

Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I
Professur für Pflanzenzüchtung

Evaluierung von Hybridwintergerste zur Nutzung als Ganzpflanzensilage (GPS) unter dem Aspekt der Instabilität des verwendeten cytoplasmatisch- kerngenischen männlichen Sterilitätssystems (CMS)

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Agrarwissenschaften

- Dr. agr. -

im Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter

1. Prof. Dr. Rod Snowdon
2. Dir. u. Prof. Prof. Dr. Frank Ordon

vorgelegt von

M. Sc. Timm Bernhard
aus Friedberg-Dorheim, Hessen

Gießen, im April 2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
1.1 Domestizierung und Biologie der Gerste	4
1.2 Wirtschaftliche Bedeutung und Verwendung der Gerste.....	7
1.3 Anbaueignung der Gerste zur bioenergetischen Nutzung.....	9
1.4 Verfahren in der Selbstbefruchterzüchtung.....	10
1.4.1 Klassische Züchtungsmethoden.....	10
1.4.2 Hybridzüchtung in autogamen Getreidearten	11
1.5 Cytoplasmatisch-kerngenische männliche Sterilität.....	14
1.5.1 Cytoplasmatisch-kerngenische männliche Sterilitätssysteme in der Kulturpflanzenzüchtung	14
1.5.2 Einsatz der CMS in der Gersten-Hybridzüchtung	18
1.5.3 Thermosensitivitätsproblematik des <i>msm1</i>-Cytoplasmas	20
2. Ziele der Arbeit	22
3. Publikation I.....	23
4. Publikation II.....	38
5. Diskussion.....	49
5.1 Heterosis als Möglichkeit der Ertragssteigerung in Wintergerste.....	49
5.2 Kombinationseignung und Heterotische Pools in der Hybridzüchtung autogamer Getreidearten	53
5.3 Untersuchung der spontanen thermosensitiven Fertilitätsrestauration des <i>msm1</i>-Sterilitätssystems in Gerste	57
5.4 Folgerungen aus den durchgeführten Studien.....	63

6. Zusammenfassung.....	65
7. Summary.....	67
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	69
9. Abkürzungsverzeichnis	71
10. Literaturverzeichnis.....	72
11. Danksagungen	84
12. Eidesstattliche Erklärung	86

1. Einleitung

1.1 Domestizierung und Biologie der Gerste

Die Gattung *Hordeum* gehört ebenso wie die Gattung *Triticum* (Weizen) und die Gattung *Secale* (Roggen) der Tribus der Triticeae in der Unterfamilie der Pooideae und der monophyletischen Familie der Poaceae an (Devos 2005, Kilian et al. 2009). Die Gattung *Hordeum* beinhaltet 32 Spezies, darunter sowohl diploide ($2n = 2x = 14$), tetraploide ($2n = 4x = 28$) als auch hexaploide ($2n = 6x = 42$) Arten. Der größte Teil der *Hordeum*-Spezies ist mehrjährig und verfügt über verschiedene Fortpflanzungssysteme. Während bei einigen Spezies vegetative Vermehrung beispielsweise über die Bildung von Rhizomen (*H. brevisubulatum*) oder „Knollen“ (*H. bulbosum*) stattfindet, reicht das Spektrum der sexuellen Vermehrung von obligater Selbstbestäubung bei *H. murinum* und *H. intercedens* über fakultative Fremdbestäubung bei *H. vulgare* ssp. *spontaneum* bis hin zu obligater Fremdbestäubung bei *H. bulbosum* und *H. brevisubulatum* (Bothmer und Komatsuda 2011). Kulturgerste (*Hordeum vulgare* L. subsp. *vulgare*) sowie ihre Stammform (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* C. Koch) sind hingegen einjährig (Bothmer et al. 2003). Im Zuge der Domestikation wurde die Auskreuzungsrate auf unter 1% reduziert, so dass Kulturgerste als nahezu vollständig selbstbefruchtend gilt (Bothmer und Komatsuda 2011).

Die ältesten archäologischen Funde domestizierter Gerste stammen aus dem Gebiet des „Fruchtbaren Halbmondes“ und werden auf ca. 8.000 – 8.500 Jahre v. Chr. datiert (Badr et al. 2000, Morrell und Clegg 2007, Mascher et al. 2016). Damit gehört Gerste zu den ersten Kulturpflanzen, den sogenannten „Neolithischen Gründerpflanzen“, der westlichen Landwirtschaft (Badr et al. 2000, Kilian et al. 2009, Mascher et al. 2016), wobei Wildgerste sogar bereits lange vor der Kultivierung gesammelt und für die Ernährung genutzt wurde (Kilian et al. 2009, Pourkheirandish et al. 2015). Badr et al. (2000) nannten ein Gebiet im heutigen Israel und Jordanien als Zentrum der ersten Inkulturnahme von Wildgerste, wohingegen andere Autoren auf Basis phylogenetischer Untersuchungen von zwei räumlich und zeitlich getrennten Domestikationszentren ausgehen. So lokalisierten Morrell und Clegg (2007) neben dem Gebiet des „Fruchtbaren Halbmondes“ einen weiteren Domestikationsursprung 1.500 – 3.000 km weiter östlich in den Ausläufern des Zagros-Gebirges, datiert auf eine Zeit zwischen 7.000 – 8.000 v. Chr. (vgl. Riehl et al. 2013, Allaby 2015). Pourkheirandish et al. (2015) hingegen beschrieben Zentren im nördlichen und südlichen Orient. Der Großteil der Diversität in heutigen europäischen und amerikanischen Sorten soll nach Morrell und Clegg (2007) dabei auf das Domestikationszentrum im Nahen Osten zurückgehen, während Sorten des zentral- und ostasiatischen Raums auf dem zweiten Domestikationsereignis basieren.

Die domestizierte Gerste ist mithin ein autogames, diploides ($2n = 2x = 14$) Süßgras (Salamini et al. 2002). Der zusammengesetzte Blüten- und Fruchtstand der Gerste ist eine Ähre, aufgrund deren Morphologie sie in zwei Gruppen – zwei- und mehrzeilige Formen - eingeteilt werden kann. Während jedes Ährchen grundsätzlich aus drei Blüten besteht (Abbildung 1), bestimmt die Anzahl fertiler Blüten den zwei- bzw. mehrzeiligen Charakter (Horsley et al. 2009).

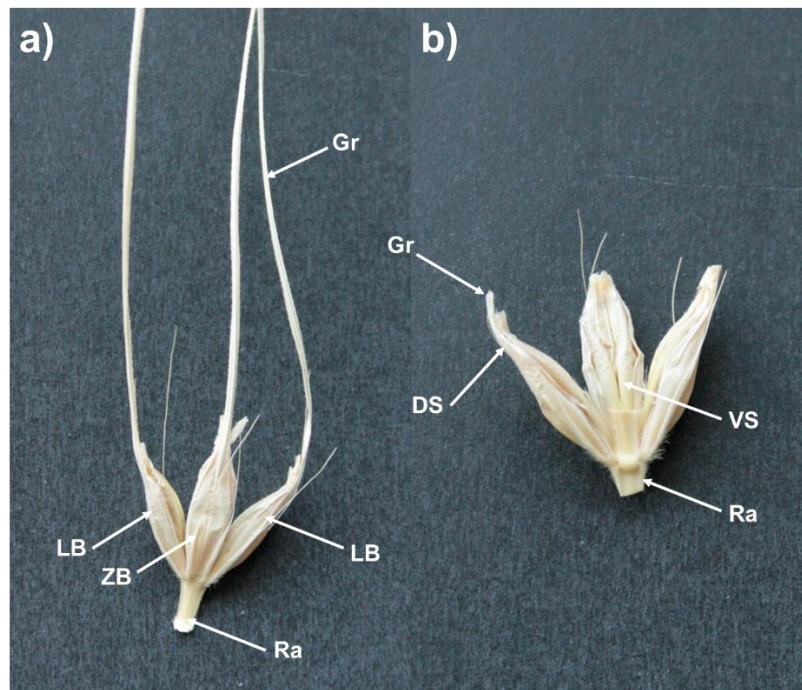


Abbildung 1: Darstellung eines Ährchens einer sechszeiligen Wintergerste in der a) Außenansicht und der b) Innenansicht (LB = Laterale Blüten, ZB = Zentrales Blüten, Gr = Granne, Ra = Rachis [Spindel], DS = Deckspelze, VS = Vorspelze).

Neben kürzeren Halmen und Grannen, breiteren Blättern und größeren Samen verfügt die heutige Kulturart im Unterschied zu ihren wilden Vorfahren über weitere, für einen Anbau essenzielle Merkmale, die entweder unbewusst oder auch bewusst durch Menschenhand ausgelesen wurden (Bothmer et al. 2003, Pourkheirandish und Komatsuda 2007). Dabei sind besonders drei Merkmale von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der Domestizierung und für die heutige Stellung der Gerste als Kulturpflanze: (i) Die Zähigkeit der Ährenspindel (*non-brittle rachis*), die von zwei rezessiven Genen kontrolliert wird: diese werden als *btr1* und *btr2* bezeichnet und können unabhängig voneinander stabile Spindeln verursachen. (ii) Die Zeiligkeit der Ähren, die durch das Gen *Six-rowed spike 1* (*Vrs1*), das auf dem Chromosom 2HL lokalisiert ist, kontrolliert wird; zweizeilige Kulturgerstensorten besitzen, wie auch die Wildgerste, das dominante Allel *Vrs1*, während das rezessive Allel *vr1* Fertilität der lateralen

Ährchen und damit die Ausbildung sechszeiliger Ähren verursacht. (iii) Das Auftreten spelzfreier Karyopsen (Nacktgerste), das ebenfalls durch ein rezessives Gen hervorgerufen wird. Dieses als *nud* bezeichnete Gen ist auf dem Chromosom 7HL lokalisiert (Salamini et al. 2002, Bothmer et al. 2003, Pourkheirandish und Komatsuda 2007). Der dominierende Teil der heute angebauten Gerste verfügt jedoch über bespelzte Körner, wobei die Deckspelze fest mit dem Korn verwachsen ist, was sie von anderen Getreidearten unterscheidet (Salamini et al. 2002).

Neben der Zeiligkeit wird Kulturgerste auch anhand ihrer inneren Kornqualität und Nutzungsrichtung hauptsächlich in die Gruppen der Braugerste bzw. der Futtergerste eingeteilt. Obwohl auch sechszeilige Gerste für die Malzherstellung verwendet wird, werden dafür zweizeilige Gersten bevorzugt, weil die Körner aufgrund des höheren Platzangebots an der Spindel ein größeres Korngewicht und Endospermvolumen (Stärkeertrag) erreichen (Horsley et al. 2009). Weiterhin kann Gerste auch bzgl. der Physiologie und Kulturform in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die zweizeilige Braugerste gehört im Allgemeinen dem Sommertyp an, während vor allem in Europa die sechszeiligen Gersten hauptsächlich der Winterform angehören und vornehmlich Futtergersten sind. Wintergerste hat in der Regel, unabhängig von der Zeiligkeit, eine höhere Ertragsleistung als Sommergerste, da die Kornfüllungsphase früher, d.h. im kühleren Frühsommers stattfindet (Horsley et al. 2009) und die zur Verfügung stehende Vegetationszeit insgesamt länger ist. Sommerformen besitzen einen reduzierten Vernalisationsbedarf und photoperiodische Insensitivität (Bothmer et al. 2003), während die Winterformen Vernalisationsbedarf, Winterhärte und photoperiodische Sensitivität vereinen (Zitzewitz et al. 2005). Der Vernalisationsbedarf der Wintergerste wird dabei durch epistatische Interaktion zwischen den Vernalisationsgenen *Vrn-1*, *Vrn-2* und *Vrn-3* (*Ft1*) kontrolliert. Während *Vrn-2* die Blüte unter Langtagbedingungen durch Suppression von *Vrn-3* inhibiert, führt eine längere Einwirkung niedriger Temperaturen zu einer Expression von *Vrn-1*, welches wiederum *Vrn-2* hemmt und die Expression von *Vrn-3* unter Langtagbedingungen bewirkt (vgl. Turner et al. 2013). Eine Deletion am *Vrn-2* Locus in Verbindung mit einem dominanten Allel des *Vrn-1* Locus resultiert in einer gesteigerten Expression des *Vrn-1* Gens und damit in einem reduzierten Vernalisationsbedarf (vgl. Rollins et al. 2013).

Im Hinblick auf der Inhaltsstoffzusammensetzung der Körner kann Gerste ferner in herkömmliche, hoch-amylose-, hoch-lysin-, hoch- β -Glukan-haltige, proanthocyanidin-freie oder „waxy“-Typen eingeteilt werden (Baik und Ullrich 2008). Die Domestizierung und Züchtung der Gerste hat somit eine Vielzahl an Kulturformen hervorgebracht, die den verschiedensten klimatischen Bedingungen und Nutzungsrichtung angepasst sind. Gerste ist dadurch eine der genetisch diversesten Getreidearten und auch die Getreideart mit der größten Anbauverbreitung (Baik und Ullrich 2008). Aufgrund ihrer guten Adaptation wird sie noch in extremen Regionen, von den Rändern der afrikanischen Wüsten bis hin zum Polarkreis

und oftmals auch als letzte Getreideart in Höhenlagen wie dem Himalaya oder den Anden, angebaut (Horsley et al. 2009).

1.2 Wirtschaftliche Bedeutung und Verwendung der Gerste

Gerste war im fünfjährigen Durchschnitt der Jahre 2010 - 2014 mit ca. 135 Mio. t/Jahr, nach Mais (933 Mio. t), Reis (594 Mio.t) und Weizen (562 Mio. t.), das Getreide mit der vierthöchsten Produktionsmenge weltweit. Der durchschnittliche Ertrag lag dabei bei 27,7 dt/ha. Die führenden Gerstenproduzenten in diesem Zeitraum waren Russland mit 15,0 Mio. t, Frankreich mit 10,4 Mio. t und Deutschland mit 10,2 Mio. t, gefolgt von der Ukraine (8,2 Mio. t) und Kanada (8,1 Mio. t) (siehe Abbildung 2).

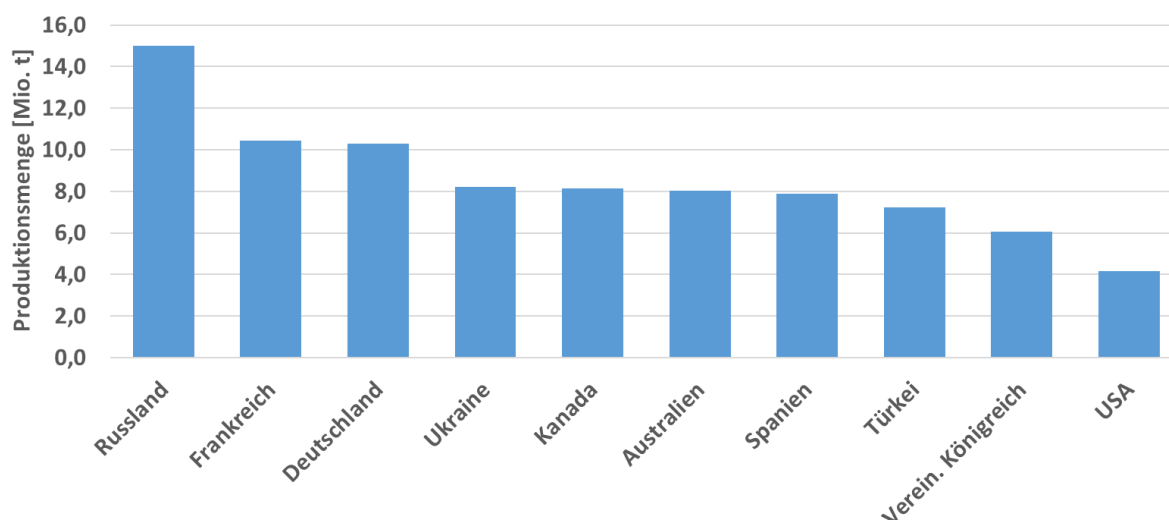


Abbildung 2: Durchschnittliche jährliche Produktionsmengen der führenden Gerstenproduzenten in den Jahren 2010 – 2014 in Millionen Tonnen (Quelle: www.fao.org).

Die höchsten Erträge wurden in diesen Jahren mit durchschnittlich 84,4 dt/ha in Belgien erreicht, gefolgt von den Vereinigten Arabischen Emiraten mit 80,3 dt/ha, Irland (73,9 dt/ha), Saudi-Arabien (71,7 dt/ha), den Niederlanden (66,5 dt/ha), der Schweiz (64,3 dt/ha) und Deutschland mit 63,8 dt/ha (<http://faostat.fao.org/beta/en/#data/QC>). Damit wurden die höchsten Erträge in den letzten Jahren hauptsächlich auf dem europäischen Kontinent erzielt. Obwohl die weltweiten Durchschnittserträge im Zeitraum von 1994 – 2014 von 22,3 dt/ha auf 29,1 dt/ha kontinuierlich angestiegen sind, sank die weltweite Produktionsmenge in der gleichen Zeit von 161 Mio. t (1994) auf 144 Mio. t (2014) aufgrund einer rückläufigen Anbaufläche deutlich ab (<http://faostat.fao.org/beta/en/#data/QC>).

In der Europäischen Union belief sich der durchschnittliche Gesamtertrag in den Jahren 2010 - 2014 auf 56 Mio. t mit einem Durchschnittsertrag von 45,5 dt/ha, wodurch Gerste hier hinter Weizen (143 Mio. t) und Mais (67 Mio. t) hinsichtlich der Gesamtproduktion den dritten Platz einnahm. Damit wurden in diesen Jahren in der Europäischen Union etwa 42% der weltweiten Gerstenproduktion geerntet. Gerste steht in Frankreich nach Weizen (37,9 Mio. t) und Mais (15,8 Mio. t) an dritter Stelle bzw. in Deutschland nach Weizen (24,4 Mio. t) an zweiter Stelle der bedeutendsten Getreidearten (<http://faostat.fao.org/beta/en/#data/QC>). Die deutsche Gesamtproduktion belief sich im genannten Zeitraum auf 8,1 Mio. t Wintergerste und 2,2 Mio. t Sommergerste, wobei Winter- und Sommergerste auch hinsichtlich der durchschnittlichen Erträge mit 67,0 dt/ha bzw. 53,7 dt/ha weit auseinanderliegen und Wintergerste somit die höhere Bedeutung zukommt. Dies wird auch anhand der deutschen Anbauflächen deutlich, die im genannten Zeitraum bei durchschnittlich 1,2 Mio. ha Wintergerste jedoch lediglich 410.000 ha Sommergerste lagen (<https://de.statista.com/statistik/suche/?q=gerste>).

Die durchschnittlichen Gerstenerträge und Produktionsmengen der einzelnen Länder reflektieren nach Ullrich (2011) die jeweiligen Produktionsbedingungen. Die größten Einflussfaktoren - gerade in Ländern mit den geringsten Erträgen - sind das Klima (z.B. in Australien [21,8 dt/ha, 2010 – 2014; <http://faostat.fao.org/beta/en/#data/QC>]) bzw. Klima und Produktionsbedingungen (z.B. in Russland und dem Iran [19,8 dt/ha bzw. 18,8 dt/ha, 2010 – 2014; <http://faostat.fao.org/beta/en/#data/QC>]). Im Gegensatz dazu stehen günstiges Klima und hochentwickelte Agrartechnologie in europäischen Ländern wie Deutschland, Frankreich und dem Vereinigten Königreich bzw. der hohe Produktionsaufwand (z.B. Bewässerung) in Ländern wie den Vereinigten Arabischen Emiraten und Saudi-Arabien.

Weltweit wird Gerste in vielfältigster Weise eingesetzt und verwertet. Da Gerste als Nahrungsmittel im Laufe des 19. und 20. Jahrhunderts immer mehr an Bedeutung verlor und zunehmend durch andere Getreidearten ersetzt wurde (Newman und Newman 2006, Baik et al. 2011), fließen heute ca. zwei Drittel der jährlichen Gerstenproduktion in die Futtermittelindustrie und ungefähr ein Drittel in die Malzherstellung. Für Deutschland wird die Menge der Braugerstenablieferung im Durchschnitt der Jahre 2015 – 2016 auf ca. 1,2 Mio. t geschätzt (<http://www.braugerstengemeinschaft.de/wp-content/uploads/2016/11/Endg%C3%BCtiger-Erntebericht-Deutschland-aktuell.pdf>) was gemessen an der durchschnittlichen Gerste-Gesamtproduktion (2015 – 2016) von ca. 11,2 Mio. t (<https://de.statista.com/statistik/suche/?q=gerste>) lediglich 11,7% ausmacht. Lediglich etwa 2% der gesamten Gerstenproduktion wird für die direkte Erzeugung von Lebensmitteln (z.B. Graupen) eingesetzt (Baik und Ullrich 2008). Speziell Nacktgerste dient jedoch nach wie vor besonders in den tibetischen Hochlagen als Hauptnahrungsquelle (Newton et al. 2011, Zeng et al. 2015), während sie vor allem in der westlichen Welt eine sehr untergeordnete Rolle spielt.

