *Number of plants in fertility class:*											Vereenvoudigde classificatie/ *Simplified classification*		
	♂	♀	0	(0)	1	2	3	4	5	6	7	8	Tot.	0...1	2...5	6...8
Pt_{66} 31-4 ⊗	5		–	–	–	5	3	6	3	9	28	22	76	–	17	59
Pt_{66} 31-6 ⊗	5		1	6	–	2	5	6	5	13	25	15	78	7	18	53
Pt_{66} 31-33 ⊗	8		–	–	–	1	–	2	5	1	10	60	79	–	8	71
Pt_{66} 33-6 ⊗	2 (!)		10	6	1	6	5	8	1	8	16	19	80	17	20	43
Pt_{66} 33-33 ⊗	4		5	4	2	8	14	20	2	5	11	9	80	11	44	25
Pt_{66} 34-29 ⊗	4		11	2	1	3	5	19	2	10	15	9	77	14	29	34
Pt_{66} 34-31 ⊗	7		–	–	–	–	–	1	3	6	8	60	78	–	4	74
Pt_{66} 34-10 ⊗	8		–	–	–	–	1	–	2	1	11	65	80	–	3	77
Pt_{66} 33-34 × 33-33	0	4	22	9	7	6	6	13	2	3	5	7	80	38	27	15
Pt_{66} 34-5 × 34-29	0	4	15	4	8	6	3	9	5	4	10	13	77	27	23	27
Pt_{66} 34-5 × 34-10	0	8	6	3	2	4	12	18	5	6	11	13	80	11	39	30
Pt_{66} 34-40 × 34-31	0	7	3	–	4	4	13	18	2	4	16	16	80	7	37	36
Pt_{66} 34-5 × 26-10	0	8	2	–	2	1	4	16	8	8	19	20	80	4	29	47
Pt_{66} 34-40 × 26-10	0	8	–	2	2	4	8	14	2	11	15	21	79	4	28	47

Table 4.8. Determination of the correlation between parents and offspring: Distribution of plants over the fertility classes 0...8 in some progenies, obtained after selfing or mutual crossing of plants of different fertility class of table 4.4, groups pR × R (above) and MS × R (midst), and after crossing between plants of the types (MS × R) and R ⊗ (below), in 1967.

4.6, en 28-13 ⊗, 29-20 ⊗ in tabel 4.7) was het aantal steriele planten betrekkelijk gering, terwijl vrij veel planten in de drie hoogste fertiliteitsklassen vielen. Deze situatie werd ook gevonden bij de twee nakomelingschappen van planten van klasse 4 (33-33 ⊗ en 34-29 ⊗) in tabel 4.8. Een geheel afwijkende fertiliteitsverdeling werd gevonden bij de F_2's van de eveneens in klasse 4 geplaatste planten 118-4, 118-20 en 118-32 ((R × Blue Bedder S. en G.) ⊗ ; tabel 4.7). Zowel het aantal steriele als het aantal fertiele planten was hier groter dan het aantal partieel fertiele. Op grond van deze sterk verschillende verdeling over fertiliteitsklassen van de F_2's moet wel aangenomen worden, dat de fenotypisch ongeveer gelijkwaardige F_1-planten R × F-Snowball en R × Blue Bedder S. en G. van verschillend genotype zijn.

De fertiliteit van lijnen verkregen van planten van klasse 5 (Pt_{66}31-4 ⊗, 31-6 ⊗; tabel 4.8) was aanzienlijk hoger dan van alle nakomelingschappen van planten van lagere klassen. Bijna $\frac{3}{4}$ van de nakomelingen viel hier in de klassen 6...8. Een nog sterkere concentratie van planten in de drie hoogste fertiliteitsklassen werd gevonden bij de lijnen van planten der klassen 7 en 8 (Pt_{66}34-31 ⊗, 31-33 ⊗, 34-10 ⊗ in tabel 4.8). Een (geringe) mate van heterozygotie leek ook in deze Tk_1-ouderplanten nog aanwezig. Dit viel af te leiden uit het (weliswaar geringe) aantal partieel fertiele planten in de nakomelingschappen uit zelfbevruchting, en tevens uit het resultaat van de kruisingen 34-5 × 34-10 resp. 34-40 × 34-31 (tab. 4.8). De nakomelingschappen uit deze beide kruisingen waren iets minder fertiel dan die van 34-5 en 34-40 met de homozygoot hersteld fertiele plant Pt_{66}26-10. Uit het totaal aan gegevens bleek bovendien, dat de planten van klassen 7 en 8 waarschijnlijk hetzelfde genotype hadden.

In nakomelingschappen van kruisingen tussen planten van de klassen 0 of 1 en partieel fertiele planten van de klassen 3 of 4 was de fertiliteit duidelijk geringer dan in de F_2's van de vaderplanten. Men vergelijke in tabel 4.6 b.v. de nakomelingschappen Pt_{66}35-10 ⊗, 35-11 ⊗ en 36-19 ⊗ met resp. 35-9 × 35-10, 35-12 × 35-11 en 36-20 × 36-19. Dit houdt in, dat tussen planten van de klassen 0 en 1 enerzijds en die van de klassen 3 en 4 anderzijds genotypische verschillen bestonden. Planten van de klassen 0 en 1 leken genotypisch gelijk te zijn, aangezien geen verschillen in fertiliteit werden gevonden tussen nakomelingschappen van kruisingen 0 × 3 en 1 × 3 noch tussen die van 0 × 4 en 1 × 4 (tabel 4.6). De nakomelingschappen van de kruisingen 35-9 × 35-10 en 35-12 × 35-11 waren aanzienlijk fertieler dan die van de overige kruisingen 0 × 3 en 1 × 3 en kwamen vrij goed overeen met die van kruisingen 0 × 4 en 1 × 4. Dit resultaat gaf steun aan het vermoeden, dat de vaderplanten (35-10 en 35-11) hetzelfde genotype bezaten als de F_1-planten MS-Snowball × R, die in klasse 4 waren geplaatst (verg. pag. 38).

De fertiliteitsverdeling van de nakomelingschap Pt_{66}33-6 ⊗ (tab. 4.8) was merkwaardig. De ouderplant was slechts op twee van de elf beoordelingsdata enigermate fertiel, zodat ook in de nakomelingschap een vrij laag fertiliteitsniveau werd verwacht. De helft van de nakomelingen bleek echter in de drie hoogste fertiliteitsklassen te vallen. De mogelijkheid bestaat, dat de verkregen nakomelingschap van een andere plant dan Pt_{66}33-6 afkomstig was. Bij de veld-

TABEL 4.9. Verdeling van planten over de fertiliteitsklassen 0...8 bij een aantal nakomelingschappen van verschillend type, waarin MS-First Lady is betrokken, in 1967. Bespreking in tekst.

Nakomelingschap 1967/ *Progeny 1967*	Nakomelingschapstype van de ouderplant(en)/ *Progeny type of the parent(s)* ♀	♂	Aantal planten in fertiliteitsklasse:/ *Number of plants in fertility class:* 0	(0)	1	2	3	4	5	6	7	8	Tot.	Vereenvoudigde classificatie/ *Simplified classification* 0...1	2...5	6...8
Pt_{66} 4316-2 ⊗	MS-First Lady × R		10	–	2	4	1	8	3	7	2	13	50	12	16	22
Pt_{66} 4316-8 ⊗	MS-First Lady × R		8	3	3	11	3	13	6	11	5	17	80	14	33	33
Pt_{66} 4316-28 ⊗	MS-First Lady × R		15	3	3	16	3	17	8	7	1	7	80	21	44	15
Pt_{66} 4316-36 ⊗	MS-First Lady × R		7	4	1	8	9	14	8	9	5	15	80	12	39	29
Pt_{65} ES-50[a] × 4316-2	MS-Snowball	MS-First Lady × R	28	10	2	7	6	6	2	1	–	3	65	40	21	4
Pt_{65} ES-50[a] × 4316-8	MS-Snowball	MS-First Lady × R	41	11	1	11	3	7	3	3	–	–	80	53	24	3
Pt_{65} ES-50[a] × 4316-36	MS-Snowball	MS-First Lady × R	41	11	3	9	2	11	1	2	–	–	80	55	23	2
Pt_{66} 213-11 × 4316-2	MS-Blue Bedder	MS-First Lady × R	52	18	–	6	1	3	–	–	–	–	80	70	10	–
Pt_{66} 213-11 × 4316-8	MS-Blue Bedder	MS-First Lady × R	45	19	–	8	1	6	1	–	–	–	80	64	16	–
Pt_{66} 4316-2 × EF-8[a]	MS-First Lady × R	F-Snowball	50	14	–	9	2	5	–	–	–	–	80	64	16	–
Pt_{66} 4316-8 × EF-28[a]	MS-First Lady × R	F-Snowball	51	16	–	7	3	3	–	–	–	–	80	67	13	–
Pt_{66} 4316-36 × EF-28[a]	MS-First Lady × R	F-Snowball	24	6	–	3	1	3	2	–	–	–	39	30	9	–

Table 4.9. Distribution of plants over the fertility classes 0...8 in a number of progenies of different type, in which MS-First Lady was involved, in 1967. The distribution pattern of F_2-progenies (MS-First Lady × R) ⊗ closely resembles that of F_2's (MS-Snowball × R) ⊗ and (R × F-Snowball) ⊗ (see tables 4.6 and 4.7).

beoordelingen werd soms gevonden, dat in de loop van het seizoen naast een proefplant een tweede plant opgroeide, die mogelijk als kiemplantje of als zaad was meegevoerd. In de meeste gevallen werden de betreffende planten snel ontdekt op grond van bloemkleurverschillen of sterk van de eigenlijke proefplant afwijkende fertiliteitsexpressie, doch in enkele gevallen kan ontdekking achterwege gebleven zijn.

De in deze paragraaf beschreven resultaten van de toetsing van de betrouwbaarheid van de indeling in fertiliteitsklassen op grond van vele malen herhaalde beoordeling tonen aan, dat planten met hetzelfde genotype door milieuvariatie in verschillende, naast elkaar gelegen, fertiliteitsklassen, b.v. 3 en 4 of 7 en 8, terecht kunnen komen, doch dat planten in verder uiteenliggende klassen steeds verschillende genotypen bezitten. Ook is gebleken, dat fenotypisch niet onderscheiden planten vrij sterk verschillende genotypen kunnen hebben (R × F-Snowball resp. R × Blue Bedder S. en G. van klasse 4: zie pag. 42).

Tabel 4.9 geeft een overzicht van het in 1967 beoordeelde materiaal waarin MS-First Lady betrokken is. Aangezien het F_1-materiaal in het najaar van 1966 in de kas was beoordeeld (verg. pag. 34), was het niet mogelijk die planten, volgens de voor nakomelingschappen te velde geldende normen, te groeperen in de fertiliteitsklassen 0...8. De stabiele en relatief hoge fertiliteit van de F_1's MS-First Lady × R (zie pag. 34) kwam niet tot uiting in een geprononceerde fertiliteit in de F_2 (tabel 4.9). De verdeling over fertiliteitsklassen kwam sterk overeen met die van F_2's van bepaalde planten van klasse 4 uit kruisingen MS-Snowball × R en R × F-Snowball (tabellen 4.6 en 4.7). Dit betekent, dat het vooral het minder fluctuerende kasklimaat in het najaar van 1966 is geweest dat de stabiliteit en de relatief hoge fertiliteit van de F_1 veroorzaakte, en niet de aanwezigheid van een extra dosis fertiliteitherstellende factoren in MS-First Lady of een geringer steriliserend effect van het First Lady-plasma.

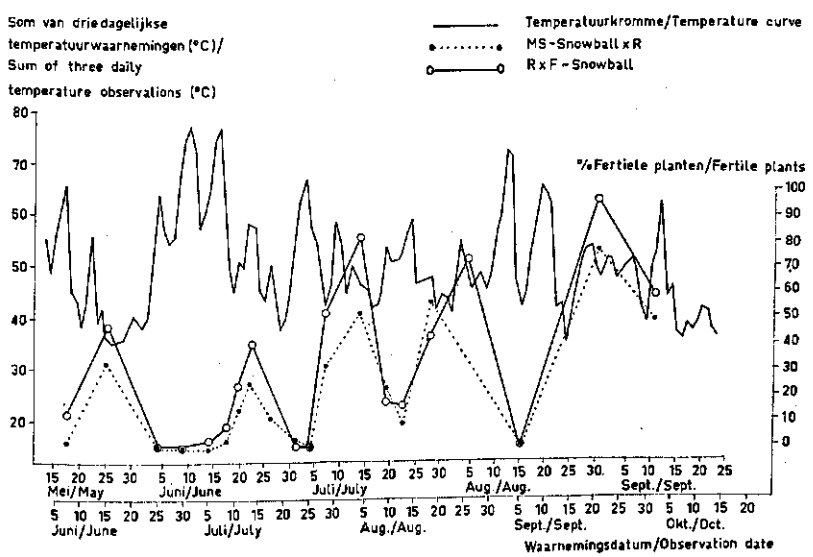
Geringe verschillen in fertiliteitsverdeling werden gevonden tussen enige nakomelingschappen van de typen MS-Snowball × (MS-First Lady × R), MS-Blue Bedder × (MS-First Lady × R) en (MS-First Lady × R) × F-Snowball; zie tabel 4.9. Alleen de nakomelingschappen met ES-50[a] als moederplant bevatten nog enkele planten van fertiliteitswaarden hoger dan 5. Het aantal cryptomere herstellergenen in ES-50[a] was dus vermoedelijk groter dan in de andere hier gebruikte steriele en normaal fertiele ouderplanten. Van alle nakomelingschappen viel meer dan de helft van de planten in de klassen 0 en (0). Aangezien in geval van monogene overerving een 1:1 splitsing was te verwachten, blijkt uit dit resultaat opnieuw, dat bij het herstel van fertiliteit meer dan een genenpaar is betrokken.

4.4. Fertiliteitsexpressie en milieu

In het voorgaande is de sterke invloed van de uitwendige omstandigheden op de fertiliteit en het fertiliteitsverloop bij herhaling gesignaleerd. Het lag voor de hand te veronderstellen, dat klimaatfactoren de belangrijkste rol speelden bij de beïnvloeding van de fertiliteit. Bij experimenten in het fytotron (zie hoofdstuk

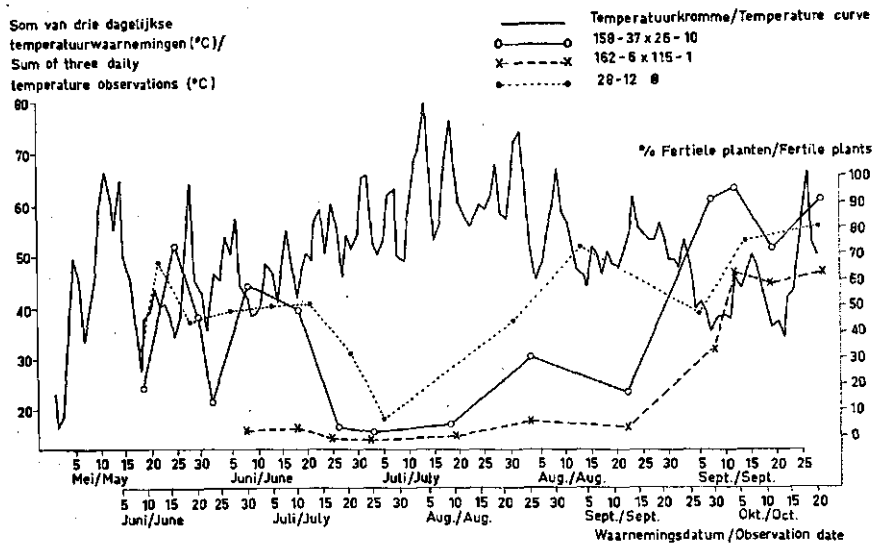
5) werd een duidelijk verband vastgesteld tussen de fertiliteitsexpressie van planten met herstellergenen in steriliserend plasma en de temperatuur. Daarbij bleek, dat de voor temperatuur gevoelige fase in de helmknopontwikkeling ongeveer samen viel met de meiotische delingen van de microsporen. De door een bepaalde temperatuur veroorzaakte fertiliteitsreactie manifesteerde zich in de open bloem na een periode, waarvan de duur afhankelijk was van het groeitempo van de bloemen na de temperatuur-inductie. Door het sterk fluctuerende milieu in het veld was een verband tussen temperatuur en fertiliteit hier minder duidelijk. Wel werd gevonden, dat perioden van warm weer na enige tijd worden gevolgd door een sterke toename van het aantal steriele planten, terwijl koel weer resulteert in een sterke toename van de fertiliteit. In de afb. 4.6 en 4.7 is het verband weergegeven tussen de som van drie dagelijkse temperatuurwaarnemingen (te 7.00, 14.00 en 19.00 uur) en het percentage min of meer fertiele planten in een aantal nakomelingschappen drie weken later. Temperatuurdalen corresponderen met pieken in de fertiliteitskromme, terwijl temperatuurpieken samenvallen met dalen in het fertiliteitsverloop. Men vergelijke ook afb. 4.2...4.5.

Het gevonden verband tussen temperatuur en fertiliteit verklaart de sterke toename van fertiliteit aan het einde van het groeiseizoen. Na augustus wordt de temperatuur gemiddeld lager, waardoor gunstige voorwaarden voor fertiliteitsexpressie ontstaan. In beide onderzoekjaren 1966 en 1967 bleek een groot



AFB. 4.6. Verband tussen de temperatuur en de fertiliteit drie weken later onder veldomstandigheden in 1966. Zie tekst.

Fig. 4.6. Relation between the temperature and the fertility three weeks afterwards under field conditions in 1966. High temperature periods are followed by a decrease, low temperature periods by an increase of fertility.



AFB. 4.7. Verband tussen de temperatuur en de fertiliteit drie weken later onder veldomstandigheden in 1967. Zie tekst.

Fig. 4.7. Relation between the temperature and the fertility three weeks afterwards under field-conditions in 1967.

aantal planten, met absolute steriliteit gedurende de zomermaanden, tijdens de laatste beoordelingen in september en oktober enig stuifmeel te hebben gevormd. Vooral in 1967 werd het opsporen van deze planten met zeer geringe fertiliteit herstellende werking intensief voortgezet (laatste beoordeling op 20-X). Desondanks blijft de mogelijkheid bestaan, dat een gedeelte van deze planten niet is herkend en tezamen met onder alle omstandigheden steriele planten in fertiliteitsklasse 0 of (0) terecht is gekomen. Alleen bij teelt onder constante voor de fertiliteit gunstige milieuomstandigheden kunnen planten met zeer geringe herstelwerking stelselmatig worden opgespoord (verg. hoofdstuk 5).

4.5. VERBAND TUSSEN HELMKNOPINHOUD EN KWALITEIT VAN HET STUIFMEEL BIJ PLANTEN UIT HET HERSTELLERMATERIAAL

Als norm voor de beoordeling van de fertiliteit van bloemen in het herstellermateriaal gold de inhoud van de helmknoppen, uitgedrukt in de fertiliteitswaarden 0...8 (verg. pag. 24). Bij bestudering van de helmknopinhoud onder het microscoop, vergr. 100×, bleek dat bij bloemen van fertiliteitswaarde 0 en 1 de degeneratie zo ver is voortgeschreden, dat nog maar zeer geringe aantallen als stuifmeel herkenbare elementen worden aangetroffen (zie tabel 4.10). De geringe aantallen herkenbare korrels bevestigden de macroscopisch bepaalde sterke mate van steriliteit bij de fertiliteitswaarden 0 en 1. Bij de hogere fertiliteitswaarden was het ondoenlijk om het aantal stuifmeelkorrels per helmknop te bepalen. Wel werd voor een aantal bloemen van alle fertiliteitswaarden het gemiddelde aantal als stuifmeel herkenbare elementen per 3 microscopische ge-

TABEL 4.10. Aantallen als stuifmeel herkenbare elementen per bloem (= 5 helmknoppen) bij 326 bloemen van fertiliteitswaarde 0 en bij 117 van fertiliteitswaarde 1, afkomstig van onvolledig hersteld fertiele planten na hoge temperatuur, in 1967.

Fertiliteitswaarde/ *Fertility value*	Aantal stuifmeelkorrels per 5 helmknoppen/ *Number of pollen grains per 5 anthers*							
	0	1–5	6–10	11–20	21–50	> 50	Tot.	
0	251	50	9	10	5	1	326	Aantal bloemen/
1	35	42	13	15	6	6	117	*Number of flowers*

Table 4.10. Numbers of elements recognizable as pollen grains per flower (= 5 anthers) of 326 flowers of fertility value 0 and of 117 of fertility value 1, from partially restored fertile plants after high temperature, in 1967.

TABEL 4.11. Gemiddeld aantal stuifmeelkorrels bij bloemen van de fertiliteitswaarden 0...8 (1 helmknop per bloem; aantal korrels per 3 gezichtsvelden bij vergr. 100×), benevens het laagste en hoogste aantal binnen iedere fertiliteitswaarde.

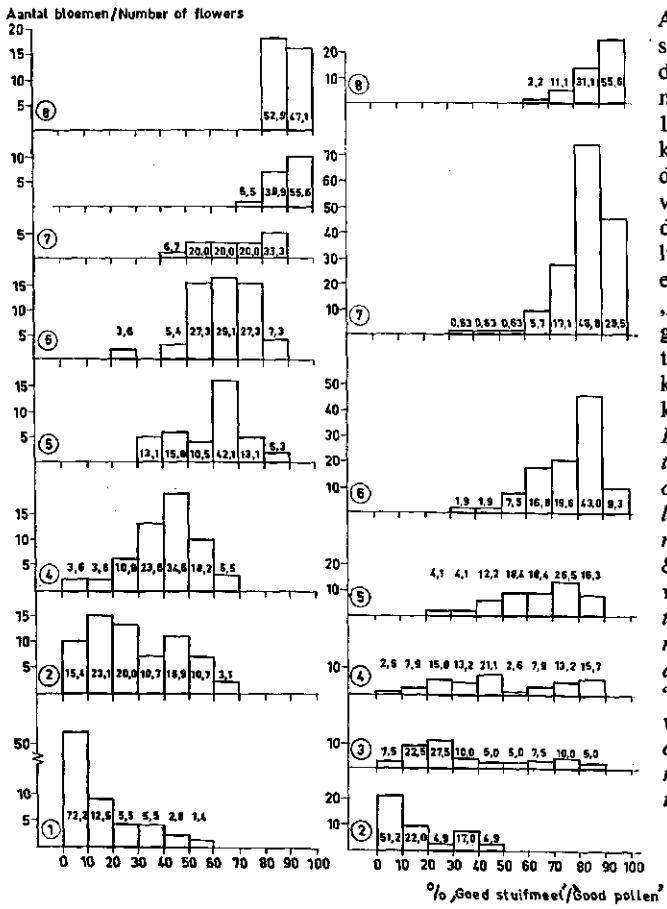
Fertiliteitswaarde/ *Fertility value*	Aantal beoordeelde bloemen/ *Number of flowers estimated*	Gemiddeld aantal stuifmeelkorrels per 3 gezichtsvelden/ *Average number of pollengrains per 3 view fields*	Uiterste waarden/ *Extreme values*
0	44	0,2	0–2
1	18	2,5	0–5
2	27	9,7	2–29
3	14	78,0	37–215
4	12	130,4	48–226
5	3	207,0	93–293
6	16	184,5	58–366
7	23	248,6	117–405
8	29	265,3	125–520

Table 4.11. Average number of pollen grains in flowers of the fertility values 0...8 (1 anther per flower; number of grains in 3 view fields, magn. ×100) with the smallest and the largest number within each fertility value.

zichtsvelden bepaald (tabel 4.11). Door de onregelmatige verspreiding van de helmknopinhoud over het praeparaat en door de sterke invloed van de hoeveelheid gebruikte vloeistof op het verdelingspatroon in het praeparaat en op de mate van uitvloeien van onder de dekglasranden, werden grote verschillen in aantal getelde korrels bij helmknoppen met dezelfde fertiliteitswaarde gevonden (zie uiterste waarden in tabel 4.11). Gemiddeld nam het aantal als stuifmeel herkenbare elementen per 3 gezichtsvelden van lage naar hoge fertiliteitswaarden echter geleidelijk toe.

Zowel in 1966 als in 1967 werd nagegaan of de ‚mate van vulling' van de helmknoppen samenhang vertoonde met de ‚kwaliteit van het stuifmeel'. Als criteria voor de kwaliteit golden de vorm van het stuifmeel en de kleurbaarheid in een oplossing van karmijnazijnzuur. Reeds door LANGE (1962) was vastgesteld, dat het kiemingspercentage van het stuifmeel slechts weinig lager is dan het percentage sterk kleurbare korrels.

Bij de kwaliteitsbepaling werd uitgegaan van op uiteenlopende data versgeplukte, juist geopende bloemen van willekeurige planten. Na bepaling van de fertiliteitswaarde van een bloem werd het stuifmeel van één helmknop in de kleurstofoplossing gebracht en onder het microscoop bij vergroting 100× beoordeeld. Als ‚goed' werden beschouwd sterk gekleurde korrels van normale grootte (ca. 40 μ), ovaalrond tot driehoekig van vorm, met duidelijk zichtbare kiemporiën. Alle overige korrels werden als ‚slecht' gewaardeerd. In 1966 werden per praeparaat ongeveer 200 korrels geteld, waaruit vervolgens het percentage ‚goede' korrels werd berekend. Alleen bij bloemen van fertiliteitswaarde 1 moest meestal met veel geringere aantallen korrels worden volstaan, zodat de hieruit berekende percentages ‚goede' korrels weinig betrouwbaar zijn. Bij de herhaling van het experiment in 1967 werd de betrouwbaarheid van de berekende percentages vergroot door verhoging van het aantal getelde korrels per praeparaat tot ongeveer 400. Ter verkrijging van zo grote aantallen korrels werd bij bloemen van fertiliteitswaarde 2 de inhoud van meer dan één helmknop



AFB. 4.8. Verband tussen hoeveelheid en hoedanigheid van het stuifmeel in 1966 (links) en 1967 (rechts). De omcirkelde cijfers 8...1 geven de fertiliteitswaarden van de bloemen weer. Op de ordinaat is het absolute aantal bloemen met een bepaald percentage ‚goed' stuifmeel weergegeven, terwijl het procentuele aandeel van elke kolom in of boven de kolom is vermeld.

Fig. 4.8. Relation between quantity and quality of pollen in 1966 (on the left) and 1967 (on the right). The ringed figures 8...1 represent the fertility values of the flowers. On the ordinate the absolute number of flowers with a certain percentage of 'good' pollen has been given, while the percentage of each column has been mentioned inside or above the column.

genomen, terwijl bloemen van fertiliteitswaarde 1 buiten beschouwing bleven.

Tussen de in 1966 en 1967 verkregen resultaten, samengevat in de blokdiagrammen van afb. 4.8, bestonden geen essentiële verschillen. Bij bloemen met hoge fertiliteitswaarde was ook het percentage ‚goed' stuifmeel meestal zeer hoog. Naarmate de fertiliteitswaarde lager werd, nam het gemiddeld percentage ‚goed' stuifmeel geleidelijk af. Voor de fertiliteitswaarden 5...2 werd een brede spreiding van de percentages ‚goed' stuifmeel gevonden. Op de mogelijke oorzaken hiervan zal in hoofdstuk 5 nader worden teruggekomen.

4.6. Samenvatting en discussie

Hoewel de sterke invloed van de uitwendige omstandigheden een enigszins dieper gaande genetische analyse onmogelijk maakte, kon in dit hoofdstuk worden vastgesteld, dat herstel van fertiliteit bij planten met steriliserend plasma wordt bepaald door meer dan één factorenpaar. Naast een of enkele, onvolledig dominant of intermediair werkende factor(en) met een sterke herstelwerking, zgn. hoofdfactoren, aanwezig in de hersteld fertiele planten, werd het bestaan van cryptomere factoren voor fertiliteitsherstel met vrij grote zekerheid aangetoond. Deze cryptomere factoren kwamen in verschillend aantal of sterkte voor in de steriele en de normaal fertiele uitgangsrassen, en kwamen tot uiting als verschilllen in fertiliteitsniveau van de diverse F_1's MS × R en R × F. Binnen het plasmatisch steriele fenotype werd empirisch het bestaan van tenminste drie, doch vermoedelijk meer, verschillende genotypen voor fertiliteitsherstel vastgesteld, in volgorde van toenemend aantal of sterkte van de cryptomere herstellerfactoren:

1. Het genotype aanwezig in het merendeel van de in 1966 gebruikte planten van MS-Blue Bedder; zie pag. 32.
2. Het genotype aanwezig in MS-Snowball, waarbij vermoedelijk nog onderscheid moet worden gemaakt tussen het genotype van de planten ES-31[a], -33[a], -43[a] aan de ene kant en dat van ES-44[a] en ES-50[a] aan de andere kant; zie pag. 32.
3. Het genotype aanwezig in de MS-Rosy Morn planten. Enkele planten van dit ras bleken zelfs enigszins fertiel te zijn; zie pag. 35.

Een nog hoger niveau van cryptomere herstellerfactoren werd gevonden in steriele planten uit het herstellermateriaal van 1965; zie pag. 35.

Cryptomere verschillen in aantal of sterkte van de herstellergenen kwamen ook voor bij volledig hersteld fertiele planten. De verschillen uitten zich niet in de van deze planten verkregen lijnen (alle vrij uniform fertiel), doch pas na kruising van verschillende hersteld fertiele planten met dezelfde steriele of normaal fertiele planten, zie pag. 32.

Hamilton (1965) verklaarde de verschillen in temperatuurgevoeligheid van de door hem onderzochte herstellerlijnen (zie pag. 21) door de aanwezigheid van een thermolabiele herstellerfactor in de ene lijn, en een thermostabiele herstellerfactor in de andere lijn aan te nemen. Vermoedelijk waren echter ook hier verschillen in aantal of sterkte van cryptomere herstellergenen verantwoorde-

lijk voor de gevonden verschillen in fertiliteitsexpressie. Het door EDWARDSON en WARMKE (1967) beschreven geval van monogene, dominante overerving van fertiliteitsherstel bij petunia kan op twee manieren worden verklaard. De mogelijkheid bestaat, dat de in hun herstellermateriaal aanwezige hoofdfactor zo sterk is, dat hij alleen een volledig en voor temperatuur ongevoelig fertiliteitsherstel bewerkt. Het is echter ook mogelijk, dat in beide ouders een vrij hoog niveau van dezelfde (homozygote) cryptomere herstellergenen aanwezig was. Het feit, dat onder bepaalde omstandigheden de steriele planten voldoende stuifmeel voor het realiseren van zelfbevruchting vormden, maakt de laatste veronderstelling waarschijnlijk.

De bij petunia aangetroffen situatie zal ongetwijfeld ook bij andere gewassen met gecompliceerd herstelmechanisme voorkomen. Zo kunnen b.v. de door OLDEMEYER (1957) bij de biet, na kruising van verschillende steriele moederplanten met dezelfde herstellerplant, waargenomen verschillen in verhouding tussen fertiele, partieel fertiele en steriele F_1-planten verklaard worden door verschillen in aantal of sterkte van cryptomere herstellergenen bij de mannelijk steriele moederplanten (verg. ROHRBACH, 1965[b]). Ook de verwarring omtrent aantal en werking van de bij het herstel van fertiliteit betrokken genen bij de biet, sorghum, wortel enz. (verg. pag. 5) is ongetwijfeld terug te voeren op al dan niet cryptomere genetische verschillen tussen het door diverse onderzoekers gebruikte uitgangsmateriaal en op de methodiek van waarneming. Het onderzoek bij petunia heeft aangetoond, dat nauwkeurige studie van mannelijke steriliteit en fertiliteitsherstel een grote reeks van waarnemingen aan hetzelfde materiaal vereist, en dat conclusies, gebaseerd op geringe aantallen waarnemingen, zeer misleidend kunnen zijn.

De steriliserende plasmata van MS-Snowball, MS-Blue Bedder, MS-First Lady en MS-Rosy Morn vertoonden alle nagenoeg dezelfde reactie op het herstellercomplex, zodat zij waarschijnlijk van dezelfde oorsprong zijn.

5. EXPERIMENTEN MET HET HERSTELLER-MATERIAAL ONDER BEHEERSTE OMSTANDIGHEDEN

5.1. Inleiding

In het vorige hoofdstuk is aangetoond, dat de temperatuur een sterke invloed uitoefent op de fertiliteitsexpressie bij planten met steriliserend plasma gecombineerd met fertiliteit herstellende genen. De invloed van de temperatuur is nader geanalyseerd in een aantal experimenten in de klimaatkamers van het fytotron van het Laboratorium voor Tuinbouwplantenteelt der Landbouwhogeschool, Wageningen. Hierbij werd getracht een antwoord te vinden op de volgende vragen:

1. Hoe is de invloed van de temperatuur op de mate van fertiliteit bij verschillende genotypen voor fertiliteitsherstel?
2. Op welk moment grijpt de temperatuur op de microsporenontwikkeling in?
3. Hoe is de kwaliteit van het bij verschillende temperaturen aan eenzelfde plant gevormde stuifmeel?

De invloed van de temperatuur op de fertiliteit werd nagegaan door een aantal klonen van uiteenlopend genotype bloot te stellen aan een reeks van constante temperaturen bij vrijwel constante relatieve luchtvochtigheid. Een gedeelte van de klonen werd ook behandeld met binnen ieder etmaal afwisselend hoge en lage temperatuur. De reacties van klonen in het fytotron werden steeds vergeleken met die van de uitgangsplanten, welke onder natuurlijke omstandigheden groeiden. Het tijdstip, waarop de temperatuur op de microsporenontwikkeling ingrijpt, kon bij benadering worden bepaald door planten met gemerkte bloemknoppen van verschillende grootte te verplaatsen naar een temperatuurregime met een in vergelijking met de oorspronkelijke behandeling sterk contrasterende fertiliteitsreactie, en vast te stellen bij welke knopgrootte de nieuwe reactie werd geïnduceerd. De kwaliteit van het bij diverse temperaturen aan een plant gevormde stuifmeel werd bepaald door bestudering van de hoeveelheid, en van de vorm en kleurbaarheid met karmijnazijnzuur van het in de helmhokjes aanwezige stuifmeel.

Op kleinere schaal werd ook de mogelijkheid van beïnvloeding van de fertiliteit door verschillen in belichtingstijd (=daglengte) onderzocht. De proefomstandigheden in de klimaatkamers zijn beschreven op pag. 14.

5.2. De invloed van temperatuur en daglengte op de fertiliteit

5.2.1. *Constante temperatuur*

In het eerste experiment (1966) werd uitgegaan van 9 klonen, afkomstig van planten met verschillende fertiliteitsexpressie onder veldomstandigheden (zie tabel 5.1). De klonen I en II waren afkomstig van homozygoot hersteld fertiele planten en vertegenwoordigden de hoogste graad van fertiliteitsherstel, die in

TABEL 5.1. Gemiddelde fertiliteitswaarden en fertiliteitsklasse van de uitgangsplanten van de in het eerste fytotron-experiment gebruikte klonen onder veldomstandigheden in 1966.