1.3 Anbaueignung der Gerste zur bioenergetischen Nutzung

Zusätzlich zu den genannten Nutzungsrichtungen, in denen die Gerste bisher Anwendung findet, hat sich in den vergangenen Jahren ein weiterer Sektor aufgetan, in dem Wintergerste ebenfalls zum Einsatz kommen kann. Durch den anhaltenden Bedarf an erneuerbaren Energien stieg in den letzten Jahren auch die Nachfrage nach einer Ausweitung des Angebots an geeigneten Pflanzen für die bioenergetische Nutzung. Zwar herrscht in Deutschland aufgrund des hohen Methanertrags pro Hektar der Silomais vor (Herrmann 2013), jedoch kann der Anbau von Wintergerste als Winterzwischenfrucht zur bioenergetischen Nutzung eine Auflockerung enger Maisfruchtfolgen bringen und gleichzeitig in Kombination mit einer Folgefrucht (z.B. *Sorghum bicolor*, Sudangras [*Sorghum bicolor* x *sudanense*], etc.) ähnlich hohe Biomasse- und Methanerträge liefern. Durch die frühe Abreife der Gerste ergibt sich die Möglichkeit einer Ernte als Ganzpflanzensilage (GPS) schon Ende Mai und dem darauffolgenden Anbau einer Zweitkultur zur Ernte im Oktober (Weiland 2003). So wurden in dem deutschen EVA-Projekt (Walter und Zürcher 2013) verschiedene Pflanzenarten, Kombinationen von Pflanzenarten und unterschiedliche Anbausysteme inkl. Wintergerste für die Bioenergieproduktion getestet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Erträge verschiedener Biogaskulturen und Erst- und Zweitfruchtkombinationen (modifiziert nach Walter und Zürcher 2013).

Kulturart/Kombination	TS [%]	TM [dt/ha]	CH ₄ [m ³ /t TM]	CH ₄ [m ³ /ha]
Mais (Hauptfrucht)	32	210	290	6100
WiGe vor Sugr	23	61	280	1660
WiRo vor Sugr	21	48	270	1300
WiRo vor Mais	21	43	270	1130
Sugr nach WiGe	27	140	250	3500
Sugr nach WiRo	27	134	250	3400
Mais nach WiRo	34	190	290	5500
WiGe + Sugr		201		5160
WiRo + Sugr		181		4600
WiRo + Mais		229		6500

(WiGe = Wintergerste, WiRo = Winterroggen, Sugr = Sudangras, TS = Trockensubstanzgehalt [%], TM = Trockenmasseertrag [dt/ha], CH₄ = Methanertrag [m³/t TM] bzw. [m³/ha])

Die Wintergerste zeigte dabei vergleichbare Methanerträge je Kilogramm Trockenmasse (TM), jedoch einen sehr viel geringeren TM-Ertrag als Mais. In der Kombination von Gerste als

Winterzwischenfrucht und Sudangras als Hauptfrucht konnten jedoch vergleichbare Gesamt-TM- und Methanerträge erzielt werden. Gerste bietet durch den früheren Erntezeitpunkt im Hinblick auf den Anbau einer Zweitfrucht, verglichen mit anderen Getreidearten (z.B. Winterroggen) einen Vorteil: Die idealen Trockenmassegehalte (% TS) für die Silierbarkeit werden bereits zu einem früheren Zeitpunkt erreicht, was unter anderem mit der ausgeprägten Vorwinterentwicklung und der damit verbundenen zeitigen Entwicklung im Frühjahr zusammenhängt. Außerdem bietet Wintergerste der Folgefrucht dadurch eine längere Wachstumsphase. Dies kann auch durch den festgestellten geringeren Ertragsrückgang des Sudangrases nach Gerste im Vergleich zu einem Anbau nach Roggen bekräftigt werden (Walter und Zürcher 2013). Wintergerste könnte somit als Winterzwischenfrucht eine erhebliche Aufwertung der ökologischen Verträglichkeit von Mais-Fruchtfolgen darstellen. Aufgrund der geringen TM-Erträge von Wintergerste und der erhöhten variablen Kosten durch doppelte Aussaat- und Erntearbeiten findet dieses Anbausystem derzeit jedoch noch keine nennenswerte Anwendung in der praktischen Landwirtschaft.

1.4 Verfahren in der Selbstbefruchterzüchtung

1.4.1 Klassische Züchtungsmethoden

Die systematische Pflanzenzüchtung ist wahrscheinlich weitaus jünger als die Landwirtschaft selbst. War die Selektion und Erzeugung von Saatgut zuvor die Arbeit eines jeden Landwirts, so begann erst im Laufe des 19. Jahrhunderts die wissenschaftliche Züchtung von Kulturpflanzen. Diese fand zunächst hauptsächlich auf Großbetrieben statt, die sich so mit der Zeit zu Saatzuchtunternehmen entwickelten. Erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts hielt schließlich die Genetik als wissenschaftliche Grundlage Einzug in die praktische Pflanzenzüchtung, was zu einer effizienteren Planung der Zuchtprogramme führte, die auch heute noch die Basis der züchterischen Arbeit darstellen. Der Grundgedanke dieser Zuchtmethoden beruht dabei nach wie vor auf fortgesetzten Neukombination und Auslese (rekurrente Selektion, Becker 2011).

Am Anfang einer Neuzüchtung steht immer die Schaffung von Variation und Rekombination. Traditionell werden in der Züchtung hierfür hauptsächlich intraspezifische Kreuzungen durchgeführt, die durch Selektion der Nachkommen zur Schaffung einer neuen Sorte führen sollen. In gewissen Fällen ist jedoch die Einkreuzung von Genen aus Wildarten notwendig bzw. hilfreich für die Schaffung neuer Variation im Züchtungspool (Merker 1992). Speziell in der Gerstenzüchtung bietet gerade Wildgerste (*H. spontaneum*) eine geeignete Quelle genetischer Variation, da Kreuzungen aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades (Primärer Genpool) zwischen Kultur- und Wildgerste problemlos durchgeführt werden können und

Chromosomenpaarung sowie Rekombination ungestört ablaufen. Dies bietet die Möglichkeit z.B. Resistenzen aus Wildgerste in Elitesorten einzukreuzen (Merker 1992). Ein Beispiel für eine Resistenzekreuzung stellt das *mlo*-Gen dar, das im Jahr 1942 erstmals in einer Gerstenmutante entdeckt, jedoch später ebenfalls in einer äthiopischen Landrasse gefunden wurde (Jørgensen 1992, Horsley et al. 2009). Das dort entdeckte Allel *mlo-11* (Jørgensen 1992, Dawson et al. 2015) verursacht vollständige Widerstandsfähigkeit und bildet heute die Basis der Mehlttauresistenz im Großteil der in Deutschland zugelassenen zweizeiligen Sommergerstensorten (Bundessortenamt 2016).

Den traditionellen Züchtungsmethoden ist gemein, dass bis zum Erreichen eines ausreichend hohen Homozygotiegrades ein hoher Zeit- und Kostenaufwand nötig ist. Aus diesem Grund werden heute vornehmlich Strategien verfolgt, die den Zeit- und Kostenaufwand reduzieren und gleichzeitig durch Einbindung molekularer Methoden eine erfolgreiche Selektion sicherstellen sollen. Als Beispiel dafür ist der Einsatz der Doppelhaploiden-Methode (DH-Technik) zu nennen, mittels derer komplette Homozygotie innerhalb einer Generation erreicht werden kann (Niu et al. 2014). Schätzungen zufolge basieren etwa 50% der derzeit am europäischen Markt erhältlichen Gerstensorten auf dieser Technologie (Forster et al. 2007).

1.4.2 Hybridzüchtung in autogamen Getreidearten

Die seit einiger Zeit auch bei Selbstbefruchtern angestrebte Methodik der Hybridzüchtung basiert auf der Kreuzung homozygoter und genetisch divergenter Elternlinien zur Erzeugung einer F₁-Hybride mit möglichst hohem Heterozygotie-Grad. Einen erheblichen Beitrag zur effektiven Erstellung von homozygoten Elternkomponenten hat hierbei die DH-Technik (Forster et al. 2007). Nachdem die Hybridzüchtung bei einigen Kulturarten wie Roggen, Mais und Raps heute zum Standardverfahren geworden ist und beispielsweise bei Mais hierzulande, seit Jahren ausschließlich Hybriden in der deutschen Sortenliste eingetragen werden (Bundessortenamt 2016), wird seit einiger Zeit auch die Etablierung von Hybridzuchtprogrammen in der Selbstbefruchterzüchtung angestrebt. Der Hauptgrund für diese Bestrebungen ist der erwartete Ertragsvorteil durch Nutzung des Heterosiseffekts (Whitford et al. 2013). Heterosis (auch „Bastardwüchsigkeit“) bezeichnet dabei das Phänomen, dass die Nachkommen aus Kreuzungen zwischen Inzuchtlinien eine höhere phänotypische Leistung zeigen als die Eltern (Birchler et al. 2003, Schnable und Springer 2013). Verschiedene quantitativ-genetische Hypothesen versuchen den Heterosiseffekt zu erklären (vgl. Birchler et al. 2003, Reif et al. 2005, Schnable und Springer 2013): 1) die Dominanzhypothese besagt, dass Heterosis auf der Komplementierung verschiedener oder zahlreicher rezessiver Allele der Inzuchtlinien beruht und bildet damit quasi die Kehrseite der Inzuchtdepression (Charlesworth und Willis 2009). 2) Das Konzept der Überdominanz: Allelische Interaktionen in den Hybriden führen dazu, dass der heterozygote Status (Aa) den

homozygoten (z.B. AA vs. aa) stets überlegen ist. Den Dominanz- und Überdominanzeffekten stehen 3) die Additiveffekte gegenüber, die auf der Akkumulation positiv wirkender Allele an unterschiedlichen Loci beruhen (Buckler et al. 2009, Chen 2010). Im Laufe der Zeit wurden neben Dominanz-, Überdominanz- und Additiveffekten zusätzlich auch Epistasie-Effekte, die auf Wechselwirkungen zwischen Allelen verschiedener Loci beruhen sowie epigenetische Faktoren mit in das Heterosis-Modell aufgenommen (Reif et al. 2005, Baranwal et al. 2012). Heute wird davon ausgegangen, dass Heterosis nicht auf einer einfachen genetischen Erklärung beruht, sondern in Kreuzungen genetisch unterschiedlicher Individuen als Resultat einer Vielzahl von Mechanismen auftritt (Schnable und Springer 2013).

Drei Grundlagen sind jedoch stets Voraussetzung für einen möglichst hohen Heterosiseffekt: (i) Hinreichende genetische Variation zwischen den Elternlinien, (ii) die Quantifizierbarkeit und Merkmalspezifität der Heterosis und (iii) die Regulation der Heterosis durch eine Vielzahl von Loci in züchterisch bearbeiteten Pflanzen (Schnable und Springer 2013). Für eine einheitliche Beschreibung des Heterosiseffekts stehen zwei Kennzahlen zur Verfügung, mit deren Hilfe die Leistung der Hybriden ins Verhältnis zu den Elternlinien gesetzt wird. Die *mid-parent* Heterosis (MPH) bezieht sich dabei auf die Ertragsdifferenz zwischen dem Nachkommen und der mittleren Elternleistung während die *best-parent* Heterosis (BPH) den Unterschied zwischen der Leistung des Nachkommen und der des besseren Elters wiedergibt (vgl. Mühleisen et al. 2013a). Die Körnermaiserträge in den USA stiegen beispielweise durch eine systematische Nutzung der Heterosis von ca. 1,5 t/ha in den 1930er Jahren auf ca. 10,1 t/ha in den 2000er Jahren, während die durchschnittliche Heterosis zwischen 1930 und 1980 dabei ca. 57% betrug (Troyer 2006). In den späten 1940er Jahren konnten ebenfalls bereits Sorghum-Hybriden mit einem Ertragsvorteil von 40% bezogen auf den durchschnittlichen Sorghum-Ertrag zu dieser Zeit erzeugt werden (Klein et al. 2008). Auch in der Züchtung autogamer Getreidearten wurden Hybriden erstellt, um diesen Ertragsvorteil umzusetzen. So erreichte eine im Jahre 1976 in China zugelassene kommerzielle Reishybride einen 20% höheren Ertrag verglichen mit Liniensorten (Cheng et al. 2007). In Weizen schätzten Longin et al. (2012) den mittleren Ertragsvorteil von Hybriden auf 3,5 – 15% und in Gerste auf 11,4%. Mühleisen et al. (2013a) fanden eine maximale Heterosis von 19,9% in Gerste und Oettler et al. (2005) sowie Fischer et al. (2010) fanden eine MPH von max. 22,4% bzw. von 12,4% für den Kornertrag in Wintertriticale. Auch hinsichtlich der MPH für den TM-Ertrag zeigten erste Untersuchungen eine positive Tendenz in Gerste (Zhang et al. 2015) und Wintertriticale (Losert et al. 2016). Zusätzlich zu einer höheren Ertragsleistung gegenüber Liniensorten zeigten Hybriden ebenfalls eine verbesserte Ertragsstabilität (Mühleisen et al. 2013b, 2014, Philipp et al. 2016), was besonders in trockenen Anbaugebieten bzw. an Grenzstandorten vorteilhaft ist.

Hinsichtlich der geringen Ausprägung des heterotischen Effekts bei Selbstbefruchtern im Vergleich zu fremdbefruchtenden Arten existieren viele Theorien. So wird z.B. die „fixierte

Heterosis“ in allopolyploiden Spezies (Weizen, Triticale) genannt. Diese beruht auf der günstigen Interaktion (Interlocus-Heterozygotie) zwischen homoeologen Loci und einer dadurch dauerhaft verbesserten Leistung auch in homozygoten Sorten (Abel et al. 2005). Weiterhin wird die geringe genetische Distanz der Elternlinien, kombiniert mit einem geringen Grad an Dominanzeffekten sowie an günstigen additiv x additiv-Epistasieeffekten, angeführt (Longin et al. 2012, Mühleisen et al. 2013a). Die geringe genetische Distanz innerhalb der europäischen Weizen- und Gerstenlinien kann dabei besonders auf das übliche Vorgehen in der Linienzüchtung zurückgeführt werden, bei der eine uneingeschränkte Kombination des vorhandenen genetischen Materials zur Erzeugung neuer Variation über Zuchtunternehmen und Landesgrenzen hinweg vorgenommen wurde. Die Einkreuzung von Resistenzgenen z.B. aus Wildarten oder Landrassen in Elitematerial dürfte weiterhin zu einer Durchmischung genetischen Materials verschiedener Herkunft geführt haben (Dreisigacker et al. 2005, Boeven et al. 2016). Gerade durch die starke Assoziation zwischen marker-basierter genetischer Distanz und Heterosis, die z.B. für Mais beobachtet werden konnte (Melchinger 1993, 1999, Reif et al. 2003), kann vermutet werden, dass eine Bildung heterotischer Pools auch bei Selbstbefruchtern zur Erleichterung und Effizienzsteigerung der Hybridzüchtung (Longin et al. 2012) und zu einer verbesserten Selektion überlegener Hybriden führen würde (Reif et al. 2007, Gowda et al. 2012). Hierbei könnte hauptsächlich die Erhöhung des Anteils der generellen Kombinationseignung (*general combining ability*, GCA) an der heterotischen Merkmalsausprägung zu einer verbesserten Selektion führen (vgl. Reif et al. 2007, Longin et al. 2012, Zhao et al. 2015). Diese Kennzahl wird neben der speziellen Kombinationseignung (*specific combining ability*, SCA) zur frühzeitigen Einschätzung der zu erwartenden Hybridleistung und zur Vorselektion der Elternlinien verwendet. Die GCA gibt dabei den generellen Ertragsvorteil mit dem betrachteten Elter von Experimentalhybriden im Vergleich zu dem Mittelwert der Population an und lässt sich auf additive Geneffekte zurückführen, die an dem heterotischen Effekt für das betrachtete Merkmal beteiligt sind (Gregorio und Senadhira 1993, Zhang et al. 2015). Die SCA hingegen, die auf nicht-additive Geneffekte zurückgeführt wird, beschreibt den Ertragsvorteil einer spezifischen Kreuzung zweier Elternlinien im Vergleich zu der Gesamtpopulation. (Gregorio und Senadhira 1993). Durch die Bildung heterotischer Pools könnte die Vorhersage der Hybridleistung auf Basis der GCA verbessert werden, wodurch ein Großteil der Elternlinien bereits vorselektiert und letztendlich kombiniert werden kann (Reif et al. 2007, Longin et al. 2012, Zhao et al. 2015).

Verglichen mit der langen Geschichte der Hybridzüchtung bei Mais (Shull 1908, Troyer 2006, vgl. Schnable und Springer 2013) und der damit verbundenen weit fortgeschrittenen Erstellung heterotischer Gruppen in Mais (Duvick et al. 2004, Boeven et al. 2016) stellt die Hybridzüchtung in autogamen Getreidearten noch einen neuen Ansatz dar. Hybriden spielen derzeit sowohl bei Weizen als auch bei Gerste noch eine untergeordnete Rolle, was bei

Betrachtung der in der deutschen Sortenliste aufgeführten Weizen- und Gerstensorten deutlich wird. Im Jahr 2016 waren hier von 163 eingetragenen Winterweizensorten (ohne Sorten für den ökologischen Landbau) lediglich vier Hybriden, während bei mehrzeiliger Wintergerste immerhin bereits 10 von 49 Sorten Hybriden waren. Als zweizeilige Gerste sind, ungeachtet des Aussaatzeitpunkts, hingegen noch keine Hybriden erhältlich (Bundessortenamt 2016).

1.5 Cytoplasmatisch-kerngenische männliche Sterilität

1.5.1 Cytoplasmatisch-kerngenische männliche Sterilitätssysteme in der Kulturpflanzenzüchtung

Die Erzeugung von Hybridsaatgut setzt stets die Sicherstellung einer kontrollierten Fremdbestäubung und Fremdbefruchtung voraus. Während sich die Kastration der Mutterpflanzen bei Mais aufgrund der monözisch diklinen Wuchsform relativ einfach darstellt und mittels mechanischen Entfernens der endständigen Fahne einfach durchgeführt werden kann (Kempe und Gils 2011, Feng et al. 2014), ist das bei den meisten Pflanzenarten mit hermaphroditen Blüten nicht möglich. Zur Erzeugung von Hybridweizen werden deshalb bspw. chemische Hybridisierungsmittel (*Chemical Hybridization Agents*, CHA) zur Kastration männlicher Blütenorgane eingesetzt (Kempe und Gils 2011, Longin et al. 2012). In anderen Kulturarten wie Sorghum (vgl. Jordan et al. 2011), Reis (vgl. Cheng et al. 2007), Sonnenblumen (vgl. Horn und Friedt 1999) und auch in Gerste (vgl. Longin et al. 2012) wird auf genetische Sterilitätssysteme zurückgegriffen. Seit der ersten Beobachtung durch den deutschen Botaniker Joseph Gottlieb Kölreuter 1763 (Mayr 1986) wurde männliche Sterilität bislang in mehr als 610 Pflanzenarten beschrieben (Kaul 1988). Diese umfasst die cytoplasmatisch-kerngenische männliche Sterilität (CMS), welche durch das Zusammenspiel von Mitochondrien- und Kerngenen verursacht wird, und die alleine auf der Wirkung von Kerngenen beruhende kerngenische männliche Sterilität (GMS) (Vedel et al. 1994, Chen und Liu 2014, Horn et al. 2014). CMS ist ein maternal vererbtes Merkmal, das auf Veränderungen der mitochondrialen DNA basiert, wodurch die Bildung funktionsfähiger Pollen unterbunden wird (Schnable und Wise 1998, Hanson und Bentolila 2004, Chase 2007, Chen und Liu 2014, Horn et al. 2014). Dabei kann die Entwicklung der männlichen Fortpflanzungsorgane entweder sporophytisch oder gametophytisch gehemmt werden. Bei dem größten Teil der sporophytisch männlich-sterilen Pflanzen werden vornehmlich das Tapetum und die Meiozyten beeinträchtigt, während bei gametophytisch männlich-sterilen Pflanzen die Entwicklung der Mikrosporen oder Pollenkörner direkt behindert wird (Guo und Liu 2012). Mehr als 140 Spezies weltweit, wozu auch eine große Zahl an Nutzpflanzen wie Sonnenblumen, Mais, Zwiebeln, Beta-Rüben, Sorghum, Raps, Bohnen, Reis, Baumwolle und Weizen gehören, besitzen

mitunter CMS-Systeme (Schnable und Wise 1998, Kubo et al. 2011). Eine Auflistung bekannter Sterilitätssysteme in Kulturpflanzen findet sich bei Chen und Liu (2014). Bislang sind weder die organspezifische Wirkung noch die Wirkmechanismen aller CMS-Systeme und der korrespondierenden Restorerogene (*restorer of fertility*) bekannt. Allerdings existieren einige Modelle zur Beschreibung der zugrundeliegenden Mechanismen, wie das Cytotoxizitätsmodell, das Energiedefizitmodell, das Modell des anormalen programmierten Zelltods (*programmed cell death*, PCD) und das retrograde Regulationsmodell (vgl. Chen und Liu 2014). Bei dem Cytotoxizitätsmodell verursacht ein durch das CMS-Gen codiertes Protein (meist Transmembranproteine mit hydrophober Region; Levings 1993, vgl. Chen und Liu 2014) direkte Zellschäden, z.B. durch mitochondriale Dysfunktion in den sporophytischen oder gametophytischen Zellen. So konnte beispielsweise die Toxizität mehrerer CMS-Proteine, darunter URF13 (CMS-T [Mais]), ORF522 (CMS-PET1 [Sonnenblume]), ORF138 (CMS-Ogu [Radieschen]) und WA352 (CMS-WA [Reis]), gegenüber *Escherichia coli* festgestellt werden (vgl. Chen und Liu 2014 und Horn et al. 2014). Bei dem Energiedefizitmodell verursacht ein CMS-Protein mitochondriale Defizite, wodurch den Zellen männlicher Fortpflanzungsorgane nicht genügend Energie für eine funktionale Entwicklung bereitgestellt wird. Die sporophytischen und gametophytischen Zellen in den Antheren haben jedoch generell einen erhöhten Energiebedarf. Um diesen erhöhten Energiebedarf decken zu können, müsste in den jeweiligen Zellen entweder eine verstärkte mitochondriale ATP-Produktion oder eine verstärkte Bildung von Mitochondrien mit gleicher metabolischer Aktivität stattfinden (Chen und Liu 2014). Eine unzureichende Energiebereitstellung führt hingegen zu einer (starken) Beeinträchtigung der männlichen Fertilität (Luo et al. 2013, Chen und Liu 2014, Horn et al. 2014). Auf eine mitochondriale Dysfunktion und einer damit verbundenen unzureichenden Energiebereitstellung schlossen beispielsweise Lee und Warmke (1979), die während der Antherenentwicklung im CMS-T-System von Mais eine verstärkte Teilung der Mitochondrien beobachteten. Beispiele für diesen Wirkmechanismus sind neben dem bereits genannten CMS-T auch CMS-Ogu (Brassicaceae) sowie CMS-BT und CMS-HL (beide in Reis). Diese sind wie bereits erwähnt Transmembranproteine und können durch Einlagerung in die innere Mitochondrienmembran und einer Depolarisierung zu einer Störung der Protonengradienten führen (Dewey et al. 1987, Rhoads et al. 1995, Wise et al. 1999a, 1999b, Chen und Liu 2014, Horn et al. 2014). Des Weiteren besitzen CMS-Gene als chimerische ORFs einige essentielle Gene, die an der Respiration beteiligt sind, wodurch die CMS-Proteine auch mit der mitochondrialen Elektronentransportkette interagieren können. Ein Beispiel für dieses Modell stellt das CMS-G-System der Zuckerrübe dar. Hier führt eine Deletion im COX2-Gen zu einer verringerten Aktivität des *cox-2* Gens was in direktem Zusammenhang mit einem Defekt in der Elektronentransportkette und der männlichen Sterilität steht (Ducos et al. 2001).

Das Modell des anormalen programmierten Zelltods besagt, dass durch vorzeitigen oder verspäteten programmierten Zelltod der Tapetumzellen männliche Sterilität verursacht wird. Eine Ursache hierfür können die als Nebenprodukt der Elektronentransportkette in den Mitochondrien entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies sein (Lázaro et al. 2013). Da die Entwicklung männlicher Gametophyten auf einer terminierten Interaktion zwischen der Antherenwand (Sporophyt) und den Mikrosporen (Gametophyt) in Verbindung mit einer PCD-basierten Zellendegeneration des Tapetums beruht, führt ein verspäteter oder verfrühter PCD zu männlicher Sterilität (vgl. Chen und Liu 2014 und Horn et al. 2014). Als Beispiel hierfür dient das CMS-PET1-Cytoplasma der Sonnenblume, bei dem ein verfrühter PCD im Tapetum durch die Freisetzung von Cytochrom c von den Mitochondrien in das Cytosol und einer anschließenden zellulären Kondensation verursacht wird (Balk und Leaver 2001).

Bei dem retrograden Regulationsmodell wiederum reguliert das CMS-Cytoplasma durch ein oder mehrere retrograde Signale die Expression eines nukleären Gens, das bei erhöhter Expression zu gametophytischer Sterilität führt (vgl. Chen und Liu 2014). Im CMS-CW-System von Reis konnte beispielweise ein chimärischer ORF (*CW-orf307*) als Kandidatengen identifiziert werden (Fujii et al. 2010), der durch ein oder mehrere unbekannte retrograde Signale die Expression des rezessiven Kernallels *rf17* reguliert, während die Expression des dominanten aktiven Restorergens *Rf17* (codiert das mitochondriale Protein RETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY) nicht durch das CMS-Cytoplasma reguliert wird. Durch eine gesteigerte Expression des *rf17* wird so die Pollenkeimung unterdrückt, was zur gametophytischen Sterilität führt. Es findet jedoch keine direkte Beeinflussung der Transkription von *CW-orf307* durch *Rf17* oder *rf17* statt (Fujii und Toriyama 2009, vgl. Chen und Liu 2014).

Weitere Beispiele sowie eingehendere Beschreibungen und weiterführende Quellen für die verschiedenen Modelle der CMS-Wirkmechanismen sind zusammenfassend bei Chen und Liu (2014) und bei Horn et al. (2014) dargestellt. Generell können die einzelnen Modelle der CMS-Wirkmechanismen verschiedenen Ebenen der Mitochondrien-Kerngen-Interaktion zugeordnet werden (Abbildung 3). Kerngenische *mitochondrial-sorting gene* Produkte, die sowohl Restorerproteine und gewebespezifische Regulationsfaktoren als auch Untereinheiten des mitochondrialen Elektronentransportkettenkomplexes darstellen, bewirken eine anterograde Regulation des Mitochondriums. Die gewebespezifischen Regulationsfaktoren können weiterhin auf der translationalen oder posttranslationalen Ebene die gewebespezifische Akkumulation von CMS-Proteinen in männlichen Fortpflanzungsorganen regulieren, die möglicherweise wiederum mit Untereinheiten der mitochondrialen Elektronentransportkette interagieren und auf diese Weise deren Funktion, Redoxstatus oder ATP-Biogenese beeinflussen. Mittels retrograder Signale führt dies so zu einem programmierten Zelltod (PCD) des Tapetums oder der Mikrosporen. Eine Restauration der männlichen Sterilität mittels

Restorerproteinen kann des Weiteren auf genomischer, mRNA-, Protein- und metabolischer Ebene stattfinden und die phänotypische Ausprägung der männlichen Sterilität unterbinden.

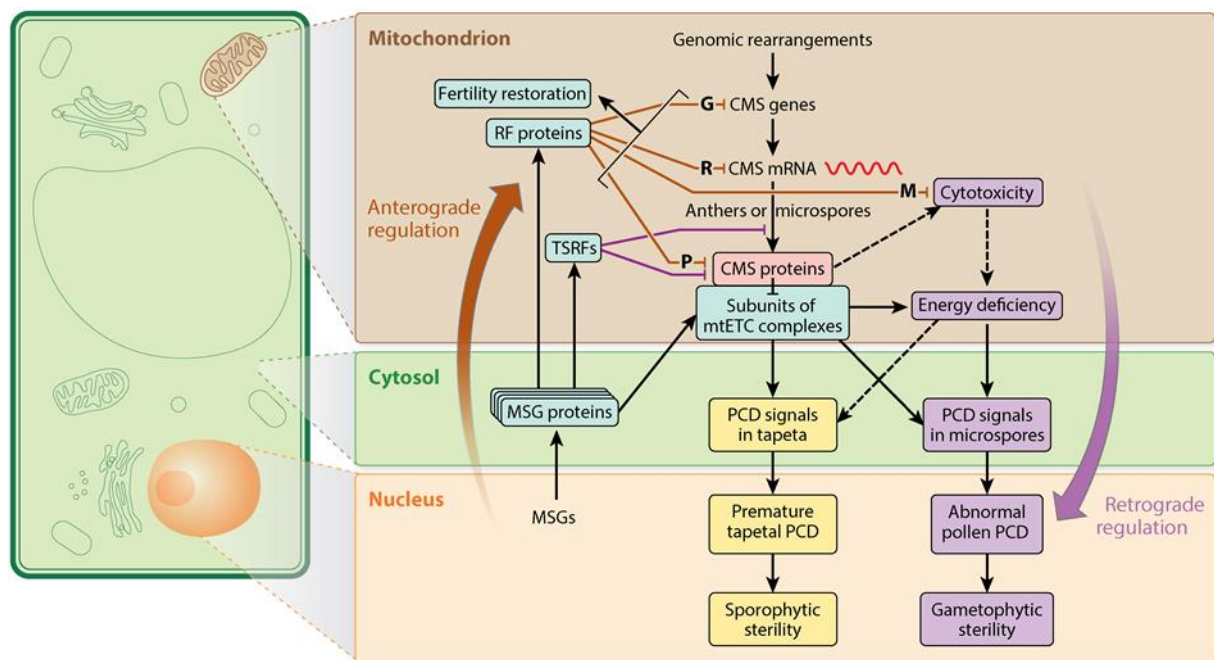


Abbildung 3: Schematische Darstellung verschiedener Ebenen (G = genomisch Ebene, R = mRNA-Ebene, P = Proteinebene, M = Metabolische Ebene) von Mitochondrien-Kerngen-Interaktionen im System der cytoplasmatisch-kerngenen männlichen Sterilität (CMS). (MSG = Kerngene, die Mitochondrien-gerichtete Proteine codieren (Mitochondrion-sorting genes), TSRF = Gewebespezifischer Regulationsfaktor, mtETC = Mitochondriale Elektronentransportkette, PCD = Programmierter Zelltod, RF proteins = Restorerproteine, (Quelle: Chen und Liu 2014).

Normalerweise unterliegen die CMS-assoziierten Transkripte pflanzlicher Mitochondrien und Chloroplasten verschiedenen, durch die Produkte der *Rf*-Gene verursachten, posttranskriptionalen Modifikationen wie Spleißen, Polyadenylierung, Spaltung und Editierung (Chen und Liu 2014). Als Beispiel kann das CMS-A3-System in Sorghum genannt werden. Hierbei besitzt das CMS-A3-assoziierte *orf107*-Transkript vier Positionen, die in unterschiedlicher Intensität editiert werden können. Bei Vorhandensein des *Rf3*-Restorer gens wird das *orf107*-Transkript abgebaut, was zu einer Restauration der betreffenden Pflanzen führt (Pring et al. 1998, Tang et al. 1999). In CMS-WA Reis führt das *Rf4*-Restorer gen zu einem Abbau des WA352-Transkripts, dessen Menge in den betreffenden Pflanzen dadurch auf ca. 20% verringert wird (Luo et al. 2013). In manchen CMS-Systemen wird jedoch weder die Menge noch die Größe der CMS-assoziierten Transkripte fertilitätsrestaurierter Pflanzen verändert. Hier wird die Restauration durch translationale bzw. posttranslationale

Mechanismen kontrolliert (Chen und Liu 2014). In CMS-Ogu beispielsweise, wird eine Fertilitätsrestauration durch das *Rfo*-Restorer gen hervorgerufen, welches das PPR-Protein (*Pentatricopeptide repeat protein*) PPR-B kodiert. Die Menge der *orf138*-mRNA in den Antheren wird dadurch nicht beeinflusst, jedoch wird die Akkumulation des ORF138-Proteins unterdrückt (Uyttewaal et al. 2008).

Auch auf metabolischer Ebene kann eine Fertilitätsrestauration stattfinden. Im CMS-T von Mais beispielsweise wird durch das Restorer gen *Rf2* eine Aldehyd-Dehydrogenase kodiert, die mindestens drei Aldehyde oxidiert (Liu et al. 2001). Obwohl einige *Rf*-Gene bereits kloniert werden konnten, bleiben die meisten Wirkmechanismen bislang unbekannt. Viele dieser geklonten Restorer gene kodieren jedoch PPR-Proteine, die eine weit verbreitete Genfamilie in terrestrischen Pflanzen darstellen (vgl. Chen und Liu 2014 und Horn et al. 2014). In *Arabidopsis* und Reis konnten mehr als 450 bzw. sogar mehr als 650 kerngenisch codierte PPR-Proteine gefunden werden, wovon sich die Wirkung eines großen Teils dieser Gene auf die Mitochondrien und Plastiden bezieht (Saha et al. 2007).

1.5.2 Einsatz der CMS in der Gersten-Hybridzüchtung

Während manche CMS-Systeme bereits den verschiedenen Modellen zugeordnet werden konnten (vgl. Chen und Liu 2014), ist das in Gerste verwendete CMS-System bislang noch nicht so intensiv erforscht. Bereits in den 1970er Jahren wurde es von Ahokas (1979) in einer israelischen Wildgerstenrasse entdeckt und durch Paul Bury (New Farm Crops Ltd., jetzt Syngenta Seeds Ltd.) 1994 durch Rückkreuzung in europäische Zuchtlinien überführt. Die ersten Gerstenhybriden konnten in den frühen 2000er Jahren auf den europäischen Markt gebracht werden (Longin et al. 2012). Die männliche Sterilität wird hier durch das mitochondriale Gen *male sterile maternal 1 (msm1)* verursacht und von dem korrespondierenden dominanten nukleären Restorer gen *Restorer of fertility in msml (Rfm1)*, das auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6H lokalisiert ist (Matsui et al. 2001, Ui et al. 2014), aufgehoben.

Erste Studien von Ahokas (1978) ließen vermuten, dass die Sterilität durch eine erhöhte Produktion und eine unkontrollierte Sekretion von Sporopollenin und dem damit verbundenen möglichen Energieverlust verursacht wird. Weitere Studien hierzu wurden jedoch bislang nicht unternommen. Trotz des ungeklärten Wirkmechanismus stellt das *msm1*-Cytoplasma das bislang einzige, in der experimentellen Gersten-Hybridzüchtung eingesetzte CMS-System dar. Praktische Zuchtprogramme basieren auf einem Drei-Linien-System, in dem drei verschiedene Zuchtlinien zum Einsatz kommen. Die männlich sterile Mutterlinie (A-Linie) besitzt in ihrem Mitochondriengenom das Sterilität induzierende CMS-Gen (*msm1*), sowie ein rezessives kerngenisches CMS-Allel. Eine Maintainerlinie (B-Linie), die wiederum ein fertiles Plasma

sowie das rezessive nukleäre CMS-Allel enthält, dient aufgrund der Sterilität der Mutterlinie als Bestäuberlinie und verfügt deshalb im angestrebten Idealfall über exakt dasselbe Kerngenom wie die Mutterlinie. Um fertiles Hybridsaatgut erstellen zu können, wird nun die Mutterlinie mit einer über das dominante Restorergergen verfügende Vaterlinie (R-Linie) gekreuzt. Diese Restorerlinie muss dabei, aufgrund des dominanten Restorerallels im Kerngenom nicht zwangsläufig über ein normales Cytoplasma verfügen, sondern kann auch ein steriles Plasma besitzen. (vgl. Chen und Liu 2014). In Abbildung 4 ist das Drei-Linien-System schematisch dargestellt.

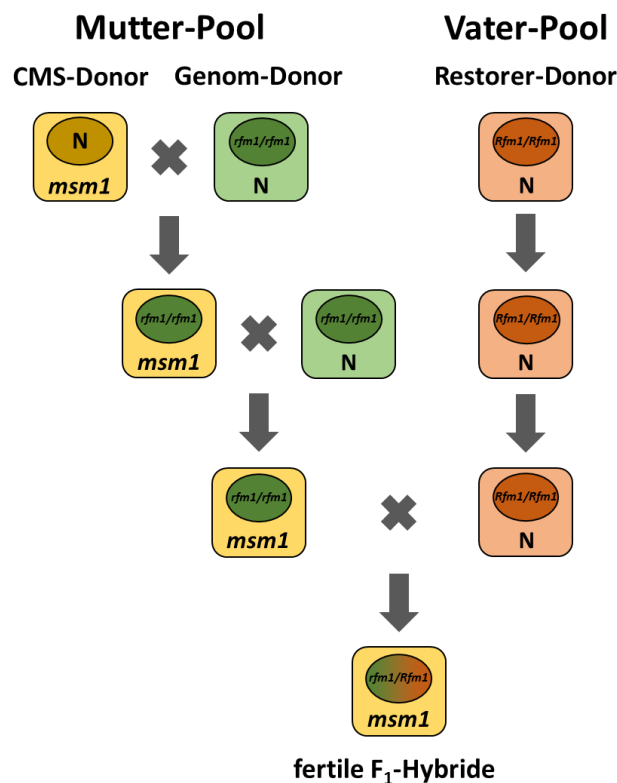


Abbildung 4: Darstellung des Drei-Linien-Hybridzüchtungsschemas. Das Restorergergen-freie Kerngenom (*rfm1/rfm1*) des Mutterlinien-Pools wird mittels Rückkreuzung in das Plasma des CMS-Donors mit beliebigem Kerngenom (N) überführt (z.B. bei der Erstellung einer neuen Mutterlinie). Durch Kreuzung der entstandenen sterilen Mutterlinie mit der fertilen Maintainerlinie (normales Cytoplasma, N) kann die Mutterlinie rückgekreuzt bzw. stabil erhalten werden. Durch Kreuzung der sterilen Mutterlinie mit der Restorerlinie (Vater-Pool) kann durch das homozygote, dominante Restorergergen (*Rfm1/Rfm1*) eine fertile F₁-Hybride (*rfm1/Rfm1*, *msm1*-Plasma) erstellt werden.

1.5.3 Thermosensitivitätsproblematik des *msm1*-Cytoplasmas

Ein gravierendes Problem, das die Entwicklung und Markteinführung einer beliebig großen Zahl an Gerstenhybriden erschwert, ist die spontane partielle Fertilitätsrestauration, die während der Rückkreuzung bzw. Erhaltung der CMS-Mutterlinien auftreten kann und dort zu einer ungewollten Selbstung führt. Dadurch kann u.U. aufgrund von genetischer „Verunreinigung“ eine Hybridsortenerstellung mit einer hohen Hybridität nicht sichergestellt werden. Wie verschiedene Studien zeigen konnten, ist diese Instabilität stark umweltabhängig. Versuche von Hockett et al. (1989) zeigten in cytoplasmatisch-kerngenisch männlich steriler Gerste beispielsweise, dass die Photoperiode einen Einfluss auf die Fertilitätsrestauration steriler Pflanzen hat, wobei eine längere Photoperiode eine geringere Selbstungsrate bewirkte. Dabei konnte beobachtet werden, dass partiell restaurierende Sorten aus Breiten südlicher als 50°N stammten, während bei nordeuropäischen Genotypen im *msm1*-Cytoplasma die Sterilität erhalten blieb. Neben dieser Photosensitivität des CMS-Systems konnte ebenfalls ein erheblicher Einfluss der Umgebungstemperatur auf die spontane partielle Fertilitätsrestauration gefunden werden (Abdel-Ghani et al. 2013). Abdel-Ghani et al. (2013) testeten die BC₁F₁-Nachkommenschaften aus Kreuzungen zwischen 23 europäischen Sorten mit einer CMS-Linie und konnten bei einigen CMS-Nachkommenschaften einen erhöhten Kornansatz unter hohen Temperaturen im Gewächshaus im Vergleich zu niedrigeren Temperaturen in der Klimakammer feststellen. Weiterhin konnten Abdel-Ghani et al. (2013) und Ui et al. (2014) beobachten, dass die Antheren von fertilen Linien normal ausgebildet und gelblich aussahen, während jene, die von sterilen Pflanzen stammten, verkümmert und weißlich waren.

Ähnliche Beobachtungen zur Temperaturabhängigkeit von CMS-Systemen wurden auch bei anderen Pflanzen wie Sorghum (Downes und Marshall 1971), Perlhirse (Reddy und Reddi 1972), Raps (Fan und Stefansson 1986) und Mais (Bückmann et al. 2014, 2016) gemacht. Bei einigen Arten konnte auch das Entwicklungsstadium, während dem es zu einer Fertilitätsrestauration kommt, identifiziert bzw. eingegrenzt werden. Bückmann et al. (2013, 2016) beobachteten beispielsweise, dass die Umgebungstemperatur die Fertilitätsrestauration kurz vor der Anthese im T- und S-Cytoplasma von Mais beeinflusst, während Fan und Stefansson (1986) im nap- und pol-Cytoplasma von Raps auf einen Zeitpunkt vor der Staubblattendifferenzierung schlossen. Wang et al. (2014) wiederum studierten den Sterilitätsprozess in Antheren einer somatischen Hybride aus *Brassica napus* und *Sinapis alba* und beobachteten, dass in der cytoplasmatisch männlich sterilen Linie SaNa-1A dieser Prozess im späten PMZ-Stadium ablief. González-Melendi et al. (2008) fanden einen vorzeitigen Tod der Tapetumzellen während des späten Tetradenstadiums der Gameten im oguCMS-System von *B. napus*.

Genauere Untersuchungen hinsichtlich der exakten Stadien der Sterilitätsinduktion und der Fertilitätsrestauration existieren in Gerste bislang nicht. Dennoch wurden in allen genannten Studien bei Gerste neben der Umweltaabhängigkeit der CMS-Stabilität auch starke genotypische Effekte festgestellt. Die daraus abgeleitete genotypische Variation gibt Aussicht auf eine Selektierbarkeit des Instabilitätsmerkmals. Mittels Marker-gestützter Selektion wäre es möglich, einerseits unerwünschte Allele aus bestehenden Züchterpools zu entfernen und gleichzeitig die Einkreuzung neuen Materials zu erleichtern. Auf diesem Weg könnte die Erstellung marktfähiger Hybridsorten effizienter und kostengünstiger gestaltet werden.

2. Ziele der Arbeit

Im Gegensatz zu der hauptsächlichen Nutzung als Körnerfrucht für Fütterungs- oder Brauzwecke, gibt es derzeit nahezu kaum Informationen zur Biomasseertragsleistung von Wintergerste für die bioenergetische Nutzung. Gerade hier entstand jedoch aufgrund des starken Interesses an erneuerbaren Energien, verbunden mit der gleichzeitigen Kritik an der hohen Anbaudichte von Mais als Biogassubstrat ein Bedarf nach größerer Artenvielfalt. Eine entsprechende Nutzung der Gerste könnte dieser Problematik entgegenwirken und ökologische Vorteile mit hohen Flächenerträgen verbinden.

Aufgrund der relativ geringen Biomasse-Ertragsleistung von Liniensorten sollte in den vorgestellten Feldversuchen der Ertragsvorteil von Hybriden untersucht werden. Die Ausprägung der Heterosis für Biomasse- und Trockenmasseertrag sowie die durch Berechnung der Kombinationseignung getroffenen Rückschlüsse auf die Vererbung dieser heterotischen Merkmale sollte zusätzlich in Verbindung zur Korntragsleistung gestellt werden, um die Möglichkeit der Züchtung von Hybriden als Zweinutzungssorten zu erörtern. Neben der Bildung geeigneter genetischer Pools stellt besonders die Einkreuzung neuen genetischen Materials derzeit ein Problem für die effiziente Erzeugung von Hybridsorten für den Saatgutmarkt dar, da diese durch die Problematik der Instabilität des für die Hybridzüchtung verwendeten CMS-Systems deutlich erschwert wird. Durch Anwendung einer markergestützten Selektion hinsichtlich der Identifizierung von stabilem genetischen Material könnte der Zuchtvorgang deutlich erleichtert und beschleunigt werden. Da es sich hierbei jedoch um ein in höchstem Maße umweltabhängiges Merkmal handelt, sind verlässliche phänotypische Daten für eine Markeretablierung notwendig, deren Ermittlung nur durch hohen Arbeitsaufwand möglich ist. In der vorliegenden Arbeit standen deshalb die Untersuchung genetischer Variation, sowie die Differenzierung geeigneter Wachstumsstadien für die Selektion des CMS-Instabilitätsmerkmals im Vordergrund. Die vorliegende Arbeit sollte somit zu einer effizienteren Gestaltung der Hybridzuchtprogramme beitragen, um so auch einen Beitrag zu einer ökonomischen und umweltverträglichen Steigerung der Flächenerträge zu leisten.