Plantnr./ *Plant No.*	Nakomelingschaps-type/ *Progeny type*	Gemiddelde fertiliteitswaarde op:/ *Average fertility value on:*													Fertiliteits-klasse/ *Fertility class*
		8-VI	14-VI	1-VII	8-VII	12-VII	15-VII	18-VII	23-VII	27-VII	3-VIII	9-VIII	10-IX	20-IX	
I	R ⊗	3,0	–,–	5,0	–,–	–,–	5,0	–,–	6,0	–,–	6,3	5,0	–,–	–,–	8
III	R × F-Snowball	0,0	5,0	0,0	0,0	3,0	4,0	0,0	0,0	2,5	7,0	1,9	–,–	–,–	4
IV	R × F-Snowball	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	–,–	–,–	–,–	–,–	–,–	–,–	–,–	1,0	(0)
V	(MS × R) × R	0,0	–,–	2,0	5,0	3,0	–,–	1,0	3,7	–,–	6,3	–,–	2,0	7,0	5
VI	MS Snowball × R	0,0	3,0	0,0	2,0	5,0	0,0	0,0	0,0	4,0	6,0	0,3	–,–	5,3	4
VII	MS-Snowball × R	0,0	0,0	0,0	–,–	3,0	1,0	1,5	0,0	1,7	4,0	0,3	–,–	3,2	4
VIII	F-Snowball	6,3	–,–	6,0	–,–	–,–	7,2	–,–	6,7	–,–	6,7	7,0	–,–	–,–	–
IX	MS-Snowball	0,0	–,–	0,0	–,–	–.–	0,0	–,–	0,0	–,–	0,0	0,0	–,–	–,–	–

Table 5.1. Average fertility values and fertility class of the plants from which the clones used in the first phytotron experiment derived in field conditions in 1966.

het proefmateriaal voorhanden was. Kloon II viel tijdens de behandeling uit wegens zeer geringe en abnormale bloemvorming. De klonen III...VII vertegenwoordigden genotypen met partieel fertiliteitsherstel. Naast de herstellergenotypen werden een normaal fertiele (F-Snowball, kloon VIII) en een steriele (MS-Snowball, kloon IX) controle-kloon bestudeerd. De klonen werden behandeld bij een reeks constante temperaturen van 9...24°C, met intervallen van 3°C. De belichtingsduur was ongeveer 20 uren per etmaal. Ter verhoging van de betrouwbaarheid van de resultaten werden per behandeling 4 kloonindividuen opgenomen. Bovendien kon op deze wijze worden nagegaan, of tussen planten van eenzelfde kloon verschillen in reactie optraden, die op het bestaan van sectoriële plasmaverschillen in de uitgangsplanten zouden kunnen wijzen.

De fertiliteit van de klonen I...IX bij de verschillende temperaturen in het fytotron is weergegeven in tabel 5.2. In deze tabel werden alleen bloemen opgenomen, waarvan met zekerheid vaststond, dat zij volledig in het fytotron waren ontwikkeld. De controle-kloon F-Snowball was bij de temperaturen 18 en 21°C even fertiel, en bij 24°C iets minder. Bij 15°C werd een vrij duidelijke daling van de fertiliteit waargenomen, terwijl bij de lagere temperaturen (12 en 9°C) geen bloemen werden gevormd. De fertiliteit was bij alle temperaturen vrij variabel (fertiliteitswaarden 3...8), terwijl, mede door het bijna ontbreken van fertiliteitswaarde 8, de gemiddelde fertiliteit vrij laag was. Deze matige fertiliteit hing vermoedelijk samen met de eerder besproken inteeltverzwakking in het F-Snowball materiaal (verg. pag. 37). De controle-kloon MS-Snowball bleek bij alle temperaturen volledig steriel te zijn. Bij de overige klonen werd een duidelijk verband tussen fertiliteitsexpressie en temperatuur gevonden. De homozygoot, hersteld fertiele kloon I was bij 18 en 21°C zeer goed fertiel; de gemiddelde fertiliteitswaarde was bij deze temperaturen hoog, terwijl de spreiding van bloemen over de fertiliteitswaarden 0...8 vrij gering was. Bij lagere temperaturen (15 en 12°C) werd een lagere gemiddelde fertiliteitswaarde en een sterkere spreiding der waarden gevonden, terwijl ook bij 24°C de fertiliteit iets leek af te nemen. Bij de klonen met partieel fertiliteitsherstel werd de hoogste gemiddelde fertiliteit en de geringste spreiding over fertiliteitswaarden aangetroffen bij lagere temperaturen (meestal 12 en 15°C, soms ook 18°C); bij hoge temperaturen (24 en 21°C) waren deze klonen volledig of bijna volledig steriel (foto 5). Tussen het fertiele en het steriele temperatuurgebied werd een overgangsgebied gevonden met uitermate variabele fertiliteit. Dit overgangsgebied tussen goed fertiel en (bijna) steriel lag bij kloon IV vermoedelijk al tussen 15 en 18°C, bij de klonen III, VI en VII rond 18°C, en bij kloon V bij 21°C. Bij de meeste partieel fertiele klonen (III, V, VI en VII) werd bij lage temperaturen (vooral 9°C) weer een zekere afname van de fertiliteit vastgesteld. Aangezien bij temperaturen beneden 12°C weinig of geen bloemen meer tot ontwikkeling kwamen was het fertiliteitsverloop hier niet verder te volgen. Duidelijke verschillen tussen planten van een kloon bij dezelfde behandeling werden niet gevonden, d.w.z. er werden geen aanwijzingen voor het bestaan van sectoriële plasmatische verschillen verkregen.

Tussen de fertiliteit van de klonen in het fytotron (tabel 5.2) en die van de

TABEL 5.2. Verdeling van beoordeelde bloemen over de fertiliteitswaarden 0...8 en gemiddelde fertiliteitswaarde bij de klonen van het eerste fytotron-experiment. Bloemen van de 4 kloonindividuen per behandeling werden tezamen genomen. Zie tabel 5.1 en tekst.

Kloonnr./ *Clone No.*	Behandeling/ *Treatment*	Aantal beoordelingsdata/ *Number of observation dates*	Aantal gewaardeerde bloemen/ *Number of estimated flowers*	Aantal bloemen met fertiliteitswaarde:/ *Number of flowers of fertility value:*									Gemiddelde fertiliteitswaarde/ *Average fertility value*
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	
VIII	12°C	1	1	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–,–
VIII	15°C	8	20	–	–	–	3	3	8	3	3	–	5,0
VIII	18°C	15	43	–	–	–	1	1	8	7	24	2	6,3
VIII	21°C	21	65	–	–	–	2	2	13	4	44	–	6,3
VIII	24°C	15	49	–	–	1	10	–	6	3	26	3	5,8
IX	12°C	7	20	20	–	–	–	–	–	–	–	–	0,0
IX	15°C	7	12	12	–	–	–	–	–	–	–	–	0,0
IX	18°C	18	89	89	–	–	–	–	–	–	–	–	0,0
IX	21°C	21	137	137	–	–	–	–	–	–	–	–	0,0
IX	24°C	11	39	39	–	–	–	–	–	–	–	–	0,0
I	12°C	9	59	–	2	14	19	2	12	9	1	–	3,7
I	15°C	11	48	–	–	–	10	5	13	11	7	2	5,1
I	18°C	21	221	–	–	–	1	1	7	18	143	51	7,1
I	21°C	22	204	–	–	–	–	–	1	9	143	51	7,2
I	24°C	19	216	–	–	1	1	–	13	30	154	17	6,8
III	9°C	3	9	–	–	–	–	–	1	5	3	–	6,2
III	12°C	10	117	–	–	–	–	–	–	3	67	47	7,4
III	15°C	12	156	–	–	–	2	–	1	–	87	66	7,4
III	18°C	21	228	12	14	37	89	10	25	18	23	–	3,5
III	21°C	24	314	266	36	11	1	–	–	–	–	–	0,2
III	24°C	20	210	210	–	–	–	–	–	–	–	–	0,0

IV	12°C	10	74	–	–	–	–	–	3	8	61	2	6,8
IV	15°C	9	85	–	–	–	–	1	8	5	66	5	6,8
IV	18°C	21	243	121	56	44	19	3	–	–	–	–	0,9
IV	21°C	24	308	305	3	–	–	–	–	–	–	–	0,0
IV	24°C	16	217	217	–	–	–	–	–	–	–	–	0,0
V	12°C	10	60	–	–	–	14	4	14	24	4	–	5,0
V	15°C	12	65	–	1	–	–	–	8	21	35	–	6,3
V	18°C	20	299	–	3	6	27	8	48	67	140	–	5,9
V	21°C	25	262	42	37	26	43	10	56	25	23	–	3,2
V	24°C	22	233	169	50	13	1	–	–	–	–	–	0,3
VI	9°C	3	14	–	–	–	–	1	3	3	7	–	6,1
VI	12°C	10	135	–	–	–	–	–	1	6	92	36	7,2
VI	15°C	12	155	–	–	–	–	–	–	2	89	64	7,4
VI	18°C	20	255	4	8	25	42	19	40	20	86	11	5,0
VI	21°C	23	334	125	70	57	58	7	11	1	5	–	1,4
VI	24°C	19	263	263	–	–	–	–	–	–	–	–	0,0
VII	9°C	2	14	–	–	1	1	3	4	2	3	–	5,0
VII	12°C	11	100	–	–	–	–	–	–	5	67	28	7,2
VII	15°C	9	125	–	–	–	–	–	6	3	71	45	7,2
VII	18°C	23	227	31	25	60	84	6	11	7	3	–	2,4
VII	21°C	24	301	278	20	3	–	–	–	–	–	–	0,1
VII	24°C	16	234	234	–	–	–	–	–	–	–	–	0,0

Table 5.2. Distribution of estimated flowers over the fertility values 0...8 and average fertility value of the clones of the first phytotron experiment. Flowers of the four clonal individuals of each treatment were taken together. See table 5.1 and text.

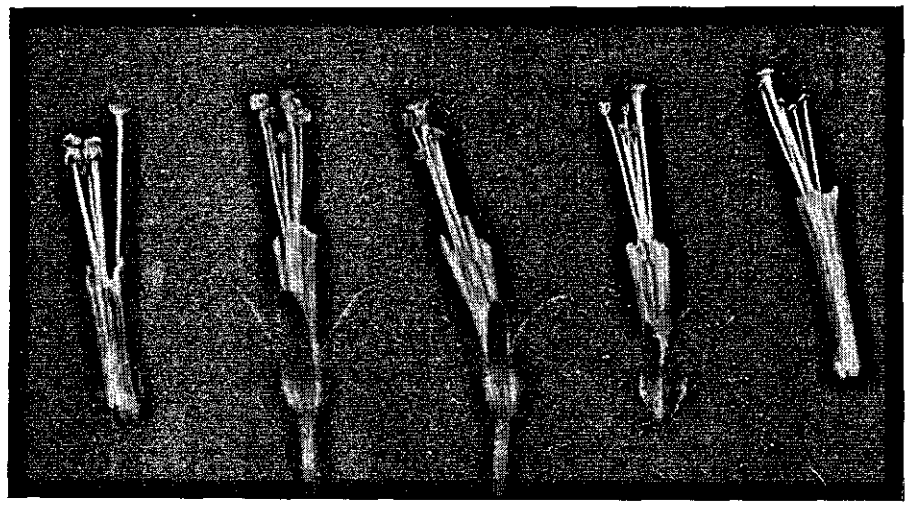


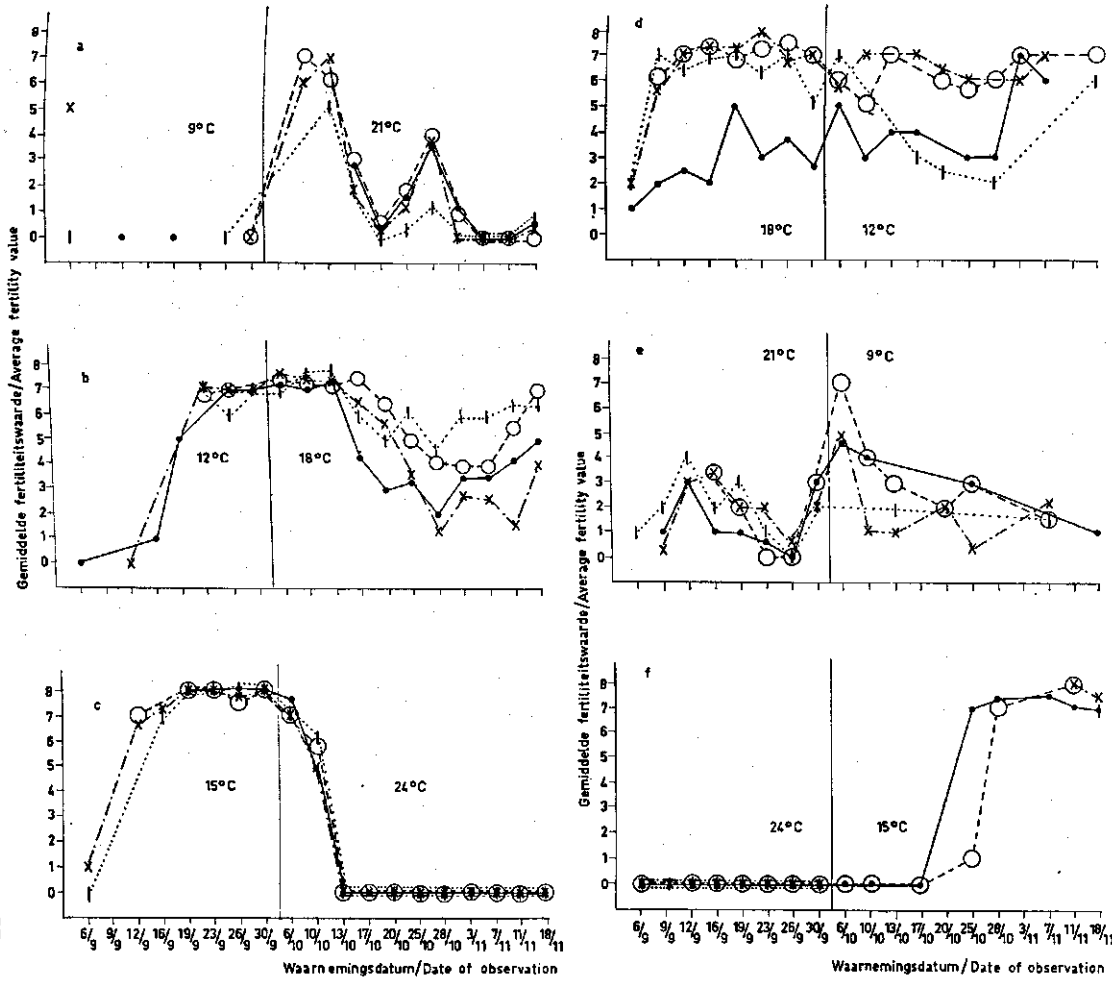
FOTO 5. Afnemende fertiliteit van een partieel hersteld fertiele plant bij oplopende constante temperatuur, v.l.n.r. bij 12, 15, 18, 21 en 24 °C.

Plate 5. Decreasing fertility of a partially restored fertile plant at rising constant temperature, from left to right at 12, 15, 18, 21 and 24 °C.

uitgangsplanten in het veld (tabel 5.1) bestond een duidelijk verband. Plant I was in het veld steeds min of meer fertiel (fertiliteitsklasse 8); ook in het fytotron werd bij alle temperaturen een zekere mate van fertiliteit gevonden. Plant V (fertiliteitsklasse 5) was in het veld gemiddeld fertieler dan de nrs. III, VI en VII (alle klasse 4); in het fytotron bleek kloon V pas bij 24 °C bijna volledig steriel, terwijl de klonen III, VI en VII al bij 21 °C in hoge mate steriel waren. Plant IV moest op grond van de veldbeoordelingen (gering aantal) als (0) worden geclassificeerd. In het fytotron bleek de hiervan verkregen kloon alleen bij 12 en 15 °C goed fertiel, terwijl al bij 18 °C bijna volledige steriliteit werd waargenomen.

De verkregen gegevens duiden erop, dat de fertiliteit van planten met fertiliteit-herstellende genen in steriliserend plasma volgens een optimumkromme verloopt. De optimumtemperatuur is hoog bij volledig hersteld fertiele planten en verschuift naar lagere waarden naarmate het herstelniveau van een plant lager is. Een hoge optimumtemperatuur gaat samen met een breed fertiliteitstraject (fertiliteit bij vele der fytotrontemperaturen), zoals in kloon I; bij een lage optimumtemperatuur wordt een smaller fertiliteitstraject (fertiliteit bij slechts enkele der temperaturen) gevonden, zoals vooral in kloon IV, en in mindere mate in III, VI en VII.; zie afb. 5.2.

Overplaatsing van de kloonindividuen naar een ander temperatuurregime resulteerde na enige tijd in een omslag naar het bij de nieuwe temperatuur behorende fertiliteitsniveau (zie afb. 5.1). Uit niet in de grafieken tot uiting komende détailgegevens leek te volgen, dat bij overgang van lage naar hoge temperatuur (9 °C→21 °C, 15 °C→24 °C) de omslag zeer abrupt plaats vindt (verg.



AFB. 5.1. Grafische voorstelling van de gemiddelde fertiliteitswaarden per waarnemingsdatum bij continue behandeling in de temperatuurreeks 9...24 °C, en de reactie op overplaatsing naar nieuwe temperatuurregimes, van telkens vier kloonindividuen van de heterozygoot hersteld fertiele plant VI. Bespreking in tekst.

Fig. 5.1. Diagram of the average fertility values per observation date in continuous treatment at temperatures of the series 9...24°C, and the response to moving to new temperature regimes, of each time four clonal individuals of the heterozygous restored plant VI. Fertility is very high and hardly variable at 15°C, while at 24°C the clone is absolutely sterile. At the remaining temperatures fertility is incomplete and very variable.

pag. 63), d.w.z. enige tijd na temperatuurwisseling werden aan eenzelfde partieel herstelde plant naast zeer fertiele ook volledig steriele bloemen aangetroffen, terwijl bloemen met een tussen deze uitersten liggende fertiliteit vrijwel ontbraken. Bij overgang van hoge naar lage temperatuur (21 °C→9 °C; 24 °C→15 °C) en van lage naar gematigde temperatuur (12 °C→18 °C) ging de omslag meer geleidelijk; hier kwamen naast bloemen met de oude en bloemen met de nieuwe fertiliteitsexpressie enige tijd verschillende overgangstypen voor.

Uit de grafieken van afb. 5.1 blijkt, dat de reactie van verschillende kloonindividuen binnen dezelfde behandeling i.h.a. vrij uniform was. Daarom werd in de volgende experimenten volstaan met één plant per behandeling.

Het fytotronexperiment werd in 1967 herhaald met 25 klonen (zie tabel 5.3; 1...26, nr. 9 uitgevallen), waaronder 2 fertiele en 4 steriele controle-klonen (nrs. 21...26). De uitgangsplanten van deze klonen werden in tweeën gedeeld en tijdens de bloei zowel in de kas als in het veld op fertiliteit beoordeeld (tabel 5.3). Aangezien de klonen reeds vóór de bloei van de uitgangsplanten gemaakt werden, waren toevalligerwijze bepaalde fertiliteitsklassen goed vertegenwoordigd (b.v. klassen 2 en 8), terwijl andere geheel ontbraken (klassen 5 en 7). De belichtingsduur werd in het tweede experiment om technische redenen teruggebracht tot 16 uur per etmaal, terwijl de behandeling bij 9 °C kwam te vervallen.

Evenals in het eerste experiment vertoonden de homozygoot hersteld fertiele planten (klonen 1 en 2) bij alle temperaturen een zekere mate van fertiliteit, met het optimum bij 18 en 21 °C (tabel 5.4, linker gedeelte). De afname van de fertiliteit bij 24 °C was hier duidelijker dan in het eerste experiment. De fertiliteit van kloon 18, waarvan de uitgangsplant evenals die van de beide vorige klonen in fertiliteitsklasse 8 was ingedeeld, was bij 24 °C nog maar zeer gering, terwijl de fertiliteit het hoogst was bij 18 °C. Bij de klonen van planten uit fertiliteitsklasse 6 (nrs. 3, 7 en 17) was de fertiliteit bij 15 en 18 °C zeer hoog; bij hogere temperaturen nam de fertiliteit sterk af, terwijl bij 12 °C alleen voor kloon 17 een duidelijke teruggang van de fertiliteit werd gevonden.

De meeste klonen van planten uit fertiliteitsklassen 0...4 (zie tabel 5.3) waren optimaal fertiel bij 15 °C (tabel 5.4, linker gedeelte); alleen de nrs. 4 en 5 (beide klasse 0) waren bij 12 °C fertieler dan bij 15 °C. Het niveau van de optimale fertiliteit vertoonde echter grote verschillen. Dit was hoog in alle klonen van nakomelingen uit kruisingen tussen herstellerplanten en MS- en F-Snowball (nrs. 4, 5, 6, 8, 13, 14, 19, 20; fertiliteitsklassen 0...4), doch laag bij klonen van F_1 en F_2-nakomelingen uit kruisingen MS-Blue Bedder × R (nrs. 10, 11, 12, 15, 16; fertiliteitsklassen 0...3). Bij nakomelingen van een terugkruising (MS-Blue Bedder × R) × R (klonen 17 en 18), was het niveau van de optimale fertiliteit weer hoog. Een laag niveau van de optimale fertiliteit ging niet altijd samen met een geringe breedte van het fertiliteitstraject. Zo was b.v. kloon 12 alleen bij 24 °C volledig steriel, ofschoon de optimale gemiddelde fertiliteitswaarde slechts 2,8 bedroeg (zie tabel 5.4). Men vergelijke hiermee b.v. het fertiliteitsverloop bij de klonen 6 en 8.

De klonen van de onder kas- en veldomstandigheden volledig steriele planten

TABEL 5.3. Tweede fytotron-experiment. Gemiddelde fertiliteitswaarden, in de kas en in het veld in 1967, van de in tweeën gedeelde uitgangsplanten der klonen 1....26 (zie tabel 5.4), en de op grond van kas- en veldwaarnemingen toegekende fertiliteitsklasse.

Plantnr./ *Plant No.*	Nakomelingschapstype/ *Progeny type*	Gemiddelde fertiliteitswaarde op:/ *Average fertility value on:*								Fertiliteits-klasse/ *Fertility class*
		kas/*greenhouse*				veld/*field*				
		24-IV	8-V	25-V	12-VIII	14-VII	1-VIII	12-VIII	31-VIII	
1	R ⊗	7,0	7,5	7,7	–,–	4,0	3,4	5,3	5,0	8
2	R ⊗	–,–	7,0	7,0	–,–	5,7	3,6	4,3	4,7	8
3	(R × F-Snowball) ⊗	7,0	7,3	6,0	2,8	4,3	1,6	4,0	7,3	6
4	(R × F-Snowball) ⊗	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
5	(R × F-Snowball) ⊗	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
6	(MS-Snowball × R) ⊗	2,0	2,3	1,0	–,–	2,0	0,0	0,0	2,3	4
7	(MS-Snowball × R) ⊗	7,0	7,5	4,8	–,–	3,0	2,4	6,3	7,0	6
8	(MS-Snowball × R) ⊗	1,3	2,0	0,0	–,–	0,3	0,0	0,0	2,7	3
10	(MS-Blue Bedder × R) ⊗	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	1
11	(MS-Blue Bedder × R) ⊗	0,0	0,0	0,0	–,–	0,0	0,0	0,0	0,7	1
12	(MS-BlueBedder × R) ⊗	1,5	1,4	0,0	–,–	1,2	0,6	0,2	1,0	3
13	MS Snowball × R	0,0	0,2	0,0	–,–	0,0	0,0	0,0	3,0	2
14	MS-Snowball × R	2,0	0,7	0,0	–,–	0,3	0,0	0,0	–,–	2
15	MS-Blue Bedder × R	–,–	2,0	0,5	–,–	0,2	0,0	0,0	0,7	2
16	MS-Blue Bedder × R	0,0	0,0	0,3	–,–	0,4	0,2	0,0	0,3	1
17	(MS-Blue Bedder × R) × R	5,0	5,7	5,0	4,5	5,7	0,0	2,8	2,7	6
18	(MS-Blue Bedder × R) × R	5,0	8,0	7,0	6,4	5,0	3,4	5,4	6,3	8
19	MS-Snowb. × (R × F-Snowball)	1,5	2,0	0,0	–,–	0,7	0,0	0,0	6,0	3
20	MS-Snowb. × (R × F-Snowball)	0,0	0,0	0,8	–,–	2,0	0,0	0,0	1,3	2
21	F-Snowball	–,–	7,0	7,0	6,3	7,0	6,7	–,–	–,–	–
22	F-Snowball	–,–	7,0	7,0	7,0	6,0	6,3	–,–	–,–	–
23	MS-Snowball	0,0	0,0	0,0	–,–	0,0	0,0	–,–	–,–	–
24	MS-Snowball	0,0	0,0	0,0	–,–	0,0	0,0	–,–	–,–	–
25	MS-Blue Bedder	0,0	0,0	0,0	–,–	0,0	0,0	–,–	–,–	–
26	MS-Blue Bedder	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	–,–	–,–	–

Table 5.3. Second phytotron experiment. Average fertility values, in the greenhouse and in the field in 1967, of the plants from which the clones 1...26 (see table 5.4) derived, and their fertility class based on both the greenhouse and field observations. The stock plants had been divided into two parts before.

4 en 5 produceerden bij 12 en 15 °C aanzienlijke hoeveelheden stuifmeel, maar waren reeds bij 18 °C bijna geheel steriel. Hetzelfde werd aangetroffen bij kloon IV van het eerste experiment (verg. pag. 56). Kennelijk waren de temperaturen in kas en veld niet laag genoeg om stuifmeelvorming aan deze planten te verkrijgen.

De normaal fertiele controle-klonen F-Snowball (nrs. 21 en 22) waren bij de meeste temperaturen goed fertiel. Beneden 15 °C trad echter een storing in de ontwikkeling van de helmknoppen op. Deze waren bij het opengaan van de bloemen klein en groenachtig, en sprongen niet open. Slechts in enkele gevallen werd in deze onvolgroeide helmknoppen een kleine hoeveelheid stuifmeel aan-

TABEL 5.4. Tweede fytotron-experiment. Gemiddelde fertiliteitswaarden van de klonen 1..26 na continue behandeling bij de temperatuurreeks 12...24 °C (linker gedeelte) en na behandeling bij binnen elk etmaal afwisselend hoge en lage temperatuur (rechter gedeelte). L = belichtingsperiode; D = donkerperiode. Bespreking in tekst.

Kloonnr./ *Clone No.*	Gemiddelde fertiliteitswaarde na behandeling bij:/*Average fertility value after treatment in:*											
	constante temperatuur/*constant temperature*					wisselende temperatuur/*alternating temperature:*						
	16hrL/8hrD 12°C	16hrL/8hrD 15°C	16hrL/8hrD 18°C	16hrL/8hrD 21°C	16hrL/8hrD 24°C	16hrL-12°C 8hrD-21°C	16hrL-15°C 8hrD-24°C	16hrL-18°C 8hrD-9°C	16hrL-21°C 8hrD-12°C	16hrL-24°C 8hrD-12°C	16hrL-24°C 8hrD-15°C	16hrL-24°C 8hrD-18°C
1	2,8	5,7	7,6	7,2	5,0	5,9	7,2	7,1	7,2	6,1	6,5	–,–
2	2,7	4,2	7,2	7,1	3,4	4,9	6,4	6,1	7,0	5,0	5,8	5,0
3	7,7	7,9	7,9	4,9	0,1	7,8	4,4	7,8	6,4	1,5	1,5	–,–
4	7,1	5,8	1,8	0,0	0,0	0,8	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0
5	5,6	4,0	1,5	0,0	0,0	0,6	0,1	2,6	0,1	0,0	0,0	0,0
6	6,6	7,1	7,0	1,6	0,0	3,9	1,3	7,7	1,9	0,0	0,0	0,0
7	7,5	7,7	8,0	6,9	0,4	7,3	6,5	7.9	6,5	3,2	1,9	2,3
8	6,3	7,4	7,5	0,3	0,0	2,3	0,1	7,2	0,5	0,0	0,0	0,0
10	3,3	4,3	2,4	0,1	0,0	1,6	0,0	2,8	0,8	0,0	0,0	0,0
11	4,4	4,4	1,6	0,0	0,0	0,8	0,0	3,3	0,1	0,0	0,0	0,0
12	0,9	2,8	2,7	1,9	0,0	2,1	1,2	2,6	3,0	0,2	0,5	0,4
13	6,7	7,8	6,2	0,0	0,0	2,8	0,0	7,1	0,6	0,0	0,0	0,0
14	6,8	7,7	5,7	0,3	0,0	3,9	0,3	7,1	1,4	0,0	0,0	0,0
15	1,4	3,6	1,9	0,4	0,0	1,8	0,1	3,3	1,2	0,0	0,0	0,0
16	0,3	2,4	1,7	0,2	0,0	0,4	0,0	2,9	0,1	0,0	0,0	0,0
17	2,6	6,1	7,0	3,9	0,5	4,8	2,0	6,0	3,6	0,0	2,2	1,8
18	4,7	6,1	7,6	4,9	0,8	6,5	5,9	6,6	5,9	5,3	5,0	4,1
19	7,4	7,4	7,4	1,0	0,0	5,1	0,5	7,7	1,1	0,0	0,0	0,0
20	6,4	7,2	5,5	0,1	0,0	2,2	0,0	6,3	0,4	0,0	0,0	0,0
21	(1,1)	5,2	7,3	7,0	6,9	7,5	6,8	7,6	–,–	6,9	7,0	7,7
22	(1,0)	6,0	7,6	7,1	6,9	7,1	6,2	7,6	6,4	7,0	6,3	–,–
23	–,–	–,–	–,–	0,0	–,–	–,–	–,–	–,–	–,–	–,–	–,–	–,–
24	0,0	–,–	0,0	0,0	–,–	0,0	–,–	0,0	0,0	–,–	–,–	–,–
25	–,–	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
26	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Table 5.4. Second phytotron experiment. Average fertility values of the clones 1...26 after continuous treatment at temperatures of the series 12...24 °C (left part) and after treatment at alternating high and low temperature in each 24-hour day (right part). L = *Photoperiod:* D = *dark period. See text for discussion.*

getroffen. Het verschijnsel werd ook in het veld na koud weer bij F-Snowball planten gevonden (verg. pag. 37), en berustte zonder twijfel op een ander mechanisme dan de afname van de fertiliteit, welke bij een aantal al dan niet volledig hersteld fertiele planten bij 12 °C werd gevonden (klonen 1, 2, 12, 15, 16 en 17). Bij deze laatste maakten de helmknoppen bij lage temperatuur weliswaar ook een minder gevulde indruk, maar ze vertoonden ongeveer normale grootte en vorm.

De controle-klonen van MS-Snowball (nrs. 23 en 24) waren sterk gedegenereerd. De vegetatieve groei verliep traag en er werden slechts weinig bloemen gevormd. De steriliteit was bij alle temperaturen volledig. Bij de controleklonen van MS-Blue Bedder (nrs. 25 en 26) trad in de lage temperatuurregimes in ernstige mate bloemverstikking op (verg. pag. 18). Vanaf 18 °C was de bloei weer normaal. Ook hier was de steriliteit bij alle temperaturen volledig.

5.2.2. *Wisselende temperatuur*

De klonen 1...26 werden niet alleen blootgesteld aan continue behandeling in de temperatuurreeks 12...24 °C, maar tevens aan afwisselend hoge en lage temperatuur binnen elk etmaal (tabel 5.4, rechter gedeelte). Deze aanvulling leek van belang, aangezien ook onder natuurlijke omstandigheden wisselende temperaturen optreden. Uiteraard vormde de gebruikte proefopzet slechts een ruwe benadering van de temperatuuromstandigheden in het veld. In de meeste behandelingen bij wisselende temperaturen werd de hoge temperatuur tijdens de belichtingsperiode (= dag) en de lage temperatuur tijdens de donkerperiode (= nacht) gegeven; in twee gevallen echter (16hrL-12 °C/8hrD-21 °C en 16hrL-15 °C/8hrD-24 °C) werd de hoge temperatuur tijdens de nacht toegediend.

In de behandelingen met afwisselend hoge dagtemperatuur en lage nachttemperatuur bleek de lage temperatuurperiode van weinig invloed op de fertiliteit. Het fertiliteitsniveau van de behandelingen 16hrL-24 °C/8hrD-12 °C, 16hrL-24 °C/8hrD-15 °C en 16hrL-24 °C/8hrD-18 °C was in de meeste klonen niet of nauwelijks hoger dan bij continu 24 °C. Alleen de klonen, die bij continu 21 °C goed of matig fertiel waren (nrs. 1, 2, 3, 7, 17 en 18) vertoonden ook in de genoemde behandelingen bij wisselende temperaturen enige fertiliteit. Ook in de behandelingen 16hrL-21 °C/8hrD-12 °C en 16hrL-18 °C/8hrD-9 °C was het fertiliteitsniveau bij nagenoeg alle klonen niet of nauwelijks afwijkend van dat bij continue behandeling in 21 resp. 18 °C.

In de omgekeerde situatie, lage dag- en hoge nachttemperatuur, werd eveneens een overheersende invloed van de hoge temperatuurperiode op de fertiliteit gevonden, ofschoon hier een iets sterker effect van de lage temperatuurperiode waarneembaar was. Zo was het fertiliteitsniveau van alle klonen in de behandeling 16hrL-15 °C/8hrD-24 °C ongeveer gelijk aan dat bij continu 21 °C, terwijl in de behandeling 16hrL-12 °C/8hrD-21 °C het fertiliteitsniveau bijna steeds lag tussen dat van de continue behandelingen bij 18 en 21 °C. Alleen de klonen 1 en 2 weken van deze regel enigszins af. Bij deze klonen was het effect van de lage temperatuur op de fertiliteit negatief, wat trouwens te verwachten was, omdat deze klonen bij 12 °C al ver beneden hun fertiliteitsoptimum waren.

De fertiliteitsreactie op regelmatig wisselende temperatuur kan, theoretisch gezien, van verschillende aard zijn:

1. De tijd nodig voor het induceren van een bepaalde graad van fertiliteit in een bloem zou zeer kort kunnen zijn, zo kort, dat door de dagelijkse wisseling van temperatuur twee typen bloemen ontstaan, in fertiliteit beantwoordend aan de ene of de andere temperatuur. Bij behandeling van partieel fertiele planten bij temperaturen met sterk contrasterend fertiliteitsniveau zouden dan naast elkaar zeer goed fertiele en volledig steriele bloemen aan de planten voorkomen, zodat een grote spreiding van bloemen over de fertiliteitswaarden 0...8 zou worden verkregen. Aangezien bij hoge temperatuur de groei sneller verloopt, worden relatief meer bloemen van de met deze temperatuur corresponderende fertiliteit gevormd, zodat de gemiddelde fertiliteitswaarde die van de continue behandeling bij hoge temperatuur zou benaderen.
2. De planten zouden op wisseling van temperatuur kunnen reageren, alsof zij bij een constante temperatuur stonden, die min of meer een gewogen gemiddelde is van de beide behandelingstemperaturen, waarbij de hogere temperatuur zwaarder weegt dan de lagere, zodat ook bij een betrekkelijk korte onderbreking van de lage temperatuur een aanzienlijke verandering van de fertiliteit in vergelijking met continue behandeling bij lage temperatuur zou optreden. De spreiding over fertiliteitswaarden zou in deze situatie gemiddeld echter niet groter zijn dan bij de behandelingen bij constante temperatuur.