3. Publikation I

‘Heterosis for biomass and grain yield facilitates breeding of productive dual-purpose winter barley hybrids’

Timm Bernhard, Wolfgang Friedt, Kai P. Voss-Fels, Matthias Frisch, Rod J. Snowdon und Benjamin Wittkop

Publiziert in: Crop Science (online publiziert)

Heterosis for Biomass and Grain Yield Facilitates Breeding of Productive Dual-Purpose Winter Barley Hybrids

Timm Bernhard, Wolfgang Friedt, Kai P. Voss-Fels, Matthias Frisch,
Rod J. Snowdon, and Benjamin Wittkop*

ABSTRACT

Winter barley (*Hordeum vulgare* L.) can be a valuable supplement as whole plant silage for bioenergy production due to positive effects of plant cover over winter and the possibility of growing a subsequent second crop after barley. However, to be competitive with other bioenergy crops, barley dry matter yield (DMY) needs to be enhanced. Therefore, we tested a factorial of 96 barley experimental hybrids together with their parental lines for DMY, grain yield (GY), and yield-associated traits in a multi-environmental field plot trial with a practical focus. The average best-parent heterosis (BPH) of GY was 7.7%, whereas average BPH of DMY was 9.1%. The higher GY of hybrids was mainly caused by the higher kernel number per ear. The variance of specific combining ability (SCA) was higher than that of general combining ability (GCA), revealing prevalence of non-additive effects on barley DMY. Additionally, SCA values highly correlated with those of DMY and GY ($r = 0.752$ and $r = 0.839$, respectively), as well as with values of mid-parent heterosis (MPH; $r = 0.768$ [DMY], $r = 0.877$ [GY]) and BPH ($r = 0.695$ [DMY], $r = 0.768$ [GY]). There was a correlation between the parental genetic distance and hybrid DMY, whereas no correlations were found between the parental per se and hybrid DMY and GY values. These results suggest that future hybrid breeding should be run in a separate program with a main focus on the establishment of heterotic pools and an increase in genetic diversity.

T. Bernhard, W. Friedt, K.P. Voss-Fels, R.J. Snowdon, B. Wittkop, Dep. of Plant Breeding, IFZ Research Centre for Biosystems, Land Use and Nutrition, Justus Liebig Univ., Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany; M. Frisch, Institute for Agronomy and Plant Breeding II, IFZ Research Centre for Biosystems, Land Use and Nutrition, Justus Liebig Univ., Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany. Received 10 Oct. 2016. Accepted 16 Apr. 2017. *Corresponding author (benjamin.wittkop@agrar.uni-giessen.de). Assigned to Associate Editor Jochum Wiersma.

Abbreviations: BPH, best-parent heterosis; DMC, dry matter content; DMY, dry matter yield; EA, number of ears m^{-2} ; EHP, estimated hybrid performance; F, female; FMY, fresh matter yield; GCA, general combining ability; GY, grain yield; H^2 , broad-sense heritability; HD, days to heading; HLW, hectoliter weight; KE, kernel number per ear; M, male; MPH, mid-parent heterosis; P_{av} , average parental performance; P_F , female parent performance; PH, plant height; P_H , hybrid performance; P_M , male parent performance; SCA, specific combining ability; TKW, thousand kernel weight

THE POLICY OF RENEWABLE ENERGY SOURCES in the European Union has stimulated a rising demand for bioenergy crops. In Germany, maize (*Zea mays* L.) has become the predominant crop for biogas production, because it provides the highest average methane yield per area unit (Herrmann, 2013). However, nitrate leaching during winter is a major drawback in maize rotations because it causes economic losses and environmental problems. Hence, winter barley, up to now mainly used as a grain crop for animal fodder, is a promising supplement in bioenergy production. It can be used as a winter catch crop in combination with a successive second crop, such as sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] (Windpassinger et al., 2015). Due to its relatively early ripening, barley can be harvested as whole plant silage prior to lignification, that is, in late May or early June during milk

Published in Crop Sci. 57:1–14 (2017).
doi: 10.2135/cropsci2016.10.0872

© Crop Science Society of America | 5585 Guilford Rd., Madison, WI 53711 USA
All rights reserved.

ripeness (Development Code [DC] 74–79; Zadoks et al., 1974), allowing a second crop like sorghum or even maize to be harvested in October. Thus, comparable or even higher total biomass and methane yields per area could be achieved (Weiland, 2003). Within the German EVA project (Walter and Zürcher, 2013) different crops, crop combinations, and cultivation systems for bioenergy use have been tested. The results obtained showed that barley had a comparable methane yield per kg of dry matter to that of maize, but its DMY was much lower. However, the combination of barley as a winter catch crop and sudan-grass (*S. bicolor* × *sudanense*) as a second crop showed an overall DMY and methane yield per hectare values comparable to that of maize. Taking into account the main use of winter barley, a dual-purpose variety with both high GY and high total DMY would be favorable. Such variety types would provide flexibility for farmers, facilitating either silage harvest for bioenergy purposes or grain harvest for feed and food. A comparable study of rye (Haffke et al., 2014) showed that both DMY and GY were highly variable with significant genetic variances, whereas broad-sense heritability (H^2) parameters for GY and DMY were moderate. Because dry matter content (DMC) and specific methane yield of winter barley are comparable to or even slightly better than those of winter rye (Walter and Zürcher, 2013), the competitiveness of barley crops can be enhanced mainly by improving DMY.

The use of hybrids instead of pure line varieties can be a possible way to achieve higher DMY of winter barley. To the best of our knowledge, no studies regarding DMY performance of winter barley hybrids in field trials had been published. In contrast, 10% mid-parent heterosis (MPH) of barley GY has already been reported by Mühleisen et al. (2013a). Previously, Longin et al. (2012) reported average heterosis values of ~10% and ~7% for GY and plant height (PH) in wheat (*Triticum aestivum* L.), durum (*T. durum*), triticale (× *Triticosecale*), and barley hybrids. Recently, Philipp et al. (2016) reported that 75% of two-way barley hybrids outperformed the highest-yielding check variety. Data of Haffke et al. (2014) on the correlation of PH and DMY in hybrid rye suggest that higher PH in barley will be associated with greater DMY. Zhang et al. (2015) calculated MPH values for different plant traits in barley and received positive average values, which ranged from negligibly low, for the number of spikes per plant, to high, for PH. Kernel weight per plant showed an MPH value of 1.78 g, whereas dry weight per plant exhibited an MPH value of 3.68 g. These results suggest that breeding of barley hybrids with the focus on whole plant biomass may result in comparable heterotic effects on DMY and GY. In addition to a higher yield, hybrids also show significantly better yield stability (Mühleisen et al., 2013b; Philipp et al., 2016), which is especially beneficial in marginal and drought-prone environments.

Since hybrid breeding is a fairly novel technique in autogamous cereals, such as wheat and barley, and due to the yet low heterosis, hybrid breeding mostly remains a spin-off from line breeding. Thus, the development of heterotic pools in these crops is still in its infancy (Gowda et al., 2012). For better understanding of heterosis in autogamous cereals and improved hybrid barley breeding for DMY and GY, the knowledge about the inheritance of heterotic traits is of crucial importance. In this regard, it is essential to understand the relative impact of key factors, such as general combining ability (GCA) and specific combining ability (SCA), as well as the influence of parental per se performance on hybrid yield and their respective prediction accuracy. Consequently, the goals of the present study were: (i) scoring of barley experimental hybrids for DMY and GY performance as well as for yield-associated traits; (ii) estimation of relevant parameters for breeding, such as heterosis, GCA and SCA for DMY and GY; and (iii) calculation of coefficients of correlation between hybrid performance, genetic distance, heterosis, and combining ability to obtain clues about the inheritance of heterotic traits and usefulness of GCA and SCA as predictors of DMY and GY.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material and Field Experiments

Plant material used in this study consisted of 96 experimental F1 hybrids, representing factorial crosses between 12 European cytoplasmic male sterile female lines (F) and eight restorer lines (M, Males). The parental lines were chosen by the cooperating breeders based on their relevance in hybrid breeding programs and seed availability. Hybrids and parental lines were grown in a randomized split-plot design in two replications in Gross-Gerau [Location 1, 49°94' N, 8°5' E] and Rauischholzhausen [Location 2, 50°76' N, 8°88' E], Hesse (Germany) for whole plant harvesting and determination of DMY (Table 1). Additionally, these lines and hybrids were also grown in one replication in Leutewitz, Saxony [Location 3, 51°15' N, 13°36' E], Hovedissen, North Rhine-Westphalia [Location 4, 52°03' N, 8°70' E] and Gudow, Schleswig-Holstein [Location 5, 53°54' N, 10°79' E], in Germany, as well as in Estrées-Saint-Denis, Picardy, France [Location 6, 49°43' N, 2°65' E] for grain harvest during the vegetation periods of 2014/2015 and 2015/2016. In accordance with the official trials of the German Federal Plant Variety Office, and reflecting recommended agricultural practice, sowing density of hybrids was reduced by 25%. This resulted in seeding rates of 300 seeds m⁻² for lines and 225 seeds m⁻² for hybrids. Since the aim of this study was to achieve a high practical relevance, this strategy aimed to reflect the actual performances of hybrids and lines as they would occur in practice. Applications of fertilizers and pesticides were conducted as customary for the respective location. During spring, time to heading (HD) in days after the first of January and shortly before harvest, the number of ears m⁻² (EA) and PH in centimeters were recorded at Locations 1 and 2 when DMY was examined. Although PH was also recorded at locations where GY was determined (Locations 3–6) in both years,

Table 1. Characterization of the two trials with respective locations and the traits recorded (DMY = dry matter yield, GY = grain yield, F = females, M = males, H = hybrids, DMC = dry matter content, FMY = fresh matter yield, EA = ears per m², PH = plant height, HD = days to heading, HLW = hectoliter weight, TKW = thousand kernel weight, KE = kernels per ear).

Purpose	DMY trials	GY trials
Barley material	12F, 8M, 96H	12F, 8M, 96H
Year	2015, 2016	2015, 2016
Locations	Gross-Gerau, Rauischholzhausen	Leutewitz, Hovedissen, Gudow, Estrées-Saint-Denis
Field design	Split-plot	Split-plot
Replications	Two replicates	One replication
Recorded traits	DMY, DMC, FMY, EA, PH, HD	GY, HLW, TKW, KE, PH, EA, HD

EA was only recorded in 2016. Additionally, thousand kernel weight (TKW) and hectoliter weight (HLW) were recorded in the GY trial. The number of kernels per ear (KE) was calculated from GY, EA, and TKW.

Whole plant harvesting was conducted at late milk ripeness using a self-propelled whole plot biomass harvester (Haldrup grass harvester 1500, Haldrup GmbH, Ilshofen, Germany). Fresh matter yield (FMY) per plot was weighed out automatically by an integrated scale, and a sample of ~10 kg per plot was automatically cut to a straw particle length of 2 to 5 cm by an integrated chopper. Afterward, a part of approximately 750 g of the chopped sample was weighed and dried at 105°C in a drying oven (until the samples reached weight constancy) to determine DMC for the calculation of DMY.

Genetic Distance Analysis

For genotypic analysis, parental lines were genotyped using the Illumina iSelect 9k barley SNP chip (Comadran et al., 2012) carrying a total of 7842 SNP assays. Calculation of the population structure was conducted using Selection Tools (www.uni-giessen.de/population-genetics/downloads) written in R (R Development Core Team, 2015). Filtering of raw marker-data was performed by excluding all markers that had more than two called alleles, more than 10% missing data, or minor allele frequency of less than 2.5%. This procedure left a total of 3092 high quality SNP-markers. Genetic distance was assessed by calculating the Rogers distance (Rogers, 1972) based on the 3092 markers. Furthermore, to visualize the population structure, the principal component analysis was conducted by using the first four principal components based on the Rogers distance.

Statistical Analyses

Statistical evaluations were all conducted with SPSS (IBM SPSS Statistics Version 22, IBM Software, Armonk, NY) and R (R Development Core Team 2015).

To characterize hybrid yield performance, MPH and best-parent heterosis (BPH) values were calculated by comparing each hybrid's performance with the respective parental performance by using the following formulas:

$$\text{MPH} = \frac{F_i}{1/2 \times (P_1 + P_2)};$$

$$\text{BPH} = \frac{F_i}{P_B},$$

(where F_i is the average hybrid performance over all locations and years; P_1 and P_2 are values of the average performance over all locations and years of the respective parents; and P_B is the average performance over all locations and years of the better performing parent).

To characterize combining ability of parental lines with regard to DMY and GY, respectively, and related expectable yield performance of hybrids derived by crosses with the respective lines, GCA and SCA parameters were calculated over all environments by using the following formulas:

$$\text{GCA}_A = \bar{x}_A - \bar{x}_T;$$

$$\text{SCA}_{A \times B} = F_{A \times B} - (\bar{x}_T + \text{GCA}_A + \text{GCA}_B),$$

(where GCA_A and GCA_B are values of general combining ability of parent A and parent B, respectively; $\bar{x}_A$ is the average yield of all crosses with parent A; $\bar{x}_T$ is the average yield of the entire factorial; $\text{SCA}_{A \times B}$ is specific combining ability of the cross between parent A and parent B; and $F_{A \times B}$ is the yield performance value of the hybrid derived from the cross between parents A and B).

For a better illustration of the prediction accuracy of GCA and SCA parameters, the sum of parental GCA effects (GCA_{sum}) and SCA of the specific cross were considered as estimated hybrid performance (EHP). The latter values were calculated according to the formulas below and compared to actual hybrid performance:

$$\text{EHP}_{\text{SCA}} = \bar{x}_T + \text{SCA};$$

$$\text{EHP}_{\text{GCA}} = \bar{x}_T + \text{GCA}_{\text{sum}},$$

(where EHP_{SCA} is estimated hybrid performance by SCA; EHP_{GCA} is estimated hybrid performance by GCA_{sum} ; and $\bar{x}_T$ is the average yield of the entire factorial).

To investigate whether DMY and DMV components were significantly different in hybrids and parental lines, that is, to assess the extent of heterosis, multivariate analysis of variance was conducted for all traits, environmental influences, and genotype $\times$ environment interactions based on the general linear model, in which genotypes and locations were set as fixed effects, whereas repeats were set as random effects:

$$y_{ijk} = \mu + G_i + L_j + GL_{ij} + R_{kj} + e,$$

(where y_{ijk} represents a phenotypic observation of the j th genotype in the j th environment in the k th repeat; μ represents the intercept; G_i represents a genotypic effect of the i th individual; L_j represents the effect of the j th environment; GL_{ij} represents the effect of the i th individual in the j th environment; R_{kj} represents the effect of the k th repeat in the j th environment; and e represents residual variance).

The same general linear model was also applied to compute the variances of male (GCA_M) and female effects (GCA_F) as well as of the sum of parental GCA (GCA_{sum}) and SCA effects

on DMY. As in the last model, genotypes and location were set as fixed effects and repeats were set as random effects.

H^2 values for DMY were calculated according to the following formula:

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \frac{\sigma_{G \times E}^2}{n_E} + \frac{\sigma_{\text{Error}}^2}{n_{ER}}}$$

(where σ_G^2 is genetic variance; σ_E^2 is environmental variance; σ_{Error}^2 is error variance; n_E is the number of environments; and n_{ER} is the number of environments and replications [cf. Mühleisen et al., 2013a]).

Because the trials for GY and GY components were only replicated once per location, we used the following modified statistical random effect model for variance component estimation:

$$y_{ij} = \mu + G_i + L_j + e,$$

(where y_{ij} represents a phenotypic observation of the j th genotype in the j th environment; μ represents the intercept; G_i represents a genotypic effect of the i th individual; L_j represents the effect of the j th environment; and e represents residual variance.)

The factors “genotype” and “environment” were both set as random, and every location in the respective year was considered a unique environment. Calculations were performed using “lmerTest” R package (Kuznetsova et al., 2016). The genotype $\times$ environment interaction could not be determined because GY and GY component trials at respective locations lacked replicates. Therefore, that interaction was confounded with the residual term e . To overcome this problem in heritability calculations, we used the following approximation method for unbalanced data proposed by Piepho and Möhring (2007).

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \frac{1}{2} \overline{vd}},$$

where H^2 represents broad-sense heritability; σ_G^2 represents genotypic variance calculated with the previous random effect model; and $\overline{vd}$ represents the average variance of a difference between two means, which was obtained by squaring the standard error of the difference between two means. To calculate the latter parameter, we used “lsmeans” R package (Lenth, 2016).

Pearson’s coefficients of correlation (r) between all investigated traits were calculated to determine which yield factors had the highest influence on DMY and GY. Pearson’s coefficients were also calculated for correlations between hybrid performance (P_H), average parental performance (P_{av}), male parent performance (P_M), female parent performance (P_F), MPH, BPH, GCA_M , GCA_F , GCA_{Sum} , and SCA values, concerning DMY and GY, to unravel relations between these operating figures for breeding.

Coefficients of determination (R^2) were calculated between EHP_{SCA} and EHP_{GCA} , respectively, and hybrid yield performance to describe the accuracy of yield prediction by SCA and GCA_{Sum} , respectively.

RESULTS

Hybrid Performance and Heterosis

The hybrid barley combinations had both a higher DMY and GY in nearly all environments as illustrated in Fig. 1a and 2a. Whereas hybrids reached an average DMY of 13.0 t ha⁻¹, parental lines showed a significantly lower DMY of 11.6 and 11.7 t ha⁻¹, respectively. Furthermore, hybrids were significantly taller than parental lines. Days to heading were comparable in hybrids and females, but showed some delay in males, so that HDs of hybrids were significantly earlier than the average of parental lines. The DMC parameter was also slightly lower in males, indicating a delayed growth and ripening. Environmental effects on HD, PH, DMC, and DMY did not differ between parental lines and hybrids. The DMY results and related yield components are presented in more detail in Supplementary Table S1. The ANOVA results for hybrids and parental lines separately and for both hybrids and parents together are presented in Supplementary Tables S2 and S3, respectively.

Analysis of GY values (Fig. 2a) also revealed that the yields were significantly higher in hybrids than in parental lines in nearly all environments. The KE values were significantly higher in hybrids than in their parental lines in three of the four locations in 2016 (Fig. 2b), whereas neither TKW nor HLW values were significantly different. Supplementary Table S4 presents detailed results for all traits. Results of ANOVA of GY data are given in Supplementary Tables S2 and S3.

All scored traits associated with DMY showed heterosis, indicating non-additive genetic effects (Table 2). The magnitude of heterosis differed for the traits: DMY itself had average MPH value of 12% and BPH value of 9%, whereas FMY and PH reached MPH values of 10 and 8%, respectively. Although the results for PH and HD were very similar in both GY and DMY trials, the EA results were quite different and variable. Whereas hybrids showed 14.5% more ears than parental lines at the two locations for DMY testing, they had fewer ears at the locations for GY testing. Since hybrids and parental lines were sown at different seeding rates, EA data could not be confidently evaluated. The magnitude of heterosis of GY (MPH of 9% and BPH of nearly 8%) was similar to that of DMY. On the other hand, heterotic effects were low for grain quality traits: neither HLW nor TKW exhibited significant heterosis, whereas KE showed BPH of 5% and MPH of 9.7%.