Tabel 5.5 laat zien, dat de spreiding over fertiliteitswaarden bij de behandelingen 16hrL-12°C/8hrD-21°C en 16hrL-21°C/8hrD-12°C vooral voor kloon 18 geringer was dan bij continu 12°C en 21°C, en sterk overeenkwam met die bij continu 18°C. De spreiding over fertiliteitswaarden van de bloemen uit behandelingen 16hrL-15°C/8hrD-24°C en 16hrL-24°C/8hrD-15°C kwam het meest overeen met die bij continu 21°C. Zo ontbraken, althans bij kloon 18, bij deze behandelingen met wisselende temperaturen bloemen met fertiliteitswaarden 0 en 1 bijna volledig, hoewel deze bij continu 24°C de meerderheid uitmaakten. Bovendien was zowel van kloon 12 als van kloon 18 de gemiddelde fertiliteitswaarde bij de behandelingen 12°C/21°C en 21°C/12°C hoger dan die bij continu 12°C en 21°C (tabel 5.4 en 5.5). Deze resultaten maken het waarschijnlijk, dat bij wisseling van temperatuur binnen een etmaal een min of meer homogene reactie van de bloemen op een ‚gewogen' tussentemperatuur plaats vindt.

Uit de proeven met per etmaal afwisselend hoge en lage temperatuur is dus gebleken, dat het effect van een periode met hoge temperatuur op de fertiliteitsexpressie van (al dan niet volledig) hersteld fertiele planten zeer groot is, onverschillig of de hoge temperatuur tijdens de (lange) dagperiode of tijdens de (korte) nachtperiode wordt gegeven. Hieruit is af te leiden, dat onder natuurlijke omstandigheden de (meestal) lagere nachttemperaturen een betrekkelijk geringe invloed hebben op het fertiliteitsniveau.

5.2.3. *Daglengte*

Om een eventuele invloed van de daglengte op de fertiliteitsexpressie op te sporen, werd bij vier temperatuurbehandelingen (15°C, 24°C, 15°C/24°C en

24°C/15°C; niet in tabel opgenomen) ook een belichtingsperiode van 8 uren per etmaal gegeven. De meeste klonen bleven bij korte dag volledig vegetatief. In de gevallen, dat bloemen werden gevormd, week de gemiddelde fertiliteitswaarde niet af van die bij lange dag met dezelfde temperatuur. Kloon 3 bijvoorbeeld had bij 15°C bij lange dag een gemiddelde fertiliteitswaarde 7,9, terwijl deze waarde bij korte dag 7,8 bedroeg; bij 24°C trad zowel bij korte als lange dag volledige steriliteit op. Het totaal der gegevens wees er op, dat de invloed van daglengte op de fertiliteitsexpressie gering is.

Het fytotrononderzoek werd afgesloten met de analyse van 40 planten uit een F_2-nakomelingschap (R × F-Snowball), waarvan de uitgangsplanten gedurende het gehele groeiseizoen 1967 in het veld op fertiliteit konden worden beoordeeld. De resultaten hiervan worden besproken in hoofdstuk 6.

5.3. Vaststelling van het ontwikkelingsstadium van bloem en meeldraad, waarbij de fertiliteitsinductie door de temperatuur plaats vindt

Ter bepaling van de voor fertiliteitsinductie gevoelige fase van de helmknop, werden bij enige planten uit de klonen 1...26 jonge bloemknoppen van verschillende grootte gemerkt (tabel 5.6). Na het merken werden de planten onmiddellijk in een temperatuurregime geplaatst, dat een met de oude behandelingstemperatuur sterk contrasterende fertiliteitsreactie induceert (15°C→ 24°C en reciprook). Tevoren was aan een groot aantal gemeten knoppen het ontwikkelingsstadium van de microsporen bepaald. Knoppen groter dan 2 mm waren steeds al postmeiotisch; de meiose bleek plaats te vinden bij een knopgrootte tussen 1½ en 2 mm.

De gemerkte knoppen werden bij het openen van de bloemen beoordeeld op fertiliteit (tabel 5.6). Vertoonden zij de fertiliteitsreactie behorende bij de oorspronkelijke behandelingstemperatuur, dan had de inductie reeds vóór overbrenging in het nieuwe temperatuurregime plaats gehad. Dit was het geval bij alle knoppen van meer dan 2 mm grootte. Onder de knoppen van 2 mm kwamen beide fertiliteitsreacties voor, terwijl de knoppen kleiner dan 2 mm alle de nieuwe reactie vertoonden. Bij verplaatsing van hoge naar lage temperatuur groeiden bijna alle gemerkte knoppen normaal uit; bij de reciproke behandeling reageerden de planten aanvankelijk met sterke bloemverstikking, zodat slechts een gering deel van de knoppen tot ontwikkeling kwam. Bloemverstikking na verplaatsing van lage naar hoge temperatuur trad niet alleen op bij (al dan niet volledig) hersteld fertiele planten, maar ook bij de steriele controleplanten, terwijl de normaal fertiele controleplanten het verschijnsel niet vertoonden. Bloemverstikking hangt dus duidelijk samen met de aanwezigheid van het steriliserend plasma, terwijl herstellergenen er geen invloed op lijken te hebben. De sterke mate van bloemverstikking verklaart waarschijnlijk de op pag. 56 beschreven waarneming, dat na overplaatsing van partieel hersteld fertiele planten van lage naar hoge temperatuur zelden overgangstypen tussen volledige fertiele en steriele bloemen worden gevonden. Uit de proeven is dus gebleken, dat de voor temperatuur gevoelige fase in de microsporenontwikke-

TABEL 5.5. Verdeling van de individueel beoordeelde bloemen van de klonen 12 (laag fertiliteitsniveau) en 18 (hoog fertiliteitsniveau) over de fertiliteitswaarden 0...8 na behandeling bij constante en bij afwisselend hoge en lage temperatuur. Bespreking in tekst.

Behandeling/ *Treatment*	Aantal beoordelingsdata/ *Number of observation dates*	Aantal gewaardeerde bloemen/ *Number of estimated flowers*	Aantal bloemen met fertiliteitswaarde:/ *Number of flowers of ferlility value:*									Gemiddelde fertiliteitswaarde/ *Average fertility value*
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	
KLOON 12/*CLONE 12*												
16hrL/8hrD-12 °C	9	36	20	9	–	6	1	–	–	–	–	0,9
16hrL/8hrD-15 °C	12	44	1	1	12	22	8	–	–	–	–	2,8
16hrL/8hrD-18 °C	15	37	–	3	9	21	4	–	–	–	–	2,7
16hrL/8hrD-12 °C	27	114	11	29	47	19	8	–	–	–	–	1,9
16hrL/8hrD-24 °C	23	130	129	1	–	–	–	–	–	–	–	0,0
16hrL-12 °C/8hrD-21 °C	5	26	–	5	13	8	–	–	–	–	–	2,1
16hrL-15 °C/8hrD-24 °C	16	67	17	25	19	6	–	–	–	–	–	1,2
16hrL-18 °C/8hrD-9 °C	5	14	–	–	5	9	–	–	–	–	–	2,6
16hrL-21 °C/8hrD-12 °C	8	52	–	1	14	23	12	2	–	–	–	3,0
16hrL-24 °C/8hrD-12 °C	4	18	16	1	1	–	–	–	–	–	–	0,2
16hrL-24 °C/8hrD-15 °C	23	112	74	25	13	–	–	–	–	–	–	0,5
16hrL-24 °C/8hrD-18 °C	8	46	35	5	6	–	–	–	–	–	–	0,4
KLOON 18/*CLONE 18*												
16hrL/8hrD-12 °C	12	24	–	–	1	4	5	7	6	1	–	4,7
16hrL/8hrD-15 °C	12	35	–	–	–	2	6	5	4	10	8	6,1
16hrL/8hrD-18 °C	13	37	–	–	–	–	–	–	–	16	21	7,6
16hrL/8hrD-21 °C	26	87	3	2	4	11	10	17	25	15	–	4,9
16hrL/8hrD-24 °C	21	62	30	21	6	4	1	–	–	–	–	0,8
16hrL-12 °C/8hrD-21 °C	5	25	–	–	–	–	–	–	13	12	–	6,5
16hrL-15 °C/8hrD-24 °C	17	75	–	1	2	4	–	8	41	11	8	5,9
16hrL-18 °C/8hrD-9 °C	6	20	–	–	–	–	–	–	8	12	–	6,6
16hrL-21 °C/8hrD-12 °C	8	39	–	–	–	2	–	6	21	10	–	5,9
16hrL-24 °C/8hrD-12 °C	5	15	–	–	–	–	–	3	7	4	1	5,3
16hrL-24 °C/8hrD-15 °C	19	68	–	2	4	4	9	24	15	10	–	5,0
16hrL-24 °C/8hrD-18 °C	5	16	–	–	2	2	5	7	–	–	–	4,1

Table 5.5. Distribution of the individually estimated flowers of the clones 12 (low fertility level) and 18 (high fertility level) over the fertility values 0...8 after treatment at constant and at alternating high and low temperature. There was a great correspondence between the distribution over fertility values of the treatment at alternating temperature and those in the continuous treatment at the higher temperature of a temperature combination (e.g. 18°/9° ∾ 18°C) or those at the continuous treatment in the temperature regime preceding the higher temperature of the temperature combination (e.g. 24°/15° ∾ 21°C in clone 18).

TABEL 5.6. Bepaling van de bloemknopgrootte corresponderend met het voor temperatuur gevoelige stadium van de microsporenontwikkeling (door overplaatsing van planten met gemerkte bloemknoppen van het ene temperatuurregime naar een ander regime met sterk contrasterende fertiliteitsreactie, 24°→15°C en vice versa). Bespreking in tekst.

Knopgrootte/ (mm)	24° → 15°			15° → 24°		
	Aantal bloemen/*Number of flowers*			Aantal bloemen/*Number of flowers*		
Bud size (mm)	geaborteerd/ *aborted*	oude fert. reactie/ *previous fertility response*	nieuwe fert.-reactie/ *present fertility response*	geaborteerd/ *aborted*	oude fert.-reactie/ *previous fertility response*	nieuwe fert.-reactie/ *present fertility response*
< 1	–	–	–	1	–	2
1	1	–	1	3	–	3
1½	1	–	7	19	–	7
2	4	23	8	19	–	2
2½	–	6	–	2	3	–
⩾ 3	8	44	–	17	30	–

Table 5.6. Determination of the size of the flower bud corresponding to the temperature sensitive stage of the microspore development (by moving plants with marked flower buds from one temperature regime to another effecting sharply contrasting fertility response, 24° → 15°C and vice versa). Buds < 2 mm show the present, larger buds the previous fertility response. When moving from low to high temperature 'blindness' (abortion) appears, especially among buds in the temperature sensitive stage.

TABEL 5.7. Aantal dagen vanaf het voor temperatuur gevoelige knopstadium tot open bloem, bij zes temperaturen en twee daglengten.

Temperatuur(°C)/ *Temperature(°C)*	Aantal benodigde dagen bij:/ *Number of days required in:*	
	20hrL/4hrD	16hrL/8hrD
9	>30	–
12	23–27	32–39
15	17–18	25–30
18	12–13	–
21	9–10	14–18
24	8	12–14

Table 5.7. Number of days from temperature sensitive bud stage to anthesis, at six temperatures and two day lengths.

ling ongeveer samenvalt met het tijdstip van de meiotische delingen.

De duur van de periode vanaf het temperatuur-gevoelige knopstadium tot het openen van de bloem (tabel 5.7) bleek afhankelijk van de temperatuur en van de dagelijkse belichtingstijd: lage temperatuur en korte belichtingstijd werkten beide sterk vertragend. Zoals eveneens uit tabel 5.7 valt af te lezen, traden individuele verschillen in groeisnelheid op tussen knoppen van dezelfde behandeling, die vooral bij lage temperatuur aanzienlijk konden zijn, b.v. 23 tot 27 resp. 32 tot 39 dagen bij 12°C. Deze waarnemingen maakten duidelijk, dat het verband tussen temperatuur en fertiliteit in het veld vrij gecompliceerd is (verg. pag. 45).

Een warmtegolf gedurende de post-inductieve periode zal de afstand tussen inductie en manifestatie van een bepaalde fertiliteitsreactie verkleinen, een koudeperiode zal deze daarentegen aanzienlijk verlengen. Ter staving hiervan werden een aantal bloemknoppen van omstreeks 2 mm grootte op 29-VIII resp. 13-IX-1966 te velde gemerkt. De eerste groep van 60 knoppen (aan 30 verschillende planten) groeide na een periode met vrij hoge temperaturen uit tot open bloem in 12 tot 15 dagen, terwijl de tweede groep van 30 knoppen (aan 6 verschillende planten) door de lage temperatuur in de post-inductieve periode pas na 19 tot 23 dagen open gingen.

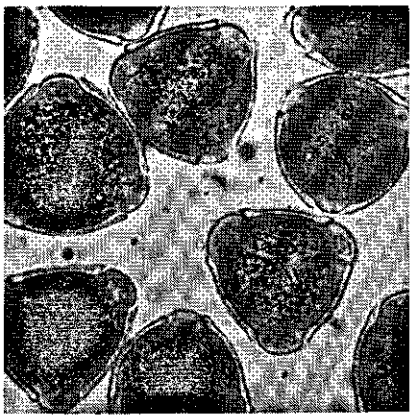
5.4. Hoedanigheid van het bij verschillende temperaturen gevormde stuifmeel

Voor het onderzoek naar de hoedanigheid van het stuifmeel, gevormd bij verschillende temperaturen, werd gebruik gemaakt van de klonen van 40 planten uit de F_2 $Pt_{67}V9$ (verg. tabel 6.1, pag. 75). Binnen deze groep werd een grote variatie in fertiliteitsexpressie gevonden, aangezien hierin homozygoot hersteld fertiele naast bijna volledig steriele planten voorkwamen. Bij hun optimale temperatuur bezaten de meeste klonen goed gevulde helmhokjes. Het stuifmeel hierin was regelmatig, driehoekig tot rond, en bezat duidelijk zichtbare kiemporiën (foto 6); de kleuring met karmijnazijnzuur was zeer intens. Verschrompelde, ongevulde en niet kleurbare korrels kwamen sporadisch voor, maar niet vaker dan ze ook in de helmknoppen van normaal fertiele controleplanten werden aangetroffen.

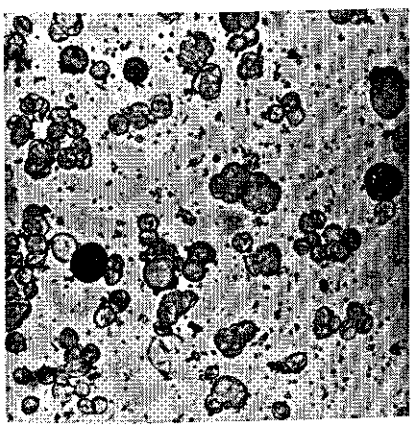
Tabel 5.8. Verband tussen fertiliteitswaarde en kwaliteit van het stuifmeel bij bloemen van de klonen van de F_2 $Pt_{67}V9$, behandeld bij constante temperaturen 12...21 °C.

Fertiliteitswaarde/ *Fertility value*	12°C		15°C		18°C		21°C	
	Aantal gewaardeerde bloemen/ *Number of estimated flowers*	Gem. % ‚goed' stuifmeel/ *Average % 'good' pollen*	Aantal gewaardeerde bloemen/ *Number of estimated flowers*	Gem. % ‚goed' stuifmeel/ *Average % 'good' pollen*	Aantal gewaardeerde bloemen/ *Number of estimated flowers*	Gem. % ‚goed' stuifmeel/ *Average % 'good' pollen*	Aantal gewaardeerde bloemen/ *Number of estimated flowers*	Gem. % ‚goed' stuifmeel/ *Average % 'good' pollen*
2	16	12,0	10	17,2	8	29,7	–	–
3	11	29,4	9	23,3	13	34,5	7	73,5
4	18	40,7	9	40,0	6	60,3	–	–
5	33	57,1	5	81,3	7	70,5	3	80,0
6	23	61,8	36	80,1	32	82,3	7	78,3
7	47	75,5	75	86,1	33	89,1	2	91,5
8	5	75,0	27	90,4	6	91,9	3	94,1

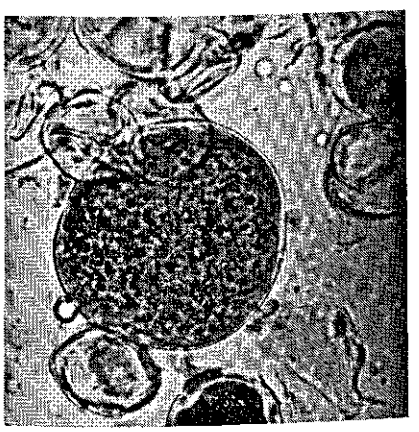
Table 5.8. Relation between fertility value and quality of the pollen in flowers of the clones of the F_2 $Pt_{67}V9$, treated at constant temperatures 12...21 °C. At low temperature a small quantity of pollen (= low ferility value) is always attended with poor quality (= small % 'good' pollen); at higher temperatures this relation is less clear.



50 μ



100 μ



50 μ

Foto 6, 7, 8. Enkele stuifmeeltypen van hersteld fertiele planten:

6. Normale stuifmeelkorrels, met verdikte exinewand en duidelijke kiemporiën, gevormd bij optimale temperatuur; 400 ×
7. Sterk gedegenereerde, niet of nauwelijks gekleurde stuifmeelkorrels, gevormd bij lage temperatuur (12 °C); 100 ×
8. Gehypertrofieerde stuifmeelkorrel, met nauwelijks verdikte exinewand en zonder kiemporieën, gevormd bij lage temperatuur (12 °C); 400 ×

Plates 6, 7, 8. Some pollen types of partially restored fertile plants:

6. *Normal pollen grains, with thickened exine-wall and distinct germ pores, developed at optimum temperature; × 400*
7. *Markedly degenerated, hardly stained or unstained pollen grains, developed at low temperature (12°C); × 100*
8. *Hypertrophied pollen grain with exine-wall hardly thickened and without germ pores, developed at low temperature (12°C); × 400*

Verlaging van de temperatuur tot beneden het optimum uitte zich in veel gevallen nauwelijks in een geringere inhoud van de helmhokjes, maar had op de kwaliteit van het daarin aanwezige stuifmeel meestal een duidelijke invloed. Bij 12°C b.v. was, ook bij bloemen met fertiliteitswaarde 7 of 8, het volgens de op pag. 47 gegeven criteria berekende percentage ‚goed' stuifmeel, vrij laag (zie tabel 5.8). Bij deze temperatuur werden, naast normale korrels en volledig lege, verschrompelde pollenhulsels, grote aantallen abnormale korrels gevonden, met onregelmatige vorm, geringe of onregelmatige kleuring, ontbrekende kiemporiën enz. (foto 7). Het meest opvallend echter waren de steeds voorkomende reuzenstuifmeelkorrels (foto 8). Deze gehypertrofieerde korrels waren zeer variabel van omvang en bezaten soms een doorsnede van 3 tot 4× die van normale korrels. Bij vergroting 400× vertoonden zij een schubbige structuur, terwijl de kleuring met karmijnazijnzuur varieerde van bijna normaal tot geheel ontbrekend. De stuifmeelwand was niet of nauwelijks verdikt, en kiemporiën ontbraken steeds.

Ook in de gevallen dat bij lage temperatuur een duidelijk verminderde vulling van de helmhokjes werd waargenomen (lage fertiliteitswaarden), waren nog grote aantallen als stuifmeel herkenbare elementen aanwezig. Het merendeel hiervan bestond uit al of niet verschrompelde, lege pollenhulsels en sterk samenklonterende, abnormale korrels, terwijl normale stuifmeelkorrels slechts verspreid voorkwamen. Het percentage ‚goede' korrels was daardoor uitermate gering: zie b.v. fertiliteitswaarde 2 bij 12 °C in tabel 5.8.

De vele overgangstypen tussen normale en duidelijk abnormale stuifmeelkorrels bij lage temperatuur maakten het onderscheiden van ‚goede' en ‚slechte' korrels moeilijk. Aan de in tabel 5.8 weergegeven percentages moet daarom geen al te grote betekenis worden gehecht. Deze percentages zijn, in het bijzonder bij 12 °C, mogelijk wat te hoog uitgevallen, omdat stuifmeelkorrels met zeer geringe afwijkingen tot de categorie ‚goed' stuifmeel kunnen zijn gerekend.

Bij temperaturen boven het optimum nam, bij lagere fertiliteitswaarden, het aantal als stuifmeel herkenbare elementen in de helmhokjes snel af. Een groot deel van de stuifmeelkorrels is blijkbaar geheel te gronde gegaan. Onder de resterende korrels werden relatief weinig gehypertrofieerde of anderszins abnormale korrels aangetroffen, zodat bij de hogere temperaturen het percentage ‚goed' stuifmeel naar de lagere fertiliteitswaarden maar weinig afnam (tabel 5.8; 21 °C).

De verkregen gegevens zouden er op kunnen duiden, dat hoge temperatuur in een vrij vroeg stadium op de stuifmeelontwikkeling ingrijpt, waardoor we een scherpe scheiding krijgen in ‚getroffen' (geheel gedegenereerde) en ‚niet getroffen' (betrekkelijk normaal ontwikkelde) korrels. Bij lage temperatuur worden de stuifmeelkorrels in allerlei ontwikkelingsstadia geremd, doch blijven meestal als zodanig herkenbaar. De lege pollenhulsels zijn vermoedelijk al vrij vroeg na het vrijkomen uit het tetradenverband geremd. Bij de gehypertrofieerde korrels is de ontwikkeling pas in een vrij laat stadium tot stilstand gekomen; de exinewand wordt niet of onvolledig gevormd, waardoor de stuifmeelkorrels in de kleurstofoplossing sterk opzwellen.

Betrekken we het in deze paragraaf gevondene op afb. 4.8, dan valt het volgende op te merken. Bij de keuze van bloemen van verschillende fertiliteitswaarde werd in de daar samengevatte experimenten geen rekening gehouden met de temperatuur. Derhalve zullen bij alle fertiliteitswaarden zowel bloemen met door hoge als met door lage temperatuur geïnduceerde fertiliteitsexpressie voorkomen. De eerste veroorzaakten de uitlopers naar hoge, de tweede die naar lage percentages ‚goed' stuifmeel binnen elke fertiliteitswaarde.

Planten van de steriele controle-rassen MS-Snowball en MS-Blue Bedder bleken bij geen enkele temperatuur als stuifmeel herkenbare elementen te bevatten: volledige degeneratie in vroeg stadium. Van 50 onderzochte bloemen -10 bij elk van de behandelingstemperaturen 12...24°C- van MS-Blue Bedder bevatten 41 geen enkele normale of abnormale stuifmeelkorrel; 8 bloemen bevatten één tot vijf, en één bloem meer dan vijf pollenkorrels. Een zo gering aantal stuifmeelkorrels zou evenwel gemakkelijk als besmetting door fertiele planten op de helmknoppen terecht gekomen kunnen zijn. De planten in het fytotron stonden nl. zeer dicht opeen, werden dagelijks verreden van de belichte naar de donkere afdelingen, terwijl ook door het herhaaldelijk openen en sluiten van toegangsdeuren en bij het begieten stuifmeel kon worden verspreid. Een aantal van te voren ingehulde bloemknoppen bleken bij het open gaan dan ook in geen enkel geval als stuifmeel herkenbare korrels op te leveren.

Ook van het ras Rosy Morn waren de meeste planten bij alle fytotrontemperaturen volledig steriel. Van de onderzochte bloemen bij vier van deze planten (RM-S II-2, -4, -12 en -14) bleken 70 totaal geen stuifmeel te bevatten, 19 minder dan vijf korrels en 6 tussen zes en dertien korrels per volledige antherenset. De planten RM-S II-3 en -13 daarentegen vormden onder bepaalde omstandigheden geringe tot vrij grote hoeveelheden stuifmeel. Het grootste aantal korrels werd gevonden bij plant RM-S II-13 bij 15°C. Hier kwamen enkele honderden normale naast nog grotere hoeveelheden abnormale stuifmeelkorrels voor. De waarneming werd op drie verschillende data herhaald. Het Rosy Morn-materiaal van Frankel was dus niet homogeen steriel, maar splitste planten af, die onder gunstige omstandigheden enigzins fertiel konden zijn.

5.5. Discussie

Beïnvloeding van het fertiliteit-herstellende mechanisme door uitwendige omstandigheden werd door vele auteurs bij uiteenlopende gewassen waargenomen, o.a. bij biet (Owen, 1945; Bandlow, 1964; Rohrbach, 1965[c]; Cortessi, 1967), katoen (Meyer en Meyer, 1965), sorghum (Kidd, 1961), ui (Barham en Munger, 1950; Jones en Clarke, 1943; Lichter en Muendler, 1961), en wortel (Hansche en Gabelman, 1963[b]). Systematisch onderzoek naar de invloed van afzonderlijke milieufactoren onder beheerste omstandigheden is in de literatuur echter nauwelijks te vinden. De bevindingen van verschillende onderzoekers over de aard van de inwerkende factoren en de richting van de beïnvloeding spreken elkaar dan ook herhaaldelijk tegen. In enkele gevallen is

de tegenspraak mogelijk slechts schijnbaar. Zo namen bij de ui LICHTER en MUENDLER (1961) een sterke toename van de fertiliteit van heterozygoot hersteld fertiele planten waar bij oplopende temperaturen tussen 11,5 en 24,5 °C. Volgens BARHAM en MUNGER (1950) zouden zelfs sommige homozygoot steriele planten, die bij lage temperatuur volledig steriel waren, bij ca. 20 °C geringe hoeveelheden stuifmeel produceren. JONES en CLARKE (1943) daarentegen troffen in F_2-nakomelingschappen bij ‚zeer hoge' temperaturen in de kas een overmaat van steriele planten aan. De situatie zou analoog kunnen zijn aan die bij de petunia: Optimale fertiliteit bij gematigde temperaturen (hier omstreeks 20 tot 24 °C) en een geleidelijke afname van de fertiliteit zowel bij lagere als bij hogere temperaturen.

Door CORTESSI (1967) werden enige plasmatisch steriele families van *Beta vulgaris* onder uiteenlopende beheerste omstandigheden getoetst. Haar resultaten wezen op een beïnvloeding van de fertiliteitsexpressie door zowel daglengte als temperatuur, terwijl een interactie tussen de beide milieufactoren niet uitgesloten leek. Bij analyse van haar gegevens rijst echter ernstige twijfel aan de homogeniteit van het onderzochte materiaal. In het bijzonder geldt dit voor familie E (CORTESSI, 1967, pag. 428), waarvan onder alle omstandigheden enige planten kiemkrachtig stuifmeel produceerden.

Bij genisch steriele spruitkool werd door NIEUWHOF (1968) een duidelijk verband tussen de temperatuur en de fertiliteit van heterozygoot fertiele klonen waargenomen. De meeste klonen vertoonden in de reeks 10, 13, 17 °C een afnemende fertiliteit. Twee klonen echter leken juist bij de hoogste temperatuur het meest fertiel. Ook hier hebben we misschien te maken met klonen met verschillende optimum-temperatuur voor fertiliteit, en dus met een zekere analogie met de resultaten bij petunia. Dit zou dan tevens een nieuwe aanwijzing zijn, dat tussen plasmatisch-genische en zuiver genische steriliteit geen wezenlijke verschillen bestaan.

Het is bevreemdend dat, juist ten aanzien van landbouwkundig belangrijke gewassen als mais, biet, sorghum e.a., toetsing van plasmatisch steriele planten en van vermeende O-typen –deze laatste via hun nakomelingschap na kruising met MS– onder beheerste omstandigheden tot nu toe, voor zover bekend, niet wordt toegepast. Uit de reactie van dergelijk materiaal op een reeks van constante temperaturen zou men snel gegevens verkrijgen omtrent de volledigheid van de steriliteit (al dan niet door temperatuur te beïnvloeden; al dan niet splitsend), en daaruit betrouwbare conclusies omtrent de bruikbaarheid van het materiaal kunnen trekken. In het bijzonder bij introductie van materiaal uit een gebied met sterk afwijkend klimaat is toetsing bij uiteenlopende temperaturen noodzakelijk.

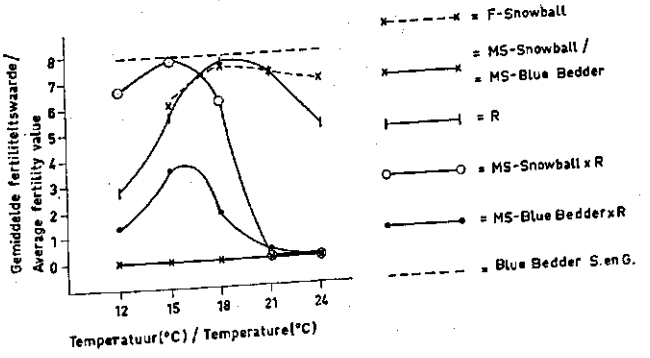
In de experimenten met petunia bleek, dat ook bij een bepaalde fytotron-temperatuur de fertiliteit van verschillende bloemen aan dezelfde plant vaak verschillend was. Deze labiliteit in fertiliteitsexpressie was het grootst bij de overgangstemperaturen tussen het optimaal fertiele en het volledig steriele (hogere) temperatuurgebied. Een deel van de variatie in fertiliteitsexpressie zal ongetwijfeld teweeg gebracht zijn door geringe schommelingen in de temperatuur

(±0,5°C) in de klimaatruimten, die vooral bij planten met steile fertiliteitskromme van betekenis zouden kunnen zijn. Daarnaast leken echter ook andere milieufactoren dan de temperatuur invloed op de fertiliteit te kunnen uitoefenen, in het bijzonder factoren, die aan sterke fluctuaties onderhevig zijn, b.v. relatieve luchtvochtigheid. Ook de voedings- en vochttoestand van het groeimedium zouden invloed kunnen hebben op de fertiliteitsexpressie (verg. DUVICK, 1959[a]).

In afb. 5.2 is voor een aantal idiotypen uit het tweede fytotronexperiment (zie tab. 5.3 en 5.4) het fertiliteitsverloop weergegeven, en wel voor F-Snowball (kloon 22), MS-Snowball (kloon 24), MS-Blue Bedder (kloon 26), R (kloon 1), MS-Snowball × R (kloon 13) en MS-Blue Bedder × R (kloon 15). Daarnaast is ook het –op grond van veldwaarnemingen bepaalde– verloop van de fertiliteit van Blue Bedder S. en G. aangegeven.

De normaal fertiele F-Snowball en Blue Bedder S. en G. vertonen geen duidelijk fertiliteitsoptimum; bij 18, 21 en 24°C is het fertiliteitsniveau nagenoeg gelijk, terwijl de sterke afname van fertiliteit van F-Snowball bij lagere temperaturen een gevolg is van de abnormale helmknopontwikkeling die dan optreedt (verg. pag. 59). De klonen 24 en 26 (MS-Snowball resp. MS-Blue Bedder) zijn bij alle temperaturen volledig steriel. Alle overige klonen (i.c. de verschillende herstellertypen) vertonen echter een uitgesproken optimumkromme voor fertiliteit.

Zoals eerder beschreven is en ook uit de afbeelding blijkt, ligt het fertiliteitsoptimum van de homozygoot hersteld fertiele kloon 1 bij hogere temperatuur (18 tot 21°C) dan dat van de heterozygote klonen 13 en 15 (15°C). Het optimale niveau van fertiliteit is voor de klonen 1 en 13 echter nagenoeg gelijk, waardoor bij lage temperatuur de fertiliteit van de heterozygoot hoger is dan die van de homozygoot hersteld fertiele kloon. De gevonden situatie zou beschouwd kunnen worden als overdominantie van het (de) fertiliteit herstellende



AFB. 5.2. Grafische weergave van de fertiliteit bij enige constante temperaturen van een aantal klonen, die elk een bepaald nakomelingschapstype vertegenwoordigen. Bespreking in tekst.

Fig. 5.2. Diagram of the fertility at several constant temperatures of a number of clones, each of them representing a definite progeny type. See text for discussion.

gen(en) bij 12 en 15 °C. Een andere mogelijkheid is, dat de werking van fertiliteit herstellende genen bij lage temperatuur wordt onderdrukt. Door TATE (1966) werd het voorkomen van een homozygoot recessieve herstel-onderdrukkende factor $i_{rf}i_{rf}$ bij mais beschreven. Veronderstellen we nu bij de petunia de aanwezigheid van een, aan een van de factoren voor fertiliteitsherstel gekoppeld, herstelonderdrukkend gen i_{rf}, dat bij lage temperatuur het meest actief is, dan zou hiermee een sluitende verklaring voor de geringe fertiliteit van de homozygote hersteller bij lage temperatuur verkregen zijn.

De dubbel homozygoot Rf_xi_{rf}/Rf_xi_{rf} wordt dan bij lage temperatuur in zijn herstelwerking gehinderd door de homozygote herstel-onderdrukker; bij hogere temperaturen neemt de activiteit van i_{rf} af, waardoor de fertiliteit een hoge waarde kan bereiken. De dubbel heterozygoot Rf_xi_{rf}/rf_xI_{rf} bezit weliswaar minder herstellergenen dan de homozygoot (volledige steriliteit bij 21 en 24 °C), doch is bij lage temperaturen t.o.v. deze bevoordeeld door de ontbrekende (bij volledige dominantie van I_{rf}) of de verminderde (bij onvolledige dominantie van I_{rf}) tegenwerking door de herstelonderdrukker, waardoor de fertiliteit bij 12 en 15 °C hoger is dan die van de homozygoot.

Een geheel ander fertiliteitsverloop vinden we bij kloon 15 (MS-Blue Bedder × R). Deze blijkt bij slechts één temperatuur (24 °C) volledig steriel, doch het fertiliteitsniveau is bij alle overige temperaturen relatief laag. Dit lage fertiliteitsniveau zou kunnen zijn veroorzaakt door geringer aantal of sterkte van de cryptomere herstellergenen in MS-Blue Bedder, zoals in hoofdstuk 4 is aangenomen. Een andere verklaring zou kunnen zijn, dat bij (sommige) MS-Blue Bedder-planten niet I_{rf}, maar de herstel-onderdrukker i_{rf} is gekoppeld aan rf_x (rf_xi_{rf}/rf_xi_{rf}). Na kruising tussen MS-Blue Bedder en de homozygote hersteller (Rf_xi_{rf}/Rf_xi_{rf}) bezitten de F_1-planten dan het genotype Rf_xi_{rf}/rf_xi_{rf}, zodat de fertiliteit hier ook bij 12 en 15 °C wordt gereduceerd.

5.6. SAMENVATTING

1. Tussen de mate van fertiliteit van normaal fertiele planten en de hoogte van de temperatuur bestaat geen duidelijk verband, terwijl plasmatisch steriele planten bij geen enkele temperatuur ook maar een spoor van stuifmeel bezitten. Hersteld fertiele planten echter vertonen een uitgesproken optimum-temperatuur voor fertiliteit. De ligging van het optimum, en, in mindere mate, het optimale fertiliteitsniveau zijn afhankelijk van aantal en aard van de aanwezige herstellergenen.
2. Bij afwisseling van hoge en lage temperatuur binnen elk etmaal is de hoge temperatuurperiode van grotere invloed op de fertiliteit dan de lage temperatuurperiode, ook wanneer de hoge temperatuur in de (korte) nachtperiode wordt toegediend.
3. De voor temperatuur gevoelige fase in de ontwikkeling van de microsporen valt ongeveer samen met het tijdstip van de meiotische delingen.
4. Het aantal dagen tussen fertiliteits-inductie in de jonge bloemknop en -manifestatie in de rijpe antheren is sterk afhankelijk zowel van de tempera-

tuur als van de daglengte gedurende de post-inductieve periode.

5. Bij optimale temperatuur is de stuifmeelhoeveelheid in de helmknoppen groot en de kwaliteit ervan goed. Bij lagere temperaturen, inzonderheid 12 °C, neemt vooral de kwaliteit van het aanwezige stuifmeel af (onvolledige degeneratie), terwijl bij temperaturen boven het optimum het meeste stuifmeel geheel te gronde gaat en de overblijvende korrels betrekkelijk normaal zijn.