Pearson’s correlation coefficients (r) were calculated in all genotypes for all traits within the respective trials (DMY and GY) and among the traits of the two trials (Table 3). As expected, the highest correlations existed between DMY and FMY ($r = 0.722$, $P < 0.001$) and between DMY and DMC ($r = 0.495$, $P < 0.001$). The HD measured at the locations for DMY (HD_{DMY}) positively correlated with DMY ($r = 0.405$, $P < 0.001$). Furthermore, DMC and HD_{DMY} also showed a moderate positive correlation

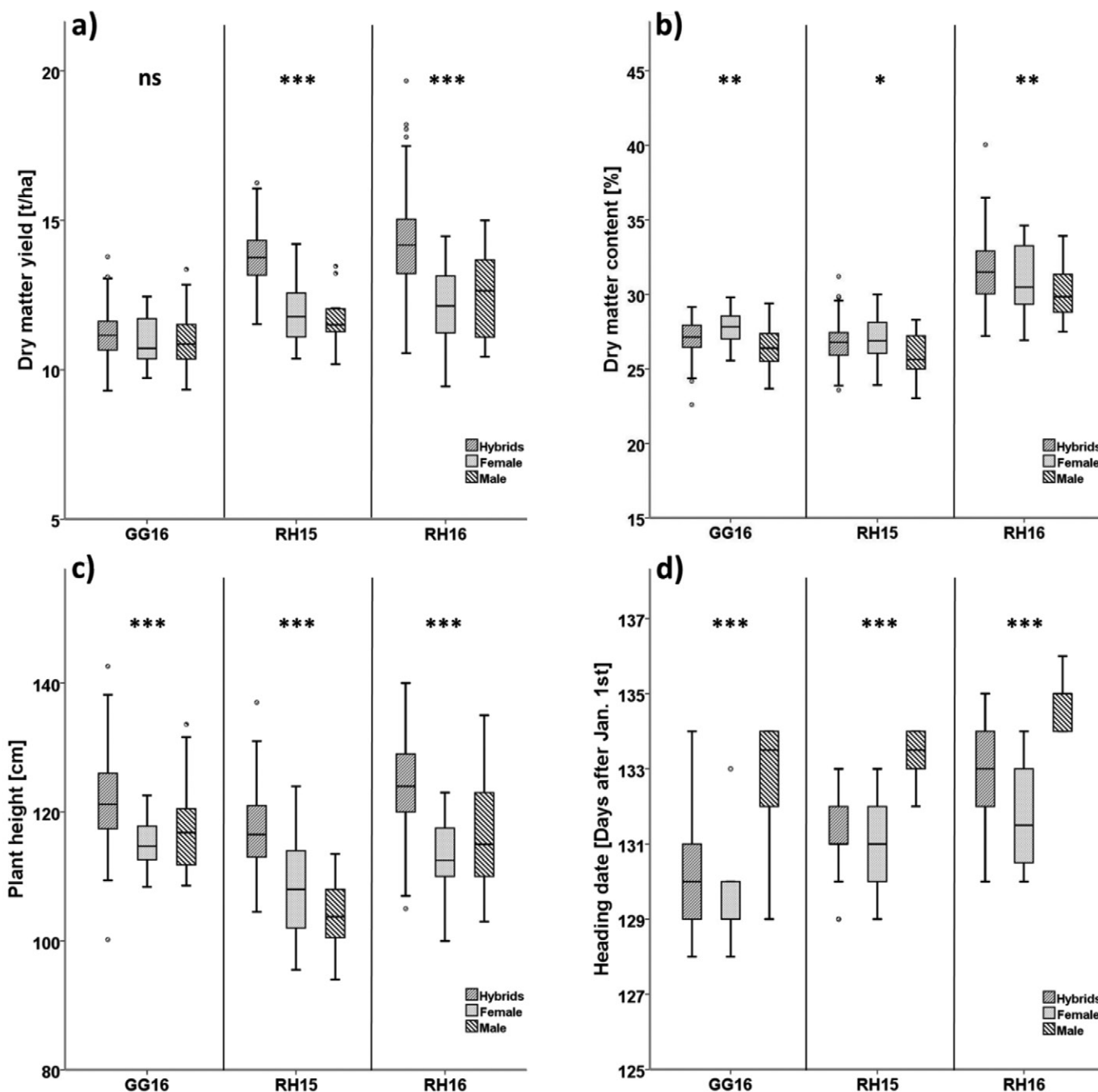


Fig. 1. Boxplots showing means, 25% percentiles and ranges of (a) dry matter yield (t/ha), (b) dry matter content (%), (c) plant height (cm), and (d) heading date (Days after January the first) for hybrids, females (maintainer lines) and males (restorer lines) separately for the three environments, Gross-Gerau (GG) 2016, Rauschholzhausen (RH) 2015, 2016. Significance levels between hybrids and the average of the parental lines: *** = 0.001, ** = 0.01, ns = not significant, ° = outliers.

($r = 0.495$, $P < 0.001$). The GY was moderately correlated with kernel size-associated traits (HLW: $r = 0.377$, $P < 0.001$; TKW: $r = 0.384$, $P < 0.001$) and EA counted at the locations for GY (EA_{GY} : $r = 0.566$, $P < 0.001$) as expected. However, GY correlated negatively with PH measured at locations for GY (PH_{GY} : $r = -0.438$, $P < 0.001$), whereas KE negatively correlated with all other traits except GY. Furthermore, Pearson's coefficients of correlation between the values of the same traits measured in the two DMV trials and four GY trials, respectively, showed contrasting

results. Coefficients of correlation between PH measurements were high ($r = 0.780$, $P < 0.001$), whereas HD values correlated only moderately ($r = 0.392$, $P < 0.001$), and EA values showed no correlation between the two trials. The analysis of results from different trials revealed that DMV correlated positively with GY ($r = 0.694$, $P < 0.001$), FMV ($r = 0.657$, $P < 0.001$), and also with PH values in the trial for DMV testing (PH_{DMV} : $r = 0.570$, $P < 0.001$).

When calculating the correlations between FMV and DMV, respectively, and GY for parents and hybrids

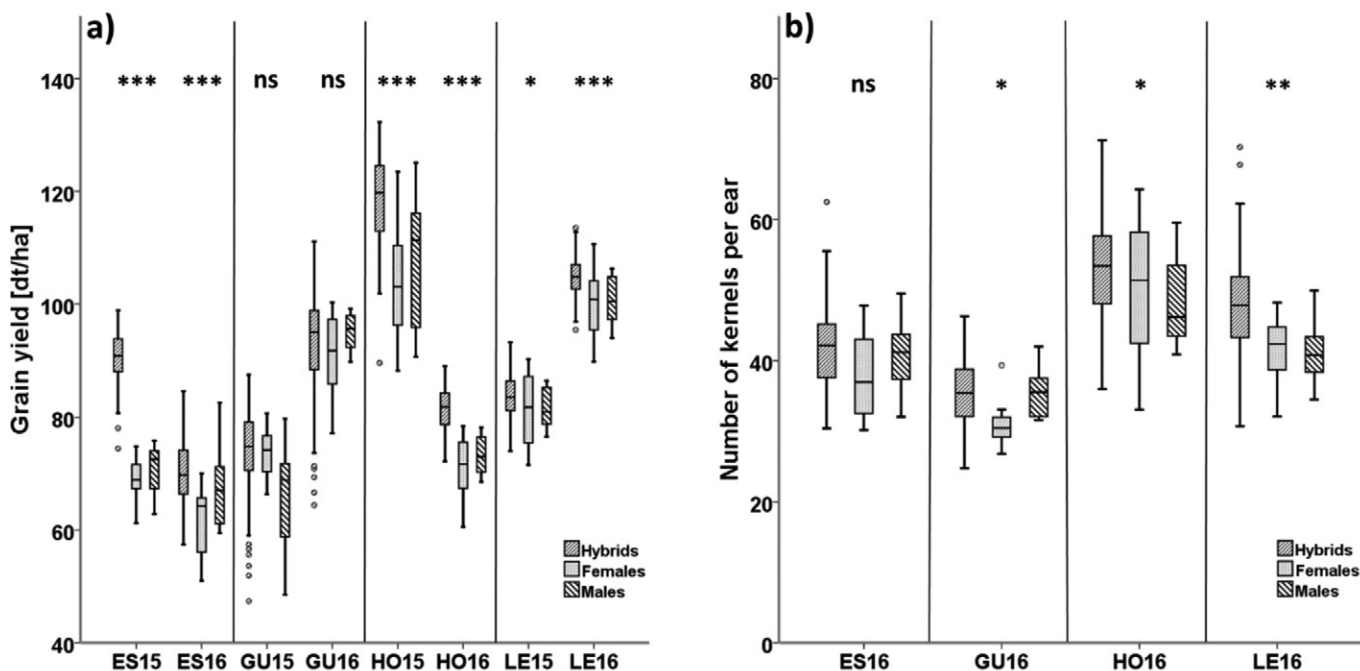


Fig. 2. Boxplots showing means, 25% percentiles and ranges of (a) grain yield (dt/ha) and (b) number of kernels per ear of hybrids, female (maintainer lines) and male (restorer lines) parents from eight environments for dry matter yield (Estrées-Saint-Denis [ES] 2015 and 2016, Gudow [GU] 2015 and 2016, Hovedissen [HO] 2015 and 2016, and Leutewitz [LE] 2015 and 2016) and four environments for kernels per ear (Estrées-Saint-Denis 2016, Gudow 2016, Hovedissen 2016, and Leutewitz 2016), respectively. Differences between hybrids and the average of the parental lines: *** = significant at 0.001 level, ** = significant at the 0.01 level, * = significant at the 0.05 level, ns = not significant; ° = outlier.

separately (Fig. 3), correlation coefficients were low in both parents (FMY vs. GY: $r = 0.445$, $P = 0.049$; DMY vs. GY: $r = 0.279$, $P = 0.234$) and hybrids (FMY vs. GY: $r = 0.287$, $P = 0.005$; DMY vs. GY: $r = 0.333$, $P = 0.001$). However, in hybrids, the correlation coefficients were positive and highly significant.

Combining Ability and Heritability

The GCA and SCA parameters, as well as H^2 values, were calculated for DMY and GY as characteristic genetic factors that are fundamental for hybrid breeding. Genotypic variances, genotype $\times$ environment interactions, and H^2 values for DMY and GY, calculated on the basis of all entries as well as for parents, males, females, and hybrids separately, are presented in Table 4. In hybrids, DMY values were significantly affected by genotypic variance effect. Overall, DMY and GY values in hybrids were significantly different from those of the parental lines (H vs. P). The GCA_M and SCA effects on DMY were significant, whereas GCA_F effects were not. However, neither GCA nor SCA variance significantly affected GY, which might be due to the experimental setup of the field trials.

The H^2 values for DMY were high in all groups, whereas H^2 values for GY showed extremely low values, which could be explained by the very high error term. Males exhibited a higher H^2 value for DMY ($H^2 = 0.807$) than females ($H^2 = 0.740$). Over all entries, the heritability parameter was 0.842 for DMY and 0.537 for GY, respectively.

Pearson's coefficients of correlation between P_H for DMY and GY, and parental performance as well as combining ability values (SCA , GCA_M , GCA_F , GCA_{Sum}) together with heterosis data are presented in Supplementary Table S5. In all trials, P_H showed the highest correlation with SCA, whereas correlations with GCA_{Sum} and P_{av} were only of minor importance (visualized in Fig. 4 and 5). P_H was also closely correlated with MPH and BPH (DMY: $r = 0.762$ [MPH] and $r = 0.606$ [BPH]; GY: $r = 0.882$ [MPH] and $r = 0.777$ [BPH]), whereas no correlation between P_{av} and heterosis of GY and a negative correlation of P_{av} and heterosis of DMY were observed (visualized in Fig. 4 and 5).

Genetic Distance and its Correlation with Mid-Parent Heterosis

Calculations of the population structure (Fig. 6) revealed a clear segregation of males (group 1) and females (group 2) into two clusters, where the first two principal components explained 48.59% of the genotypic variation. The average Rogers distance between male and female pools was 0.38 (range: 0.22–0.46). However, the average distances within the male (0.30) and female (0.27) pools were only slightly smaller, ranging from 0.17 to 0.39 in males and from 0.14 to 0.38 in females. Correlations between the genetic distance and MPH of the phenotypic traits (expressed in percent of mid-parent performance) revealed significant but negligibly low correlations for DMC ($r =$

Table 2. Mid-parent heterosis (MPH) and best-parent heterosis (BPH) for dry matter yield (DMY), grain yield (GY), dry matter content (DMC), fresh matter yield (FMY), plant height (PH), ears per m² (EA), days to heading (HD) in days after the first of January (DA1J), hectoliter weight (HLW), thousand kernel weight (TKW), and number of kernels per ear (KE), N_E = number of environments, SD = standard deviation).

Trait	Unit	N _E	Mid-parent heterosis					Best-parent heterosis					Significance
			Mean	Mean [%]	SD	Min.	Max.	Mean	Mean [%]	SD	Min.	Max.	
DMY	t ha ⁻¹	3	1.36	11.69	0.52	-0.23	2.51	1.07	9.07	0.60	-0.45	2.15	***
DMC	%	3	0.47	1.69	0.71	-1.06	2.87	-0.19	-0.60	0.86	-2.18	1.81	*
FMY	t ha ⁻¹	3	4.04	9.72	1.74	-0.83	7.32	2.53	6.03	2.19	-2.26	7.26	***
PH	cm	3	8.56	7.63	2.55	3.13	13.46	5.77	5.08	3.14	-1.97	12.30	***
EA	m ⁻²	3	60.88	14.53	35.70	-16.94	157.15	35.79	8.31	40.42	-75.69	144.91	***
HD	DA1J	3	-0.63	-0.47	0.58	-2.33	0.50	-2.09	-1.56	0.76	-3.67	-0.33	**
GY	dt ha ⁻¹	8	7.51	9.19	2.58	0.95	12.42	6.33	7.65	2.71	0.29	11.81	***
HLW	kg	8	0.25	0.42	1.62	-3.24	4.49	-0.63	-0.95	1.69	-4.01	3.60	ns†
TKW	g	7	0.45	1.15	2.13	-4.54	5.47	-1.24	-2.65	2.40	-7.03	4.67	ns
PH	cm	5	6.71	5.92	3.11	-1.00	13.30	4.30	3.74	3.28	-3.40	10.80	***
EA	m ⁻²	4	-20.73	-3.25	58.08	-133.21	111.83	-56.03	-9.03	65.99	-211.63	91.65	*
HD	DA1J	5	0.01	0.01	1.27	-3.30	3.90	-0.96	-0.71	1.37	-4.00	3.80	ns
KE	No.	4	3.84	9.65	4.13	-5.47	12.17	2.07	5.07	4.05	-7.15	11.74	***

* Significance level at 0.05; ** Significance level at 0.01; *** Significance level at 0.001.

† ns = not significant.

Table 3. Pearson's correlations between the traits of the respective trial and between the traits of the two trials. (Dry matter yield [DMY], grain yield [GY], dry matter content [DMC], fresh matter yield [FMY], plant height [PH], ears per m² [EA], days to heading [HD], hectoliter weight [HLW], thousand kernel weight [TW], and number of kernels per ear [KE], *r* = coefficient of correlation).

Trait	GY	DMC	FMY	HLW	TKW	KE	PH _{DMY}	PH _{GY}	EA _{DMY}	EA _{GY}	HD _{DMY}	HD _{GY}
DMY	0.694***	0.495***	0.722***	0.226*	0.227*	0.160	0.234***	0.495***	0.178**	-0.283**	0.405***	-0.076
GY		0.142	0.657***	0.377***	0.384***	0.025	0.570**	-0.438***	0.457***	0.566***	-0.191*	-0.063
DMC			-0.239***	0.012	0.268**	0.070	0.304***	0.126	0.045	-0.150	0.495***	-0.194*
FMY				0.216*	0.108	0.141	0.002	0.454***	0.161**	-0.227*	0.068	0.002
HLW					0.838***	-0.222***	0.317**	-0.364***	-0.026	0.047	-0.215*	0.356***
TKW						-0.463***	0.361***	-0.094*	-0.208*	-0.079	-0.401***	0.325***
KE							0.095	-0.353***	0.186*	-0.541***	0.128	-0.410***
PH _{DMY}								0.780***	0.277***	-0.177	0.069	-0.121
PH _{GY}									0.288***	-0.187***	-0.098	-0.460***
EA _{DMY}										0.005	-0.025	-0.082
EA _{GY}											-0.112	0.085
HD _{DMY}												0.392***

* Significance level at 0.05; ** Significance level at 0.01; *** Significance level at 0.001.

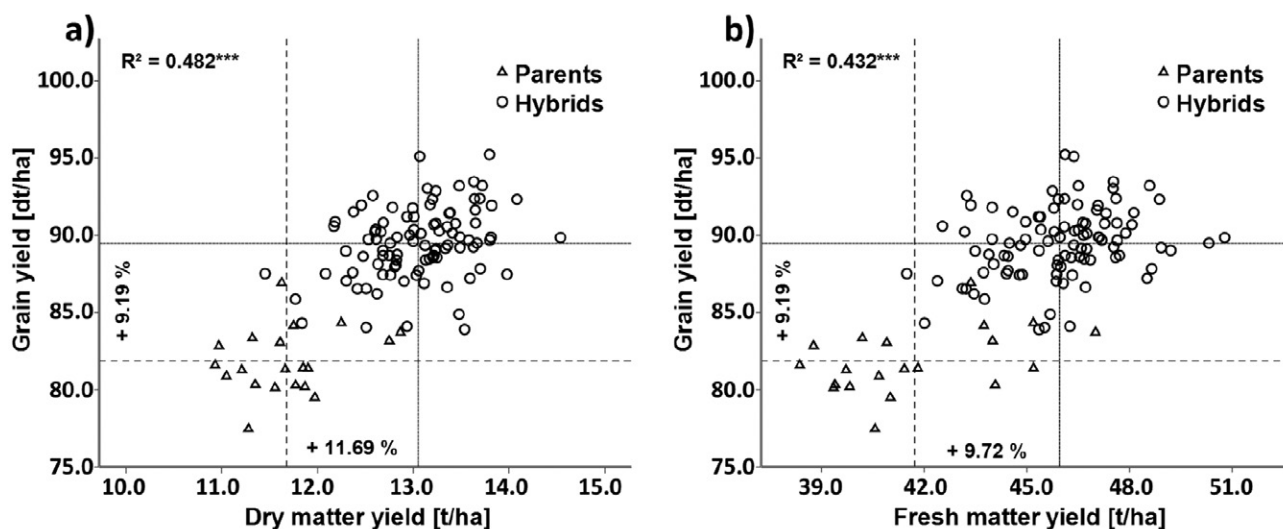


Fig. 3. Correlation between grain yield (dt/ha) and biomass yield: (a) dry matter yield (t/ha) and (b) fresh matter yield (t/ha), respectively. The dashed lines indicate the averages of the parents and the solid lines the averages of the hybrids. Significance level: * = 0.001.**

Table 4. Genotypic variances (mean squares) and their environmental interactions for dry matter yield (DMY) and grain yield (GY), and broad-sense heritabilities for DMY and GY for all entries as well as for parents, males, females, and hybrids separately.

Entries	DMY			GY		
	df	Variance (σ^2)	Significance	df	Variance (σ^2)	Significance
Entries	115	3.606	***	115	7.163	***
Entries $\times$ E	230	1.578	ns†	–‡	–	–
Environment (E)	2	477.521	***	7	244.783	***
Error	348	1.103		804	49.238	
Heritability (H^2)		0.842			0.537	
Parents (P)						
P	19	1.637	ns	19	35.844	ns
P $\times$ E	38	0.860	ns	–	–	–
M vs. F	1	0.361	ns	1	0.442	ns
E	2	18.450	***	7	239.784	***
Error	60	1.33		132	47.245	
H^2		0.763			0.000§	
Males (M)						
M	7	2.125	ns	7	0	ns
M $\times$ E	14	0.769	ns	–	–	–
E	2	9.862	**	7	257.812	***
Error	24	1.506		48	50.763	
H^2		0.807			0.000§	
Females (F)						
F	11	1.443	ns	11	0.557	ns
F $\times$ E	22	0.913	ns	–	–	–
E	2	9.502	**	7	231.131	***
Error	36	1.210		76	41.398	
H^2		0.740			0.097§	
Hybrids (H)						
H	95	2.136	**	95	0.131	ns
H $\times$ E	190	1.426	ns	–	–	–
E	2	497.190	***	7	253.452	***
H vs. P	1	186.748	***	1	28.295	***
GCA _M	7	0.659	***	7	0.335	ns
GCA _F	11	0.197	ns	11	0.200	ns
GCA _{Sum}	95	0.765	***	95	0.353	ns
SCA	95	2.644	***	95	0.000	ns
GCA _M $\times$ E	14	2.182	***	–	–	–
GCA _F $\times$ E	22	1.102	***	–	–	–
GCA _{Sum} $\times$ E	190	0.288	**	–	–	–
SCA $\times$ E	190	1.039	ns	–	–	–
Error	288	1.346		664	41.585	
H^2		0.761			0.025§	

** Significance level at 0.01.

*** Significance level at 0.001.

† ns = not significant.

‡ – = not calculable due to missing replications per location.

§ Extremely low heritability values due to the high error variance caused by the unfavorable experimental setup.

0.202, $P = 0.048$), DMY ($r = 0.307$, $P = 0.002$), and PH ($r = 0.378$, $P < 0.001$). Figure 7 shows the scatterplots of the correlations between MPH of DMY and GY and genetic distance of the parental lines.

DISCUSSION

Hybrid Performance and Heterosis of Biomass and Grain Yield

The results of the present study highlight heterotic yield performance in barley. To our knowledge, this is the first study that investigated biomass DMY of barley hybrids vs. their parental lines in replicated multi-location field plot experiments. Our experiments demonstrated that systematic exploitation of heterotic effects in hybrid varieties can enhance barley whole plant biomass production and ensure higher DMY. The heterotic effects for grain yield found in our study (MPH: 7.5 dt ha⁻¹; BPH: 6.3 dt ha⁻¹) were comparable to those described in previous studies of barley (Mühleisen et al., 2013a; Longin et al., 2012). Furthermore, our results obtained in winter barley are also in accordance with the results of Corbellini et al. (2002) obtained in bread wheat, and those of Oettler et al. (2005) and Fischer et al. (2010) obtained in winter triticale. In the present study, we have determined HLW, TKW, and KE values as important yield parameters. Interestingly, BPH was positive neither for HLW (–0.95%) nor for TKW (–2.65%), and for both traits, MPH was only slightly positive, which is similar to previously reported data on HLW in wheat (Corbellini et al., 2002). In contrast, Zhang et al. (2015) and Oettler et al. (2005) demonstrated positive MPH for TKW in barley and triticale, respectively. However, our study revealed positive BPH of 5% for KE value, which seems to be the major spike trait that determines the higher GY in hybrids.

Regarding hybrid growth parameters, significantly higher PH values were obtained in all locations with MPH values of 5.9 and 7.6% for GY and DMY trials, respectively. These results are also comparable to previously reported heterotic values for wheat (Corbellini et al., 2002; Longin et al., 2013), hybrid triticale (Oettler et al., 2005; Losert et al., 2016), and barley (Longin et al., 2012).

With regard to DMY, Zhang et al. (2015) found low MPH and negative BPH of dry weight per plant values in barley. Those findings are contrary to the results of the present study, where DMY of hybrids was on average 1.1 t ha⁻¹ (9.1%) higher than that of the best parent (range: –0.45–2.15 t ha⁻¹). Thus, the magnitudes of heterosis for DMY and GY were similar. Furthermore, comparable results for heterosis of DMY in winter triticale were found by Losert et al. (2016), who also underscored the importance of PH for biomass yield. Comparing all reported data concerning heterosis in autogamous cereals with our present results, it can be concluded that the higher DMY of hybrids seems to be rather due to enhanced whole plant vigor. However, autogamous cereals such as barley and wheat, are naturally less heterotic than outcrossing cereals, such as rye (Geiger and Miedaner, 1999) or maize (Melchinger et al., 1986). Fixed heterosis due to epistatic interactions between homologous genes in allopolyploid species

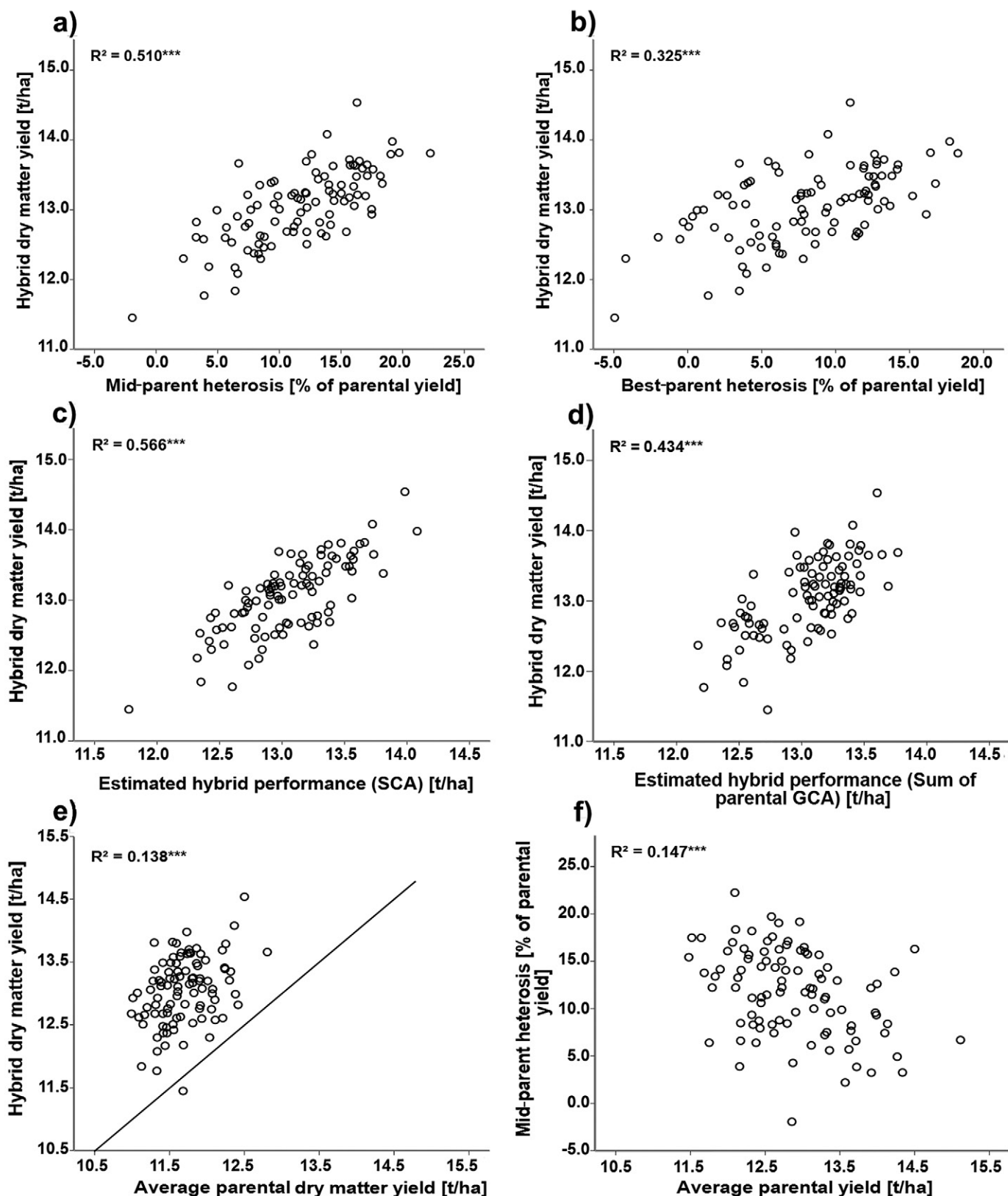


Fig. 4. Scatter plots showing the correlation between (a) mid-parent heterosis and (b) best-parent heterosis (both in percent of the parental dry matter yield), respectively, and hybrid dry matter yield, between (c) hybrid performance estimated on the basis of specific combining ability (SCA), (d) hybrid performance estimated by the sum of parental general combining abilities (GCA), and (e) average parental dry matter yield, respectively, and average hybrid dry matter yield. Scatter plot (f) shows the correlation between the average parental yield and the mid-parent heterosis (in percent of the parental yield). (R^2 = coefficient of determination, significance level: *** = 0.001).

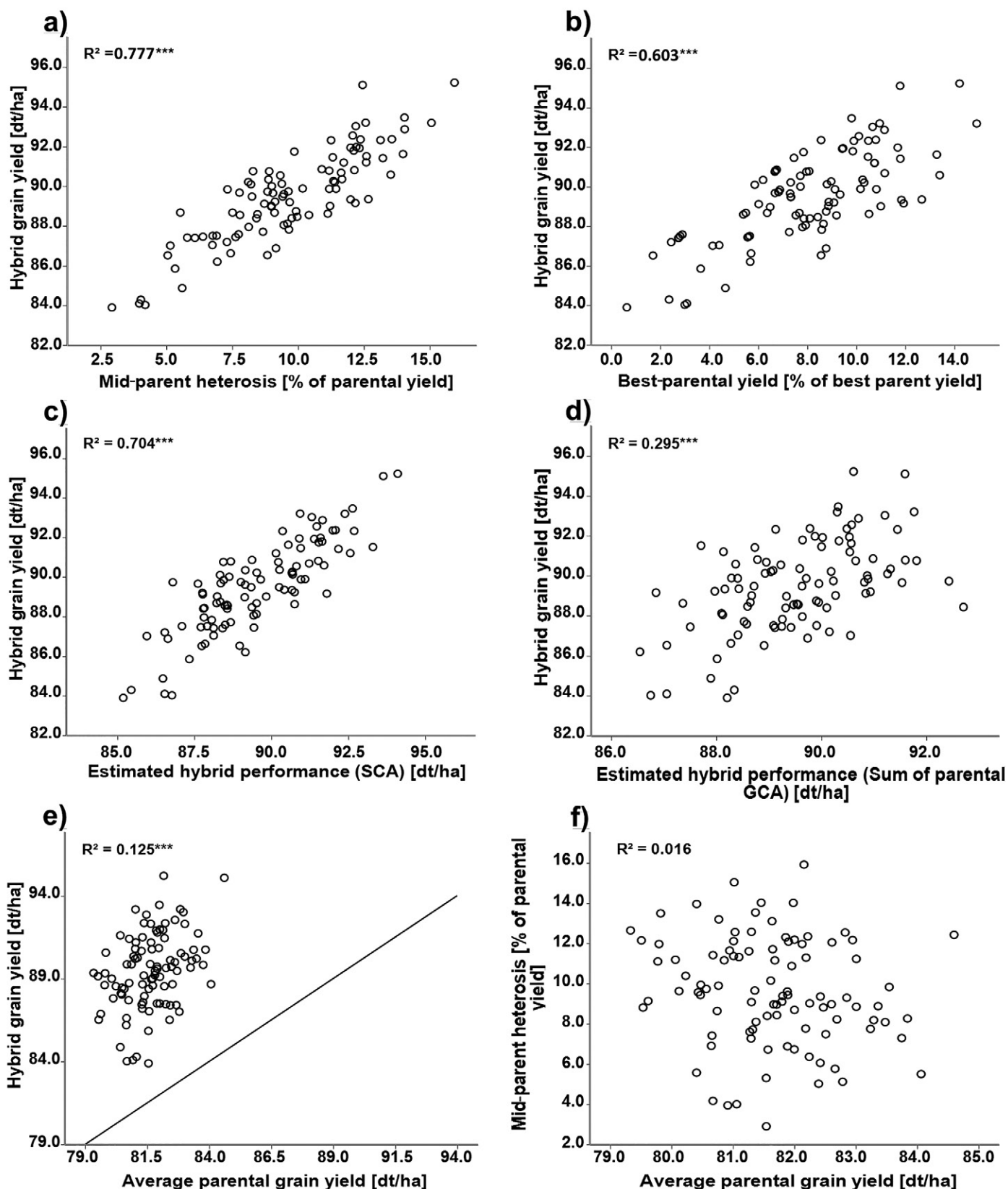


Fig. 5. Scatterplots of correlations between (a) mid-parent heterosis and (b) best-parent heterosis (both in percent of the parental grain yield), respectively, and hybrid grain yield, between (c) hybrid performance estimated by specific combining ability (SCA), (d) hybrid performance estimated by the sum of parental general combining abilities (GCA), and (e) average parental grain yield, respectively, and hybrid grain yield. Scatterplot (f) shows the correlation between the average parental grain yield and the mid-parent heterosis (in percent of the parental yield). (R^2 = coefficient of determination; significance level: *** = 0.001).

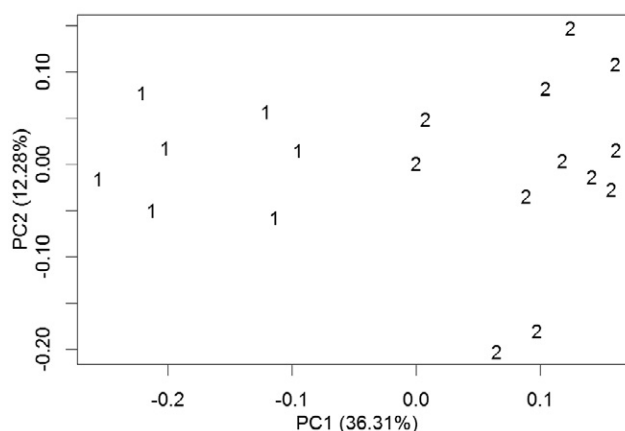


Fig. 6. Principal component analysis of the parental lines, 1 = males, 2 = females. (PC1 = first principal coordinate, PC2 = second principal coordinate).

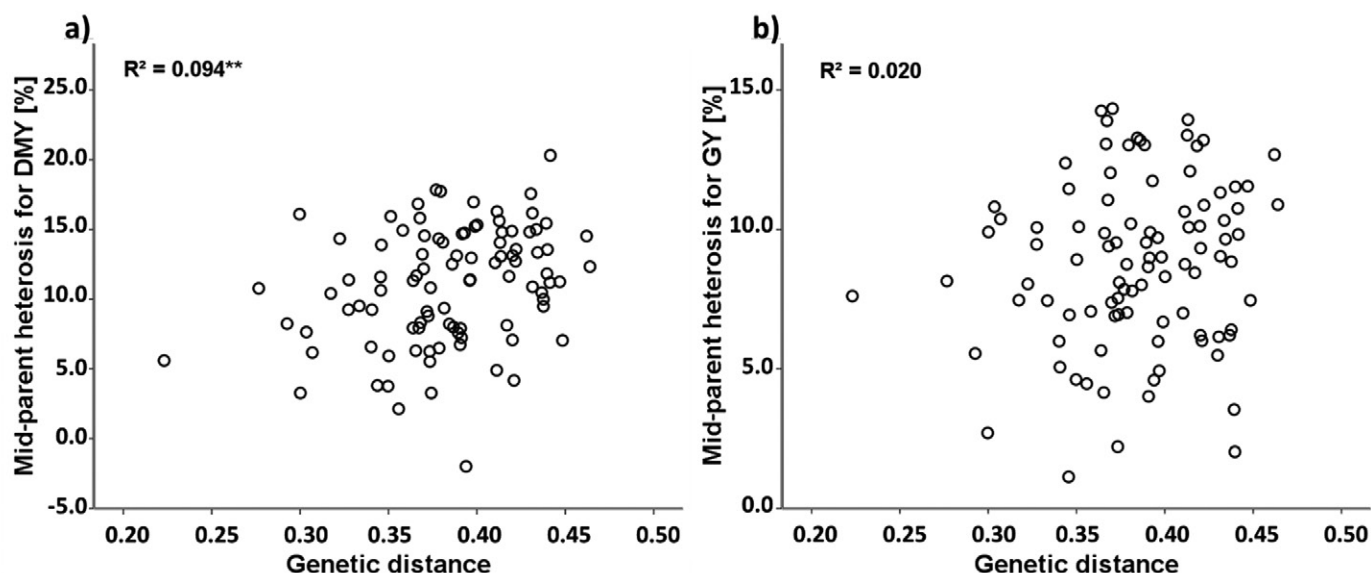


Fig. 7. Scatterplots showing the correlation between mid-parent heterosis in percent of the parental (a) dry matter yield and (b) grain yield, respectively, and the genetic distance measured by Rogers distance (Rogers 1972).

may partly explain weaker heterosis in wheat and triticale (see Mühleisen et al., 2013a; Oettler et al., 2005), as can the elimination of inbreeding depression during evolution of inbreeding cereal species. However, comparable levels of heterosis in our material indicate that the lower heterosis compared to outcrossing cereals may be more due to the low genetic divergence between male and female parents, since barley is a true diploid species where fixed heterosis should not be existent (cf. Longin et al., 2012; Mühleisen et al., 2013a). Because genetic distance of homozygous parental lines is proportional to the differences in gene frequency (Boeven et al., 2016), and a strong association between marker-based genetic distance and heterosis of GY has been observed in maize (Melchinger, 1993, 1999; Reif et al., 2003), we have calculated the Rogers distance to test for the correlation between genetic distance and heterosis of different phenotypic traits. Although male and female pools could be distinguished using principal component analysis (Fig. 6), we failed to observe distinct correlations

between Rogers distance and MPH. However, MPH for dry matter yield exhibited a low positive correlation with genetic distance, suggesting that a higher correlation might arise if the distance between the parental lines is increased. Data concerning the correlation between genetic distance and hybrid performance or heterosis for GY in autogamous cereals are not concordant (no correlation: Corbellini et al., 2002; Dreisigacker et al., 2005; Solomon et al., 2007; significant but low correlation: Corbellini et al., 2002; El-Maghraby et al., 2005; significant correlation but only for a limited number of traits excluding GY: Corbellini et al., 2002; Krystkowiak et al., 2009; Solomon et al., 2007). One reason for the lack of correlations may lie in a relatively narrow basis of the respective parental germplasm materials (see Boeven et al., 2016). In our study, we found that the average genetic distance between parental pools was only slightly higher than average genetic distances within two pools. Therefore, the existing distance between male and female pools is likely not yet sufficient to generate a higher

heterotic effect. The development of genetically diverse heterotic pools as basic material for hybrid development has been more advanced in maize, with its long history of hybrid breeding (Shull, 1908), than in autogamous cereals, where systematic hybrid breeding is still a comparatively new approach. In particular, the two-pool concept might be an advantageous system to improve hybrid breeding in autogamous cereals (Longin et al., 2012), facilitating selection of superior hybrids (Gowda et al., 2012; Reif et al., 2007). For instance, Fischer et al. (2010) were able to increase MPH by 24% by an optimum assignment of lines into heterotic groups in triticale. Conventional line breeding methods applied in barley up to now, such as continuous intercrossing of parents from all origins and breeders, leading to an amalgamation of barley germplasm, have worked strongly against the concept of using genetically (very) distant heterotic pools. However, inexpensive marker technologies nowadays allow for rapid analyses of genetic diversity, which can facilitate the development of new distinct pools.

In breeding for polygenic quantitative traits like yield, the knowledge about yield components and their correlations with respective target traits is of major importance. We have observed the highest correlations between DMC, FMY, and HD with DMY. Remarkably, however, neither PH nor EA values showed a relevant correlation with DMY. Similarly, Haffke et al. (2014) found no correlation between DMY and EA in hybrid rye, but a relatively strong correlation between PH and DMY. Furthermore, in our study, GY values closely correlated with DMY and FMY values, indicating the possibility to breed for dual-purpose hybrid varieties.

Most remarkably, in the present study, a higher DMY combined with a higher GY was found in winter barley hybrids, enabling the development of a dual-purpose type for both grain production and whole plant silage, for example, for bioenergy production. The higher GY apparently was mainly caused by a higher KE of hybrids compared to the KE of parental lines. The suitability of barley as a bioenergy source could be simultaneously enhanced by breeding hybrid varieties for grain production. Furthermore, hybrids could improve the competitiveness of barley in comparison with other bioenergy crops, such as rye or triticale, when it is grown in combination with a consecutive second biomass crop, such as sudangrass (Walter and Zürcher, 2013) or sorghum (Windpassinger et al., 2015).

Combining Ability and Heritability for Biomass and Grain Yield

For the selection of appropriate parental lines, different predictors are available in hybrid breeding. Our present study was focused on DMY and GY, since these two traits are of main interest for cultivation and breeding. Agro-economic traits, such as PH or EA, are yield-determining factors and were therefore evaluated by estimating their

effects on final yield performance on the basis of correlations. We revealed relatively high values for heritability of DMY. In contrast, missing replications in locations of the GY trials caused very high error variances and, in combination with additional low genotypic variance within the individual groups (males, females, parents, and hybrids), led to extremely low heritability estimates. However, calculations of GY over all entries indicated medium heritability, which was comparable to values reported in literature (cf. Haffke et al., 2014; Longin et al., 2013).

We found that GCA_{Sum} and SCA parameters significantly affected DMY but not GY, which might be due to the experimental setup of the GY field trials. Furthermore, GCA_M was significant for DMY, whereas GCA_F was not, suggesting that in the case of DMY, male additive effects played a major role in P_H . Nevertheless, results of Corbellini et al. (2002) obtained in bread wheat and those of Zhang et al. (2015) obtained in barley indicate that mainly additive genetic effects determine GY, whereas both additive and non-additive genetic components affect DMY, as shown in our experiments and in the study of Madić et al. (2014). Additionally, Singh et al. (2012) found significant GCA and SCA variances for traits such as PH and EA, both affecting DMY. In contrast, Mühleisen et al. (2013a) found only significant SCA effects on GY.

Replicating the approach described for different traits by Corbellini et al. (2002), Madić et al. (2014), and Zhang et al. (2015), we analyzed the GCA_{Sum}/SCA variance ratio ($\sigma^2_{GCA}/\sigma^2_{SCA}$) for DMY (0.289) and concluded that SCA had a predominant influence on that trait. Prevalence of non-additive genetic effects on barley DMY was further supported by the strong correlations between SCA and P_H and between SCA and heterosis. A weaker correlation was found between GCA_{Sum} and heterosis and an even lower, negligible correlation was detected between P_{av} and P_H . Hence, non-additive genetic effects are a major reason of heterosis and P_H of DMY in barley. Assuming absence or minor importance of epistasis, the ratio of dominance (σ^2_{SCA}) vs. additive (σ^2_{GCA}) variance decreases with the increase in genetic divergence of parental populations (Gowda et al., 2012; Longin et al., 2012; Reif et al., 2007). Vice versa, a low $\sigma^2_{GCA}/\sigma^2_{SCA}$ ratio may be caused by limited genetic diversity between the parental groups, as was concluded on the basis of experiments in wheat by Longin et al. (2013). Therefore, the creation of divergent heterotic groups may improve the prediction of hybrid performance based on GCA effects (Longin et al., 2012; Reif et al., 2007). By combining these assumptions with findings of the present study, we conclude that the low genetic diversity in barley accounts for the prevalence of SCA effects on DMY. Due to their poor correlations with P_H values (for DMY and GY), P_{av} and GCA_{Sum} parameters are inaccurate predictors of heterosis and P_H , and breeders have to take SCA into account. As a result, a large number of hybrid combinations need to

be tested, implying high costs and low breeding efficiency. Hence, genetically divergent heterotic groups have to be built, or at least improved, as it was achieved in commercial hybrid breeding of maize (Duvick et al., 2004; Longin et al., 2012) and also suggested for *S. bicolor* (Windpassinger et al., 2016). This would additionally simplify handling of different flowering characteristics of male and female lines, including taller plants and later flowering of the male pool compared to the female pool (Longin et al., 2012). However, in the present study, restorer lines (males) were already flowering later in DMY trials (Fig. 1, Supplementary Table S1), implicating that the selection for male or female parents may have already led to certain pooling as indicated by principal component analysis (Fig. 6). Additionally, the observed higher magnitude of GCA_M variance for DMY compared to GCA_F variance may indicate a first step in widening the genetic diversity within the restorer pool.

High correlations between per se performance of parental lines and their respective GCA facilitate the development of genetic pools and make hybrid breeding more efficient. In this case, parental lines could be selected for both line and hybrid breeding approaches. We revealed (Supplementary Table S5) that coefficients of correlation between P_M and GCA_M for GY and DMY comprised 0.708 ($P < 0.001$) and 0.638 ($P < 0.001$), respectively. Corresponding coefficients of correlations between P_F and GCA_F for GY and DMY were 0.634 ($P < 0.001$) and 0.441 ($P < 0.001$) for DMY, respectively. For comparison, Dreisigacker et al. (2005) found a significant correlation coefficient of 0.86 between parental performance and GCA in spring bread wheat. Although coefficients of correlation between P_M and P_H are somewhat higher than coefficients of correlation between P_F and P_H , and despite these correlations are generally higher for DMY than for GY, they are not sufficiently high to select better hybrids only on the basis of parental performance. The observed predominance of SCA effects on hybrid yield further complicates predictions based on per se performance. Consequently, hybrid barley breeding must be run in separate, major programs instead of being conducted as a spin-off from line breeding, as described for hybrid wheat by Gowda et al. (2012). For this purpose and to further enhance heterosis, relative contribution of GCA, and, ultimately, hybrid performance, barley breeding for GY and DMY has to be based on genetically divergent parental pools. These pools can be created by crosses between adapted and non-adapted lines (Longin et al., 2012), or, in the long term, by hybridization with primitive or wild species, as described by Pickering and Johnston (2005).