6. GENETISCHE ANALYSE VAN ENIGE SPLITSINGSGEGEVENS

6.1. Inleiding

De sterke milieugevoeligheid van planten met steriliserend plasma en fertiliteit herstellende genen bemoeilijkt de analyse van aantal en aard van de werkzame herstellergenen in hoge mate. Wel werd reeds vastgesteld (hoofdstuk 4), dat meer dan één genenpaar bij fertiliteitsherstel is betrokken. Het gedrag van een bepaalde F_2-nakomelingschap in het fytotron, dat in de volgende delen van dit hoofdstuk zal worden besproken, leverde meer nauwkeurige aanwijzingen betreffende de genetische constitutie op. Aan de hand van de verschillen in fertiliteit in de temperatuurreeks 12...24°C werd voor deze F_2 een hypothese opgesteld betreffende aantal en aard van de daarin werkzame herstellergenen. De zo verkregen hypothese werd vervolgens aan een aantal te velde beoordeelde nakomelingschappen getoetst.

6.2. Analyse van de F_2-nakomelingschap $PT_{67}V9$ onder beheerste omstandigheden

In 1967 werden klonen gemaakt van 40 willekeurige planten (uit twee veldjes, I en II, elk van 40 planten) van de F_2 $Pt_{67}V9$ (R × F-Snowball). De klonen werden bij de temperaturen 12, 15, 18, 21 en 24°C in het fytotron op fertiliteit onderzocht. De gemiddelde fertiliteitswaarden van alle klonen bij de verschillende temperaturen zijn verzameld in tabel 6.1. De uitgangsplanten van de klonen in het fytotron werden terzelfdertijd in het veld beoordeeld. De resultaten van deze beoordelingen en de uiteindelijke classificatie in de fertiliteitsklassen 0...8 zijn weergegeven in tabel 6.2.

Tabel 6.1 laat zien, dat er onder de 40 fytotron-klonen grote verschillen in fertiliteit voorkwamen. Sommige klonen waren bij alle temperaturen enigermate fertiel (I-2, I-35, II-2 en II-40), terwijl andere bij slechts één temperatuur (12°C) een geringe hoeveelheid stuifmeel produceerden (I-3, II-9). Tussen deze uitersten werden diverse overgangstypen gevonden. Na rangschikking van de klonen naar toenemende gemiddelde fertiliteitswaarde, binnen elke temperatuur, ontstond het in afb. 6.1 geschetste beeld. Om het aantal individuen bij elke temperatuur gelijk te houden, werden de in tabel 6.1 ontbrekende gegevens voor I-3 bij 12°C, voor I-16 bij 18°C, en voor I-8 en II-10 bij 24°C geschat. De enige aan I-3 bij 12°C beoordeelde bloem was niet volledig steriel; voor de plant werd daarom in analogie met II-9 een waarde tussen 2,5 en 3,0 aangenomen. Voor I-16 bij 18°C werd de gemiddelde fertiliteitswaarde geschat tussen 4,5 en 5,0 terwijl de beide klonen I-8 en II-10 bij 24°C een waarde tussen 0,0 en 0,5 kregen toebedeeld.

Op grond van het totaal der gegevens lieten de klonen zich indelen in vijf groepen, A t.e.m. E, die zich onderscheidden in hun reactie op de tempera-

TABEL 6.1. Gemiddelde fertiliteitswaarde van de klonen van de F_2 $Pt_{67}V9$ bij de temperatuurreeks 12...24 °C in het fytotron. Zie tekst.

Kloonnr./ *Clone No.*	Gemiddelde fertilititeitswaarde bij:/ *Average fertility value in:*				
	12°C	15°C	18°C	21°C	24°C
V9 I-2	6,2	7,4	7,4	7,2	3,2
V9 I-3	–,–	0,0	0,0	0,0	0,0
V9 I-5	1,3	2,5	1,9	0,6	0,0
V9 I-7	1,2	1,5	0,7	0,0	0,0
V9 I-8	6,5	7,7	6,9	0,2	–,–
V9 I-11	7,3	7,5	7,5	4,0	0,0
V9 I-12	5,0	5,8	3,6	0,0	0,0
V9 I-14	5,9	7,2	6,1	2,0	0,0
V9 I-16	4,6	5,3	–,–	0,0	0,0
V9 I-18	7,2	7,1	5,2	0,1	0,0
V9 I-20	5,7	6,2	5,3	0,4	0,0
V9 I-22	5,5	7,3	4,6	0,1	0,0
V9 I-23	2,4	3,3	0,4	0,0	0.0
V9 I-24	4,1	6,9	6,7	4,0	0,0
V9 I-25	2,3	5,4	2,6	0,7	0,0
V9 I-26	6,4	6,4	6,0	1,7	0,0
V9 I-27	1,9	3,9	4,5	2,7	0,3
V9 I-28	6,4	6,8	2,6	0,9	0,0
V9 I-29	2,4	2,1	0,3	0,0	0,0
V9 I-30	5,4	5,8	3,1	0,0	0,0
V9 I-31	4,3	6,1	2,4	0,0	0,0
V9 I-32	6,0	6,4	7,0	2,0	0,0
V9 I-35	4,8	7,1	6,9	6,5	2,3
V9 I-37	1,9	3,0	0,2	0,0	0,0
V9 I-38	5,9	7,0	1,9	0,0	0,0
V9 II-2	4,2	6,7	7,3	6,2	1,9
V9 II-4	5,3	6,1	3,5	0,0	0,0
V9 II-7	7,0	7,2	7,5	4,6	0,3
V9 II-8	6,9	7,6	5,7	1,3	0,0
V9 II-9	2,8	0,3	0,0	0,0	0,0
V9 II-10	2,3	2,4	0,2	0,0	–,–
V9 II-12	6,7	6,4	5,0	0,8	0,0
V9 II-13	4,5	6,8	7,1	2,9	0,0
V9 II-14	6,9	7,3	7,5	4,3	0,0
V9 II-18	6,6	7,4	7,6	3,1	0,2
V9 II-20	5,3	7,2	5,2	1,7	0,0
V9 II-23	3,4	5,7	4,6	0,2	0,0
V9 II-24	4,9	7,0	6,1	5,0	0,6
V9 II-27	3,2	1,9	1,0	0,5	0,0
V9 II-40	5,1	6,9	7,0	6,5	1,9

Table 6.1. Average fertility value of the clones of the F_2 $Pt_{67}V9$ at the temperatures of the series 12...24 °C in the phytotron. The great diversity in fertility of the clones indicates a complicated heredity of fertility restoration.

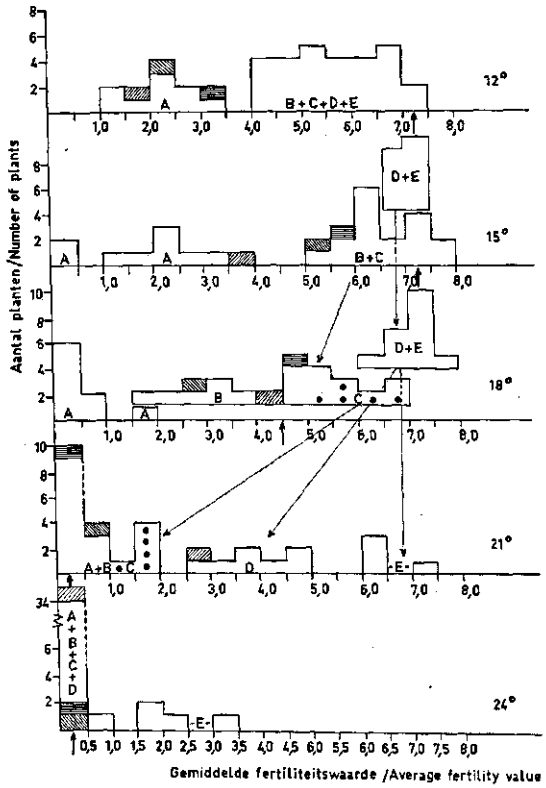
Tabel 6.2. Gemiddelde fertiliteitswaarden onder veldomstandigheden en fertiliteitsklasse van de uitgangsplanten der in het fytotron onderzochte klonen van de F_2 $Pt_{67}V9$.

Plantnr./ *Plant No.*	Gemiddelde fertiliteitswaarde op: / *Average fertility value on:*														Fertiliteitsklasse/ *Fertility class*
	8-VI	13-VI	19-VI	22-VI	27-VI	4-VII	13-VII	21-VII	27-VII	22-VIII	4-IX	26-IX	5-X	20-X	
V9 I-2	7,0	7,0	–,–	8,0	7,0	6,5	6,3	6,5	2,0	8,0	7,0	7,3	7,3	8,0	8
V9 I-3	0,0	–,–	0,0	–,–	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0
V9 I-5	0.0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	–,–	–,–	–,–	–,–	–,–	1
V9 I-7	0,0	0,0	0,0	–,–	–,–	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	1
V9 I-8	–,–	2,0	–,–	0,0	0,0	1,0	1,3	0,0	0,0	0,7	4,7	3,3	5,7	3,0	4
V9 I-11	6,5	–,–	8,0	8,0	7,5	7,7	2,7	4,8	0,0	6,0	6,0	7,0	7,3	6,0	7
V9 I-12	0,0	–,–	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3	0,0	2,3	–,–	2
V9 I-14	0,0	–,–	–,–	–,–	4,0	4,3	3,7	0,5	0,0	0,0	7,0	–,–	6,3	6,7	4
V9 I-16	–,–	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	3,0	3,7	2
V9 I-18	0,0	3,0	–,–	4,0	1,0	2,0	0,7	0,0	0,0	0,0	1,7	–,–	5,0	–,–	4
V9 I-20	0,0	–,–	2,0	0,0	2,5	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,7	–,–	–,–	–,–	3
V9 I-22	0,0	2,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	6,0	4,3	3
V9 I-23	0,0	–,–	–,–	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	–,–	–,–	–,–	–,–	(0)
V9 I-24	–,–	–,–	6,0	–,–	4,0	4,0	4,7	0,3	0,0	3,7	6,0	2,7	6,0	6,3	6
V9 I-25	0,0	–,–	2,0	0,0	2,0	1,5	0,7	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	2,0	1,5	3
V9 I-26	1,0	6,0	5,0	–,–	3,0	3,0	3,3	1,0	0,0	2,7	2,5	5,0	5,0	–,–	5
V9 I-27	0,0	–,–	–,–	–,–	1,3	3,0	2,7	0,7	0,0	1,7	5,7	–,–	–,–	–,–	4
V9 I-28	2,0	–,–	2,0	–,–	2,0	1,0	1,0	0,0	–,–	0,0	–,–	–,–	–,–	–,–	4
V9 I-29	0,3	–,–	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	1,0	0,0	–,–	–,–	1
V9 I-30	0,0	–,–	0,0	0,5	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	–,–	–,–	–,–	2

V9 I-31	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	4,0	2
V9 I-32	3,5	6,0	3,0	–,–	5,5	4,5	3,7	1,8	0,0	3,7	6,0	–,–	5,0	–,–	5
V9 I-35	2,0	5,0	6,0	6,5	6,0	5,0	5,0	2,7	0,0	5,7	5,0	4,0	6,0	6,3	7
V9 I-37	0,0	–,–	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	–,–	–,–	–,–	–,–	(0)
V9 I-38	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,7	2,0	4,3	2
V9 II-2	–,–	–,–	–,–	–,–	7,0	–,–	4,3	5,7	2,3	7,0	8,0	3,7	7,0	7,3	7
V9 II-4	–,–	–,–	–,–	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0	4,0	3,8	3
V9 II-7	–,–	6,0	5,5	2,0	7,0	6,0	6,7	1,8	0,0	4,7	6,3	6,7	7,0	6,3	6
V9 II-8	3,0	–,–	1,0	–,–	3,5	0,5	1,3	0,3	0,0	0,0	–,–	–,–	–,–	–,–	4
V9 II-9	0,0	–,–	0,0	–,–	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
V9 II-10	0,0	–,–	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
V9 II-12	0,0	–,–	0,0	2,0	3,0	3,0	1,7	0,3	0,0	0,0	4,7	0,7	5,0	4,7	4
V9 II-13	0,0	–,–	0,0	0,0	1,0	1,5	1,7	0,0	0,0	0,0	4,7	0,0	5,0	4,0	3
V9 II-14	–,–	5,0	7,0	2,0	3,5	4,0	5,7	0,5	0,0	4,7	6,7	5,0	7,0	6,3	6
V9 II-18	–,–	7,0	2,0	8,0	2,5	6,5	5,3	2,0	0,0	5,3	8,0	7,0	7,0	7,3	6
V9 II-20	2,0	–,–	2,0	0,0	2,5	2,0	2,0	1,7	0,0	–,–	–,–	–,–	–,–	–,–	4
V9 II-23	0,0	–,–	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0	3,0	5,0	2
V9 II-24	5,0	–,–	–,–	–,–	–,–	3,0	3,7	2,3	–,–	–,–	–,–	–,–	–,–	–,–	6?
V9 II-27	–,–	–,–	–,–	–,–	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,7	0,7	–,–	–,–	3,0	2
V9 II-40	2,0	8,0	7,0	7,0	7,0	6,5	5,7	2,7	0,0	–,–	–,–	–,–	–,–	–,–	7

Table 6.2. Average fertility values in field conditions and fertility class of the plants from which the clones of the F_2 $Pt_{67}V9$, examined in the phytotron, derived.

uren van de reeks 12...24°C. De tot een bepaalde groep behorende klonen vertoonden, zoals uit afb. 6.1 blijkt, i.h.a. een regelmatig gedragspatroon bij de verschillende temperaturen: steeds alle ongeveer even fertiel. Slechts een drietal klonen (gearceerd in afb. 6.1) vertoonde kleine (I-25 en II-23) of vrij sterke (I-27) onregelmatigheden. Zowel bij 12 als bij 15°C vielen de klonen in twee groepen uiteen, resp. met geringe en met matige tot hoge gemiddelde fertiliteitswaarde. De scheiding was het scherpst bij 15°C. De klonen met geringe fertiliteit bij 12 en 15°C waren bij 18°C volledig of bijna volledig steriel (groep A; 9 individuen). De klonen met matige tot hoge gemiddelde fertiliteitswaarde bij 12 en 15°C vertoonden bij 18°C grote variabiliteit, maar vormden nog een samenhangend geheel; bij 21°C echter vielen deze klonen in vier groepen (B t.e.m. E) uiteen. Groep B was bij 21°C volledig steriel, terwijl de hiervan niet scherp onderscheiden groep C nog een geringe mate van fertiliteit vertoonde De twee resterende groepen D en E waren bij 21°C nog matig resp. goed fertiel. Bij 24°C waren ook de klonen van groep D volledig steriel, terwijl de fertiliteit van groep E sterk afnam. Gezien het gedrag bij andere temperaturen dan 12°C, lijkt het gerechtvaardigd de gearceerde klonen I-25 en II-23 tot groep B te rekenen, terwijl I-27 vanwege zijn zeer onregelmatig gedrag in de verdere analyse buiten beschouwing gelaten wordt.



Afb. 6.1. Rangschikking van de klonen van de F_2 $Pt_{67}V9$ naar gemiddelde fertiliteitswaarde bij de temperaturen van de reeks 12...24°C. Klonen met onregelmatig gedragspatroon zijn gearceerd: ▩ = I-25; ▨ = I-27; ▤ = II-23
↑ = positie van de F_1-ouder. Bespreking in tekst.

Fig. 6.1. Arrangement of the clones of the F_2 $Pt_{67}V9$ according to average fertility value at the temperatures of the series 12...24°C. Most of the clones always fall into the same of the fertility groups A to E inclusive. Clones showing irregular behaviour are hatched; see Dutch caption.
↑ = position of the F_1-parent.

De verkregen gegevens zouden nu als volgt kunnen worden geïnterpreteerd. Bij 12 en 15°C trad een 1:3 splitsing op voor een herstellergenenpaar Rf_1-rf_1 (9 rf_1rf_1 versus 30 Rf_1.). De heterozygoten Rf_1rf_1 (groepen B en C) en de homozygoten Rf_1Rf_1 (groepen D en E) zijn, zoals uit de afb. valt af te lezen, bij 15°C nauwelijks te onderscheiden: (bijna) volledige dominantie van Rf_1 over rf_1. Bij 18°C echter blijken de heterozygoten en homozygoten bijna volledig gescheiden te zijn, zodat de werking van Rf_1 hier intermediair zou zijn. De verdere opsplitsing bij 21°C, zowel van de heterozygote als van de homozygote klonen, zou kunnen worden verklaard door het aannemen van een tweede factorenpaar voor fertiliteitsherstel, verantwoordelijk voor zowel het verschil in fertiliteit tussen klonen van de groepen B en C (Rf_1rf_1, samen 19 individuen), als voor het verschil tussen klonen van de groepen D en E (Rf_1Rf_1, samen 11 individuen). De getalsverhoudingen B:C (14:5) en D:E (7:4) lijken te duiden op een monofactoriële splitsing, waarbij de homozygoot recessief, rf_2rf_2, het meest fertiel is.

In de voorgestelde hypothese wordt Rf_1 beschouwd als de hoofdfactor voor fertiliteitsherstel. De invloed van het gen rf_2 op het fertiliteitsniveau is betrekkelijk gering en uit zich alleen bij hogere temperaturen (vooral 21 en 24°C). Naast de factorenparen Rf_1-rf_1 en Rf_2-rf_2 moet de aanwezigheid van tenminste een derde herstellerfactor worden aangenomen, om het ontbreken van volledig steriele planten bij 12°C te kunnen verklaren. Er moet dan aangenomen worden, dat deze derde factor (of dit factorencomplex), aangeduid als Rf_3, in homozygote vorm in alle F_2-planten, en dus ook in de F_1 en de beide ouderplanten, aanwezig was. Reeds in hoofdstuk 4 werd de aanwezigheid van cryptomere genen voor fertiliteitsherstel in de normaal fertiele en in de steriele Snowball-ouders geponeerd, ter verklaring van verschillen binnen en tussen de diverse F_1's. De invloed van Rf_3 lijkt eveneens tamelijk gering; in afwezigheid van de hoofdfactor (groep A) veroorzaakt dit gen meestal alleen bij 12 en 15°C een geringe mate van fertiliteit. Eén plant uit groep A echter was zelfs bij 18°C nog niet volledig steriel. Mogelijk hebben we daar te maken met de gecombineerde werking van Rf_3Rf_3 en rf_2rf_2. Een overzicht van de genotypen voor de groepen A t.e.m. E, met bijbehorende aantallen planten, wordt gegeven in tabel 6.3.

Op grond van de splitsing in de F_2 moet het genotype van de F_1-plant Rf_1rf_1 $Rf_2rf_2Rf_3Rf_3$ zijn geweest en van de beide ouderplanten resp. $Rf_1Rf_1rf_2rf_2Rf_3Rf_3$ (homozygote hersteller) en $rf_1rf_1Rf_2Rf_2Rf_3Rf_3$ (normaal fertiel met cryptomere herstellerfactor(en)). Het fertiliteitsverloop van de F_1 zou dus moeten overeenkomen met dat van planten in groep B. De positie van de F_1-plant bij de verschillende temperaturen is in afb. 6.1. met ↑ aangegeven, en beantwoordt volledig aan de verwachting.

TABEL 6.3. Hypothetische genotypen van de F_2-populatie $Pt_{67}V9$ op grond van de reactie op de temperatuurreeks 12...24 °C in het fytotron (zie afb. 6.1).

Splitsingsgroep/ *Segregation group*	Voorgesteld genotype/ *Proposed genotype*	Aantal planten/ *Number of plants*	Verwacht/ *Expected*	P
A	$rf_1rf_1Rf_2.\ Rf_3Rf_3$ $rf_1rf_1rf_2rf_2Rf_3Rf_3$	9	9,75	
B	$Rf_1rf_1Rf_2.\ Rf_3Rf_3$	14	14,63	$\chi^2 = 1{,}13$
C	$Rf_1rf_1rf_2rf_2Rf_3Rf_3$	5	4,87	$p \sim 0{,}90$
D	$Rf_1Rf_1Rf_2.\ Rf_3Rf_3$	7	7,31	
E	$Rf_1Rf_1rf_2rf_2Rf_3Rf_3$	4	2,44	
Totaal/*Total*		39	39,00	

Table 6.3. Hypothetical genotypes of the F_2-population $Pt_{67}V9$, based on the response to the temperatures of the series 12...24 °C in the phytotron (see fig. 6.1).

6.3. VERGELIJKING VAN DE CLASSIFICATIE VAN $PT_{67}V9$ OP GROND VAN WAARNEMINGEN TE VELDE MET DE CLASSIFICATIE IN HET FYTOTRON

In tabel 6.4 wordt de indeling van V9 in fertiliteitsklassen 0...8 op grond van de veldwaarnemingen vergeleken met de op fytotrongegevens gebaseerde indeling in de fertiliteitsgroepen A...E.

Van de klonen met geringe fertiliteitsexpressie in het fytotron (groep A) bleken ook de uitgangsplanten in de laagste fertiliteitsklassen (0, (0) en 1, éénmaal 2) te zijn ingedeeld. Vijf van deze uitgangsplanten waren in het veld steeds steriel, ofschoon de waarnemingen tot laat in het seizoen werden voortgezet (verg. tabel 6.2) en ofschoon de betreffende planten in het fytotron bij 12 en 15 °C alle enigszins fertiel waren (tab. 6.1). Hieruit bleek eens te meer, dat planten met een gering herstelvermogen in het veld niet steeds worden herkend, en dat dus indeling in de fertiliteitsklassen (0) of 0 de aanwezigheid van geringe doses herstellerfactoren niet uitsluit.

De uitgangsplanten van klonen uit groep B bleken in het veld te vallen in de klassen 2, 3 en 4, die van groep C in de klassen 4 en 5, zodat ze, evenmin als de klonen in het fytotron, scherp gescheiden waren. Van de meeste klonen uit groep D waren de uitgangsplanten tamelijk goed fertiel (klasse 6, éénmaal 7). De aanwezigheid van kloon II-13 in groep D was echter merkwaardig. De uitgangsplant hiervan vertoonde slechts een geringe fertiliteit (klasse 3). Het lijkt niet uitgesloten, dat kloon II-13 bij vergissing van een andere plant was genomen. De uitgangsplanten van klonen uit groep E waren goed fertiel (klasse 7, éénmaal 8).

In grote lijnen kwam de indeling in fertiliteitsklassen op grond van veldwaarnemingen, dus vrij goed overeen met de op grond van de fytotronproeven aan de individuen van $Pt_{67}V9$ toegekende genotypen. Alleen lettend op de hoofdfactor, waren alle planten van de klassen 8, 7 en 6 homozygoot Rf_1Rf_1; de planten van de klassen 5, 4 en 3 waren heterozygoot Rf_1rf_1, terwijl de klassen 1, (0) en 0 planten met het genotype rf_1rf_1 bevatten. Planten van klasse 2 waren meestal

TABEL 6.4. Vergelijking van de verdeling over fertiliteitsklassen van de F_2 $Pt_{67}V9$ onder veldomstandigheden met de indeling in de groepen A. t.e.m. E in het fytotron. Bespreking in tekst.

Planten in groep A/ *Plants of group A*	Veldclassificatie/*Field classification*	Planten in groep B/ *Plants of group B*	Veldclassificatie/*Field classification*	Planten in groep C/ *Plants of group C*	Veldclassificatie/*Field classification*	Planten in groep D/ *Plants of group D*	Veldclassificatie/*Field classification*	Planten in groep E/ *Plants of group E*	Veldclassificatie/*Field classification*
V9 I-3	0	V9 I-8	4	V9 I-14	4	V9 I-11	7	V9 I-2	8
V9 I-5	1	V9 I-12	2	V9 I-26	5	V9 I-24	6	V9 I-35	7
V9 I-7	1	V9 I-16	2	V9 I-32	5	V9 II-7	6	V9 II-2	7
V9 I-23	(0)	V9 I-18	4	V9 II-8	4	V9 II-13	3	V9 II-40	7
V9 I-29	1	V9 1-20	3	V9 II-20	4	V9 II-14	6		
V9 I-37	(0)	V9 I-22	3			V9 II-18	6		
V9 II-9	0	V9 I-25	3			V9 II-24	6?		
V9 II-10	0	V9 I-28	4						
V9 II-27	2	V9 I-30	2						
		V9 I-31	2						
		V9 I-38	2						
		V9 II-4	3						
		V9 II-12	4						
		V9 II-23	2						

Table 6.4. Comparison of the distribution over fertility classes of the F_2 $Pt_{67}V9$ in field conditions with the classification into the groups A to E inclusive in the phytotron. Both classifications are in good agreement.

Rf_1rf_1, maar in één geval (II-27) bleek ook een homozygoot recessieve plant tot deze fertiliteitsklasse te behoren. Ook in het fytotron was dit de enige plant uit groep A, die zelfs bij 18 °C nog in lichte mate fertiel was. Zoals al eerder gesuggereerd werd zouden we hier te maken kunnen hebben met een plant van het genotype $rf_1rf_1rf_2rf_2Rf_3Rf_3$.

6.4. Toetsing van de ontwikkelde hypothese aan een aantal met PT_{67}V9 verwante veldnakomelingschappen

De in onderhoofdstuk 6.3 ontwikkelde hypothese betreffende aantal en aard van de in V9 werkzame herstellergenen werd getoetst aan een aantal te velde beoordeelde nakomelingschappen, waarin een met V9 vergelijkbare uitgangssituatie aanwezig was. Het betrof hier F_2's van kruisingen tussen de ook bij V9 gebruikte homozygote hersteller Pt_{65}205-3 en verschillende F- en MS-Snowball planten.

Tabel 6.5. Toetsing van de waarschijnlijkheid van de splitsingsverhoudingen 1:3 en 3:13 bij een aantal F_2's van kruisingen Pt_{65}205-3 × F-Snowball (boven) en MS-Snowball × 205-3 (onder). MS omvat de fertiliteitsklassen 0, (0) en 1; F omvat de klassen 2...8 (verg. tabel 4.6 en 4.7). Bespreking in tekst.

Nakomelingschap /*Progeny*	Splitsing/ *Segregation*		Theoretische verhouding/*Theoretical ratio*			
			1:3		3:13	
	MS	F	χ^2	P	χ^2	P
Pt_{66}28-12 ⊗	19	52	0,12	$0,70 < p < 0,80$	3,00	$0,05 < p < 0,10$
Pt_{66}28-13 ⊗	12	67	4,05	$0,01 < p < 0,05$	0,65	$0,50 < p < 0,60$
Pt_{66}29-9 ⊗	3	16	0,85	$0,30 < p < 0,40$	0,12	$0,70 < p < 0,80$
Pt_{66}29-20 ⊗	11	75	7,84	$p < 0,01$	1,98	$0,10 < p < 0,20$
Pt_{66}35-10 ⊗	16	64	1,07	$p = 0,30$	0,08	$0,70 < p < 0,80$
Pt_{66}35-11 ⊗	15	59	0,88	$0,30 < p < 0,40$	0,11	$0,70 < p < 0,80$
Pt_{66}36-19 ⊗	6	72	12,46	$p < 0,01$	6,26	$0,01 < p < 0,05$
Pt_{66}37-4 ⊗	10	67	5,92	$0,01 < p < 0,05$	1,68	$0,10 < p < 0,20$
Pt_{66}38-7 ⊗	20	60	0,00	$p > 0,99$	2,05	$0,10 < p < 0,20$
Pt_{66}39-27 ⊗	16	64	1,07	$p = 0,30$	0,08	$0,70 < p < 0,80$
Pt_{66}40-38 ⊗	6	70	11,85	$p < 0,01$	5,74	$0,01 < p < 0,05$

Table 6.5. Test of the probability of the segregation ratios 1:3 and 3:13 in a number of F_2's of crosses Pt_{65}205-3 × F-Snowball (above) and MS-Snowball × 205-3 (below). MS comprises the fertility classes 0, (0) and 1; F comprises the classes 2...8 (cf. tab. 4.6 and 4.7). The probability of a 3:13 ratio is greater than that of a 1:3 ratio in nine cases.

Met de Chi-kwadraat toets werd in al deze nakomelingschappen de waarschijnlijkheid van een 1:3 splitsing tussen de planten in de klassen 0, (0) en 1 (rf_1rf_1); aangeduid als MS, en de planten in de klassen 2...8 (Rf_1.), aangeduid als F, bepaald. Aangezien de mogelijkheid bestond, dat (de) planten met het genotype $rf_1rf_1rf_2rf_2Rf_3Rf_3$ in klasse 2 waren ingedeeld (verg. 6.3, laatste alinea) werd daarnaast ook de splitsingsverhouding 3:13 op waarschijnlijkheid beoor-

deeld. De resultaten van deze bewerking zijn samengevat in tabel 6.5.

Bij zes F_2's werd goede overeenstemming met de theoretische verhouding 1:3 gevonden; bij de vijf overige F_2's was het relatieve aantal fertiele planten echter zo groot, dat een 1:3 splitsing weinig waarschijnlijk leek. De waarschijnlijkheid van een splitsingsverhouding 3:13 was in negen van de elf nakomelingschappen groter dan die van een 1:3 splitsing. Voor een verhouding 3:13 werd weliswaar ook tweemaal een p-waarde <0,05 gevonden, doch de p-waarde voor een 1:3 splitsing was in deze gevallen nog geringer. Op grond van deze resultaten lijkt de conclusie gewettigd, dat voor de F_2 van kruisingen tussen de homozygote hersteller Pt_{65}205-3 en normaal fertiele vaderplanten resp. steriele moederplanten van het ras Snowball, de uit de fytotronproeven afgeleide aanwezigheid van de herstellerfactoren Rf_1 en rf_2 in de herstellerlijn (en van het Rf_3-complex in beide kruisingsouders), een aanvaardbare basis vormt ter verklaring van het herstel van fertiliteit. Voor een volledige bewijsvoering zou toetsing op grote schaal en onder beheerste omstandigheden van de F_3-lijnen van alle F_2-genotypen nodig zijn.

TABEL 6.6. Toetsing van de waarschijnlijkheid van de splitsingsverhouding 3:13 bij de F_2-nakomelingschappen van kruisingen MS-First Lady × homozygote hersteller.

Nakomelingschap/ *Progeny*	Splitsing/ *Segregation*		Theoretische verhouding/ *Theoretical ratio*	χ^2	P
	MS	F			
Pt_{66}4316–2 ⊗	12	38	3:13	0,90	0,30 < p < 0,40
Pt_{66}4316–8 ⊗	14	66	3:13	0,08	0,70 < p < 0,80
Pt_{66}4316–28 ⊗	21	59	3:13	2,95	0,05 < p < 0,10
Pt_{66}4316–36 ⊗	12	68	3:13	0,74	0,30 < p < 0,40

Table 6.6. Test of the probability of the segregation ratio 3:13 in F_2-progenies from crosses MS-First Lady × homozygous restorer.

Een goede overeenkomst met de splitsingsverhouding 3:13 werd ook gevonden bij de vier F_2's (MS-First Lady × R) ⊗ (tabel 6.6) en bij een aantal F_2's (MS-Blue Bedder × R) ⊗. Het is echter niet zonder meer te zeggen of de hier verkregen splitsingen werden veroorzaakt door dezelfde herstellergenen als in de eerder behandelde nakomelingschappen.

6.5. SAMENVATTENDE BESPREKING

Polygene overerving van fertiliteitsherstel bij de petunia werd reeds in 1958 gesuggereerd door GOLDSMITH (zie DUVICK, 1959[b]), terwijl ook HAMILTON (1962, 1965) een gecompliceerde overerving vermoedde. Uit de eigen resultaten werd het voorkomen van (tenminste) 3 genen voor fertiliteitsherstel afgeleid. Eén daarvan (Rf_1) moet worden beschouwd als hoofdfactor voor fertiliteitsherstel, de andere (rf_2 en Rf_3) als accessorische factoren. In wezen is Rf_3 niet een

welomschreven factor, doch het complex van de (cryptomere) herstellergenen, die niet alleen in de hersteld fertiele ouder, maar ook in de normaal fertiele ouderplanten van het ras Snowball in homozygote vorm aanwezig waren, en waarvoor dus noch in de F_1 noch in de F_2 splitsing optrad.

De gecompliceerdheid van het herstelmechanisme bij de petunia berust niet alleen op het aantal, maar ook op de werking van de factoren. Bij de F_2 $Pt_{67}V9$ werd in het fytotron bij 12 en 15 °C vrijwel volledige dominantie van het allel Rf_1 over rf_1 gevonden. Bij hogere temperaturen (18 en 21 °C) was Rf_1rf_1 echter duidelijk intermediair. Bij 21 °C werd goede fertiliteit alleen verkregen bij gelijktijdige aanwezigheid van de homozygote hoofdfactor Rf_1Rf_1 en de homozygoot recessieve factor rf_2rf_2, terwijl bij 24 °C ook planten met dit genotype nog maar weinig fertiel waren. De situatie bij de petunia vertoont analogie met de door DUVICK (1966) geponeerde hypothese voor het herstelmechanisme bij sorghum.

De hier opgestelde hypothese betreffende aantal en aard van de herstellergenen heeft primair slechts geldigheid voor kruisingen tussen MS- resp. F-Snowball en volledig homozygote herstellerplanten, afgeleid van Pt_{65}201, 205 en 207 (zie afb. 4.1). Zowel in de rassen Blue Bedder, First Lady en Rosy Morn, als in andere dan de genoemde herstellerplanten, komen mogelijk andere al dan niet cryptomere, herstellergenen voor.

7. KOPPELING TUSSEN BLOEMKLEURFACTOREN EN FERTILITEIT-HERSTELLENDE GENEN

7.1. Inleiding

Bij de veldwaarnemingen in 1966 viel het op, dat in een aantal families een duidelijk verband bestond tussen fertiliteit en bloemkleur. Planten met nagenoeg ongekleurde, ‚witte', bloemen bleken gemiddeld fertieler dan die met gekleurde bloemen. De gevonden correlatie zou kunnen berusten op koppeling tussen het allelenpaar van de hoofdfactor voor fertiliteitsherstel (Rf_1-rf_1) en de allelen van een factorenpaar voor bloemkleur (B_x-b_x).

De betrokken nakomelingschappen waren alle Tk_1-familes van kruisingen tussen planten uit nummer $Pt_{65}314^b$ en ‚wit'-bloemige, homozygoot hersteld fertiele planten. De F_1 ($Pt_{65}314^b$) was ontstaan uit kruisingen tussen gekleurdbloemige, steriele moederplanten en de ‚wit'-bloemige herstellerlijn $Pt_{60}14$ (zie afb. 4.1). Ze was uniform gekleurdbloemig, en vertoonde een geringe mate van fertiliteitsherstel (verg. pag. 23). De ‚wit'-bloemige herstellerlijn bezat dus het genotype b_xRf_1/b_xRf_1, de steriele, gekleurdbloemige uitgangsplanten waren B_xrf_1/B_xrf_1, en de F_1 was uniform B_xrf_1/b_xRf_1 (gekleurdbloemig; partieel fertiel of steriel, afhankelijk van het restgenotype).

In de Tk_1-families van 1966 met $Pt_{65}201$-4 als vader werd de vermoede koppeling nader geanalyseerd door de nakomelingen in te delen in de vier fertiliteitsklassen I (zeer gering fertiliteitsherstel), II, III, en IV (bijna volledig fertiel) en het percentage gekleurdbloemige planten in elke fertiliteitsklasse te bepalen (tabel 7.1). Uit de tabel valt duidelijk af te lezen, dat het percentage gekleurdbloemige planten bij toenemende fertiliteit sterk afnam. De families van tabel 7.1 bevatten tezamen 241 gekleurdbloemige tegenover 226 ‚wit'-bloemige planten. Deze verhouding is in overeenstemming met een te verwachten 1:1 splitsing ($\chi^2 = 0{,}48$; $0{,}50 < p < 0{,}60$).