Conflict of Interest Disclosure

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was part of the collaborative project “HybGPS” carried out in cooperation with German Seed Alliance GmbH funded by the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) and coordinated by the Federal Agency of Renewable Resources (FNR). Thanks are due to the companies Ackermann Saat-zucht GmbH & Co. KG, Deutsche Saatveredelung AG (DSV), Nordsaat Saat-zucht GmbH, Saaten Union Recherche s.a.s. (SU), W. von Borries-Eckendorf GmbH & Co. KG (WvB) for their support and conducting field trials. We are particularly grateful to Dr. Jutta Ahlemeyer, Dr. Laszlo Cselenyi (WvB), Dr. Eberhard Laubach (Nordsaat), Dr. Jens Vaupel and Astrid Hoffmann (DSV), and Dr. Charles Snijders (SU) for supporting this study, and for valuable discussions. We also thank Annette Plank, Birgit Keiner, Lisa Unterberg, Liane Renno, Isabelle Deppé, Anna Dietermann, Karlheinz Balzer, Mario Tolksdorf, Kurt-Werner Franzmann, and the whole teams of the field stations in Gross-Gerau and Rauischholzhausen for their valuable technical assistance.

References

- Boeven, P.H.G., C.F.H. Longin, and T. Würschum. 2016. A unified framework for hybrid breeding and the establishment of heterotic groups in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 129:1231–1245. doi:10.1007/s00122-016-2699-x
- Comadran, J., B. Kilian, J. Russell, L. Ramsay, N. Stein, M. Ganal et al. 2012. Natural variation in a homolog of *Antirrhinum CENTRORADIALIS* contributed to spring growth habit and environmental adaptation in cultivated barley. *Nature Genetics* 44(12):1388–1392. doi: 10.1038/ng.2447
- Corbellini, M., M. Perenzin, M. Accerbi, P. Vaccino, and B. Borghi. 2002. Genetic diversity in bread wheat, as revealed by coefficient of parentage and molecular markers, and its relationship to hybrid performance. *Euphytica* 123:273–285. doi:10.1023/A:1014946018765
- Dreisigacker, S., A.E. Melchinger, P. Zhang, K. Ammar, C. Flachenecker, D. Hoisington, and M.L. Warburton. 2005. Hybrid performance and heterosis in spring bread wheat, and their relations to SSR-based genetic distances and coefficients of parentage. *Euphytica* 144:51–59. doi:10.1007/s10681-005-4053-2
- Duvick, D.N., J.S.C. Smith, and M. Cooper. 2004. Long-term selection in a commercial hybrid maize breeding program. In: J. Janick, editor, *Plant breeding reviews, long term selection: Crops, animals, and bacteria. Part 2. Vol. 24.* John Wiley & Sons, New York. p. 109–151.
- El-Maghraby, M.A., M.E. Moussa, N.S. Hana, and H.A. Agrama. 2005. Combining ability under drought stress relative to SSR diversity in common wheat. *Euphytica* 141:301–308. doi:10.1007/s10681-005-8066-7
- Fischer, S., H.P. Maurer, T. Würschum, J. Möhring, H.-P. Piepho, C.C. Schön et al. 2010. Development of heterotic groups in triticale. *Crop Sci.* 50:584–590. doi:10.2135/cropsci2009.04.0225
- Geiger, H.H., and T. Miedaner. 1999. Hybrid rye and heterosis. In: J.G. Coors and S. Pandey, editors, *Genetics and exploitation of heterosis in crops.* CSSA, Madison, WI. p. 439–450.
- Gowda, M., C.F.H. Longin, V. Lein, and J.C. Reif. 2012. Relevance of specific versus general combining ability in winter wheat. *Crop Sci.* 52:2494–2500. doi:10.2135/cropsci2012.04.0245

- Haffke, S., B. Kusterer, F.J. Fromme, S. Roux, B. Hackauf, and T. Miedaner. 2014. Analysis of covariation of grain yield and dry matter yield for breeding dual use hybrid rye. *BioEnergy Res.* 7:424–429. doi:10.1007/s12155-013-9383-7
- Herrmann, A. 2013. Biogas production from maize: Current state, challenges and prospects. 2. Agronomic and environmental aspects. *BioEnergy Res.* 6:372–387. doi:10.1007/s12155-012-9227-x
- Krystkowiak, K., T. Adamski, M. Surma, and Z. Kaczmarek. 2009. Relationship between phenotypic and genetic diversity of parental genotypes and the specific combining ability and heterosis effects in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 165:419–434. doi:10.1007/s10681-008-9761-y
- Kuznetsova, A., P.B. Brockhoff, and R.H.B. Christensen. 2016. lmerTest: Tests in linear mixed effects models. R package version 2.0–30. The R Foundation. <http://CRAN.R-project.org/package=lmerTest> (accessed 15 Sept. 2016).
- Lenth, R.V. 2016. Least-Squares Means: The R package lsmeans. *J. Stat. Softw.* 69:1–33. doi:10.18637/jss.v069.i01
- Longin, C.F.H., M. Gowda, J. Mühleisen, E. Ebmeyer, E. Kazman, R. Schachschneider et al. 2013. Hybrid wheat: Quantitative genetic parameters and consequences for the design of breeding programs. *Theor. Appl. Genet.* 126:2791–2801. doi:10.1007/s00122-013-2172-z
- Longin, C.F.H., J. Mühleisen, H.P. Maurer, H. Zhang, M. Gowda, and J.C. Reif. 2012. Hybrid breeding in autogamous cereals. *Theor. Appl. Genet.* 125(6):1087–1096. doi:10.1007/s00122-012-1967-7
- Losert, D., H.P. Maurer, S. Weissmann, and T. Würschum. 2016. Hybrid breeding for biomass yield in winter triticale: I. Hybrid performance, trait correlations and heterosis. *Plant Breed.* 135:560–566. doi:10.1111/pbr.12402
- Madić, M.R., D.S. Djurović, D.S. Knezević, A.S. Paunović, and S.T. Tanasković. 2014. Combining abilities for spike traits in a diallel cross of barley. *J. of Central European Agric.* 15(1):108–116. doi:10.5513/JCEA01/15.1.1419
- Melchinger, A.E. 1993. Use of RFLP markers for analysis of genetic relationships among breeding materials and prediction of hybrid performance. In: D.R. Buxton, R. Shibles, R.A. Forsberg, B.L. Blad, K.H. Asay, G.M. Paulsen, and R.F. Wilson, editors, *International crop science. I. CSSA*, Madison, WI. p. 621–628.
- Melchinger, A.E. 1999. Genetic diversity and heterosis. In: J.G. Coors and S. Pandey, editors, *The genetics and exploitation of heterosis in crops*. CSSA, Madison, WI. p. 99–118.
- Melchinger, A.E., H.H. Geiger, and F.W. Schnell. 1986. Epistasis in maize (*Zea mays* L.): 2. Genetic effects in crosses among early flint and dent inbred lines determined by three methods. *Theor. Appl. Genet.* 72:231–239. doi:10.1007/BF00266997
- Mühleisen, J., H.P. Maurer, G. Stiewe, P. Bury, and J.C. Reif. 2013a. Hybrid breeding in barley. *Crop Sci.* 53(3):819–824. doi:10.2135/cropsci2012.07.0411
- Mühleisen, J., H.-P. Piepho, H.P. Maurer, C.F.H. Longin, and J.C. Reif. 2013b. Yield stability of hybrids versus lines in wheat, barley and triticale. *Theor. Appl. Genet.* 127(2):309–316. doi:10.1007/s00122-013-2219-1
- Oettler, G., S.H. Tams, H.F. Utz, E. Bauer, and A.E. Melchinger. 2005. Prospects for hybrid breeding in winter triticale: I. Heterosis and combining ability for agronomic traits in European elite germplasm. *Crop Sci.* 45:1476–1482. doi:10.2135/cropsci2004.0462
- Philipp, N., G. Liu, Y. Zhao, S. He, M. Spiller, G. Stiewe, K. Pillen, J.C. Reif, and Z. Li. 2016. Genomic prediction of barley hybrid performance. *Plant Genome* 9(2):1–8. doi:10.3835/plantgenome2016.02.0016
- Pickering, R., and P.A. Johnston. 2005. Recent progress in barley improvement using wild species of *Hordeum*. *Cytogenet. Genome Res.* 109:344–349. doi:10.1159/000082418
- Piepho, H.-P., and J. Möhring. 2007. Computing heritability and selection response from unbalanced plant breeding trials. *Genetics* 177:1881–1888. doi:10.1534/genetics.107.074229
- R Development Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reif, J.C., F.-M. Gumpert, S. Fischer, and A.E. Melchinger. 2007. Impact of interpopulation divergence in additive and dominance variance in hybrid populations. *Genetics* 176:1931–1934. doi:10.1534/genetics.107.074146
- Reif, J.C., A.E. Melchinger, X.C. Xia, M.L. Warburton, D.A. Hoisington, S.K. Vasal et al. 2003. Genetic distance based on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize populations. *Crop Sci.* 43:1275–1282. doi:10.2135/cropsci2003.1275
- Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in genetics* 7(7213):145–153.
- Shull, G.H. 1908. The composition of a field of maize. *J. Hered.* 1:296–301. doi:10.1093/jhered/os-4.1.296
- Singh, B., A. Sharma, N. Joshi, P. Mittal, and S. Singh. 2012. Combining ability analysis for grain yield and its components in malt barley (*Hordeum vulgare*). *Indian J. Agric. Sci.* 83(1):96–98.
- Solomon, K.F., M.T. Labuschagne, and C.D. Viljoen. 2007. Estimates of heterosis and association of genetic distance with heterosis in durum wheat under different moisture regimes. *J. Agric. Sci.* 145:239–248. doi:10.1017/S0021859606006551
- Walter, E., and A. Zürcher. 2013. Entwicklung und Optimierung von standortangepassten Anbausystemen für Energiepflanzen im Fruchtfolgeregime klimabegünstigter Lagen. Endbericht EVA II, FNR Förderkennzeichen 22013008, LTZ Augustenberg, Rheinstetten-Forchheim.
- Weiland, P. 2003. Production and energetic use of biogas from energy crops and wastes in Germany. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 109:263–274. doi:10.1385/ABAB:109:1-3:263
- Windpassinger, S., W. Friedt, I. Deppé, C. Werner, R. Snowdon, and B. Wittkop. 2016. Towards enhancement of early-stage chilling tolerance and root development in sorghum F1 hybrids. *J. Agron. Crop Sci.* 10.1111/jac.12171
- Windpassinger, S., W. Friedt, M. Frauen, R. Snowdon, and B. Wittkop. 2015. Designing adapted sorghum silage types with an enhanced energy density for biogas generation in temperate Europe. *Biomass Bioenergy* 81:496–504. doi:10.1016/j.biombioe.2015.08.005
- Zadoks, J.C., T.T. Chang, and C.F. Konzak. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14(6):415–421. doi:10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x
- Zhang, X., L. Lv, C. Lv, B. Guo, and R. Xu. 2015. Combining ability of different agronomic traits and yield components in hybrid barley. *PLoSOne* 10(6):e126828. doi:10.1371/journal.pone.0126828

4. Publikation II

‘New insights into genotypic thermo-dependency of cytoplasmic male sterility for hybrid barley breeding’

Timm Bernhard, Wolfgang Friedt, Rod J. Snowdon und Benjamin Wittkop

Publiziert in: Plant Breeding 136:8-17

New insights into genotypic thermodependency of cytoplasmic male sterility for hybrid barley breeding

TIMM BERNHARD, WOLFGANG FRIEDT, ROD J. SNOWDON and BENJAMIN WITTKOP*

Department of Plant Breeding, IFZ Research Centre for Biosystems, Land Use and Nutrition, Justus Liebig University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, Giessen 35392, Germany; *Corresponding author, E-mail: benjamin.wittkop@agr.uni-giessen.de

With 4 figures and 5 tables

Received July 22, 2016 / Accepted October 24, 2016

Communicated by K. Pillen

Abstract

The cytoplasmic male sterility (CMS) system *msm1* in barley is known to be thermosensitive, sometimes resulting in spontaneous fertility restoration in the absence of the corresponding restorer gene *Rfm1*. Here, we investigated genotypic differences concerning temperature sensitivity and the plant developmental stage at which elevated temperature induces spontaneous fertility restoration in three CMS mother lines. While one line stayed completely male sterile, a significantly higher fertility was observed in two lines after treatment from growth stage DC 41 until maturation. Microscopic analysis revealed that sterile anthers contained neither intact pollen, nor remains of aborted pollen grains, whereas pollen was visible in anthers of potentially fertile plants. We conclude that the barley CMS system affects anther and pollen development prior to meiosis. Elevated temperature during heading and flowering can lead to a spontaneous fertility restoration by reactivating pollen growth. Nevertheless, genotypic variation exists enabling the selection for stable CMS mother lines and the development of F₁ hybrids with high hybridity. As spontaneous fertility restoration due to environmental effects is difficult to phenotype, further investigations will focus on the development of molecular markers for marker-assisted selection.

Key words: barley — cytoplasmic male sterility — CMS instability — heat stress — *Hordeum vulgare* — pollen development

Barley is one of the most important grain crops worldwide, mainly used for malting and as an animal feed. The seed market is dominated by line varieties, which exploit the predominantly obligate self-pollinating nature of the species. On the other hand, interest is growing in breeding of F₁ hybrid varieties due to potential heterosis, currently estimated at around 10% yield gain compared with inbred parental lines (Longin et al. 2012, Mühleisen et al. 2013). Furthermore, hybrids show a higher yield stability under fluctuating environmental conditions (Longin et al. 2012, Mühleisen et al. 2014) and can simplify combining essential dominant genes for major traits in breeding (Longin et al. 2012, Mühleisen et al. 2013).

Across crop species, different methods are applied to ensure cross-pollination for hybrid seed production. These include mechanical detasseling of maternal plants in maize (Kempe and Gils 2011, Feng et al. 2014), application of chemical hybridization agents (CHA), for example in hybrid wheat production

(Kempe and Gils 2011, Longin et al. 2012), and genetically controlled male sterility. Genetic male sterility eliminates the need for chemical treatment, mechanical input and labour, making seed production considerably more cost efficient (Chen and Liu 2014). A distinction is made between genic male sterility (GMS), determined by nuclear genes, environment-sensitive genic male sterility (EGMS), which is reversible in response to specific environmental conditions (e.g. temperature, photoperiod), and cytoplasmic male sterility (CMS), which is caused by specific interactions between nuclear and mitochondrial genomes (Chase 2007). CMS results from mitochondrial DNA rearrangements causing the inability to shed functional pollen (Schnable and Wise 1998, Hanson and Bentolila 2004, Chase 2007, Chen and Liu 2014, Horn et al. 2014). In the 1950s, the first CMS system was introduced in maize (CMS-T), facilitating an improvement in hybrid seed production. Later, CMS systems were also established for other crops (Chen and Liu 2014). In 1976, a commercial hybrid rice variety was released in China, increasing grain yield by 20% compared with line varieties (Cheng et al. 2007).

However, the exact mechanisms underlying cytoplasmic male sterility and the corresponding fertility restoration by *restorer of fertility* (*Rf*) genes are still not fully understood.

In barley, nuclear male sterility was first described by Suneson (1940). However, due to the segregation of the responsible recessive nuclear alleles, it was difficult to maintain these alleles and hence the male sterility trait over multiple breeding cycles (Mühleisen et al. 2013). In the late 1970s, a CMS system was discovered by Ahokas (1979) in an Israeli strain of wild barley (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*). This CMS system consists of the maternally transmitted sterility gene *male sterile maternal 1* (*msm1*) in the mitochondrial genome, along with the corresponding dominant restorer gene *restorer of fertility in msml* (*Rfm1*), located on the short arm of chromosome 6H (Matsui et al. 2001, Ui et al. 2014). In 1994, Paul Bury (New Farm Crops Ltd., now Syngenta Seeds Ltd.) transferred the wild barley CMS system by backcrossing into European breeding lines (Longin et al. 2012). This was a prerequisite for the release of the first barley hybrid varieties into the European market in the early 2000s.

Nevertheless, by 2015 only eight of 48 six-rowed winter barley varieties registered in Germany were hybrids, and all of the two-rowed winter barley (36) and spring barley varieties (60) listed were lines (Bundessortenamt 2015). Adoption of hybrid breeding in barley is hampered mainly by instability of the CMS system, which leads to spontaneous fertility restoration in CMS barley (in the absence of *Rfm1*). The exact reasons for this instability are still unknown, but it has been observed that environmental conditions can affect pollen development (Ahokas 1979, Hockett et al. 1989, Abdel-Ghani et al. 2013). While some

Abbreviations: CC, cool control; CHA, chemical hybridization agent; CMS, cytoplasmic male sterility; DC, decimal code; DHT, days of treatment with elevated temperatures; EGMS, environment-sensitive genic male sterility; FT, fertility index; GMS, genic male sterility; HD, heading date; KS, kernels per spike; LSD, least significant difference; MANOVA, multivariate analysis of variance; PMC, pollen mother cell; *r*, coefficient of correlation; R, heat treatment until ripeness; SD, standard deviation; SP, spikelets per spike; S, short heat treatment.

authors reported a negative effect of high temperature on pollen development or pollen viability in barley (Sharma and Reinbergs 1976, Sakata et al. 2000), others mentioned an opposite effect in different crop species like sorghum (Downes and Marshall 1971) and pearl millet (Reddy and Reddi 1972). Bückmann et al. (2014, 2016) found a strong effect of low temperature on spontaneous fertility restoration in CMS maize. Besides temperature, the reaction to photoperiod can also influence spontaneous male fertility restoration in CMS barley (Hockett et al. 1989). Moreover, drought stress was recognized as an influential factor on fertility restoration in sorghum (Gupta et al. 2010).

More recently, Abdel-Ghani et al. (2013) performed a study on the effect of high temperature on CMS stability in barley. BC₁F₁ progeny, derived from crosses between 23 European varieties with one CMS line, were exposed to three temperature regimes during flowering in glasshouse and climate chamber experiments. Considerably higher kernel setting was observed for some CMS progeny under high compared with lower temperature. This demonstrates the temperature influence on fertility restoration of the barley CMS system. To our knowledge, there are no further publications on temperature sensitivity of barley CMS lines. Hence, the primary aim of this study was to identify the specific developmental stage in which temperature imparts pollen fertility in CMS barley. We further investigated how temperature stress affects anther development in different CMS lines, in order to provide data to overcome this problem in hybrid breeding.

Materials and Methods

Experimental assembly: Three six-rowed European winter barley CMS lines, CMS_3705, CMS_3709 and CMS_3713, were used in this study to capture the temperature-sensitive developmental stage at which fertility restoration of CMS occurs. The CMS lines were provided by the cooperating breeding companies and represent three European elite lines. They possess the same CMS cytoplasm (*msm1*) but differ in their nucleus genomes.

The experiments were conducted in climate chambers and in a glasshouse of the Department of Plant Breeding, Justus Liebig University Giessen. Seeds were sown into quickpot plates. After reaching the growth stage DC 12 to DC 13 according to the decimal code (DC) proposed by Zadoks et al. (1974; Fig. 1), the seedlings were vernalized for eight weeks at a constant temperature of 5°C and day length of 8 h. After vernalization, the plantlets were repotted into pots with a size of 11 × 11 × 12 cm (L × W × H) and transferred to the glasshouse for acclimation.

Glasshouse trial design: In the first glasshouse trial, the climate conditions were relatively uncontrolled with changing temperatures ranging from 9 to 41°C at day and 3 to 22°C at night in the spring

2015. For the second glasshouse trial, the plants were grown under semicontrolled stable day and night temperature conditions ranging from 18 to 24°C in fall and winter 2015–2016. Thus, these glasshouse trials represent two distinct environments. The artificial lighting (10 000 lx) was set to 16 h/day and 8 h/night in both trials. Fertilizers (0.2 ml per litre Wuxal Super, AGLUKON Spezialdünger GmbH & Co. KG, Düsseldorf, Germany) were applied weekly in all trials starting one week after repotting until maturity. Plant protection against powdery mildew was carried out using Vegas (51.3 g/l Cyflufenamid, BASF SE, Ludwigshafen, Germany), applied at DC 29. Insecticides were only applied if necessary.

Design of climate chamber experiments: For the climate chamber trials, barley plants in stage DC 29 were transferred into a climate chamber at 16°C/day for 16 h and 12°C/night for 8 h, at a light intensity of 15 700 lx. Seven random groups (five plants per CMS line) were built and six groups were transferred to the climate chamber with elevated temperature, that is 30°C/day for 16 h and 24°C/night for 8 h (light intensity: 15 700 lx), depending on the respective treatment group, whereas the seventh group was considered as the control group (CC = cool control). Plants of the CC group were left in the cool chamber until maturity. An overview of the experimental design, the developmental stages and how long the plants of the random groups were exposed to elevated temperatures is presented in Fig. 1.

Three groups were consecutively exposed to higher temperatures for a short period until replacement – according to the developmental stage – by the next group (S = short heat treatment) and then retransferred into the cool chamber. Another three groups were subsequently exposed to higher temperatures until maturity (R = heat treatment until ripeness) (Fig. 1). Thereby, each single plant within one group was individually examined regarding its particular growth development and subsequently transferred.