De planten in fertiliteitsklasse IV waren vermoedelijk alle homozygoot voor de herstellerfactor Rf_1, terwijl de klassen I en II heterozygote planten bevatten. Wanneer, op grond van de in hoofdstuk 6 besproken resultaten, aangenomen wordt, dat van de planten van klasse III ongeveer $\frac{1}{3}$ het genotype Rf_1Rf_1 bezat (~klasse 6 volgens de indeling in fertiliteitsklassen 0...8), dan vinden we een verhouding van 219 homozygote tegenover 248 heterozygote planten, hetgeen eveneens goed overeenkomt met de te verwachten 1:1 verhouding ($\chi^2 = 1{,}78$; $0{,}10 < p < 0{,}20$).

In het materiaal van 1966 werden een aantal zelfbestuivingen en kruisingen uitgevoerd aan ‚witte' en gekleurdbloemige planten van de verschillende fertiliteitsklassen, welke resulteerden in de in tabel 7.3 vermelde nakomelingschappen St-1...St-28. Met uitzondering van $Pt_{66}3$-9 werden alle in de kruisingen gebruikte planten ook zelfbevrucht. Aan de hand van deze nakomelingschappen werd de situatie in 1967 nader geanalyseerd. Voorafgaande aan die analyse worden in onderhoofdstuk 7.2 thans eerst als basis daarvoor enkele hoofdpunten uit de genetische bloemkleuranalyse bij de petunia weergegeven.

TABEL 7.1. Correlatie tussen bloemkleur en fertiliteit bij een aantal terugkruisingsnakomelingschappen (MS × R) × R in 1966.

Veldnrs. 1966/ *Field Nos. 1966*	Kruisingscombinaties 1965/ *Cross combinations 1965*	Aantal planten in fertiliteitsklasse:/ *Number of plants in fertility class:*							
		I		II		III		IV	
		totaal/ *total*	gekleurd/ *coloured*	totaal/ *total*	gekleurd/ *coloured*	totaal/ *total*	gekleurd/ *coloured*	totaal/ *total*	gekleurd/ *coloured*
Pt_{66} 2/3	Pt_{65} 314b-10 × 201-4	–	–	18	16	12	11	42	4
Pt_{66} 4/5	Pt_{65} 314b-1 × 201-4	12	12	21	15	18	9	29	7
Pt_{66} 6/7	Pt_{65} 314b-3 × 201-4	4	4	19	16	19	12	36	11
Pt_{66} 8/9	Pt_{65} 314b-9 × 201-4	30	27	9	3	19	6	21	3
Pt_{66} 10/11	Pt_{65} 314b-16 × 201-4	7	7	16	12	11	9	44	20
Pt_{66} 12/13	Pt_{65} 314b-27 × 201-4	16	14	30	17	20	3	14	3
Totaal/*Total*		69	64	113	79	99	50	186	48
Aandeel gekleurde planten/ *Proportion of coloured plants*		93%		70%		51%		26%	

Table 7.1. Correlation between flower colour and fertility in a number of backcross progenies (MS × R) × R in 1966.

7.2. Bloemkleurgenen bij de petunia

Door Bianchi en medewerkers is de erfelijkheid van bloemkleur bij de petunia grondig geanalyseerd (Bianchi, 1960; Wiering, 1967, pers. meded.). Hun resultaten kunnen als volgt worden samengevat. Het celvocht van gekleurde bloemen bevat glycosiden van bepaalde anthocyanidinen. Voor de vorming van een ruime hoeveelheid van het basis-anthocyanidine is de gecombineerde werking van twee dominante genen B_1 en B_2 nodig. B_1 alleen veroorzaakt anthocyaanvorming in het aderingspatroon van bloembuis en bloemzoom, terwijl B_2 bij aanwezigheid van B_1 de vorming van anthyocaan in het tussen de adering gelegen weefsel van de bloemzoom stimuleert, maar geen effect heeft in de bloembuis. Planten van de genotypen $b_1b_1b_2b_2$ en $b_1b_1B_2$. vormen dus totaal geen stuifmeel en bloeien zuiver wit. Planten met het genotype $B_1B_1b_2b_2$ of $B_1b_1b_2b_2$ echter bezitten een gekleurde adering, terwijl op de bloemzoom bovendien soms weinig scherp omgrensde gekleurde vlekjes voorkomen. De bloemkleur van deze planten wordt hier verder aangeduid als ‚wit'.

Tabel 7.2. Overzicht van enige bloemkleuren bij petunia en de bijbehorende genotypen. HCC = Horticultural Colour Chart. Gegevens verkregen van H. Wiering, Genetisch Instituut, Univ. van Amsterdam.

Genotype/*Genotype*	Bloemkleur/*Flower colour*	HCC-nr./*HCC No.*
b_1b_1...	wit/*white*	
$B_1.\ b_2b_2$...	‚wit'; bloembuis geaderd, bloemzoom aangelopen/ '*white*'; *flower tube veined, edge of the corolla colouring slightly*	022/1
$B_1.\ B_2.\ o_1o_1o_2o_2m_1m_1$	rood/*red*	025/1
$B_1.\ B_2.\ O_1$.....m_1m_1	vuilrood/*greyish red*	0023
$B_1.\ B_2.\ o_1o_1O_2.\ m_1m_1$	matrood/*dull red*	29
$B_1.\ B_2.\ o_1o_1o_2o_2M_1.$	magenta/*magenta*	730/1
$B_1.\ B_2.\ O_1$.....$M_1.$	violet/*violet*	30/1
$B_1.\ B_2.\ o_1o_1O_2..M_1.$	‚heb'/'*heb*'* (verblauwd magenta/*bluish magenta*)	30/1

Table 7.2. Tabulation of some flower colours in petunia and their corresponding genotypes. HCC = Horticultural Colour Chart. Data obtained from H. Wiering, *Institute of Genetics, Univ. of Amsterdam.*
*'*heb' stands for Dutch* ‚Hemelroosje verblauwd'

Binnen de sterk gekleurde $B_1.B_2.$-planten komen onder de invloed van twee dominant-recessief werkende genenparen, een oxydatiefactor O_1 en een methyleringsfactor M_1, vier hoofdbloemkleurtypen (rood, vuilrood, magenta en violet) voor, elk met zijn eigen specifieke kleurstof (tabel 7.2). Bij planten, die recessief O_1O_1 zijn, kan een tweede, zwakker werkende oxydatiefactor O_2 tot uiting komen.

O_2 veroorzaakt onvolledige oxydatie, zodat mengsels van wel en niet geoxydeerde anthocyanidinen ontstaan, resulterend in de bloemkleuren matrood en ‚heb' (= Hemelroosje verblauwd; Wiering, 1967, pers. meded.). Verdere modificerende en intensiteitsfactoren kunnen hier buiten beschouwing blijven.

7.3. Bloemkleursplitsingen en -genotypen in het eigen materiaal

Aan de hand van de splitsingsverhoudingen voor bloemkleur in de zelfbevruchtingsnakomelingschappen (I_1) werd het genotype van het merendeel van de in tabel 7.3 vermelde ouderplanten bepaald (tabel 7.4). Zuiver wit-bloeiende planten ontbraken volledig, zodat de grondfactor B_1 in alle ouderplanten homozygoot aanwezig moet zijn geweest. De kleuren rood, vuilrood en matrood ontbraken eveneens, zodat ook de factor M_1 blijkbaar homozygoot aanwezig was. De symbolen B_1B_1 en M_1M_1 worden daarom verder weggelaten.

Tabel 7.3. Aard van het materiaal voor het onderzoek naar het verband tussen factoren voor bloemkleur en fertiliteit-herstellende genen; gerangschikt in ‚wit' en gekleurd en binnen elke kleurgroep naar afnemende fertiliteit.

Veldnr. 1967/ *Field No. 1967*	Ouderplant(en)/ *Parent(s) 1966*		Kleurgroep van de ouderplant(en)/ *Colour group of the parent(s)*		Fertiliteitsklasse van de ouderplant(en)/ *Fertility class of the parent(s)*	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
$Pt_{67}St$-1	Pt_{66} 2-4		‚wit'/'*white*'		IV	
$Pt_{67}St$-3	Pt_{66} 4-1		‚wit'/'*white*'		IV	
$Pt_{67}St$-4	Pt_{66} 5-34		‚wit'/'*white*'		IV	
$Pt_{67}St$-6	Pt_{66}11-26		‚wit'/'*white*'		IV	
$Pt_{67}St$-7	Pt_{66} 9-3		‚wit'/'*white*'		IV	
$Pt_{67}St$-11	Pt_{66} 5-33		‚wit'/'*white*'		III	
$Pt_{67}St$-12	Pt_{66}13-24		‚wit'/'*white*'		III	
$Pt_{67}St$-5	Pt_{66}11-16		gekleurd/*coloured*		IV	
$Pt_{67}St$-15	Pt_{66} 5-4		gekleurd/*coloured*		III	
$Pt_{67}St$-16	Pt_{66}13-11		gekleurd/*coloured*		III	
$Pt_{67}St$-17	Pt_{66}10-33		gekleurd/*coloured*		III	
$Pt_{67}St$-18	Pt_{66}10-8		gekleurd/*coloured*		III	
$Pt_{67}St$-2	Pt_{66} 3-5		gekleurd/*coloured*		II	
$Pt_{67}St$-8	Pt_{66} 2-7		gekleurd/*coloured*		II	
$Pt_{67}St$-9	Pt_{66} 3-10		gekleurd/*coloured*		II	
$Pt_{67}St$-10	Pt_{66} 4-14		gekleurd/*coloured*		II	
$Pt_{67}St$-13	Pt_{66}11-19		gekleurd/*coloured*		II	
$Pt_{67}St$-14	Pt_{66} 9-31		gekleurd/*coloured*		II	
$Pt_{67}St$-20	Pt_{66} 4-32		gekleurd/*coloured*		I	
$Pt_{67}St$-21	Pt_{66} 4-5		gekleurd/*coloured*		I	
$Pt_{67}St$-25	Pt_{66}5-33	Pt_{66}5-34	‚wit'/'*white*'	‚wit'/'*white*'	III	IV
$Pt_{67}St$-27	Pt_{66}3-10	Pt_{66}3-9	gekleurd/*coloured*	‚wit'/'*white*'	II	IV
$Pt_{67}St$-28	Pt_{66}3-9	Pt_{66}3-10	‚wit'/'*white*'	gekleurd/*coloured*	IV	II
$Pt_{67}St$-22	Pt_{66}4-32	Pt_{66}4-1	gekleurd/*coloured*	‚wit'/'*white*'	I	IV
$Pt_{67}St$-23	Pt_{66}4-5	Pt_{66}4-1	gekleurd/*coloured*	‚wit'/'*white*'	I	IV
$Pt_{67}St$-24	Pt_{66}4-5	Pt_{66}4-14	gekleurd/*coloured*	gekleurd/*coloured*	I	II

Table 7.3. Nature of the material in the investigations of the relation between flower colour governing factors and restorer genes; classified as 'white' and coloured and within each colour group according to decreasing fertility.

De nakomelingschappen Pt_{67}St-1,-3,-4,-6,-7,-11 en -12 (ouderplanten ‚wit'), bevatten weer uitsluitend nagenoeg wit-bloeiende planten van het genotype $B_1B_1b_2b_2$. De splitsing voor bloemkleur van de nakomelingschappen van gekleurdbloemige ouderplanten is weergegeven in tabel 7.4. De theoretische verhoudingen zijn gebaseerd op onafhankelijke splitsing van de genenparen B_2-b_2, O_1-o_1, en O_2-o_2. Slechts in één geval (St-13) werd een significante afwijking van de te verwachten verhouding gevonden ($p < 0{,}01$). Toch moest aan de ouderplant Pt_{66}11-19 het genotype $B_2b_2o_1o_1O_2o_2$ worden toegekend, op grond van het voorkomen van de kleuren ‚heb' en magenta en het ontbreken van violet. Bij St-10 leverde de indeling in kleurtypen moeilijkheden op, mogelijk door in het spel zijnde intensiteitsfactoren. De ouderplant was echter, blijkens het afsplitsen van ‚witte' naast gekleurde bloemen, zeker B_2b_2. Van een aantal der zelfbevruchte ouderplanten werd het uit de I_1 afgeleide genotype getoetst door beoordeling van de nakomelingschappen uit onderlinge kruisingen. In al deze gevallen werd het op grond van de I_1-splitsing toegekende genotype bevestigd.

7.4. Fertiliteit van het materiaal in 1967

De fertiliteitsbeoordeling van de individuele planten gebeurde op de in hoofdstuk 4, pag. 24 beschreven wijze. Aangezien het aantal beoordelingen per plant bij deze nakomelingschappen iets geringer was dan bij de overige herstellernakomelingschappen, werd geen onderscheid gemaakt tussen de fertiliteitsklassen 6 en 7. Voor het overige correspondeert de indeling geheel met die bij de eerder besproken herstellernakomelingschappen.

De verdeling van de nakomelingschappen over fertiliteitsklassen is weergegeven in tabel 7.5. In de nakomelingschappen van zelfbevruchte planten uit fertiliteitsklasse IV (bijna volledig fertiel), trad nauwelijks splitsing voor fertiliteit op. Deze planten waren blijkbaar alle homozygoot voor de hoofdfactor voor fertiliteitsherstel Rf_1. Bij de nakomelingschappen van planten uit fertiliteitsklassen III, II en I nam het aantal volledig fertiele planten geleidelijk af, terwijl bijna steeds ook volledig steriele planten werden gevonden. Deze splitsing voor fertiliteit berustte voornamelijk op heterozygotie van de ouderplanten voor de herstellerfactor Rf_1, maar ten dele ook op de werking van accessorische herstellergenen, die soms een zo grote invloed hebben, dat het dan niet mogelijk is de planten van het genotype Rf_1Rf_1 en die van het genotype Rf_1rf_1 van elkaar te onderscheiden. Hierop zal in het volgende nader worden teruggekomen.

7.5. Verdeling der fertiliteitsklassen over de bloemkleurtypen B_2. en b_2b_2; koppelingsanalyse

De waarschijnlijke koppeling tussen het hoofdgenenpaar voor fertiliteitsherstel, Rf_1-rf_1, en een genenpaar voor bloemkleur, B_x-b_x, kwam reeds tot uiting in het in 7.1 besproken materiaal van 1966. Uit het voorgaande en vooral uit de tabellen 7.5 en 7.6 blijkt wel, dat B_x-b_x identiek is met het genenpaar B_2-b_2. Voorafgaande aan de verdere bespreking zij opgemerkt, dat, aangezien een

TABEL 7.4. Splitsingsverhoudingen voor bloemkleur in 1967 bij een aantal lijnen van gekleurd-bloemige ouderplanten uit 1966, en de daaruit afgeleide genotypen van de ouderplanten.

Veldnr. 1967/ *Field No.* 1967	Ouderplant 1966/ *Parent 1966*	Aantal planten met bloemkleur:/ *Number of plants with flower colour:* violet/ *violet*	heb/ *heb*	magenta/ *magenta*	‚wit'/ *'white'*	Totaal/ *Total*	Theoretische verhouding/ *Theoretical ratio*	χ^2	P	Genotype ouderplant/ *Parental genotype*
Pt_{67}St-5	Pt_{66}11-16	50	10		18	78	9:3:4	2,37	$0,30 < p < 0,40$	$B_2b_2O_1o_1$...
Pt_{67}St-15	Pt_{66} 5-4	–	32	12	20	64	9:3:4	1,45	$0,40 < p < 0,50$	$B_2b_2o_1o_1O_2o_2$
Pt_{67}St-16	Pt_{66}13-11	44	–	12	15	71	9:3:4	0,99	$0,50 < p < 0,60$	$B_2b_2O_1o_1o_2o_2$
Pt_{67}St-17	Pt_{66}10-33	–	49	–	15	64	3:1	0,08	$0,70 < p < 0,80$	$B_2b_2o_1o_1O_2O_2$
Pt_{67}St-18	Pt_{66}10-8	–	38	15	11	64	9:3:1	0,26	$0,80 < p < 0,90$	$B_2b_2o_1o_1O_2o_2$
Pt_{67}St-2	Pt_{66} 3-5	55	–	–	17	72	3:1	0,07	$0,70 < p < 0,80$	$B_2b_2O_1O_1$...
Pt_{67}St-8	Pt_{66} 2-7	–	55	–	19	74	3:1	0,02	$0,80 < p < 0,90$	$B_2b_2o_1o_1O_2O_2$
Pt_{67}St-9	Pt_{66} 3-10	–	49	–	27	76	3:1	4,49	$0,01 < p < 0,05$	$B_2b_2o_1o_1O_2O_2$
Pt_{67}St-10	Pt_{66} 4-14									B_2b_2.....
Pt_{67}St-13	Pt_{66}11-19	–	28	12	29	69	9:3:4	12,05	$p < 0,01$	$B_2b_2o_1o_1O_2o_2$
Pt_{67}St-14	Pt_{66} 9-31	38	4	5	18	63	36:9:3:16	5,53	$0,10 < p < 0,20$	$B_2b_2O_1o_1O_2o_2$
Pt_{67}St-20	Pt_{66} 4-32	–	–	53	22	75	3:1	0,75	$0,30 < p < 0,40$	$B_2b_2o_1o_1o_2o_2$
Pt_{67}St-21	Pt_{66} 4-5	–	–	19	8	27	3:1	0,31	$0,50 < p < 0,60$	$B_2b_2o_1o_1o_2o_2$

Table 7.4. Segregation ratios for flower colour in 1967 in a number of lines from parents with coloured flowers in 1966, and the parental genotypes derived from them.

aantal planten wel op fertiliteit maar niet op bloemkleur kon worden beoordeeld, de in tabel 7.6 vermelde aantallen planten per fertiliteitsklasse soms iets geringer zijn dan die in tabel 7.5.

TABEL 7.5. Verdeling van de nakomelingschappen Pt_{67}St-1...St-28 over de fertiliteitsklassen 0...8. Bespreking in tekst.

Veldnr. 1967/ *Field No. 1967*	Aantal planten in fertiliteitsklasse:/ *Number of plants in fertility class:*									Genotype ouder-plant(en)/ *Parental Genotype(s)*		Fertiliteits-klasse ouder-plant(en)/ *Fertility class of the parent(s)*	
	0	1	2	3	4	5	6+7	8	Tot.	♀	♂	♀	♂
Pt_{67}St-1	–	–	–	–	–	2	5	71	78	b_2b_2		IV	
Pt_{67}St-3	–	–	–	1	3	5	9	60	78	b_2b_2		IV	
Pt_{67}St-4	–	–	–	–	1	3	8	65	77	b_2b_2		IV	
Pt_{67}St-6	–	–	–	–	1	1	6	69	77	b_2b_2		IV	
Pt_{67}St-7	–	1	–	–	2	10	13	50	76	b_2b_2		IV	
Pt_{67}St-11	3	2	2	3	4	18	26	19	77	b_2b_2		III	
Pt_{67}St-12	–	3	1	–	4	16	24	23	71	b_2b_2		III	
Pt_{67}St-5	–	2	1	–	2	5	2	65	77	B_2b_2		IV	
Pt_{67}St-15	1	1	3	–	1	9	17	46	78	B_2b_2		III	
Pt_{67}St-16	1	–	5	6	4	17	20	26	79	B_2b_2		III	
Pt_{67}St-17	3	7	1	1	2	12	13	27	66	B_2b_2		III	
Pt_{67}St-18	5	–	3	1	4	3	12	44	72	B_2b_2		III	
Pt_{67}St-2	14	5	6	1	6	15	6	25	78	B_2b_2		II	
Pt_{67}St-8	7	4	3	–	5	7	18	33	77	B_2b_2		II	
Pt_{67}St-9	10	3	9	5	3	4	10	36	80	B_2b_2		II	
Pt_{67}St-10	2	4	3	4	4	8	12	40	77	B_2b_2		II	
Pt_{67}St-13	14	7	5	1	2	4	11	32	76	B_2b_2		II	
Pt_{67}St-14	16	9	1	1	4	12	5	31	79	B_2b_2		II	
Pt_{67}St-20	33	14	2	2	4	7	5	11	78	B_2b_2		I	
Pt_{67}St-21	8	4	2	2	1	3	3	6	29	B_2b_2		I	
Pt_{67}St-25	4	5	7	4	5	14	30	9	78	b_2b_2	b_2b_2	III	IV
Pt_{67}St-27	21	6	8	4	4	7	12	18	80	B_2b_2	b_2b_2	II	IV
Pt_{67}St-28	1	5	5	3	3	6	10	30	63	b_2b_2	B_2b_2	IV	II
Pt_{67}St-22	9	4	6	4	6	14	18	17	78	B_2b_2	b_2b_2	I	IV
Pt_{67}St-23	5	3	4	5	8	11	20	15	71	B_2b_2	b_2b_2	I	IV
Pt_{67}St-24	15	6	6	7	7	4	14	16	75	B_2b_2	B_2b_2	I	II

Table 7.5. Distribution of the progenies Pt_{67}St-1...St-28 over the fertility classes 0...8. Most of the parental plants show linkage between b_2 and the major gene for fertility restoration, Rf_1. The parents of St-5 (B_2Rf_1/b_2Rf_1), of St-11 and St-12 (b_2Rf_1/b_2rf_1), and of St-16 (B_2Rf_1/b_2Rf_1) are (selected) recombination types.

Op grond van de verdeling van de nakomelingschappen St-1, -3, -4, -6 en-7 over de fertiliteitsklassen (zeer veel planten van klasse 8, zeer weinig planten van klasse 4 en lager; tabel 7.5), mogen we aannemen, dat het genotype van de ‚wit'-bloemige ouderplanten van fertiliteitsklasse IV b_2Rf_1/b_2Rf_1 was. Het vrij

TABEL 7.6. Verdeling van de fertiliteitsklassen 0...8 over de fenotypen b_2b_2 en B_2. in het materiaal van 1967. Bespreking in tekst.

Veldnr. 1967/ *Field No. 1967*	Fenotype/ *Phaenotype*	Aantal planten in fertiliteitsklasse:/ *Number of plants in fertility class:*								
		0	1	2	3	4	5	6 + 7	8	Tot.
Pt_{67}St-5	b_2b_2	–	–	–	–	1	–	1	16	18
	B_2.	–	2	1	–	1	5	1	49	59
Pt_{67}St-15	b_2b_2	–	–	–	–	–	–	3	17	20
	B_2.	1	–	3	–	1	6	13	20	44
Pt_{67}St-16	b_2b_2	–	–	1	1	–	4	3	6	15
	B_2.	1	–	2	4	4	10	16	19	56
Pt_{67}St-17	b_2b_2	–	–	–	–	1	3	–	9	13
	B_2.	3	6	1	1	1	9	11	17	49
Pt_{67}St-18	b_2b_2	–	–	–	–	–	–	–	10	10
	B_2.	3	–	3	1	4	1	10	31	53
Pt_{67}St-2	b_2b_2	–	–	–	1	–	2	1	12	16
	B_2.	13	4	5	–	5	12	4	12	55
Pt_{67}St-8	b_2b_2	–	–	–	–	–	1	3	15	19
	B_2.	7	4	3	–	4	5	15	17	55
Pt_{67}St-9	b_2b_2	1	–	1	1	1	1	–	22	27
	B_2.	9	3	7	3	2	3	9	13	49
Pt_{67}St-13	b_2b_2	–	1	2	1	1	1	3	19	28
	B_2.	12	5	3	–	1	2	8	9	40
Pt_{67}St-14	b_2b_2	–	1	–	–	–	2	1	14	18
	B_2.	10	8	–	–	4	8	1	14	45
Pt_{67}St-20	b_2b_2	3	–	–	–	1	7	3	8	22
	B_2.	28	14	2	2	3	–	2	2	53
Pt_{67}St-21	b_2b_2	1	–	1	1	–	1	1	4	9
	B_2.	6	3	1	1	1	2	2	2	18
Pt_{67}St-27	b_2b_2	2	1	–	2	3	3	7	14	32
	B_2.	14	2	6	4	1	2	2	3	34
Pt_{67}St-28	b_2b_2	–	–	2	–	1	3	6	26	38
	B_2.	1	5	3	2	2	4	2	1	20
Pt_{67}St-22	b_2b_2	2	–	1	2	1	13	12	12	43
	B_2.	7	4	5	2	5	1	4	5	33
Pt_{67}St-23	b_2b_2	2	–	1	5	5	5	15	10	43
	B_2.	3	3	3	1	4	6	5	5	30
Pt_{67}St-24	b_2b_2	–	–	2	1	1	1	10	14	29
	B_2.	13	5	3	4	4	3	4	2	38

Table 7.6. Distribution of the fertility classes 0...8 over the phaenotypes b_2b_2 and B_2. in the material of 1967. The fairly rare 'white' plants of fertility classes 0, (0) and 1 should be considered heterozygous or homozygous recombination types (b_2Rf_1/b_2rf_1 or b_2rf_1/b_2rf_1). Part of the few plants with coloured flowers of class 8 in the nrs. St-20, -21, -27, -28, -22, -23 and -24 at least are also recombination types (B_2Rf_1/b_2Rf_1 or B_2Rf_1/B_2Rf_1).

geringe aantal planten van klasse 8 en het voorkomen van (bijna) volledig steriele planten in de nrs. St-11 en St-12 maken het zeer waarschijnlijk, dat de eveneens ‚wit'-bloemige ouderplanten hiervan (klasse III) overkruisingstypen b_2Rf_1/b_2rf_1 zijn geweest.

De voor bloemkleur splitsende nakomelingschap St-5 vertoont een fertiliteitsverdeling, die zeer sterk overeenkomt met die bij de uniform ‚witte' nrs. St-1, -3, -4, -6 en -7 (tabel 7.5), terwijl van de planten van klasse 8 drievierde deel gekleurdbloemig is (tabel 7.6). Dit betekent, dat de ouderplant van St-5 (fertiliteitsklasse IV) een overkruisingstype B_2Rf_1/b_2Rf_1 moet zijn geweest. Bij St-16, met vrij weinig planten van klasse 8 en enige planten van geringe fertiliteit, wordt geen duidelijk verschil gevonden in verdeling over fertiliteitsklassen tussen de B_2. en de b_2b_2-planten (tabel 7.6). Zowel bij de ‚witte' als bij de gekleurdbloemige planten komen naast een meerderheid van goed tot matig fertiele planten (klassen 8...5) enkele planten met geringe fertiliteit voor. Het lijkt, dat ook de ouderplant van St-16 een overkruisingstype B_2Rf_1/b_2Rf_1 was, en dat de gemiddeld wat lagere fertiliteit van deze ouderplant (klasse III) en van de nakomelingschap berustte op het ontbreken van aanvullende fertiliteitsfactoren (rest-genotype).

De verdeling over de beide kleurtypen van de nakomelingschappen van de overige gekleurdbloemige ouderplanten van klasse III, en van de nakomelingschappen van ouderplanten van de klassen II en I, laten een duidelijk verschil in fertiliteit zien tussen de ‚witte' en de gekleurdbloemige individuen. Al deze ouderplanten zullen dus waarschijnlijk B_2rf_1/b_2Rf_1 geweest zijn. De verschillen in fertiliteit tussen deze ouderplanten komen derhalve geheel voor rekening van het restgenotype.

Onder de 20 ouderplanten van de nrs. St-1...St-21 zijn er blijkens het voorgaande zeker 4, die een recombinatie-gameet hebben ontvangen: 2 b_2rf_1 en 2 B_2Rf_1. Het zou echter minder juist zijn om op grond hiervan een vrij hoog overkruisingspercentage (20%) aan te nemen. Onder de planten van 1966 werd namelijk met opzet gezocht naar planten met verschillende fertiliteitsexpressie binnen de twee bloemkleurtypen, zodat een zekere selectie op overkruisingstypen kan hebben plaatsgevonden.

Uit de fertiliteitsverdelingen (tabel 7.5 en 7.6) valt af te leiden, dat de werking van Rf_1 onvolledig dominant of intermediair is. De ‚witte' planten (overwegend b_2Rf_1/b_2Rf_1) vertonen steeds een duidelijke piek in de hoogste fertiliteitsklassen. Bij volledige dominantie (en absolute koppeling) zou 2/3 van de gekleurde nakomelingen (B_2rf_1/b_2Rf_1) dezelfde fertiliteitsverdeling moeten vertonen als de ‚witte' planten. In werkelijkheid treedt bij de B_2.-planten een sterke verschuiving van de fertiliteitsverdeling in de richting van de minder fertiele klassen op. Deze verschuiving komt het duidelijkst naar voren in lijnen met geringe restgenotype-werking (St-2, -8, -9, -13, -14, -20, -21). Dit betekent, dat de fertiliteit van de homozygote Rf_1Rf_1-planten (bijna alle ‚witte' individuen) kennelijk vrij weinig, die van de heterozygote Rf_1rf_1-planten (meestal gekleurd) echter in veel sterkere mate door het restgenotype wordt beïnvloed.

Bij een aantal nakomelingschappen uit zelfbevruchting (St-9, -13, -14, -20 en -21) of uit onderlinge kruising (St-27, -28, -22, -23, en -24) worden één of enkele ‚wit'-bloemige planten van de fertiliteitsklassen 0, 1 en 2 gevonden. Deze vrij zeldzame ‚witte' planten met zeer geringe fertiliteit moeten als heterozygote of homozygote overkruisingstypen (b_2Rf_1/b_2rf_1 of b_2rf_1/b_2rf_1) worden beschouwd.

Ook de enkele gekleurdbloemige planten van klasse 8 en misschien ook die van klasse 7 in de nrs. St-20, -21, -27, -28, -22, -23 en -24 zijn zeker ten dele overkruisingstypen (B_2Rf_1/b_2Rf_1 of B_2Rf_1/B_2Rf_1).

Door de sterke invloed van de uitwendige omstandigheden en van het restgenotype op de fertiliteit kan een overkruisingspercentage voor de genenparen B_2-b_2 en Rf_1-rf_1 niet worden bepaald met behulp van nakomelingschappen van zelfbevruchte dubbel-heterozygote ouderplanten. Met wat groter zekerheid is het te bepalen uit nakomelingschappen van terugkruisingen van het type B_2rf_1/b_2Rf_1 (gekleurd, licht fertiel) $\times$ b_2Rf_1/b_2Rf_1 (‚wit', fertiel), b.v. de nrs. St-22, -23 en -27. Hierin zijn de volgende 4 typen te verwachten: de beide oudertypen B_2rf_1/b_2Rf_1 en b_2Rf_1/b_2Rf_1 en de recombinatie-typen B_2Rf_1/b_2Rf_1 (gekleurd, fertiel) en b_2rf_1/b_2Rf_1 (‚wit', licht fertiel). Worden de gekleurd-bloemige planten van fertiliteitsklasse 8 (in St-22, -23 en -27 gezamenlijk 13 individuen) en de ‚witte' planten van de klassen 0, 1 en 2 (9 individuen) beschouwd als recombinatie-typen, dan bedraagt het overkruisingspercentage hier dus 22/215 = 10,2%, hetgeen slechts ongeveer de helft is van de bij de (geselecteerde) ouderplanten in 1966 gevonden waarde.

7.6. Samenvattende beschouwing

De koppeling van kwalitatieve eigenschappen bepalende genen met kwantitatieve factoren uit een polygeen stelsel, is een belangrijk hulpmiddel bij de identificatie van afzonderlijke genen. In het onderhavige geval werd koppeling van het recessieve allel van de grondfactor B_2 voor anthocyanidineproductie met de hoofdfactor voor fertiliteitsherstel (Rf_1) met zekerheid vastgesteld. Het overkruisingspercentage kon door de splitsing voor accessorische herstellergenen en de invloed van het milieu niet met volledige zekerheid worden berekend, maar leek ongeveer 10% te bedragen. Vastgesteld kon worden, dat de expressie van Rf_1Rf_1 in vrij geringe, die van Rf_1 rf_1 in veel sterkere mate door het restgenotype wordt beïnvloed.

8. ONDERZOEK NAAR DE MOGELIJKE VIRUSNATUUR VAN DE STERILITEITSVERWEKKER

8.1. Inleiding

Mede op grond van de vermeende overdracht van steriliteit door middel van enting bij de petunia (zie hoofdstuk 9) is in de literatuur een discussie gaande over de mogelijke aard van het mannelijke steriliteit verwekkend agens in het cytoplasma. Edwardson en Corbett (1961) zijn van mening, dat althans bij de petunia de steriliteit wordt veroorzaakt door een virus. Atanasoff (1964, 1965) voerde argumenten aan voor de stelling, dat vele zo niet alle gevallen van plasmatische steriliteit aan virusaantasting moeten worden toegeschreven. In het artikel van 1964 vermeldde hij een groot aantal gevallen bij uiteenlopende gewassen, o.a. bij ui, bonen, kool, wortel, haver en soja, waar pollensteriliteit als begeleidend verschijnsel van aantasting door bepaalde virussen werd gevonden. In sommige gevallen bleek de zo veroorzaakte steriliteit via enting op gezonde planten onverdraagbaar te zijn, o.a. bij de doornappel (Blakeslee, 1921).

In dit hoofdstuk worden enkele oriënterende proeven besproken, die werden opgezet als pogingen om de aanwezigheid van een virus in het steriliserende plasma aan te tonen.

8.2. Electronenmicroscopisch onderzoek

Door de welwillende medewerking van Ir. T. S. Ie, Afd. Virologie der Landbouwhogeschool, kon enig petunia-materiaal electronenmicroscopisch worden onderzocht. Het door hem verrichte vergelijkend onderzoek aan vegetatieve en generatieve delen van steriele standaardplanten van Snowball en Blue Bedder enerzijds en normaal fertiele planten van Snowball anderzijds, leverde echter geen aanwijzingen op voor het bestaan van een speciaal partikel in het steriliserend plasma. Hiermee is de mogelijkheid dat het steriliserend agens van corpusculaire aard is natuurlijk niet uitgesloten. Het zou kunnen bestaan uit partikels, die wel in hun werking veranderd zijn, maar van het normale deeltje morfologisch niet zijn te onderscheiden. Daarnaast bestaat de mogelijkheid, dat het agens op moleculair niveau of in vloeibare fase werkzaam is.

8.3. Pogingen tot mechanisch overbrengen van het steriliteit verwekkend agens

Jonge zaailingen van de rassen F-Snowball (196 individuen), Snowball S. en G. (287 individuen) en Blue Bedder S. en G. (143 individuen) werden behandeld met perssap van vegetatieve en generatieve delen van MS-Snowball en van F_1-planten MS-First Lady × F-Snowball. Als sapleverancier werden stengels en bladeren van jonge zaailingen (kiemplanten), volwassen bladeren van bloeiende planten, en bloemen en bloemknoppen gebruikt. De behandeling vond plaats aan zaailingen, welke behalve de kiemlobben 5 tot 10 stengelbladeren

bezaten. Het aantal stengelbladeren werd bij alle te behandelen planten tot vijf teruggebracht. Deze werden met carborundumpoeder bestrooid, waarna met behulp van een perstang verkregen perssap via een schuimrubber sponsje over de bladeren uitgewreven werd, zonder het weefsel ernstig te beschadigen. Voor elke te behandelen plant werd vers perssap gebruikt om inactivering van het steriliserend agens door te langdurige blootstelling aan licht en lucht zoveel mogelijk te voorkomen. Na ongeveer 16 uur werd het overtollige carborundum met een fijne broes van de bladeren weggewassen.

De helft der planten van elk der drie groepen werd acht dagen na de eerste behandeling opnieuw met perssap ingewreven. Vooraf werden deze planten van de meeste bladeren en okselspruiten ontdaan; slechts 4 middelgrote bladeren werden overgelaten, waardoor de bewerking sterk werd vereenvoudigd en meer volledig en gelijkmatig kon blijven. Van het behandelde materiaal waren alle planten van de F-Snowball-lijnen EF-19^{a}⊗ en -20^{a}⊗ vermoedelijk volledig homozygoot en genotypisch gelijk; de Snowball S. en G. en de Blue Bedder S. en G.-planten waren onderling niet verwant. Een eventuele genische beheersing van de reactie op sapinwrijving –in analogie met de door FRANKEL vermoede genische beheersing van overdracht van steriliteit via enting (verg. pag. 10)– zou dus waarschijnlijk tot een uniforme reactie van de EF-lijnen en tot een meer individueel gedrag van de overige planten leiden.

De behandelde planten groeiden bijna alle normaal uit en vormden na enige tijd bloemen. Bij de F-Snowball-lijnen EF-19^{a} ⊗ en -20^{a} ⊗ werden weinig abnormaliteiten gevonden. Enkele planten vertoonden een opvallend bleke loofkleur en late bloei, doch de eraan voorkomende bloemen waren goed fertiel. Eén plant bleek volledig steriel en vertoonde ook de karakteristieke bloemkroon van MS-Snowball (verg. pag. 17). Na kruising van deze plant met een normaal fertiel individu werd een uniforme en volledig steriele nakomelingschap verkregen. Dit volledig steriel zijn van één plant uit EF-19^{a} ⊗, terwijl de genotypisch gelijke zusterplanten ervan geheel normaal fertiel waren, lijkt enigszins verdacht en maakt het waarschijnlijk dat het hier gaat om een verdwaald exemplaar van het type MS-Snowball.

Van de behandelde planten van Snowball S. en G. vertoonde een klein aantal dwerggroei, misvormde bladeren en trage bloei. Drie van de abnormale planten vertoonden daarnaast een variabele fertiliteit; sommige bloemen waren goed fertiel, terwijl andere onvolledig fertiel of soms zelfs (bijna) steriel waren. Van één van deze drie planten werd na zelfbestuiving een nakomelingschap verkregen. De nakomelingen vertoonden alle een wat gedrongen groei, maar niet het uitgesproken dwergtype van de ouderplant. De fertiliteit van deze planten was sterk variabel; in het begin van de zomer 1967 overheersten de meer steriele bloemen, later nam de fertiliteit toe. De bij de in deze alinea besproken planten aangetroffen verschijnselen kwamen sterk overeen met die, aangetroffen bij de op pag. 105 te bespreken E_2-nakomelingschappen van de, uit hetzelfde Snowball S. en G.-materiaal afkomstige, entcomponenten Pt_{65}15-14 en 4-9. Daar wordt waarschijnlijk gemaakt, dat de variabele fertiliteitsexpressie niet berust op enigerlei invloed van de steriele entcomponent, maar op de aard van het

Snowball S. en G.-materiaal zelf. De nakomelingschappen uit zelfbevruchting van (na behandeling met perssap) volledig fertiele planten waren alle weer volledig fertiel. Van de behandelde planten Blue Bedder S. en G. vertoonde geen enkele verminderde fertiliteit.

In de hier beschreven proeven met perssapbehandeling van normaal fertiele planten werd overdracht van steriliteit dus in geen enkel geval met zekerheid aangetoond.

8.4. Inactivering van de steriliteitsverwekker via warmteschokbehandeling

De oudste methode voor het virusvrij maken van een gastheer is warmwaterbehandeling. Reeds in 1923 werd door Wilbrink (zie Bos, 1965, pag. 238) aangetoond, dat stekken van suikerriet door onderdompeling in water van 50 tot 52° C gedurende 30 minuten vrij gemaakt werden van de sereh-ziekte, welke naar later bleek op virusaantasting berust.

Bladrolzieke knollen van de aardappel kunnen volgens Kassanis (1950, 1965) virusvrij gemaakt worden door ze gedurende 15 tot 30 dagen bloot te stellen aan een constante temperatuur van 36°C. Hetzelfde resultaat wordt verkregen door gedurende 6 tot 8 weken per etmaal ongeveer 4 uur een hoge (40 tot 42°C) en de rest van het etmaal een lagere temperatuur (15 tot 20°C) toe te dienen (Nagaich en Upreti, 1964). Volgens deze auteurs wordt volledige inactivering van het virus ook bereikt door één warmteschok in water van 50 tot 55°C gedurende 17 tot 20 minuten.

Een poging tot inactivering van het steriliteit verwekkend agens bij de petunia werd ondernomen door droge resp. twee dagen voorgekiemde zaden (uit kruisingen MS × F) te behandelen in water van hoge temperatuur (55 resp. 60°C). De behandelingsduur bedroeg voor de droge zaden 4, 8 en 16, voor de voorgekiemde zaden ½, 1 en 2 uur.

Geen der 1300 zaden behandeld met water van 60°C vertoonde ook maar de geringste kieming, terwijl ook de 350 met 55°C behandelde droge zaden geen van alle kiemden. Alleen de met 55°C behandelde voorgekiemde zaden leverden kiemplantjes en bloeiende planten en wel:

175 zaden, ½ uur 55°C: 68 kiemplantjes; 59 bloeiende planten
175 zaden, 1 uur 55°C: 49 kiemplantjes; 49 bloeiende planten
175 zaden, 2 uur 55°C: 1 kiemplantje; 1 bloeiende plant.

De 873 hieraan onderzochte bloemen waren volledig steriel. Inactivering van het steriliserend agens had dus in geen enkel geval plaats gevonden.

8.5. Discussie

De onderzoekingen naar de mogelijke virusnatuur van het steriliteit verwekkend agens bij de petunia hadden een volledig negatief resultaat. Speciale partikels in het steriliserende plasma werden met het electronenmicroscoop niet gevonden, overbrenging van het steriliteit verwekkend agens via sapinwrijving

kon niet met zekerheid worden aangetoond, en inactivering van het agens door warmwaterbehandeling werd niet verkregen.

Een negatief resultaat na warmteschokbehandeling verkregen ook SHUMWAY en BAUMANN (1966) bij mais en ZEVEN (1967) bij tarwe. Daarentegen meende CLEY (1967) door warmwaterbehandeling van steriel bietenzaad enige min of meer fertiele planten te hebben verkregen. In verband met de gecompliceerde en nog onvolledig bekende werking van fertiliteit herstellende genen bij de biet, lijkt enige reserve t.o.v. dit resultaat echter op zijn plaats.

Hoewel het onderzoek naar de mogelijke virusnatuur van het steriliteit verwekkend agens beperkt werd gehouden en dus geen zeker uitsluitsel omtrent de gestelde vraag geeft, kunnen nog enkele punten worden genoemd, die een virusnatuur van het agens minder waarschijnlijk maken. Eén punt is dat, ondanks het ontbreken van enige voorzorgsmaatregel tegen transport van het steriliserend agens via luizen of andere insecten, onderling contact enz., nimmer spontaan optreden van steriele planten in een fertiele populatie werd waargenomen. Een sterker argument tegen de virus-hypothese is misschien nog de mate van overgang van het steriliteit verwekkend agens via het zaad. Overgang van virusaantastingen via het zaad is weliswaar herhaaldelijk gevonden en is ook bij de petunia en naaste verwanten niet onbekend (HENDERSON, 1931; VALLEAU, 1941), doch in al deze gevallen betreft het onvolledige en zeer variabele overgang van de ziekteverwekker. Naast aangetaste planten komen meestal in meerderheid gezonde planten voor. Kruising tussen plasmatisch steriele moederplanten en fertiele bestuivers leidt evenwel steeds tot een volledig steriele nakomelingschap, tenzij in de vaderplant specifieke genen voor fertiliteitsherstel aanwezig zijn. Een laatste argument tegen virusnatuur van het steriliserend agens is het niet overgaan van steriliteit na enting tussen plasmatisch steriele en normaal fertiele planten, zoals uitvoerig beschreven wordt in hoofdstuk 9.

9. OVERDRACHT VAN STERILITEIT DOOR MIDDEL VAN ENTING

9.1. Inleiding

Overdracht van steriliteit door middel van enting tussen plasmatisch steriele en normaal fertiele planten bij de petunia werd gevonden door Frankel (1956, 1962, 1964), Edwardson en Corbett (1961), en Bianchi (1963, 1964); verg. pag. 9. In al deze gevallen kwam steriliteit niet tot uiting in de entgeneratie zelf, doch pas bij de nakomelingen van (zelfbestoven of onderling gekruiste) fertiele entcomponenten. Overdracht van steriliteit werd steeds slechts in een deel der entcombinaties gevonden, zodat het leek, alsof het genotype van de fertiele receptorplant van invloed was op de transmissie van het steriliteit verwekkend agens. Corbett en Edwardson (1964) meenden de passage van de steriliteitsverwekker door een tussenstam te hebben aangetoond. De door hen gebruikte tussenstam van *Nicotiana tabacum* gedroeg zich neutraal t.o.v. het steriliteit verwekkend agens, d.w.z. ze liet het agens door zonder zelf te worden beïnvloed.

Uitgaande van de resultaten van de bovengenoemde auteurs zullen in het eigen onderzoek de volgende problemen ter sprake komen:

1. Vindt inderdaad overdracht van steriliteit plaats, en zo ja, geschiedt dat dan zowel van ent naar onderstam als van onderstam naar ent?
2. Heeft het genotype van de normaal fertiele receptorplant invloed op het al dan niet overgaan van steriliteit?
3. Hebben herstellergenen invloed op overdracht of op transport van het steriliteit verwekkend agens?
4. Is er naast steriliserende werking van de steriele entcomponent misschien ook een fertiliserende invloed van de fertiele component op de steriele partner aanwezig?

In de volgende paragraaf wordt besproken op welke wijze werd getracht een antwoord op deze vragen te verkrijgen.

9.2. Bespreking van de entcombinaties

9.2.1. *Opzet van de entproeven*

In het kader van de in 9.1. aangeduide probleemstelling werden in de jaren 1964 t.e.m. 1966 grote aantallen entcombinaties tot stand gebracht, vele waarvan reciprook werden uitgevoerd. Het schema van entingen werd zo veelzijdig mogelijk opgezet en omvatte entcombinaties tussen nauw verwante en tussen minder nauw verwante normaal fertiele en plasmatisch steriele planten van hetzelfde ras, entcombinaties tussen planten van verschillende rassen, en entcombinaties tussen diploïde steriele en tetraploïde fertiele planten (verg. tabel 9.1).

Door het invoegen van tussenstammen van hersteld fertiele planten werd getracht eventuele invloed van herstellergenen op het transport van het steriliteit verwekkend agens vast te stellen. Daarnaast werden ‚tripel-enten' gemaakt,

waarbij MS en R resp. F en R op afzonderlijke takken van de F- resp. MS-onderstam werden geënt $\left(\frac{MS+R}{F}\right.$ en $\left.\frac{F+R}{MS}\right)$. Dit om na te gaan of een eventuele blokkerende werking van de hersteller via de entplaats in de fertiele component zou kunnen diffunderen.

Een eventuele fertiliserende invloed van de fertiele entcomponent op de steriele partner werd nagegaan door onderzoek van een groot aantal nakomelingschappen uit kruisingen tussen steriele entcomponenten en onverente normaal fertiele vaderplanten.

TABEL 9.1. Overzicht van aard en aantal van de entcombinaties voor het onderzoek naar eventuele overdracht van plasmatische mannelijke steriliteit via enting. Bespreking zie tekst.

Jaar/ *Year*	Steriele component/ *Sterile component*	Fertiele component/ *Fertile component*	Aantal entcombinaties/ *Number of graft combinations*					
			$\frac{F}{MS}$	$\frac{MS}{F}$	$\frac{F}{\frac{R}{MS}}$	$\frac{MS}{\frac{R}{F}}$	$\frac{MS+R}{F}$	$\frac{F+R}{MS}$
1964	MS-Snowball	F-Snowball	30	30	–	–	–	–
1965	MS-Snowball	F-Snowball	16	16	22	22	–	–
1965	MS-Snowball	Snowball S. en G.	4	4	–	–	–	–
1965	MS-Blue Bedder	Blue Bedder S. en G.	10	10	10	–	–	–
1966	MS-Rosy Morn	F-Rosy Morn	–	10	–	–	–	–
1965	MS-Snowball	Blue Bedder S. en G.	10	10	19	21	–	–
1966	MS-Blue Bedder	F-Rosy Morn	–	10	–	–	–	–
1965	MS-First Lady	F-Snowball	10	10	–	–	4	4
1965	MS-First Lady	Blue Bedder S. en G.	5	5	–	–	–	–
1965	MS-Snowball	Snowball S. en $G._{4x}$	6	6	–	–	–	–
1965	MS-Snowball	Blue Bedder S. en $G._{4x}$	6	6	–	–	–	–

Table 9.1. Tabulation of nature and number of the graft combinations for the investigation into possible transmission of cytoplasmic male sterility by means of grafting. See text for discussion.

9.2.2. *Overzicht van de entingen en waarnemingen omtrent het verloop ervan*

De in 1964 t.e.m. 1966, volgens de op pag. 13 beschreven methode, gemaakte entingen zijn samengevat in tabel 9.1. Van alle bij entingen gebruikte planten werd een controle-stek op eigen wortel aangehouden.

De meeste enkelvoudige entcombinaties, zowel op diploïd als of tetraploïd niveau, waren na 2 tot 3 weken goed vergroeid; verschillen in ent-verenigbaarheid binnen en tussen rassen werden niet gevonden. Wel bleken entingen op de hoofdstengel een groter slagingspercentage op te leveren dan die op zijstengels. Het mislukken van een enting bleek verschillende oorzaken te kunnen hebben. Oudere, enigszins verhoute hoofdstengels verdroogden soms juist onder de

entplaats; jonge, sappige (zij)stengels werden tijdens het vergroeiingsproces gemakkelijk door vochtschimmels aangetast, waardoor de enten eveneens te gronde gingen. Een bepaalde entcombinatie werd als geslaagd beschouwd als tenminste één entscheut volledig met de onderstam vergroeide en enige uitgroei vertoonde. Volgens dit criterium slaagde meer dan 80% van de uitgevoerde entcombinaties.

Aangeslagen enten groeiden doorgaans zeer snel verder uit en vertoonden ongeveer een maand na de entdatum de eerste bloemknoppen. Een aantal aanvankelijk geslaagde entcombinaties ging naderhand alsnog verloren door het afsterven van de onderstam. Dit verschijnsel was geen vorm van vertraagde ent-onverenigbaarheid, want het afstervingsproces deed zich in dezelfde mate voor bij de op eigen onderstam geënte planten, het meest bij de inteeltlijnen van F-Snowball en de bijbehorende steriele versie.

Om te voorkomen dat symptomen, veroorzaakt door de ent-ingreep als zodanig, zouden worden toegeschreven aan de plasmatische verschillen tussen de entpartners, werden ook een aantal homoplastische (ent op eigen onderstam) en heteroplastische controle-entingen $\frac{F}{F}$ en $\frac{MS}{MS}$ uitgevoerd (tabel 9.2).

TABEL 9.2. Overzicht van aard en aantal van de homo- en heteroplastische controle-entingen $\frac{F}{F}$ en $\frac{MS}{MS}$.

Jaar/ *Year*	Entcomponenten/ *Graft components*	Aantal entcombinaties/ *Number of graft combinations*	
		Homoplastisch/ *Homoplastic*	Heteroplastisch/ *Heteroplastic*
1965	F-Snowball	3	4
1965	Snowball S. en G	–	8
1965	Blue Bedder S. en G.	3	4
1966	F-Rosy Morn	3	2
1965	F-Snowball/Blue Bedder S. en G.	–	6
1965	Snowball S. en G./Blue Bedder S. en G.	–	6
1965	MS-Snowball	2	4
1965	MS-Blue Bedder	2	2
1965	MS-First Lady	2	2
1966	MS-Rosy Morn	3	4
1965	MS-Snowball/MS-First Lady	–	10

Table 9.2. Tabulation of nature and number of the homo- and heteroplastic control grafts $\frac{F}{F}$ *and* $\frac{MS}{MS}$.

Entingen met herstellertussenstam vonden in twee étappen plaats. Bij de eerste behandeling werden scheuten van homozygoot hersteld fertiele planten van de lijnen Pt_{65}201, 205 en 207 (zie pag. 23) geënt op normaal fertiele en op

steriele onderstammen. Nadat vergroeiing had plaatsgevonden en de herstellerscheuten voldoende waren uitgegroeid, werden deze ontdaan van bladeren en eventuele zijscheuten en gedecapiteerd. Op het resterende, ca. 5 cm lange stengelstuk werd vervolgens een nieuwe entscheut aangebracht van de andere plasmaconstitutie als die van de onderstam (zie tabel 9.1). Van de tot stand gebrachte combinaties met herstellertussenstam stierven er, na aanvankelijke vergroeiing, een aantal geheel of ten dele af. De groeikracht van de onderstam leek hierbij een belangrijke rol te spelen, alsook de groeiverhouding tussen enten en onderstam. Vooral bij combinaties van de zwak groeiende MS-Snowball als onderstam met de groeikrachtige Blue Bedder S. en G. als ent was de uitval groot. De reciproke combinatie slaagde daarentegen zeer goed.

Bij de tripel-entingen werden de verschillende enten (MS en R resp. F en R) tegelijkertijd op de onderstam aangebracht. Alle combinaties waren na een maand volledig vergroeid.

Volgens FRANKEL (1962, 1964) werd niet alleen bij de nakomelingschappen van fertiele entcomponenten een splitsing in fertiele en steriele nakomelingen gevonden, maar soms ook bij stekken, die enige tijd na geslaagde enting werden weggenomen van de fertiele entcomponent en op eigen wortel verder groeiden. Ter toetsing van deze waarneming, alsmede ter bepaling van de voor steriliteitsoverdracht benodigde periode, werden in 1965, op twee verschillende tijdstippen na de entdatum, beinvloede stekken gesneden van F-Snowball, en op één tijdstip van Blue Bedder S. en G., beide geënt met MS-Snowball. De eerste stekname gebeurde ca. 4, de tweede ca. 10 weken na de entdatum. Van Blue Bedder S. en G. werden alleen op de tweede datum stekken genomen. Alle stekken bewortelden en vormden bloemen.

9.2.3. *Waarnemingen aan de bloeiende entcombinaties*

Van alle fertiele en steriele entcomponenten werden de bloemen onderzocht op mogelijke beïnvloeding door de entpartner. In geen enkel geval week de fertiliteit van de entcomponenten af van die van de bijbehorende controlestekken. Dit resultaat komt geheel met het door Frankel e.a. gevondene overeen (verg. pag. 9).

9.3. ONDERZOEK VAN DE FERTILITEITSEXPRESSIE BIJ NAKOMELINGSCHAPPEN VAN ENTCOMPONENTEN

9.3.1. *Zelf- en kruisbestuiving van entcomponenten*

Door het maken van zelf- en kruisbestuivingen aan de entcomponenten werd nagegaan in hoeverre een onderlinge beïnvloeding van de entpartners tot uiting kwam in de fertiliteit van de ervan verkregen nakomelingschappen. Bij de enkelvoudige entcombinaties werd voornamelijk het volgende bestuivingsschema aangehouden:

1. Zelfbestuiving van de fertiele entcomponent, van de fertiele controle-stek, en van stekken van de fertiele entcomponent op eigen wortel: Onderzoek naar de steriliserende invloed van de steriele entcomponent.

2. Kruising van de steriele entcomponent en van de steriele controle-stek met de controle-stek van de bijbehorende fertiele entpartner of met een willekeurige fertiele plant: Onderzoek naar de fertiliserende invloed van de fertiele entcomponent.
3. Kruising van de fertiele entcomponent met onbeïnvloede normaal fertiele planten en vice versa: Dit kruisingstype is ingevoegd als controle op de waarneming van FRANKEL (1964), dat overdracht van steriliteit op de nakomelingschap van fertiele componenten alleen plaats vond na zelfbestuiving of wanneer beide kruisingsouders met een steriele entpartner verenigd waren resp. geweest waren.

Bij de dubbele entingen (R-tussenstammen en tripel-enten) werd ook zelfbestuiving van de R-component en zijn controle-stek uitgevoerd.

De diverse bestuivingen werden op verschillende tijdstippen na de entdatum gemaakt om een eventuele invloed van de duur van de entverbinding op de onderlinge beïnvloeding van de entpartners na te gaan. De eerste bestuivingen vonden ongeveer een maand na de entdatum plaats, de laatste zeven maanden later. Aangezien i.h.a. slechts 50% van de bestuivingen in bevruchting resulteert werden alle bestuivingen in meervoud uitgevoerd.

9.3.2. *Macroscopische waarnemingen aan de nakomelingschappen*

Een aantal nakomelingschappen van fertiele componenten van enkelvoudige entcombinaties en hun controle-stekken werden in drie achtereenvolgende jaren 1965 t.e.m. 1967 ten dele in de kas en ten dele in het veld uitgeplant. Tijdens de bloei werden alle planten enige keren beoordeeld op fertiliteit. Op grond van de hoeveelheid stuifmeel in de pas geopende helmknoppen werden de afzonderlijke bloemen als volgt globaal geclassificeerd:

ms = bloem steriel; geen stuifmeel in de helmknoppen
ps = bloem bijna steriel; zeer geringe hoeveelheid stuifmeel in enkele of alle helmknoppen
pf = bloem partieel fertiel; matige hoeveelheid stuifmeel in enkele of alle helmknoppen
f? = bloem bijna fertiel; bijna normale hoeveelheid stuifmeel in alle helmknoppen
f = bloem fertiel; normale hoeveelheid stuifmeel in alle helmknoppen.

In 1965 werden 1917 nakomelingen van zelfbevruchte fertiele entcomponenten (alle F-Snowball) verkregen. Hiervan bezaten 1858 uitsluitend fertiele bloemen (fertiliteitswaarde f); 42 planten vertoonden naast geheel fertiele ook één of enkele bloemen met fertiliteitswaarde f?, terwijl bij 9 planten ook de waarde pf werd gevonden. Van 264 planten verkregen na zelfbevruchting van de fertiele controle-stekken waren er 259 volledig fertiel, terwijl 5 planten ook enkele onvolledig fertiele bloemen (f? of pf) bezaten.

De in 1966 verkregen resultaten van beoordelingen van nakomelingschappen zijn samengevat in de tabellen 9.4...9.8. Aangezien de hierin voorkomende onvolledig fertiele en steriele bloemen meestal vrij willekeurig over de planten waren verdeeld en dus zelden planten werden aangetroffen, die door opvallend

TABEL 9.3. Betekenis van afkortingen, gebruikt in de tabellen 9.4...9.9.

Ffs	= Fertiele component van een $\frac{MS}{F}$ entcombinatie/ *Fertile component of a $\frac{MS}{F}$ graft combination*
Fsf	= Fertiele component van een $\frac{F}{MS}$ entcombinatie/ *Fertile component of a $\frac{F}{MS}$ graft combination*
F_0	= Fertiele controle-stek op eigen wortel, afgestekt vóór de enting/ *Fertile control cutting on own root, taken before grafting*
F.fs I	= Fertiele stek op eigen wortel, afgestekt van een $\frac{MS}{F}$ entcombinatie ca. 4 weken na entdatum/ *Fertile cutting on own root, taken from a $\frac{MS}{F}$ graft combination ca. 4 weeks after grafting*
F.fs II	= Als vorige, doch afgestekt ca. 10 weken na entdatum/ *As the previous, but taken ca. 10 weeks after grafting*
F-ent	= Ent van homo- of heteroplastische controle enting $\frac{F}{F}$/ *Scion of homo- or heteroplastic control graft $\frac{F}{F}$*
F-ond	= Onderstam van homo- of heteroplastische controle enting $\frac{F}{F}$/ *Rootstock of homo- or heteroplastic control graft $\frac{F}{F}$*

Table 9.3. Meaning of the abbreviations used in the tables 9.4...9.9.

hoge steriliteit van de overige (fertiele) planten afweken, werden in deze tabellen de bloemen van alle beoordeelde planten van een nakomelingschap of zelfs van alle nakomelingschappen van een bepaald type tezamen genomen. De verklaring van de in deze tabellen gebruikte afkortingen is te vinden in tabel 9.3.

Bij nakomelingschappen (E_2-lijnen) van F-Snowball geënt met MS-Snowball (tabel 9.4) leken, vooral als de fertiele component als ent had gefungeerd (Fsf ⊗), wat vaker steriele bloemen (fertiliteitswaarden ps en ms) voor te komen dan bij de bijbehorende controle-lijnen (F ⊗). Bij de nakomelingschappen van F-Snowball geënt met MS-First Lady (tabel 9.7, boven) echter was het relatieve aantal steriele bloemen zeker niet groter dan bij de daarbij behorende controlelijnen. Het lijkt daarom, mede op grond van de volgende punten, niet waarschijnlijk, dat bij de E_2-lijnen in tabel 9.4 sprake is van een invloed van de steriele entcomponent op de fertiele partner:

1. De minder fertiele bloemen kwamen doorgaans naast een meerderheid van goed fertiele bloemen aan dezelfde plant voor.
2. Na gunstige weersomstandigheden (vrij warm en vochtig) herstelde de fertiliteit van planten met onvolledig fertiele of steriele bloemen zich volledig.
3. De helmknoppen van minder fertiele bloemen waren vaak abnormaal ontwikkeld (verschrompeling; bruinkleuring), en weken sterk af van het karak-

TABEL 9.4. Verdeling van beoordeelde bloemen over de fertiliteitswaarden ms...f bij nakomelingschappen van verschillend type, verkregen van fertiele componenten van entcombinaties tussen F-Snowball en MS-Snowball en bijbehorende controles, in 1966. Zie tekst.

Nakomelingschapstype/ *Progeny type*	Aantal betrokken entcomponenten/ *Number of graft components concerned*	Aantal beoordeelde planten/ *Number of plants estimated*	Aantal bloemen met fertiliteitswaarde:/ *Number of plants with fertility value:*					
			ms	ps	pf	f?	f	Tot.
Ffs ⊗	7	536	6	–	10	21	3179	3216
Fsf ⊗	3	213	15	8	18	38	1226	1305
F.fs I ⊗	7	497	7	15	19	31	3371	3443
F.fs II ⊗	2	101	–	2	1	3	654	660
F_0 ⊗	8	374	3	1	24	5	2123	2156
Ffs × F_0	2	33	–	–	–	1	131	132
F_0 × Ffs	1	12	–	–	–	–	47	47
F-ond ⊗	4	91	1	–	5	1	348	355

Table 9.4. Distribution of estimated flowers over the fertility values ms...f in progenies of different type, obtained from fertile components of graft combinations between F-Snowball and MS-Snowball and their controls, in 1966.
ms = *flower sterile; no pollen in the anthers*
ps = *flower nearly sterile; minimum quantity of pollen in some or all anthers*
pf = *flower partially fertile; rather small quantity of pollen in some or all anthers*
f? = *flower nearly fertile; practically normal quantity of pollen in all anthers*
f = *flower fertile; normal quantity of pollen in all anthers.*

teristieke voorkomen van die bij plasmatisch steriele planten (verg. pag. 17).

Enkele onvolledig fertiele bloemen werden zelfbestoven of ‚gekruist' met fertiele bloemen van dezelfde plant. In de resulterende E_3-lijnen werden geen planten met opvallende steriliteit aangetroffen.

Bij de E_2-lijnen van twee entcomponenten Snowball S. en G. (tabel 9.5, boven) werd een vrij sterk variabele fertiliteit aangetroffen. Geringe hoeveelheid stuifmeel ging hier niet, zoals bij F-Snowball, gepaard met abnormale helmknoppen. De variatie in fertiliteit kwam het sterkst naar voren in de E_2-lijnen van plant Pt_{65}4-9. Helaas werd van deze plant geen controle-nakomelingschap (F_0⊗) verkregen, waardoor geen definitief oordeel over aard en oorzaak van de variabele fertiliteit kan worden gegeven. Nochtans leek ook hier steriliteitsoverdracht via de entplaats niet waarschijnlijk, daar de uitgangsplant zelf, Pt_{65}4-9, reeds een variabele fertiliteit bezat, terwijl ook in deze groep de meer of minder steriele bloemen verspreid over vele planten voorkwamen. Bovendien werd voor de andere in tabel 9.5 verwerkte entcomponent, Pt_{65}15-14, bij de E_2-lijn Ffs ⊗ en de controle-lijn F_0 ⊗ een overeenkomstige mate van variabiliteit gevonden.

De nakomelingen van entcomponenten Blue Bedder S. en G. (tabellen 9.5, onder; 9.6; en 9.7, onder) waren merendeels goed fertiel (bijna alle bloemen f).

TABEL 9.5. Verdeling van beoordeelde bloemen over de fertiliteitswaarden ms...f bij nakomelingschappen van verschillend type, verkregen van fertiele componenten van entcombinaties tussen Snowball S. en G. en MS-Snowball (boven), resp. tussen Blue Bedder S. en G. en MS-Snowball (beneden) en bijbehorende controles, in 1966. Zie tekst.

Nakomelingschapstype/ *Progeny type*	Aantal betrokken entcomponenten/ *Number of graft components concerned*	Aantal beoordeelde planten/ *Number of plants estimated*	Aantal bloemen met fertiliteitswaarde:/ *Number of plants with fertility value:*					
			ms	ps	pf	f?	f	Tot.
Ffs ⊗ (Pt_{65}4–9)	1	69	15	37	33	38	443	566
Ffs ⊗ (Pt_{65}15-14)	1	139	2	4	15	12	933	966
Fsf ⊗ (Pt_{65}4-9)	1	68	4	11	20	32	377	444
F_0 ⊗ (Pt_{65}15-14)	1	28	–	3	3	13	374	393
Ffs ⊗	5	410	–	–	3	3	1996	2002
Fsf ⊗	2	108	–	–	–	–	499	499
F_0 ⊗	4	110	–	–	–	–	560	560
Ffs × F_0	1	66	–	–	–	–	234	234

Table 9.5. Distribution of estimated flowers over the fertility values ms...f in progenies of different type, obtained from fertile components of graft combinations between Snowball S. en G. and MS-Snowball (above) resp. between Blue Bedder S. en G. and MS-Snowball (below) and their controls, in 1966.
The rather variable fertility of the progenies of Snowball S. en G. was probably not caused by the sterile graft symbiont, but by the nature of the fertile plants themselves.

Alleen in lijnen van de entcomponent Pt_{65}Cl-7 werd een aantal in hoge mate steriele bloemen gevonden (tabel 9.6). Deze bloemen kwamen echter uitsluitend voor bij planten met bontbladige sectoren, welke in de betreffende lijnen voorkwamen. In de normaal groene delen van de ‚bonte' planten waren de bloemen weer goed fertiel. Zelfbestuiving van bloemen in ‚bonte' sectoren leidde niet tot zaadzetting; kruising van bloemen in ‚bonte' sectoren met volledig fertiele bloemen van normale takken van de ‚bonte' planten leverden volledig fertiele nakomelingschappen op. Aangezien ‚bonte' sectoren ook bij enkele planten der van de controle-stek van Pt_{65}Cl-7 verkregen lijn werden gevonden moest ook deze vorm van steriliteit aan andere oorzaken (virus?), dan aan beïnvloeding van de fertiele entcomponent door de steriele partner worden toegeschreven.

Nakomelingschappen van tetraploïde fertiele entcomponenten van de rassen Snowball S. en G. en Blue Bedder S. en G. (tabel 9.8) vertoonden geen spoor van beïnvloeding door de steriele entpartner.

Op grond van de verkregen resultaten mag geconcludeerd worden, dat overdracht van plasmatische steriliteit via enting, onder de in 1965 en 1966 tijdens de uitvoering van de experimenten heersende milieuomstandigheden, tussen de

TABEL 9.6. Verdeling van beoordeelde bloemen over de fertiliteitswaarden ms...f bij nakomelingschappen van verschillend type, verkregen van fertiele componenten van entcombinaties tussen Blue Bedder S. en G. en MS-Blue Bedder in 1966. De tussen haakjes geplaatste aantallen bloemen waren afkomstig van planten met ‚bonte' sectoren uit lijnen van $Pt_{65}C1$-7. Zie tekst.

Nakomelingschapstype/ *Progeny type*	Aantal betrokken entcomponenten/ *Number of graft components concerned*	Aantal beoordeelde planten/ *Number of plants estimated*	Aantal bloemen met fertiliteitswaarde:/ *Number of plants with fertility value.*					
			ms	ps	pf	f?	f	Tot.
Ffs ⊗	4	518	– (32)	1 (1)	21 (28)	22	2583	2688
Fsf ⊗	2	279	–	1	3	5	1391	1400
F. fs II ⊗	1	88	– (11)	– (1)	1 (6)	3	489	511
F_0 ⊗	4	165	– (2)	–	–	6	748	756
Ffs × Fsf	1	43	–	–	1	2	160	163
Ffs × F_0	2	298	– (6)	– (6)	2 (11)	1	1170	1196
Fsf × F_0	2	24	–	–	–	–	190	190
F_0 × Fsf	1	53	–	–	2	–	238	240

Table 9.6. Distribution of estimated flowers over the fertility values ms...f in progenies of different type, obtained from fertile components of graft combinations between Blue Bedder S. en G. and MS-Blue Bedder in 1966. The numbers of flowers in brackets came from plants with 'variegated' sectors of lines of $Pt_{65}C1$-7. See text for discussion.

ter beschikking staande steriliteitsbronnen aanwezig in MS-Snowball, MS-Blue Bedder en MS-First Lady en de fertiele entpartners van de rassen Snowball en Blue Bedder niet heeft plaatsgevonden.

Nakomelingschappen van enten van F-Rosy Morn op MS-Rosy Morn resp. MS-Blue Bedder (elke fertiele component op beide steriele rassen) werden in 1967 in de kas op fertiliteit onderzocht. De E_2-lijnen van de fertiele entcomponenten RM-F-1 t.e.m. RM-F-10 (tabel 9.9) vertoonden onderling grote verschillen in fertiliteitsverdeling. Bij enkele lijnen (RM-F-1 ⊗, RM-F-7 ⊗) waren bijna alle bloemen normaal fertiel. De geringe afwijking van normale fertiliteit bij een klein aantal bloemen werd vooral veroorzaakt door enige neiging tot petaloïdie bij een aantal planten. Bij de lijnen van andere entcomponenten werd een meer variabel patroon van fertiliteit gevonden, het sterkst bij die van RM-F-3 en RM-F-8. Verminderde fertiliteit ging hier meestal niet gepaard met vormafwijkingen van de helmknoppen. Wel vielen de betreffende helmknoppen op door een fletsgele tot transparant witte kleur, ongeveer als de kleur bij partieel hersteld fertiele planten onder steriliteit bevorderende milieuomstandigheden. De sterielere bloemen waren hier niet willekeurig over de planten verdeeld, zoals bij de eerder besproken nakomelingschappen.

De fertiliteitsexpressie der planten met variabele fertiliteit stond duidelijk onder invloed van het milieu. Op bepaalde waarnemingsdata waren de bloemen

TABEL 9.7. Verdeling van beoordeelde bloemen over de fertiliteitswaarden ms...f bij nakomelingschappen van verschillend type, verkregen van fertiele componenten van entcombinaties tussen F-Snowball en MS-First Lady (boven) resp. tussen Blue Bedder S. en G. en MS-First Lady (beneden), in 1966.

Nakomelingschapstype/ *Progeny type*	Aantal betrokken entcomponenten/ *Number of graft components concerned*	Aantal beoordeelde planten/ *Number of plants estimated*	Aantal bloemen met fertiliteitswaarde:/ *Number of plants with fertility value:*					
			ms	ps	pf	f?	f	Tot.
Ffs ⊗	7	817	4	4	20	55	3983	4066
Fsf ⊗	6	430	8	–	17	9	2327	2361
F_0 ⊗	6	162	3	–	–	16	786	805
Ffs × F_0	1	28	–	–	–	–	84	84
F_0 × Ffs	2	113	–	–	–	–	449	449
F_0 × Fsf	2	75	–	1	–	4	291	296
Ffs ⊗	5	621	–	–	7	7	3640	3654
Fsf ⊗	4	631	–	–	–	3	3405	3408
F_0 ⊗	5	218	–	–	–	1	935	936
Fsf × F_0	2	185	–	–	1	2	716	719
F_0 × Fsf	2	56	–	–	–	–	283	283

Table 9.7. Distribution of estimated flowers over the fertility values ms...f in progenies of different type, obtained from fertile components of graft combinations between F-Snowball and MS-First Lady (above) resp. between Blue Bedder S. en G. and MS-First Lady (below) in 1966.

aan deze planten vrij normaal fertiel, op andere echter waren zij geheel of bijna geheel steriel; zie verder ook pag. 113.

Wanneer we nu de controle-lijnen (tabel 9.9, F_0 ⊗) bekijken, dan valt onmiddellijk op dat de soms vrij sterke variatie in fertiliteit van de E_2-lijnen i.h.a. bij de controle wordt teruggevonden. Slechts in enkele gevallen (RM-F-2, -5, -9) was de fertiliteit van de controle-lijn misschien iets minder variabel dan van een of beide lijnen van de bijbehorende entcomponenten. Van de E_2-lijnen met de grootste variabiliteit ontbrak in één geval (RM-F-8) de controle-lijn; in het andere geval (RM-F-3) was de variabiliteit van de controle-lijn even groot als die van de lijnen van de entcomponenten. Een en ander wijst er wel op, dat ook de onvolledige fertiliteit bij een aantal planten uit E_2-lijnen van F-Rosy Morn, geënt op MS-Rosy Morn en MS-Blue Bedder, niet berustte op een invloed van de steriele entcomponent op de fertiele partner, maar op het genotype van de fertiele uitgangsplanten zelf (modificerende genen voor fertiliteit).

Aan twaalf E_2-planten en twee onbeïnvloede controle-planten met variabele fertiliteit, afkomstig van de in tabel 9.9 vertegenwoordigde lijnen van RM-F-2 en RM-F-3, werden zelfbestuivingen uitgevoerd ter verkrijging van een E_3-generatie. Om eventuele incompatibiliteitsreacties (welke alleen in het Rosy Morn materiaal optraden) te omzeilen, werden alle bestuivingen uitgevoerd in het meest gunstige knopstadium van de bloem (empirisch bepaald: knop ca. $\frac{1}{2}$ van

TABEL 9.8. Verdeling van beoordeelde bloemen over de fertiliteitswaarden ms...f bij nakomelingschappen van verschillend type, verkregen van fertiele componenten van entcombinaties tussen Snowball S. en G.4x en MS-Snowball (boven) resp. tussen Blue Bedder S. en G.4x en MS-Snowball (beneden), in 1966.

Nakomelingschapstype/ *Progeny type*	Aantal betrokken entcomponenten/ *Number of graft components concerned*	Aantal beoordeelde planten/ *Number of plants estimated*	Aantal bloemen met fertiliteitswaarde:/ *Number of plants with fertility value:*					
			ms	ps	pf	f?	f	Tot.
Ffs ⊗	2	39	–	1	2	14	174	191
Fsf ⊗	2	98	–	1	8	10	456	475
F_0 ⊗	2	56	–	2	10	3	302	317
F-ond ⊗	3	59	1	4	13	11	343	372
Ffs ⊗	3	34	–	–	1	3	128	132
Fsf ⊗	4	76	–	–	–	–	385	385
F_0 ⊗	3	30	–	–	–	–	167	167
F-ond ⊗	3	68	–	–	2	2	339	343
F-ent ⊗	1	8	–	–	–	2	28	30

Table 9.8. Distribution of estimated flowers over the fertility values ms...f in progenies of different type, obtained from fertile components of graft combinations between Snowball S. en G.4x and MS-Snowball (above) resp. between Blue Bedder S. en G.4x and MS-Snowball (below), in 1966.

de volwassen lengte; slagingspercentage bij fertiele planten 90%), terwijl stuifmeel genomen werd van de meest fertiele bloemen. Desondanks werd maar in twee gevallen enig zaad verkregen. Dit betekent, dat op het oog redelijk gevulde helmknoppen functioneel bijna volledig steriel waren, zodat de in tabel 9.9 weergegeven verdeling van bloemen over fertiliteitswaarden ms...f, althans voor RM-F-2 ⊗ en RM-F-3 ⊗, een sterk geflatteerd beeld geeft omtrent de fertiliteit. Kruising tussen onvolledig fertiele en goed fertiele planten resulteerde in alle gevallen in een overvloedige zaadzetting, zodat vrouwelijke steriliteit van de moederplanten was uitgesloten.

De enige twee uit het zaad van (beïnvloede) zelfbevruchte E_2-planten met variabele fertiliteit verkregen E_3-lijnen omvatten 1 resp. 45 plant(en). Al deze planten vertoonden weer dezelfde variabele fertiliteit als de ouderplanten; volledig steriele planten ontbraken. Alle families van kruisingen tussen onvolledig fertiele moederplanten en goed fertiele bestuivers waren weer goed fertiel. Er mag dus geconcludeerd worden, dat ook hier in geen enkel geval een van de steriele component uitgaande steriliserende werking op de fertiele ent kon worden aangetoond.

De vraag, of fertiliserende werking van de fertiele component op de steriele partner uitgaat, kan kort worden afgedaan. F_1's van kruisingen tussen steriele entcomponenten en normaal fertiele planten waren steeds volledig steriel. Van de ca. 16500 beoordeelde bloemen aan 3000 planten bevatte er geen enkele zichtbaar stuifmeel. Van enigerlei fertiliserende werking van de fertiele entcomponent op de steriele partner is dus geen sprake.

TABEL 9.9. Verdeling van beoordeelde bloemen over de fertiliteitswaarden ms...f bij de afzonderlijke nakomelingschappen van de typen Fsf ⊗ en F_0⊗, verkregen van de fertiele componenten van entcombinaties van F-Rosy Morn met MS-Rosy Morn en met MS-Blue Bedder en hun controle-stekken, in 1967. Bespreking in tekst.

Nakomelingschap/ *Progeny*	Steriele entcomponent/ *Sterile graft component*	Aantal beoordeelde planten/ *Number of plants estimated*	Aantal bloemen met fertiliteitswaarde:/ *Number of flowers with fertility value:*					
			ms	ps	pf	f?	f	Totaal
RM-F-1 Fsf ⊗	MS-Rosy Morn	96	–	–	1	18	822	841
RM-F-1 Fsf ⊗	MS-Blue Bedder	95	–	–	–	16	867	883
RM-F-1 F_0 ⊗	–	45	–	–	–	6	423	429
RM-F-2 Fsf ⊗	MS-Rosy Morn	122	9	3	15	103	1151	1281
RM-F-2 Fsf ⊗	MS-Blue Bedder	172	–	–	16	194	1295	1505
RM-F-2 F_0 ⊗	–	30	–	–	1	40	210	251
RM-F-3 Fsf ⊗	MS-Rosy Morn	39	–	2	7	20	302	331
RM-F-3 Fsf ⊗	MS-Blue Bedder	118	6	17	40	70	1065	1198
RM-F-3 F_0 ⊗	–	44	3	3	6	14	311	337
RM-F-4 Fsf ⊗	MS-Rosy Morn	83	1	3	12	20	878	914
RM-F-4 Fsf ⊗	MS-Blue Bedder	133	2	2	8	44	1351	1407
RM-F-4 F_0 ⊗	–	47	1	1	8	11	547	568
RM-F-5 Fsf ⊗	MS-Rosy Morn	151	2	8	11	14	1922	1957
RM-F-5 Fsf ⊗	MS-Blue Bedder	60	2	–	5	7	831	845
RM-F-5 F_0 ⊗	–	41	–	–	10	3	426	439
RM-F-6 Fsf ⊗	MS-Rosy Morn	94	–	–	5	33	493	531
RM-F-6 Fsf ⊗	MS-Blue Bedder	94	1	1	5	27	513	547
RM-F-6 F_0 ⊗	–	45	–	–	5	30	290	325
RM-F-7 Fsf ⊗	MS-Rosy Morn	96	–	1	–	5	748	754
RM-F-7 Fsf ⊗	MS-Blue Bedder	96	–	–	–	–	792	792
RM-F-7 F_0 ⊗	–	44	–	–	–	–	385	385

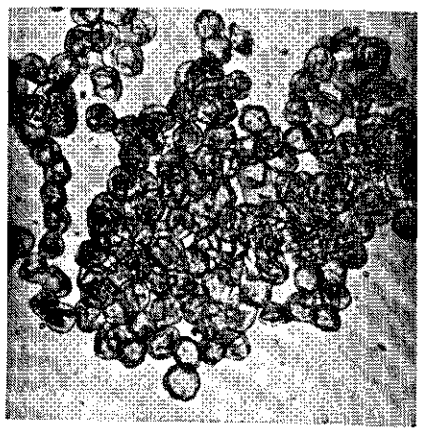
RM-F-8 Fsf ⊗	MS-Rosy Morn	145	12	4	15	55	1034	1120
RM-F-8 Fsf ⊗	MS-Blue Bedder	137	2	5	9	25	978	1019
RM-F-9 Fsf ⊗	MS-Rosy Morn	95	1	1	4	13	918	937
RM-F-9 Fsf ⊗	MS-Blue Bedder	92	–	–	–	3	1023	1026
RM-F-9 F_0 ⊗	–	48	–	–	–	32	507	539
RM-F-10 Fsf ⊗	MS-Rosy Morn	65	–	–	–	2	968	970
RM-F-10 Fsf ⊗	MS-Blue Bedder	22	–	2	3	10	229	244
RM-F-11 F-ond ⊗	–	47	–	1	3	41	364	409
RM-F-11 F-ent ⊗	–	45	–	–	8	30	301	339
RM-F-11 F_0 ⊗	–	46	–	4	7	50	384	445
RM-F-12 F-ond ⊗	–	54	–	–	2	2	779	783
RM-F-12 F-ent ⊗	–	8	–	–	–	–	85	85
RM-F-13 F-ond ⊗	–	38	–	–	–	1	458	459
RM-F-13 F-ent ⊗	–	44	–	–	2	11	457	470
RM-F-13 F_0 ⊗	–	21	–	–	–	3	349	352
RM-F-14 F-ond ⊗	–	45	–	–	–	5	466	471
RM-F-14 F-ent ⊗	–	45	–	–	–	9	478	487
RM-F-14 F_0 ⊗	–	38	–	–	1	45	569	615

Table 9.9. Distribution of estimated flowers over the fertility values ms...f in the separate progenies of the types Fsf ⊗ and F ⊗, obtained from the fertile components of graft combinations of F-Snowball with MS-Rosy Morn and with MS-Blue Bedder and their control cuttings, in 1967. For discussion see text.

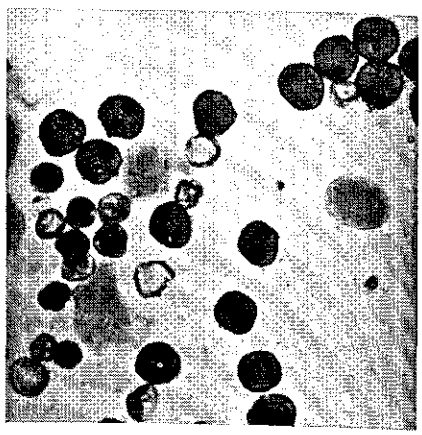
In eerste instantie waren alleen de besproken nakomelingschappen van enkelvoudige entcombinaties $\frac{MS}{F}$ en $\frac{F}{MS}$ uitgezaaid. Het ontbreken van duidelijke aanwijzingen voor onderlinge beïnvloeding bij alle enkelvoudige entcombinaties maakte het zinloos om de nakomelingschappen uit meer gecompliceerde entcombinaties uit te zaaien en te analyseren. Dit werd daarom achterwege gelaten.

9.3.3. *Onderzoek naar de hoedanigheid van het stuifmeel van onvolledige fertiele F-Rosy Morn-planten*

Een aantal bloemen van onvolledig fertiele planten uit E_2- en controle-lijnen van F-Rosy Morn werd microscopisch onderzocht op vorm en op kleurbaarheid met karmijnazijnzuur. Bloemen van fertiliteitswaarde f of f? bevatten grote aantallen sterk samenklonterende stuifmeelkorrels van verschillende gra-



100 µ



100 µ

FOTO 9, 10. Stuifmeel van een onvolledig fertiele F-Rosy Morn plant bij verschillende temperaturen:

9. Bij 15 °C; alle korrels leeg, verschrompeld en ongekleurd; 100 ×
10. Bij 24 °C; ongeveer de helft van de korrels leeg, de overige vrij groot, onregelmatig rond en duidelijk gekleurd. Volledig normale korrels ontbreken; 100 ×

Plates 9, 10. Pollen of a incompletely fertile F-Rosy Morn plant at different temperatures:

9. *At 15 °C; all grains empty, shriveled and unstained; × 100*
10. *At 24 °C; about half of the grains empty, the remaining being fairly large, irregularly round and distinctly stained. Completely normal grains are lacking: × 100*

den van kleurbaarheid. De sterkst gekleurde korrels waren groot, onregelmatig afgerond en dunwandig; de minder sterk of niet gekleurde korrels waren meestal sterk verschrompeld. Het aantal (enigszins) kleurbare korrels overschreed zelden 50%, terwijl volledig normaal gevormde korrels met regelmatige vorm en duidelijke kiemporiën slechts sporadisch werden aangetroffen. In de helmknoppen van bloemen met lage fertiliteitswaarden (pf, ps en ms), was het aantal kleurbare stuifmeelkorrels gering. In alle gevallen, ook bij als ms geclassificeerde bloemen, werden echter grote aantallen lege, sterk verschrompelde pollenhulsels aangetroffen.

Van vier F-Rosy Morn-planten met variabele fertiliteit werden klonen gemaakt, die in klimaatkamers van 15 en 24 °C werden geplaatst. In alle vier de gevallen was de stuifmeelvorming bij 24 °C beter dan bij 15 °C. Bij microscopisch onderzoek bleek, dat bij de lage temperatuur volledige of zeer sterke degeneratie en onkleurbaarheid van het stuifmeel optrad, terwijl bij de hoge temperatuur naast veel ongekleurde ook enigszins kleurbare korrels in grote getale voorkwamen. Volkomen normaal ontwikkelde stuifmeelkorrels ontbraken echter ook hier nagenoeg. Bij slechts één van de 17 onderzochte hoge temperatuur-bloemen werden vier normale stuifmeelkorrels gevonden, waarbij nog de mogelijkheid bestaat, dat deze van normaal fertiele planten afkomstig waren.

De hier gevonden reactie op temperatuur vertoont analogie met die van planten met steriliserend plasma en een hoge dosis herstellergenen (15 °C geringe fertiliteit; 18 tot 21 °C goede fertiliteit; 24 °C matige fertiliteit; verg. tabel 5.2 en 5.4). Helaas werden de vier Rosy Morn-klonen niet bij 18 en 21 °C onderzocht, zodat de reactie op deze temperaturen onbekend is. Hoewel dus aanwezigheid van steriliserend plasma plus herstellergenen in deze klonen niet geheel uitgesloten kan worden, lijkt hier toch, gezien de aard en de sterkte van de degeneratieverschijnselen (totaal geen normale stuifmeelkorrels bij zowel 15 als 24 °C; foto 9 en 10), een ander steriliserend mechanisme dan plasmatische steriliteit werkzaam te zijn, b.v. fertiliteit verlagende genen in normaal plasma.

9.4. Discussie

In de eigen experimenten werden, zoals hiervoor besproken is, geen overtuigende aanwijzingen gevonden voor overdracht van steriliteit tussen plasmatisch steriele en fertiele planten door middel van enting. De grootste variatie in fertiliteit werd nog aangetroffen bij de E_2-lijnen van F-Rosy Morn (tabel 9.9) Aangezien echter bij de meeste controle-lijnen een even sterke variabiliteit werd gevonden als in de bijbehorende E_2-lijnen, moet wel aangenomen worden, dat van overdracht van steriliteit geen sprake is geweest, en dat de gevonden verschijnselen werden veroorzaakt door de aard van de F-Rosy Morn planten zelf (fertiliteit verlagende genen in normaal plasma of ev. herstellergenen in steriliserend plasma; zie boven.

De negatieve resultaten in het eigen onderzoek maken een kritische analyse van de resultaten en conclusies van vroegere auteurs, Frankel (1956, 1962, 1964), Edwardson en Corbett (1961) en Bianchi (1963) noodzakelijk. Naast

een zekere overeenkomst (geen steriliteitsverschijnselen in de entgeneratie; ‚overdracht' bij slechts een deel van de entcombinaties) bevatten de resultaten van de verschillende onderzoekers enkele opvallende verschilpunten.

Volgens FRANKEL (1956, 1962, 1964) zou, als gevolg van overdracht van steriliteit, in de E_2 een splitsing optreden in volledig fertiele en volledig steriele planten; tussenvormen zouden door hem nauwelijks zijn aangetroffen (FRANKEL, 1966, pers. meded.). In het artikel van 1956 wordt echter gesproken van twee aanvankelijk steriele E_2-planten, die later fertiele bloemen gingen vormen, en een aantal macroscopisch ‚steriele' planten moest blijkens de tabellen in FRANKEL (1964) op grond van microscopisch onderzoek toch als ‚fertiel' worden ingedeeld. Afgezien van één geval, dat verderop afzonderlijk besproken zal worden, produceerden de fertiele E_2-planten na zelfbevruchting een volledig fertiele nakomelingschap, terwijl de steriele E_2-planten na kruising en herhaalde terugkruising met een fertiele controle-plant een volledig steriele nakomelingschap voortbrachten (plasmatische overerving van het steriliteitskenmerk; volledige omvorming van het plasma dus). EDWARDSON en CORBETT (1961) vonden in de E_2 geen enkele volledig steriele plant. Van de totaal 82 planten waren 68 volledig fertiel, terwijl 14 planten naast elkaar fertiele, partieel fertiele en steriele bloemen vertoonden. E_3-nakomelingschappen werden hier verkregen door de aan deze ‚gemengde' planten voorkomende fertiele bloemen te zelfbestuiven en de pF- en MS-bloemen te kruisen met onbeïnvloede fertiele vaderplanten (F_0). De nakomelingschappen van alle drie bestuivingstypen, F-bloem $\otimes$, pF-bloem $\times$ F_0, en MS-bloem $\times$ F_0 bestonden uit een mengsel van zeer vele fertiele en enige ‚gemengde' planten; slechts twee van de 1192 E_3-planten waren volledig steriel. Zeer opmerkelijk hierbij was dat, van de vijf kruisingen MS-bloem $\times$ F_0, twee alleen fertiele en de drie overige naast merendeels fertiele enige ‚gemengde', maar geen volledig steriele, planten voortbrachten. Hier dus géén ‚plasmatische overerving' van de steriliteit (zoals bij Frankel en ook bij Bianchi).

BIANCHI (1963) trof in de E_2 van drie fertiele entcomponenten een gradueel verloop van fertiele naar (bijna) steriele planten aan. De laatste maakten ongeveer 20% van het totale aantal planten uit. De fertiliteit van de planten bleek enigszins milieugevoelig te zijn. Zelfbevruchting van ‚fertiele' E_2-planten resulteerde in een splitsing in fertiele en min of meer steriele planten (ca. 20%), terwijl kruising tussen ‚steriele' E_2-planten en onbeïnvloede fertiele partners resulteerde in nakomelingschappen, geheel bestaande uit nagenoeg steriele planten, op grond waarvan plasmatische overerving van de steriliteit werd aangenomen.

Afgezien van het bezwaar, dat de hier geschetste, sterk verschillende resultaten moeilijk onder één noemer gebracht kunnen worden, is onvoldoende bewezen, dat de gevonden verschijnselen inderdaad zijn toe te schrijven aan ‚steriliteitsoverdracht via enting'. Zowel bij EDWARDSON en CORBETT (1961) als bij BIANCHI (1963) ontbreekt een critische analyse van het controlemateriaal. De door hen beschreven steriliteitsverschijnselen vertonen bovendien grote overeenkomst met het in het onderhavige onderzoek gevondene, en kunnen daarom met evenveel recht worden toegeschreven aan ‚selectie op genotypen

met gemodificeerde fertiliteit', in normaal plasma. Het ontbreken van enige ‚steriliserende invloed' in de entgeneratie zelf wijst –alle ervoor aangevoerde theorieën ten spijt– ook al sterk in die richting, evenals de langzame toename van de steriliteit in opeenvolgende generaties (‚verdichting' van fertiliteitverlagende modificerende genen).

Ook de door FRANKEL (1962) beschreven gevallen van ‚overdracht van steriliteit' bij twee entcombinaties tussen mannelijk steriele en fertiele planten van het ras Rosy Morn, zijn weinig overtuigend. In het ene geval werd splitsing in de E_2 gevonden na kruising tussen de fertiele enten RM_1 (♀) en RM_2 (♂), doch niet in de reciproke kruising; E_2-lijnen van de RM_1- en de RM_2-component ontbraken, terwijl alle overige kruisingen en zelfbestuivingen een volledig fertiele nakomelingschap gaven. De fertiele E_2-planten uit de splitsende familie brachten na zelfbevruchting weer volledig fertiele E_3-lijnen voort, terwijl de steriele planten niet verder werden gekruist. In het tweede geval werd een geheel ander resultaat verkregen. Hier werd na zelfbevruchting van de fertiele entcomponent (RM_5) een splitsing in fertiele en steriele planten gevonden, die een 3:1 verhouding dicht benaderde. Deze splitsingsverhouding wordt ook aangetroffen in de E_2's der van de fertiele onderstam verkregen stekken, dit in tegenstelling tot de situatie in het eerste geval, waar het inducerend vermogen zou verdwijnen zodra het contact tussen de steriele en de fertiele entcomponent was verbroken. Zelfbevruchte of onderling gekruiste fertiele E_2-planten splitsten weer in een 3:1 verhouding, terwijl kruisingen tussen steriele en fertiele E_2-planten resulteerden in ongeveer gelijke aantallen fertiele en steriele planten (1:1). FRANKEL (1964) verklaart een en ander door aan te nemen, dat in dit speciale geval het ‚steriliteit verwekkend agens' in het genoom wordt geïntegreerd en zich als een mendelende factor gaat gedragen. We zouden hier dus moeten aannemen:

1. Overdracht van de steriliserende plasmafactor van de steriele entcomponent naar de fertiele partner, doch onwerkzaam blijven hierin, zelfs 4½ jaar na de entdatum.
2. Aanhechting van de steriliserende plasmafactor aan het genoom van de helft van de vrouwelijke en de mannelijke gameten (3:1 splitsing in de E_2).
3. Blijvende chromosomale werking en totale afwezigheid van de steriliserende factor in het plasma (3:1 resp. 1:1 splitsing in de E_3).

Zelfs wanneer, op grond van het vermelde volledig fertiel zijn van de onbeïnvloede controle-lijn van RM_5, zou worden aangenomen dat overdracht van plasmatische steriliteit tussen de beide entpartners heeft plaatsgevonden, is een andere, meer voor de hand liggende verklaring voor de gevonden splitsingsverschijnselen zeer wel mogelijk. In het eigen onderzoek werd de aanwezigheid van fertiliteit herstellende genen in het MS-Rosy Morn-materiaal (van Frankel) aangetoond (verg. pag. 34). Aangezien de MS-Rosy Morn-families door herhaalde terugkruising van F-Rosy Morn op de oorspronkelijke plasmatisch steriele planten waren verkregen, is het aannemelijk, dat ook in sommige F-Rosy Morn planten herstellergenen voorkomen. Nemen we nu aan, dat RM_5 heterozygoot was voor een hoofdfactor voor fertiliteitsherstel, (N)Rfrf, dan zouden de E_2-planten als gevolg van ‚steriliteitsinductie' in het plasma ((N)→

(S)) voor drievierde bestaan uit fertiele (S)Rf. en voor eenvierde uit steriele (S)rfrf-planten. Van de fertiele E_2-planten geven tweederde (nl. (S)Rfrf) na zelfbevruchting weer een splitsing in fertiele en steriele planten in de verhouding 3:1 te zien, terwijl deze zelfde planten als vader gebruikt in kruisingen met steriele E_2-planten ((S)rfrf) een nakomelingschap met gelijke aantallen fertiele en steriele planten (1:1) voortbrengen. Alternatieve verklaringen zijn, dat de fertiele entcomponent RM_5 heterozygoot was voor een gen voor mannelijke steriliteit (Msms), of dat hij naast de heterozygote factor voor fertiliteitsherstel ook het steriliserend plasma bezat ((S)Rfrf). Aangezien volgens FRANKEL (1962) alle nakomelingen van de controle-lijn fertiel waren, zouden we hier dus moeten aannemen, dat een verkeerde controle-plant is gebruikt, of dat de E_2- en de controle-lijn op verschillende tijdstippen werden beoordeeld en de gevonden verschillen een gevolg waren van milieuvariatie.

Wat sterker gefundeerde aanwijzingen voor mogelijke overdracht van de steriliserende factor via de entplaats werden door FRANKEL (1956, 1964) verkregen voor twee entcombinaties tussen steriele onderstammen en fertiele enten van het ras Northern Star (NS_1 resp. NS_5). De fertiele entcomponenten leverden na zelfbestuiving 27 fertiele versus 11 steriele resp. 5 fertiele versus 1 steriele plant(en) op (FRANKEL, 1964, tab. 1). De beide onbeïnvloede controlestekken brachten na zelfbestuiving volledig fertiele nakomelingschappen voort, terwijl ook onderlinge kruisingen tussen de controle-stekken en andere Northern Star-planten niet-splitsende, geheel fertiele nakomelingschappen opleverden. De ‚geïnduceerde' steriliteit bleek plasmatisch over te erven. Het is echter ook bij deze twee gevallen moeilijk verklaarbaar waarom de steriliteits-verschijnselen zich niet reeds in de entgeneratie manifesteerden, en waarom een deel van de E_2-planten volledig en een ander deel totaal niet tot steriliteit ‚geactiveerd' werd.

Naast de hier besproken resultaten moeten enkele niet gepubliceerde worden vermeld. EVERETT (gecit. door EDWARDSON en CORBETT, 1961) vond geen overdracht van steriliteit na enting tussen fertiele en plasmatisch steriele petunia. Ook BIANCHI (1966; pers. meded.) slaagde er niet in om met behulp van het Rosy Morn-materiaal van Frankel zijn min of meer positieve resultaten van 1963 te bevestigen.

Onze conclusie moet dan ook zijn, dat overdracht van plasmatische mannelijke steriliteit door middel van enting bij de petunia niet overtuigend is aangetoond. Verder onderzoek omtrent deze materie zal, ook bij andere gewassen dan de petunia, alleen dan tot betrouwbare resultaten kunnen leiden, wanneer gewerkt wordt met zuivere lijnen, die nauwkeurig onderzocht zijn op de aanwezigheid van al dan niet cryptomere genische en plasmatische steriliteitsfactoren en op invloeden van het milieu op de stuifmeelvorming (toetskruisingen, fytotrononderzoek), en wanneer critisch onderzoek van voldoende controle-materiaal wordt uitgevoerd.

SAMENVATTING

Volledige plasmatische mannelijke steriliteit bij de petunia komt tot uiting in algehele degeneratie van het microsporogene weefsel direct na de meiotische delingen (tetradenstadium), en wordt niet beïnvloed door de uitwendige omstandigheden. Steriele planten zijn gemakkelijk herkenbaar aan de karakteristieke spiesvormige en kleine helmknoppen. Van de nevenverschijnselen van plasmatische steriliteit is abortie van bloemknoppen (‚bloemverstikking') het meest opvallend. Deze vormt een ernstige complicatie bij de toepassing van plasmatische steriliteit in de heterose-teelt.

Herstel van mannelijke fertiliteit bij planten met steriliserend plasma berust op de werking van verscheidene genen. Naast een of enkele gen(en) met een sterke herstellende werking (hoofdfactoren), bestaan er ook accessorische, soms cryptomere, factoren voor fertiliteitsherstel. Deze laatste komen in wisselend aantal en met verschillende sterkte voor in plasmatisch steriele en normaal fertiele rassen. Bij nakomelingschappen van de typen (R × F-Snowball) ⊗, (MS-Snowball × R) ⊗ en mogelijk ook bij (MS-First Lady × R) ⊗ leek herstel van fertiliteit te berusten op de gecombineerde werking van een hoofdfactor voor fertiliteitsherstel, Rf_1 (volledige dominantie van Rf_1 over rf_1 bij 12 en 15°C; Rf_1rf_1 intermediair bij 18 en 21°C; genenpaar geheel onwerkzaam bij 24°C), het homozygoot recessief werkzame accessorische gen rf_2, en een derde gen of genen-complex, Rf_3. De gegevens wijzen er op, dat in het overige materiaal mogelijk ook nog andere herstellerfactoren werkzaam waren.

De fertiliteitsexpressie van planten met herstellergenen in steriliserend plasma staat sterk onder invloed van het milieu, waardoor in het veld aan dezelfde plant zeer grote verschillen in fertiliteit kunnen optreden. De temperatuur blijkt hierbij de belangrijkste rol te spelen. Fytotron-onderzoek bij de temperaturen 12, 15, 18, 21 en 24°C leerde, dat de fertiliteit bij hersteld fertiele planten verloopt volgens een optimumkromme, waarbij de ligging van het optimum en de breedte van het fertiliteitstraject worden bepaald door het aantal en de sterkte van de aanwezige herstellergenen: Hoe meer herstellergenen des te hoger optimumtemperatuur en des te breder fertiliteitstraject. Bij normaal fertiele planten wordt geen duidelijke optimumtemperatuur gevonden, terwijl volledig plasmatisch steriele planten bij geen enkele temperatuur ook maar enig stuifmeel bevatten.

Het hoofdgenenpaar voor fertiliteitsherstel, Rf_1-rf_1, vertoont sterke koppeling met een factorenpaar voor anthocyanidine-vorming, B_2-b_2, waardoor in een bepaald terugkruisingsmateriaal (B_2rf_1/b_2Rf_1 × b_2Rf_1/b_2Rf_1) de ‚witte' planten veel fertieler waren dan de gekleurde. Het moeilijk nauwkeurig te bepalen recombinantie-percentage bedraagt ongeveer 10%.

Voor een eventuele virusnatuur van de steriliteit verwekkende plasmaconstituent werden geen aanwijzingen gevonden: Speciale partikeltjes in het steriliserend plasma werden met het electronenmicroscoop niet gevonden, overbrenging van het steriliteit verwekkend agens via sapinwrijving kon niet worden aangetoond, en inactivering van het agens door warmwaterbehandeling werd

niet verkregen. In de eigen omvangrijke entingsexperimenten werden geen aanwijzingen verkregen, dat mannelijke steriliteit via de entplaats wordt overgebracht. De in de literatuur beschreven gevallen van steriliteitsoverdracht door middel van enting blijken bij kritische beschouwing niet overtuigend te zijn, en de beschreven verschijnselen lijken ook op andere wijze te kunnen worden verklaard.

SUMMARY

1. General introduction

This thesis includes the results of research on cytoplasmic male sterility and restoring fertility in petunia. In a general review of the literature different aspects, problems and possibilities of male sterility are discussed.

2. Material and methods

Different varieties, families and lines of the garden petunia, *Petunia* × *hybrida* (Hook.) Vilm. were used:

a. The cytoplasmic male-sterile forms MS-Snowball and MS-Blue Bedder (original sterile form received from D. F. Jones), MS-First Lady (received from N.V. Sluis en Groot's Koninklijke Zaadteelt en Zaadhandel), and MS-Rosy Morn (received from R. Frankel).
b. The normal male-fertile forms F-Snowball (the lines used for the maintenance of MS-Snowball), Snowball S. en G., Blue Bedder S. en G. and F-Rosy Morn (from Frankel).
c. Restored fertile inbred lines (R-lines), developed at the Institute of Plant Breeding (I.V.P), Wageningen.

Crosses between the types a, b and c were made and studied (F_1, F_2 and Back-crosses). In one trial the autotetraploid forms of Snowball S. en G. and Blue Bedder S. en G. were also used.

The methods of growing, grafting, propagation and producing tetraploids are discussed.

3. General observations and views on male sterility in petunia

The development of the anther of cytoplasmic male-sterile petunia closely resembles that of the cytoplasmic sterile form of such crops as beet (Artschwager, 1947), carrot (Zenkteler, 1962) and onion (Monosmith, 1926). Development is normal up to and including meiosis (plate 1). Degeneration first appears in the tetrad stage. The individual microspores do not separate and remain inside the common wall of the pollen mother cell (plate 2). At the same time the tapetal layer expands to a marked extent (plate 3), after which the tetrads merge into a slimy amorphous mass.

Cytoplasmic sterile plants can be distinguished from normal fertile individuals because of the aberrant shape of the anthers (plate 4). Attendant symptoms may sometimes be observed: abnormal corolla, later flowering and abortion of the flower buds ('blindness'). The period of flowering of individual blooms and of the whole plant is longer with cytoplasmic sterile forms than with normal fertile forms because seeds do not form. 'Blindness' is the most limiting factor playing a part in the use of cytoplasmic sterile plants in a cross-breeding program.

GOLDSMITH (see DUVICK, 1959[b]), HAMILTON (1962, 1965), LANGE (1962), FERWERDA (1963) and EDWARDSON and WARMKE (1967) studied number and nature of genes restoring fertility in petunia. EDWARDSON and WARMKE (1967) found monogenic inheritance of fertility-restoration, the other authors saying that restoration of fertility is governed by more than one pair of genes, although none gave a clear genetic analysis.

A purpose of the present study, started in 1964, was to find out how many genes were involved in the restoration of fertility, whether cryptomeric restorer genes occur in cytoplasmic sterile and normal fertile plants, and which influence environment has on fertility. The restorer material used was developed by FERWERDA (1963) and LANGE (1962). The parentage of this material is given in fig. 4.1; its fertility, based on the results of fertility estimation in the glasshouse, is in table 4.1. By selfing and crossing plants from table 4.1, and by crossing them with cytoplasmic sterile and normal fertile plants of different varieties, the material for 1966 was obtained (partly included in table 4.4). All this was planted in the field and its fertility was repeatedly judged.

Fertility was judged by estimating the contents of the anthers with the naked eye (and in doubtful cases with a lens, × 5). The degree of fertility or 'fertility value' of the anther (and of the flower) was expressed in a scale 0 to 8 (0 = no pollen at all, 8 = normal quantity of pollen). The fertility of a plant at a certain observation was assessed from the fertility values of individual flowers, emphasis being placed upon completely sterile flowers. The fertility expression of plants with restorer genes in sterilizing cytoplasm proved very susceptible to external conditions, so that any one plant varied markedly in fertility between observations (cf. tables 4.2 and 4.3; figs. 4.2 to 4.5), especially with temperature (figs. 4.6 and 4.7). Classification of the plants (fert. classes 0 to 8) was based on fertility at all observations (see caption to table 4.4), with bias towards dates on which one or more completely sterile flowers were found (see tables 4.4 to 4.9).

Although the strong influence of environment made it extremely difficult to give a genetic analysis, the data (especially those in tables 4.4 and 4.5) indicated that restoration of fertility was governed by several pairs of genes. Besides one or two major factors, one of which was present in our homozygous lines with restored fertility (R ⊗), there are accessory, sometimes cryptomeric, factors for fertility-restoration. Cryptomeric factors occur in cytoplasmic sterile and normal fertile plants in variable frequency and effectiveness, and find expression in differences in fertility within and between F_1-progenies. Of the cytoplasmic sterile varieties MS-Rosy Morn possessed on average the most cryptomeric genes (in a few cases even a major gene seemed to be present) and MS-Blue Bedder the fewest; MS-Snowball and MS-First Lady were intermediate; compare the F_1-progeny in tables 4.4 and 4.5.

On determining the correlation of fertility between parents in 1966 and their progeny in 1967 (tables 4.6 to 4.8) it was shown that plants with a similar genotype sometimes had been placed in adjacent fertility classes (e.g. 3 and 4 or 7 and

8) because of environmental variation, but that plants in classes wider apart were invariably different in genotype. As the sterile cytoplasm in MS-Snowball, MS-Blue Bedder, MS-First Lady and MS-Rosy Morn responded to the introduction of restorer genes in much the same way they are probably of the same origin.

The macroscopical assessment of the fertility values 0 and 1 was corroborated by microscopical observations (table 4.10). The correlation between the microscopically determined contents of the anthers (fertility value) and the quality of the pollen (percentage normally developed grains stainable with acetic carmine) is given in fig. 4.8.

5. Trials with the restorer material under controlled conditions

The influence of temperature on fertility expression was further analysed in the phytotron of the Horticultural Department of the Agricultural University, Wageningen, by treating some clones at 9 to 24 °C (expt. 1, tables 5.1 and 5.2) and 12 to 24 °C (expt. 2, tables 5.3. to 5.5), in steps of 3 °C.

Normal fertile clones (F-Snowball) do not show a distinct optimum temperature, for fertility was almost equal at 24, 21 and 18 °C. At lower temperatures the fertility of F-Snowball markedly decreased, presumably as a result of inbreeding depression of this material (I_9). Cytoplasmic sterile clones (MS-Snowball and MS-Blue Bedder) had no pollen at all at any temperature: always complete degeneration. Plants with sterile cytoplasm and fertility-restoring genes invariably displayed a marked fertility optimum (see tables 5.2 and 5.4, figs. 5.1 and 5.2). The optimum temperature was high (18 to 21 °C) for homozygous plants with restored fertility (R ⊗) and some fertility was found at all temperatures for these plants. For partially restored plants (all the other progeny types) the optimum temperature was lower, with decreasing number or effectiveness of the restorer genes about 18, 15 or even 12 °C, strong or even complete sterility being found for these plants at the higher temperatures.

With plants exposed to alternating high and low temperatures within every 24-hour day (table 5.4, on the right) the average fertility deviated only slightly from that with continuous treatment at the higher temperature, even when the higher temperature was during the 8-hour night.

The pollen was usually of very good quality at the optimum temperature for fertility (plate 6). At temperatures less than optimum the number of elements recognizable as pollen was large, but the quality was bad (plates 7 and 8): incomplete degeneration. As a result of this the percentage 'good' pollen was relatively small at low temperatures (cf. table 5.8). At temperatures above optimum most of the microspores are completely degenerated, the relatively few remaining grains being fairly normal.

The flowers' response to temperature, i.e. the induction of degeneration of the microspores, was at about the meiotic stage (table 5.6). The time required for the development of the flower from the bud stage when the plant is susceptible to temperature to anthesis was markedly influenced by temperature and

photoperiod during every 24-hour day in the post-induction period (table 5.7). The length of the daily photoperiod did not influence fertility perceptibly.

6. Genetic analysis of some segregation data

The response of 40 plants of the F_2 $Pt_{67}V9$, (R × F-Snowball) ⊗, to the phytotron temperatures 12 to 24 °C was further analysed (table 6.1). The plants could be classified into five groups, A to E, according to average fertility at different temperatures (fig. 6.1). This division into five groups may be explained by the effect of two pairs of genes for fertility restoration, the pair of major genes Rf_1-rf_1 (complete dominance of Rf_1 at 12 and 15 °C, Rf_1rf_1 intermediate at 18 and 21 °C; complete inactivity at 24°C), and the accessory pair of genes Rf_2-rf_2 (the recessive type rf_2rf_2 being most fertile; table 6.3). To account for the total absence of completely sterile plants the effect of a third restorer gene (or gene complex), present in this material in homozygous condition, Rf_3-rf_3, had to be assumed.

A clear relation existed between the fertility classification based on field observation of the plants from which the clones derived (table 6.2) and that of the clones in the phytotron; compare table 6.4. Taking into consideration the major factor only, (for $Pt_{67}V9$) the plants of the fertility classes 8, 7 and 6 were homozygous Rf_1Rf_1, those of the classes 5, 4 and 3 were heterozygous Rf_1rf_1, classes 1, (0) and 0 including only plants of the genotype rf_1rf_1. Plants of class 2 could be both Rf_1rf_1 and rf_1rf_1, the latter probably only when having the genotype $rf_1rf_1rf_2\,rf_2Rf_3Rf_3$. This means, that progeny of nearly the same parentage as that of $Pt_{67}V9$ would have to display a segregation into 3 sterile and 13 more or less fertile plants. A good agreement with a 3:13 segregation was found in practically all the tested progenies of the types (R × F-Snowball) ⊗, (MS-Snowball × R) ⊗ and (MS-First Lady × R) ⊗ ; see tables 6.5 and 6.6. It is quite possible that fertility-restoring genes other than those described here are present in the varieties Blue Bedder and particularly in Rosy Morn.

7. Linkage between flower colour factors and fertility restoring genes

In 1966 a strong correlation was noted in certain back-cross material between practically white flower colour ('white') and a high degree of fertility (table 7.1). This correlation was further studied on some progeny of self-fertilized and mutually cross-fertilized 'white' and coloured plants (table 7.3). The data from table 7.2 helped to infer the genotype for flower colour of the parental plants from the segregation ratios in the progenies (table 7.4). From tables 7.5 and 7.6 it is quite clear, that there is a rather strong linkage between the major gene for fertility-restoration, Rf_1, and the recessive allele, b_2, of the basic dominant gene for flower colour. On account of the influence of minor fertility-restoring genes and of the environment on fertility expression, it was not possible to determine the recombination percentage accurately, but it was found to be ca. 10 %.

8. Study of the possible viral nature of the agent inducing sterility

The nature of the sterility inducing agent in cytoplasmic male sterile plants is controversial. Edwardson and Corbett (1961) believe, that cytoplasmic male sterility in petunia is caused by a virus, Atanasoff (1964) adducing arguments in favour of the hypothesis that perhaps all cases of cytoplasmic sterility should be ascribed to viral attacks.

The preliminary trials made by the present author concerning the possible viral nature of the sterility inducing agent in petunia failed to yield any positive result. With the electron microscope no special particles were found in the sterilizing cytoplasm. It was not possible to show transmission of the sterility inducing agent by rubbing leaves of fertile plants with expressed juice of cytoplasmic sterile plants, nor could the agent be inactivated by hot water treatment. Transmission of sterility by aphids or other insects was never observed in the field, nor could sterility be transmitted by grafting (see chapter 9).

9. Transmission of sterility by grafting

Frankel (1956, 1962, 1964), Edwardson and Corbett (1961) and Bianchi (1963) described transmission of sterility after grafting between normal fertile and cytoplasmic male sterile petunia plants. The present study also aimed at exploring any possible mutual influence with a large number of graft combinations between fertile and sterile petunia forms (table 9.1). The uninfluenced cutting of each graft component was used as a control. At the same time some homoplastic and heteroplastic control grafts were carried out (table 9.2).

In the graft generation (E_1; from Dutch ‚enten' = to graft) no trace of mutual influence of the graft partners was observed. Also the progeny (E_2), obtained by self- or cross-fertilizing graft components, did not provide any indication as to mutual influence (tables 9.4 to 9.9). Reduced fertile or even sterile flowers were sometimes observed on some E_2-plants, but on the whole they were not more frequent than in the lines obtained from the control cuttings.

Critical analysis of the results and conclusions drawn by former authors justifies the inference that they have not shown convincingly sterility transmission by grafting either. It is only in the 1956 article of Frankel that somewhat grounded indications as to possible transmission of the sterilizing agent via the graft-joint have been included: some completely sterile E_2-plants, and cytoplasmic inheritance of 'induced' sterility, although the absence of any sterilizing influence on the fertile graft components themselves is surprising. The results of Edwardson and Corbett (1961) and of Bianchi (1963) might be interpreted as selection for and 'condensation' of genes reducing fertility in normal, unchanged cytoplasm. The instance of sterility transmission followed by integration of the sterilizing agent in the genome described by Frankel (1962, 1964) was attributed to segregation of a pair of genes for fertility restoration in sterilizing cytoplasm, (S)Rfrf, or of a genic sterility factor in normal cytoplasm, (N)Msms.

GERAADPLEEGDE LITERATUUR

ANDERSEN, R. G.: The mechanism of sterility and restoration of fertility in wheat. Wheat Newsl. 10 (1964): 1–3.

ANDERSEN, W. R.: Cytoplasmic male sterility and intergrafts between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum penellii*. Minn. Acad. Sci. J. 32 (1965): 93–94.

ARTSCHWAGER, E.: Pollen degeneration in male sterile sugarbeets, with special reference to the tapetal plasmodium. J. Agric. Res. 75 (1947): 191–197.

ATANASOFF, D.: Viruses and cytoplasmic heredity. Z. Pflanzenz. **51** (1964): 197–214.

ATANASOFF, D.: Leaf fleck disease of maize and its possible relation to cytoplasmic inheritance. Phytopathol. Z. **52** (1965): 89–95.

BANDLOW, G.: Pollensterile Zuckerrüben. Dtsch. Landwirtsch. **12** (1961): 81–83.

BANDLOW, G.: Die Pollensterilität von *Beta vulgaris* und deren Artbastarden sowie ihre Verwertung in der Zuckerrübenzüchtung. Z. Pflanzenz. **52** (1964): 160–240.

BANGA, O. and J. PETIET: Breeding male sterile lines of Dutch onion varieties as a preliminary to the breeding of hybrid varieties. Euphytica 7 (1958): 21–30.

BANGA, O., J. PETIET and J. L. VAN BENNEKOM: Genetical analysis of male sterility in carrots, *Daucus carota L.* Euphytica 13 (1964): 75–93.

BARHAM, W. S. and H. M. MUNGER: The stability of male sterility in onions. Proc. Am. Soc. hort. Sci. **56** (1950): 401–409.

BATESON, W. and E. GAIRDNER: Male sterility in flax, subject to two types of segregation. J. Genet. **11** (1921): 269–276.

BECKETT, J. B.: Inheritance of partial male fertility in maize in the presence of Texas sterile cytoplasm. Crop Sci. **6** (1966): 183–184.

BIANCHI, F.: Onderzoek naar de erfelijkheid van de bloemvorm bij *Petunia*. Proefschr., Univ. Amsterdam (1959): 83 pp.

BIANCHI, F.: Genetisch bloemkleuronderzoek bij *Petunia*. Genen en Phaenen **5** (1960): 33–45.

BIANCHI, F.: Transmission of male-sterility in *Petunia* by grafting. Genen en Phaenen **8** (1963): 53–64.

BIANCHI, F.: Genetica en Plantenveredeling. Aanvaardingsrede Univ. Amsterdam, okt. 1964: 23 pp.

BLAKESLEE, A. F.: A graft-infectious disease of *Datura* resembling a vegetative mutation. J. Genet. **11** (1921): 17–36.

BLISS, F. A. and W. H. GABELMAN: Inheritance of male sterility in beets, *Beta vulgaris* L. Crop Sci. **5** (1965): 403–406.

BOND, D. A., J. M. DRAYNER, J. L. FYFE and G. TOYNBEE-CLARKE: Male sterility in field beans (*Vicia faba* L.). I. A male sterile bean inherited as a Mendelian recessive. J. agric. Sci. **63** (1964): 229–234.

BOND, D. A., J. L. FYFE and G. TOYNBEE-CLARKE: Male sterility in field beans (*Vicia faba* L.). III. Male sterility with a cytoplasmic type of inheritance. J. agric. Sci. **66** (1966): 359–367.

BOS, L.: Virussen en planten ,1e druk, Tjeenk Willink, Zwolle (1965): 277 pp.

BRAAK, J. P. and Y. O. KHO: Some observations on the floral biology of the carrot (*Daucus carota* L.). Euphytica 7 (1958): 131–139.

BUCHERT, J. G.: The stage of the genome-plasmon interaction in the restoration of fertility to cytoplasmically pollensterile maize. Proc. nat. Acad. Sci. **47** (1961): 1436–1440.

BURK, L. G.: Male sterile flower anomalies in interspecific tobacco hybrids. J. Hered. **51** (1960): 27–31.

CHAUHAN, S. V. S. and S. P. SINGH: Pollen abortion in male sterile hexaploid wheat ('Norin') having *Aegilops ovata* L. cytoplasm. Crop Sci. **6** (1966): 532–535.

CHILDERS, W. R.: Male sterility in *Medicago sativa* L.. Sci. Agric. **32** (1952): 351–364.

CHITTENDEN, R. J.: The rogue wallflower. J. Bot. **52** (1914): 265–271.

CHITTENDEN, R. J. and C. PELLEW: A suggested interpretation of certain cases of anisogeny. Nature, (London) **119** (1927): 10–11.

CLAYTON, E. E.: Male-sterile tobacco. J. Hered. **41** (1950): 171–175.

CLEY, G.: Influence of the cytoplasmic male sterility and fertility in beets. Euphytica **16** (1967): 23–28.

CLEY, G. en D. KLOEN: Het optreden van plasmatische mannelijke steriliteit bij bieten. Zaadbelangen **17** (1963): 105–106.

CORBETT, M. K. and J. R. EDWARDSON: Inter-graft transmission of cytoplasmic male sterility. Nature, (London) **201** (1964): 847–848.

CORRENS, C.: Die Rolle der männlichen Keimzellen bei der Geschlechtsbestimmung der gyndioecischen Pflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **36** (1908): 686–701.

CORRENS, C.: Ueber Fragen der Geschlechtsbestimmung bei höheren Pflanzen. Z. indukt. Abstamm.-u. Vererb. Lehre **41** (1926): 5–40.

CORTESSI, H. A.: Investigations made into male sterile beets. Euphytica **16** (1967): 425–432.

CRAIGMILES, J. P.: The development, maintenance and utilization of cytoplasmic male sterility for hybrid Sudangrass seed production. Crop Sci. **1** (1961): 150–152.

CRAIGMILES, J. P.: Genetic inheritance of cytoplasmic male-sterility in Sudan-grass. Crop Sci. **2** (1962): 203–205.

CRANE, M. B.: Heredity of types of inflorescence and fruits in the tomato. J. Genet. **5** (1915): 1–11.

CURTIS, G. J.: Graft-transmission of male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Euphytica **16** (1967): 419–424.

DAHLGREN, K. V. O.: Ueber eine Form von *Primula officinalis* mit pistilloiden Staubgefässen und ihre Vererbung. Hereditas **17** (1932): 115–130.

DUBEY, D. K. and S. P. SINGH: Inheritance of cytoplasmic male sterility in some commercial varieties of Indian linseed. Indian J. Genet. Pl. Breed. **25** (1965[a]): 291–296.

DUBEY, D. K. and S. P. SINGH: Mechanism of pollen abortion in three male-sterile lines of flax (*Linum usitatissimum* L.). Crop Sci. **5** (1965[b]): 121–124.

DUVICK, D. N.: Genetic and environmental interactions with cytoplasmic pollen sterility of corn. Rep. 14th hybrid Corn industr. Res. Conf., Chicago, Ill. (1959[a]): 42–52.

DUVICK, D. N.: The use of cytoplasmic male sterility in hybrid seed production. Econ. Bot. **13** (1959[b]): 167–195.

DUVICK, D. N.: Influence of morphology and sterility on breeding methodology. Plant Breeding, 1th Ed., Univ. Press, Ames, Iowa (1966): 85–139.

EAST, E. M.: Studies on selfsterility. IV. The behaviour of crosses between self-fertile and self-sterile plants. Genetics **17** (1932): 175–202.

EDWARDSON, J. R.: The restoration of fertility to cytoplasmic male-sterile corn. Agron. J. **47** (1955): 457–461.

EDWARDSON, J. R.: Cytoplasmic male sterility. Bot. Rev. **22** (1956): 696–738.

EDWARDSON, J. R.: Cytoplasmic male sterility and fertility restoration in *Crotalaria mucronata*. J. Hered. **58** (1967): 266–268.

EDWARDSON, J. R. and M. K. CORBETT: Asexual transmission of cytoplasmic male sterility. Proc. nat. Acad. Sci. **47** (1961): 390–396.

ERICHSEN, A. W. and J. G. ROSS: Inheritance of colchicine induced male sterility in *Sorghum*. Crop Sci. **3** (1963): 335–338.

FERGUSON, M. G. and A. M. OTTLEY: Studies on *Petunia*. III. A redescription and additional discussion of certain species of *Petunia*. Am. J. Bot. **19** (1932): 385–406.

FERWERDA, F. P.: Cytoplasmatische mannelijke steriliteit bij *Petunia*. Genen en Phaenen **8** (1963): 33–35.

FRANKEL, R.: Graft induced transmission to progeny of cytoplasmic male sterility in *Petunia*. Science, **124** (1956): 684–685.

FRANKEL, R.: Further evidence on graft induced transmission to progeny of cytoplasmic male sterility in *Petunia*. Genetics **47** (1962): 641–646.

FRANKEL, R.: The nature of cytoplasmic male sterility in petunias. Spec. Bull. 69, Nat. and Univ. Inst. Agric., Rehovot (1964): I-VIII (English summary).

FUKASAWA, H.: Studies on restoration and substitution of nucleus in *Aegilotricum*. I. Appearance of male-sterile *durum* in substitution crosses. Cytologia **18** (1953): 167–175.

FUKASAWA, H.: Studies on restoration and substitution of nucleus (genome) in *Aegilotricum*.

II. The interrelationship between *ovata*-cytoplasm and fertility restoring factors. Cytologia **20** (1955): 211–217.

GAIRDNER, A. E.: Male sterility in flax. II. A case of reciprocal crosses differing in F_2. J. Genet. **19** (1929): 117–124.

GAJEWSKI, W. A.: A contribution to the knowledge of the cytoplasmic influence on the effect of nuclear factors in *Linum*. Acta Soc. Bot. Pol. **14** (1937): 205–214.

HADLEY, H. and S. P. SINGH: Partial male fertility in *Sorghum* hybrids with cytoplasm from male sterile Combine Kafir 60. Crop Sci. **1** (1961): 457–458.

HAMILTON, B. A.: A study of cytoplasmic male sterility and male fertility restoration in *Petunia*. Thesis in Hort., Penn. State Univ. (1962): 97 pp.

HAMILTON, B. A.: A cytological study of temperature-cytoplasmic-genetic interactions in a fertility restorer line in *Petunia*. Diss. Penn. State Univ. (1965): 93 pp.

HANSCHE, P. E. and W. H. GABELMAN.: Digenic control of male sterility in carrots, *Daucus carota* L.. Crop Sci. **3** (1963a): 383–386.

HANSCHE, P. E. and W. H. GABELMAN: Phenotypic stability of pollen sterile carrots, *Daucus carota* L.. Am. Soc. hort. Sci. **82** (1963b): 341–350.

HENDERSON, R. G.: Transmission of tomato ring spot by seed of *Petunia*. Phytopathology **21** (1931): 225–229.

HERMSEN, J. G. TH.: Towards a more efficient utilization of genic male sterility in breeding hybrid barley and wheat. Euphytica **14** (1965): 221–224.

HERMSEN, J. G. TH: A discussion on cytoplasmic restoration of ms-sterility. In: Cereal improvement. Hybrid varieties and aspects of culm shortening. Euphytica **17**, suppl. 1 (1968): in druk.

HOGABOAM, G. J.: Factors influencing phenotypic expression of cytoplasmic male sterility in the sugar beet, *Beta vulgaris* L. .J. Am. Soc. Sug. Beet Technol. **9** (1957): 457–465.

HOSOKAWA, S. and C. TSUDA: Variation of free amino acid in anther tissues accompanied with the male sterility. Abstr. Stat. Pap. presented at the 3d Res. Meet. Sug. Beet Technol. Coop. North Japan (1963): 23–24 (English Summary).

JAIN, S. K.: Male sterility in flowering plants. Bibliogr. Genet. **18** (1959): 101–166.

JOHNSON, A. G.: Male sterility in Brassica. Nature (London) **182** (1958): 1523.

JONES, D. F., H. T. STINSON and U. KHOO: Transmissible variation in the cytoplasm within species of higher plants. Proc. nat. Acad. Sci. **43** (1957a): 598–602.

JONES, D. F., H. T. STINSON and U. KHOO: Pollen restoring genes. Bull. Conn. Agric. Exp. Stat. 610 (1957b): 43 pp.

JONES, H. A. and A. E. CLARKE: Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. Proc. Am. Soc. hort. Sci. **43** (1943): 189–194.

JONES, H. A. and S. L. EMSWELLER: A male sterile onion. Proc. Am. Soc. hort. Sci. **34** (1937): 582–585.

JOPPA, L. R., F. H. MC NEAL and J. R. WELSH: Pollen and anther development in cytoplasmic male sterile wheat (*Triticum aestivum* L.). Crop Sci. **6** (1966): 296–297.

JOSEPHSON, L. M. and M. T. JENKINS: Male sterility in corn hybrids. J. Am. Soc. Agron. **40** (1948): 267–274.

KARPER, R. E. and J. C. STEPHENS: Floral abnormalities in *Sorghum*. J. Hered. **27** (1936): 183–194.

KASSANIS, B.: Heat inactivation of leaf-roll virus in potato tubers. Ann. appl. Biol. **37** (1950): 339–341.

KASSANIS, B.: Therapy of virus infected plants. J. R. Agric. Soc. **126** (1965): 105–114.

KAUL, C. L. and S. P. SINGH: Studies in male sterile barley. II. Pollen abortion. Crop Sci. **6** (1966): 539–541.

KHOO, U. and H. T. STINSON: Free amino acid differences between cytoplasmic male sterile and normal fertile anthers. Proc. nat. Acad. Sci., U.S.A. **43** (1957): 603–607.

KIDD, H. J.: The inheritance of restoration of fertility in cytoplasmic male-sterile *Sorghum*. Sorghum Newsl. 4 (1961): 47–49.

KIHARA, H.: Substitution of nucleus and its effect on genome manifestations. Cytologia **16** (1951): 177–193.

KIHARA, H. and K. TSUNEWAKI: Pistillody of *Triticum durum* induced by an *Aegilops*-cytoplasm. Ann. Rep. nat. Inst. Genet. Jap. **12** (1962): 50.

KLEY, F. K. VAN DER: Male sterility and its importance in breeding heterosis varieties. Euphytica **3** (1954): 117–124.

KOBABE, G.: Entwicklungsgeschichtliche und genetische Untersuchungen an neuen männlich sterilen Mutanten der Küchenzwiebel (*Allium cepa* L.). Z. Pflanzenz. **40** (1958): 353–384.

KOBABE, G.: Männliche Sterilität bei Spinat (*Spinacea oleracea* L.). Z. Pflanzenz. **57** (1967): 114–122.

KOHEL, R. J. and T. R. RICHMOND: Tests for cytoplasmic-genetic interaction involving a genetic male-sterile stock of the genotype ms_2ms_2. Crop Sci. **3** (1963): 361–362.

KOOPMANS, A:. Changes in sex in the flowers of the hybrid *Solanum rybinii* × *S. chacoense*. Genetica **26** (1952): 359–380.

KOOPMANS, A.: Changes in sex in the flowers of the hybrid *Solanum rybinii* × *S. chacoense* II. Plasmatic influences upon gene action. Genetica **27** (1954): 273–285.

KOOPMANS, A.: Changes in sex in the flowers of the hybrid *Solanum rybinii* × *S. chacoense* III. Data about the reciprocal cross *Solanum chacoense* × *S. rybinii*. Genetica **27** (1955): 465–471.

LACADENA, J. R.: Negative evidence of the transmission of the cytoplasmic male sterility in wheat by embryo-endosperm grafting. Wheat Inform. Serv. 23/24 (1967): 10–11.

LACADENA, J. R.: Hybrid wheat VII. Tests on the transmission of cytoplasmic male sterility by embryo-endosperm grafting. Euphytica **17** (1968): in druk.

LAMM, R.: Investigations on some tuberbearing *Solanum*-hybrids. Hereditas **39** (1953): 97–112.

LAMPRECHT, H.: Die Kreuzungen zwischen *Petunia axillaris* (Lam.) B.S.P., *violacea* Lindl. und *inflata* R. Fries. Die Entwicklung der Arten, 1. Aufl., Springer Verlag, Wien-New York (1966): 158–178.

LANGE, W.: Verslag over onderzoek naar de erfelijkheid van fertiliteitsherstel in mannelijk steriele petunia's. Ingenieursscriptie Plantenveredeling (1962): 14 pp.

LARSON, R. E. and S. PAUR: The description and inheritance of a functionally sterile flower mutant in the tomato and its possible value in hybrid tomato seed production. Proc. Am. Soc. hort. Sci. **52** (1948): 355–364.

LICHTER, R. und M. MUENDLER: Untersuchungen über die Pollensterilität der Küchenzwiebel (*Allium cepa* L.) insbesondere über den Einfluss von Witterung und genetischer Konstitution. Z. Pflanzenz. **45** (1961): 393–405.

LIVERS, R. W.: Fertility restoration and its inheritance in cytoplasmic male sterile wheat. Science, N.Y. **144** (1964): 420.

MAAN, S. S. and K. LUCKEN: Additional cytoplasmic male sterility-fertility restoration systems in *Triticum*. Wheat Inform. Serv. 23/24 (1967): 6–9.

MASCRÉ, M.: Recherches sur le développement de l'anthère chez les Solanacées (Contribution à l'étude de l'assise nourricière du pollen). Thèses Présentées à la Faculté des Sciences de Paris, Série A, No. 876. no. d'ordre 1679 (1921): 123 pp.

MAUNDER, A. B. and R. C. PICKETT: The inheritance of cytoplasmic-genetic male sterlity in grain-sorghum. Agron. J. **51** (1959): 47–49.

MEYER, V. G. and J. R. MEYER: Cytoplasmically controlled male sterility in cotton. Crop Sci. **5** (1965): 444–448.

MICHAELIS, P.: Die Bedeutung des Plasmas für die Pollenfertilität reciprok verschiedener *Epilobium*-Bastarde. Ber. dtsch. bot. Ges. **49** (1931): 96–104.

MICHAELIS, P.: Cytoplasmic inheritance in *Epilobium* and its theoretical significance. Adv. Genet. **6** (1954): 287–401.

MILLER, D. A. and R. C. PICKETT: Inheritance of partial male fertility in *Sorghum vulgare* Pers.. Crop Sci. **4** (1964): 1–4.

MONOSMITH, H. R.: Male sterility in *Allium cepa*. Doctoral Thesis, Univ. Calif. (1926): 83 pp.

NAGAICH, B. B. and G. C. UPRETI: Heat inactivation of potato leaf roll virus. Indian Potato J. **6** (1964): 96–102.

NIEUWHOF, M.: Effect of temperature on the expression of male sterility in Brussels sprouts

(*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* DC.). Euphytica **17** (1968): 265–273.

OEHLER, E. and M. INGOLD: New cases of male sterility and new restorer source in *Triticum aestivum*. Wheat Inform. Serv. 22 (1966): 1–3.

OEHLKERS, F.: Bastardierungsversuche in der Gattung *Streptocarpus* Lindl. I. Plasmatische Vererbung und die Geschlechtsbestimmung von Zwitterpflanzen. Z. Bot. **32** (1938): 305–393.

OEHLKERS, F.: Neue Ueberlegungen zum Problem der auszerkaryotischen Vererbung. Z. indukt. Abstamm.-u. Vererb. Lehre **84** (1952): 213–250.

OHTA, Y.: Grafting and cytoplasmic male sterility in *Capsicum*. Seiken Zihô **12** (1961): 35–39.

OLDEMEYER, R. K.: Sugar beet male-sterility. J. Am. Soc. Sugar Beet Technol. **9** (1957): 381–386.

OWEN, F. V.: Cytoplasmically inherited male-sterility in sugar beets. J. agric. Res. **71** (1945): 423–440.

OWEN, F. V.: The sugar beet breeders' problem of establishing male sterile populations for hybridization purposes. Proc. Am. Soc. Sugar Beet Technol. **6** (1950): 191–194.

PETERSON, C. E. and R. L. FOSKETT: Occurrence of pollen sterility in seed fields of Scott County Globe onions. Proc. Am. Soc. hort. Sci. **62** (1953): 443–448.

PETERSON, D. F.: Inbred seed production in progeny classification for type 0-plants in open pollinated varieties. Proc. Am. Soc. Sug. Beet Technol. 7 (1952): 351–353.

PETERSON, P. A.: Cytoplasmically inherited male-sterility in *Capsicum*. Am. Nat. **92** (1958): 111–119.

RAEBER, J. G. and A. BOLTON: A new form of male sterility in *Nicotiana tabacum* L.. Nature (London) **176** (1955): 314–315.

RAMAGE, R. T.: Balanced tertiary trisomics for use in hybrid seed production. Crop Sci. **5** (1965): 177–178.

RHOADES, M. M.: The cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays*. J. Genet. **27** (1933): 71–93.

RHOADES, M. M.: Gene induced mutation of a heritable cytoplasmic factor producing male sterility in maize. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. **36** (1950): 634–635.

RICK, C. M.: A survey of cytogenetic causes of unfruitfulness in the tomato. Genetics **30** (1945): 347–362.

RICK, C. M.: Genetics and development of nine male-sterile tomato mutants. Hilgardia **18** (1948): 599–633.

ROEVER, E.: A promising type of male sterility for use in hybrid tomato seed production. Science, N. Y. **107** (1948): 506.

ROGERS, J. S. and J. R. EDWARDSON: The utilization of cytoplasmic male-sterile inbreds in the production of corn hybrids. Agron. J. **44** (1952): 8–13.

ROHRBACH, K. U.: Bericht über mehrjahrigen Untersuchungen an männlich-sterilen Zuckerrüben. Vortrag I.I.R.B.-Wintertagung, Brüssel, Febr. 1962: 6 pp.

ROHRBACH, U.: Beiträge zum Problem der Pollensterilität bei *Beta vulgaris* L. I. Untersuchungen über die Ontogenese des Phänotyps. Z. Pflanzenz. **53** (1965[a]): 105–125.

ROHRBACH, U.: Beiträge zum Problem der Pollensterilität bei *Beta vulgaris* L. II. Untersuchungen über die Wirkung der Herkunft auf den Phänotyp des Merkmals 'Pollensterilität'. Z. Pflanzenz. **54** (1965[b]): 23–45.

ROHRBACH, U.: Beiträge zum Problem der Pollensterilität bei *Beta vulgaris* L. III. Untersuchungen über die Wirkung der Umwelt auf den Phänotyp des Merkmals 'Pollensterilität'. Z. Pflanzenz. **54** (1965[c]): 111–130.

RUTGER, J. N. and N. F. JENSEN: On the use of genetic male sterility in screening for a cytoplasmic-genetic sterility in barley. Euphytica **16** (1967): 350–353.

SALESSES, G.: La sterilité-mâle chez le blé (Revue bibliographique), Annls Amél. Pl. **15** (1965): 413–419.

SAMPSON, D. R.: Linkage of genetic male sterility with a seedling marker and its use in producing F_1 hybrid seed of *Brassica oleracea* (cabbage, broccoli, kale, etc.), Canad. J. Pl. Sci. **46** (1966): 703.

SAND, A. S.: Autonomy of cytoplasmic male sterility in grafted scions of tobacco. Science, N.Y. **131** (1960): 665.

SASS, J. E.: Botanical Microtechnique, 3d Ed., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa (1961): 69–71.

SAUNDERS, A. P. and G. L. STEBBINS: Cytogenetic studies in *Paeonia*. I. The compatibility of the species and the appearance of the hybrids. Genetics **23** (1938): 65–82.

SCHWARTZ, D.: The interaction of nuclear and cytoplasmic factors in the inheritance of male sterility in maize. Genetics **36** (1951): 676–696.

SHUMWAY, L. K. and L. F. BAUMANN: The effect of hot water treatment, X-ray irradiation and mesocotyl grafting on cytoplasmic male sterility of maize. Crop Sci. **6** (1966): 341–342.

SINGH, S. P. and H. H. HADLEY: Pollenabortion in cytoplasmic male sterile *Sorghum*. Crop Sci. **1** (1961): 430–432.

SIRKS, M. J.: Die gynanthere Form des Goldlacks und ihre Vererbung. Genetica **6** (1924): 537–548.

STEPHENS, J. C.: Male sterility in *Sorghum*: its possible utilization in production of hybrid seed. J. Am. Soc. Agron. **29** (1937): 690–696.

STEPHENS, J. C. and R. F. HOLLAND: Cytoplasmic male-sterility for hybrid sorghum seed production. Agron. J. **46** (1954): 20–24.

STOREY, W. B.: Genetics of the papaya. J. Hered. **44** (1953): 70–78.

TATE, S.: Gene analysis on cytoplasmic male sterility in maize: nature of causal genes and their side effect on expression of some agronomic characters. Rep. Hokkaido nat. agric. Exp. Stat. 13 (1966):90–96 (English Summary).

THOMPSON, D. J.: Studies on the inheritance of male sterility in the carrot, *Daucus carota* L. var. *sativa*. Am. Soc. hort. Sci. **78** (1961): 332–338.

VALLEAU, W.D.: Experimental production of symptoms in so-called Ring Spot tobacco plants and its bearing on acquired immunity. Phytopathology **31** (1941): 522–533.

VIRNICH, H.: Untersuchungen über das Verhalten der männlichen Sterilität und anderer Eigenschaften bei polyploiden Zwiebeln (*Allium cepa* L.) als Grundlage für eine Nutzung in der Hybridzüchtung. Z. Pflanzenz. **58** (1967): 205–244.

WEATHERWAX, P.: Anomalies in maize and its relatives. III. Carpelloidy in maize. Bull. Torrey bot. Club **52** (1925): 167–180.

WELCH, J. E. and E. L. GRIMBALL: Male sterility in the carrot. Science, N.Y. **106** (1947): 594.

WELZEL, G.: Entwicklungsgeschichtlich-genetische Untersuchungen an pollensterilen Mutanten von *Petunia*. Z. indukt. Abstamm.-u. Vererb. Lehre **86** (1954): 35-53.

WETTSTEIN, F. VON: Ueber Fragen der Geschlechtsbestimmung bei Pflanzen. Naturwissenschaften **12** (1924): 761–768.

WIEBE, G. A.: A proposal for hybrid barley. Agron. J. **52** (1960): 181–182.

WIEBE, G. A.: The contribution of DDT and its analogs to the genetics and breeding of barley. Proc. 1st int. Barley Genet. Symp., Wageningen, Aug. 1963, (1964): 278–281.

WILSON, J. A. and W. M. ROSS: Cross-breeding in wheat, *Triticum aestivum* L. I. Frequency of the pollen-restoring character in hybrid wheats having *Aegilops ovata* cytoplasm. Crop Sci. 1 (1961): 191–193.

ZEVEN, A. C.: Transfer and inactivation of male sterility and sources of restorer genes in wheat. Euphytica **16** (1967): 183–189.