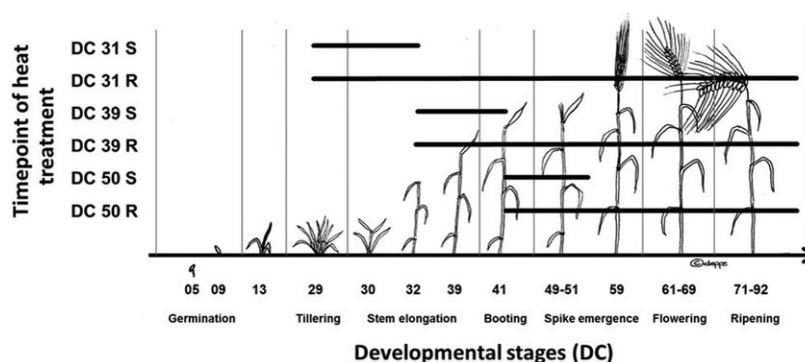
The six groups treated with higher temperatures were: ‘DC 31 S’ (DC 29 to DC 32), ‘DC 31 R’ (DC 29 to DC 90), ‘DC 39 S’ (DC 32 to DC 41), ‘DC 39 R’ (DC 32 to DC 90), ‘DC 50 S’ (DC 41 to DC 55) and ‘DC 50 R’ (DC 41 to DC 90).

According to Gómez and Wilson (2012), who developed a scale for spike and anther development based on Zadoks et al. (1974), our heat stress treatment groups comprise the following prominent developmental stages of floret and pollen formation: (i) group DC 31 S, the developmental stage prior to spike/floret differentiation, (ii) group DC 39 S, intended to be exposed to high temperatures shortly before meiosis until the release of microspores, and (iii) group DC 50 S, until the second pollen mitosis.

The two replications of the climate chamber trial were conducted under constant conditions. Fertilization was identical to the glasshouse trials. Chemical plant protection (Vegas, 1.3 g/l Cyflufenamid BASF SE, Ludwigshafen, Germany) was only applied once before transferring the plants to the climate chambers.

Fertility scoring: Five individually bagged spikes (to avoid cross-pollination) per plant of each CMS line in the climate chamber and

Fig. 1: Developmental stages according to Zadoks et al. (1974), when the barley plantlets were exposed to higher temperatures of 30°C/day for 16 h and 24°C/night for 8 h (S, short heat treatment; R, heat treatment until ripeness). Horizontal bars indicate the growth stages at which plants were grown under elevated temperature



glasshouse trials were scored for fertility. For bagging, cellophane bags (Zellglas-Flachbeutel, 80 * 250 mm, Baumann Saat-zuchtbedarf, Waldenburg, Germany) were used. Only such spikes arising in a narrow time frame were bagged to obtain comparable fertility scores for each plant. At maturity, the numbers of spikelets per spike (SP) and kernels per spike (KS) were counted and fertility index (FT) was calculated using the following formula:

$$FT = \text{Number of kernels per spike} / (3 * \text{Number of spikelets per spike})$$

where the factor 3 multiplied with the number of spikelets per spike accounts for the number of florets per spikelet.

Besides the fertility-related traits, the heading date (HD) in days after the start of the respective experiment (plantlets transferred to the cool climate chamber) and additionally, the days of treatment with elevated temperature (DHT) were noted for each plant to record the influence of the higher temperature treatment duration on the traits of interest.

Statistical evaluation: The statistical analysis was carried out using the software SPSS (IBM SPSS Statistics 22, IBM Corp., Armonk, NY, USA). Multivariate analysis of variance (MANOVA) was firstly conducted to identify significant differences in variances of the observed traits between the two climate chamber and the two glasshouse repetitions, respectively. In both cases, the differences in variances were calculated over all varieties and for each variety, separately. Further, differences in variances were calculated between the variable treatments and between the lines. Hence, the least significant differences (LSD) were calculated based on the 95% confidence intervals to differentiate the kernel settings of the genotypes over all temperature treatments and within the temperature treatments for each line individually. Pearson's correlations were calculated between HD and SP, HD and FT and SP and FT based on all CMS lines and for each line separately. Furthermore, Pearson's correlations between HD, SP, FT and the DHT were again calculated over all CMS lines and for each line separately.

Microscopic studies of anthers: The anthers of two plants each of the lines CMS_3705 and CMS_3713 from the CC and the heat treatment DC 50 R were taken from the fourth to the sixth spikelet (counted from the ear basis) four days after bagging. These anthers were consecutively transferred onto an object slide and carefully immersed in 40 µl acetocarmine [1% (w/w) carmine [CAS 1390-65-4, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany] dissolved in 45% acetic acid]. Afterwards, anthers were covered with a cover slide and stained for 20 min.

Photomicrographs of anthers and pollen were taken using a digital microscope camera (Leica DMR microscope with Leica DFC450 C camera, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and the LAS software (Leica Application Suite LAS v.4.5.0., Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

Results

Plant development and fertility under uncontrolled glasshouse conditions

Results for days to heading (HD), spikelets per spike (SP) and fertility index (FT) for both glasshouse trials are presented in Table 1. The multivariate analysis of variance (MANOVA) over all CMS lines revealed highly significant differences for SP ($P < 0.0001$) and FT ($P < 0.0001$) but not for HD ($P = 0.368$). The MANOVA calculated for each line separately revealed that CMS_3705 needed significantly longer until heading ($P = 0.029$) in experiment 2 vs. 1. CMS_3709 and CMS_3713 showed a later heading date, but differences for these lines between the trials were not significant. Regarding the number of spikelets CMS_3705 and CMS_3709 showed highly significant differences ($P < 0.0001$) between the trials, while CMS_3713 did not differ. For FT, highly significant differences between the trials were observed for CMS_3709 ($P = 0.002$) with a higher fertility in glasshouse experiment 1, where temperatures occasionally rose above the critical value for fertility restoration. For CMS_3705, no significant differences were present regarding FT and complete sterility was observed in CMS_3713 in both trials.

Climate chamber trials

MANOVA results for the two climate chamber experiments over all CMS lines and treatments are listed in Table 2 separately for the genotypes, the trial replications and their corresponding interactions. In order to show that CMS lines behaved comparably in the two climate chamber trials, Pearson's correlations were calculated between the results of the two experiments. As the two trials showed no significant differences regarding the FT ($P = 0.105$) and Pearson's correlations revealed strong and highly significant coefficients of correlation (r) for the three traits (HD [$r = 0.867$, $P < 0.000$], SP [$r = 0.867$, $P < 0.000$] and FT [$r = 0.593$, $P = 0.006$]) all further calculations were conducted based on trait-specific mean values over both experiments for each line and treatment.

The corresponding results for the individual traits are compiled in Fig. 2 and are additionally presented in Table S1. This table depicts the number of plants and the sum of spikes for each treatment and CMS line together with the corresponding mean values and standard deviations for HD, SP and FT. The line CMS_3705 needed the shortest time to heading in all treatments, while CMS_3713 and CMS_3709 showed HD values of up to 99 and 114 days, respectively, in the short treatment at

Accession	Exp.	No. of plants	Sum of spikes	HD		SP		FT		Sig. ¹
				Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
CMS_3705	1	19	95	48.79	10.97	18.75	2.40	0.175	0.450	ns
	2	18	85	64.53	28.06	11.91	5.13	0.000	0.000	
CMS_3709	1	18	88	80.63	11.55	19.23	2.04	0.555	0.474	**
	2	10	45	82.31	18.72	14.06	1.33	0.019	0.051	
CMS_3713	1	9	43	90.23	8.46	17.81	3.22	0.000	0.000	–
	2	11	50	80.91	13.68	15.45	2.56	0.000	0.000	
Sig. ²				ns		***		***		

Exp. 1: 9–42°C at day and 3–22°C at night; Exp. 2: 18–24°C at day and night.

¹Significance of differences between the FT values between the two experiments calculated for each genotype separately (*0.05 level; **0.01 level; ***0.001 level; ns, not significant).

²Significance of differences between the two experiments calculated over all genotypes.

Table 1: Descriptive statistics of the greenhouse trials (HD, days to heading from sowing; SP, spikelets per spike; FT, fertility index; SD, standard deviation)

Table 2: Multivariate analysis of variance for genotypes, repetitions and genotype $\times$ experiment interaction in the climate chamber experiment for heading date (HD), spikelets per spike (SP) and fertility index (FT)

Source	Trait	Sum of squares	df	Variance	F-test	P-value	Sig.
Genotypes	HD	44619.338	2	22309.669	104.511	0.000	***
	SP	70.050	2	35.025	1.610	0.203	ns
	FT	0.054	2	0.027	6.855	0.001	**
Trial repetitions	HD	81.521	1	81.521	0.382	0.537	ns
	SP	120.776	1	120.776	5.553	0.020	*
	FT	0.010	1	0.010	2.661	0.105	ns
Genotype $\times$ exp. interaction	HD	1160.300	2	580.150	2.718	0.069	ns
	SP	55.010	2	27.505	1.265	0.285	ns
	FT	0.021	2	0.011	2.689	0.071	ns
Error	HD	37997.330	178	213.468			
	SP	3871.500	178	21.750			
	FT	0.701	178	0.004			

*0.05 level; **0.01 level; ***0.001 level; ns, not significant.

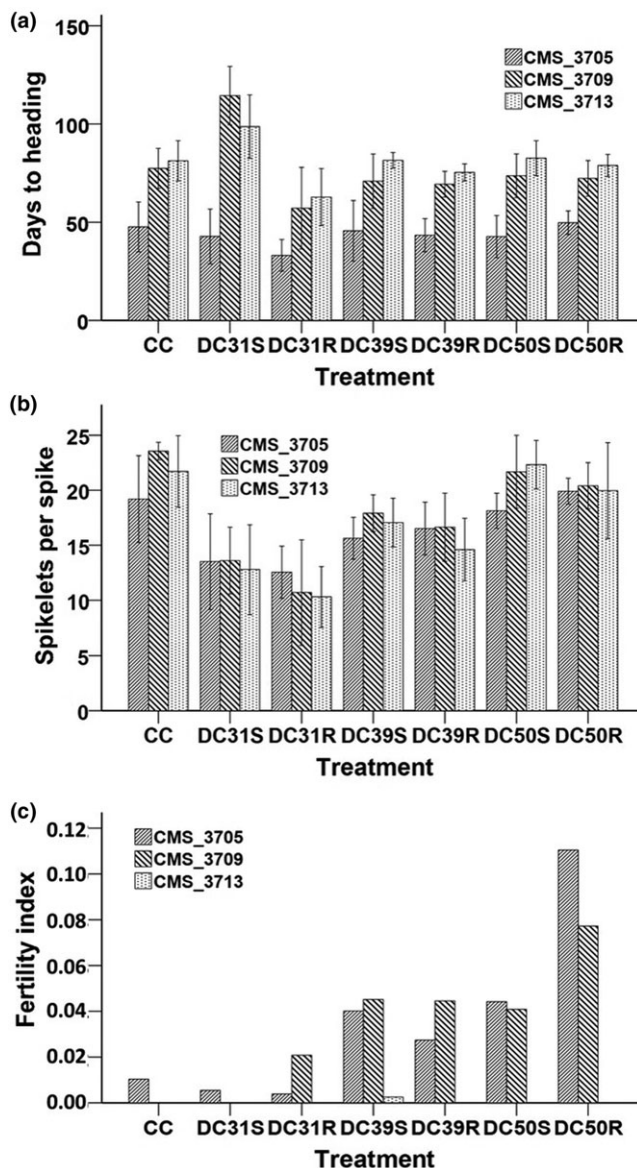


Fig. 2: Results for days to heading (a), spikelets per spike (b) and fertility index (c) (CC, cool control; DC 31, DC 39 and DC 50, developmental stages of treatment according to Zadoks et al. (1974); S, Short heat treatment; R, Heat treatment until ripeness; Error bars = $\pm$ Standard deviation). Error bars are not given for FT because of the wide range of standard deviation. Spikes of line CMS-3713 were completely sterile.

DC 31. This is approx. 18 and 37 days, respectively, longer than in the control group (CC). The opposite effect is visible regarding the heat treatment starting from DC 31 until ripeness. Here, all three lines reached heading in a shorter time than in the control group. A similar effect is observed for CMS_3713 at DC 39. Treatments starting at DC 50 showed no significant difference to the control group regarding days to heading. With regard to the number of spikelets per spike (SP), a comparable trend is observable. All three CMS lines showed lower SP values in the treatments beginning at DC 31, whereas the other treatments caused only a small or no reduction in SP.

It is also clearly visible that CMS_3705 and CMS_3709 had an increased fertility in treatments at later developmental stages compared with the control. But, CMS_3713 remained completely sterile under all treatments. The results of a MANOVA for treatments and CMS lines presented in Table 3 reveal highly significant genotypic differences for HD and FT, while the treatments caused highly significant differences in all three traits. Genotype $\times$ treatment interactions were significant for HD and SP but not for FT which means that the treatment itself or the time point of heat treatment affects the genotypes similarly and that the unstable genotypes always show a higher FT than the stable one.

Further on, LSDs were calculated to directly compare the average trait expressions for HD, SP and FT of the different heat treatments and the control group (Table 4). The LSD test revealed significant differences of the means for HD in CMS_3705 between CC and DC 31 R, while CMS_3709 and CMS_3713 showed a significantly earlier heading (HD) in DC 31 R and a significantly later heading for the DC 31 S treatment compared with CC. Similar results were obtained for SP. All three CMS lines showed significantly fewer spikelets in DC 31 R, DC 31 S, DC 39 R and DC 39 S. CMS_3709 also exhibits a significant difference between CC and DC 50 R regarding the number of spikelets.

To illustrate the observed differences for the fertility index (FT), the bar charts in Fig. 3 show the FT values for each of the three CMS lines and each treatment. It becomes clear from Fig. 3 that particularly the heat treatment beginning at later developmental stages significantly increased the fertility of environmentally sensitive CMS lines CMS_3705 and CMS_3709. Significant differences for FT of these lines are only observed in DC 50 R; differences for treatments beginning at DC 39 were visible but only significant for CMS_3713. As it may be argued that the duration of heat treatment (DHT) can also affect the fertility restoration besides or in addition to the developmental stage, the days of short heat treatments (DC 31 S, DC 39 S and

Source	Trait	Sum of squares	df	Variance	F-test	P-value	Sig.
Genotype	HD	50204.752	2	25102.376	194.568	0.000	***
	SP	48.424	2	24.212	2.736	0.068	ns
	FT	0.046	2	0.023	6.102	0.003	**
Treatment	HD	13715.145	6	2285.857	17.718	0.000	***
	SP	2336.595	6	389.432	44.011	0.000	***
	FT	0.71	6	0.012	3.116	0.006	**
Genotype $\times$ treatment	HD	6455.460	12	537.955	4.170	0.000	***
	SP	198.259	12	16.522	1.867	0.042	*
	FT	0.044	12	0.004	0.974	0.476	ns
Error	HD	21029.577	163	129.016			
	SP	1442.318	163	8.849			
	FT	0.620	163	0.004			

*0.05 level; **0.01 level; ***0.001 level; ns, not significant.

Table 3: Multivariate analysis of variance for genotypes, treatments and genotype $\times$ treatment interaction in the climate chamber experiment for heading date (HD), spikelets per spike (SP) and fertility (FT)

DC 50 S) were recorded and are presented in Table 5. Pearson's correlations over all accessions between the duration of heat treatment and the trait of interest showed highly significant correlation coefficients for SP ($r = -0.599$; $P < 0.000$) and HD ($r = 0.498$, $P < 0.000$), while logically no correlation was observed between DHT and FT. Calculation for each line separately showed also significant coefficients of correlation between DHT and SP ($r = -0.474$, $P = 0.13$ [CMS_3705], $r = -0.742$, $P < 0.000$ [CMS_3709] and $r = -0.759$, $P < 0.000$ [CMS_3713]) and HD ($r = -0.154$, $P = 0.445$ [CMS_3705], $r = 0.762$, $P < 0.000$ [CMS_3709] and $r = 0.673$, $P < 0.000$ [CMS_3713]), respectively. In none of the lines, a significant correlation was found between the duration of heat treatment and the fertility index which indicates that the developmental stage is more critical than the duration of (heat) stress applied.

Microscopic observation of anther and pollen development

Anther morphology and pollen development in two random plants each of lines CMS_3705 and CMS_3713 in CC and DC 50 R treatments were carried out exemplarily to detect possible differences between stable and instable CMS lines. Anthers were collected from the fourth to the sixth spikelet counted from the spike basis. A typical example is given in Fig. 4, which shows photomicrographs of two anthers from CMS_3705 and two anthers from CMS_3713 in treatments CC and DC 50 R. The photomicrographs clearly reveal that only the anthers of CMS_3705 treated at DC 50 R contained intact pollen grains, while the other anthers did not.

Discussion

Genotypic variation for thermo-stability of barley CMS system

In the present study, the temperature stability of three CMS lines of barley was investigated in glasshouse and climate chamber experiments. Both trials revealed genotypic variation for temperature-induced stability vs. breakdown of the CMS system. The glasshouse trial was conducted under two temperature regimes. High maximum temperatures of over 40°C in the first trial caused comparatively higher fertility of CMS lines than under more constant temperatures below 25°C in the second glasshouse trial. However, the genotypes showed different reaction under ambient temperature: line CMS_3709 had a significantly higher seed set and CMS_3705 tended to have a higher FT in the first compared with the second experiment, while CMS_3713

remained totally sterile under both temperature regimes. Abdel-Ghani *et al.* (2013) reported comparable results and found also genotypes showing higher seed set under high temperatures, while others stayed sterile or tended to have a higher seed set. Temperature dependency of the CMS system was also shown in studies of other crop plants such as sorghum (Downes and Marshall 1971) and pearl millet (Reddy and Reddi 1972). Fan and Stefansson (1986) studied the influence of ambient temperature (22/16, 26/20 and 30/24°C at day and night, respectively) on the stability of two CMS cytoplasms (nap CMS and pol CMS) in *Brassica napus*. They found that both CMS systems were consistently stable under the lowest temperature, while plants containing the nap CMS became fully fertile, and pol CMS plants became at least partially fertile under the highest temperature. Studies by Bückmann *et al.* (2014, 2016) dealt with the stability of the T- and S-cytoplasms in maize under low and high ambient temperature. The results revealed, in contrast, a high CMS stability under relatively high (35°C at day, 22°C at night) air temperature, while lower temperatures led to CMS instability. The highest fertility restoration was found under air temperatures of 21°C at day and 16°C at night. The approach and the results of our study were relatively similar to those of Abdel-Ghani *et al.* (2013), so that the exact developmental stage of CMS breakdown remains open. Due to the absence of the restorer gene and the identity of the CMS system in all three mother lines used in the present study, differences in temperature sensitivity are genotypic and must be caused by one or more additional genes.

Thermal effects in different developmental stages lead to CMS breakdown

Unfortunately, earlier studies regarding temperature sensitivity/stability of the common barley CMS system gave no evidence about the developmental stage at which elevated temperatures induced undesired fertility restoration. To enable a better and easier phenotyping and to get hints on potential candidate genes, knowledge about the developmental stage in which temperature suspends CMS and causes fertility would be advantageous. Therefore, the focus of the present study was the examination of the critical temperature-sensitive developmental stage in CMS barley. In this regard, more constant and controlled climate chamber experiments were performed. In these experiments, only one treatment led to a significantly higher fertility index (FT) compared with the control (CC). The highest FT was observed in plants exposed to higher temperature from an early booting stage until ripeness (DC 50 R).

Table 4: Mean differences and least significant differences between the treatments and the control group for each accession and treatment (HD, heading date; SP, spikelets per spike; FT, fertility index; LSD, least significant difference)

Line	Trait	Treatment	Mean difference to CC	P value	LSD
CMS_3705	HD	DC 31 S	4.86	0.359	ns
		DC 31 R	14.50	0.013	*
		DC 39 S	2.01	0.697	ns
		DC 39 R	4.26	0.421	ns
		DC 50 S	4.94	0.351	ns
		DC 50 R	-2.12	0.688	ns
	SP	DC 31 S	5.67	0.000	***
		DC 31 R	6.65	0.000	***
		DC 39 S	3.56	0.006	**
		DC 39 R	2.68	0.040	*
		DC 50 S	1.06	0.410	ns
		DC 50 R	-0.72	0.410	ns
	FT	DC 31 S	0.00	0.895	ns
		DC 31 R	0.01	0.871	ns
		DC 39 S	-0.03	0.411	ns
		DC 39 R	-0.02	0.646	ns
		DC 50 S	-0.03	0.364	ns
		DC 50 R	-0.10	0.009	**
CMS_3709	HD	DC 31 S	-37.10	0.000	***
		DC 31 R	20.30	0.002	**
		DC 39 S	6.50	0.316	ns
		DC 39 R	8.05	0.186	ns
		DC 50 S	3.75	0.547	ns
		DC 50 R	5.07	0.402	ns
	SP	DC 31 S	9.96	0.000	***
		DC 31 R	12.84	0.000	***
		DC 39 S	5.65	0.000	***
		DC 39 R	6.92	0.000	***
		DC 50 S	1.88	0.190	ns
		DC 50 R	3.16	0.026	*
	FT	DC 31 S	0.00	1.000	ns
		DC 31 R	-0.02	0.561	ns
		DC 39 S	-0.05	0.227	ns
		DC 39 R	-0.04	0.203	ns
		DC 50 S	-0.04	0.256	ns
		DC 50 R	-0.08	0.030	*
CMS_3713	HD	DC 31 S	-17.41	0.001	**
		DC 31 R	18.45	0.000	***
		DC 39 S	-0.24	0.962	ns
		DC 39 R	5.91	0.210	ns
		DC 50 S	-2.37	0.606	ns
		DC 50 R	0.05	0.992	ns
	SP	DC 31 S	8.92	0.000	***
		DC 31 R	11.40	0.000	***
		DC 39 S	4.65	0.005	**
		DC 39 R	7.11	0.000	***
		DC 50 S	-0.07	0.962	ns
		DC 50 R	2.47	0.098	ns
	FT	DC 31 S	0.00	1.000	ns
		DC 31 R	0.00	1.000	ns
		DC 39 S	-0.003	0.032	*
		DC 39 R	0.00	1.000	ns
		DC 50 S	0.00	1.000	ns
		DC 50 R	0.00	1.000	ns

LSD: *0.05 level; **0.01 level; ***0.001 level; ns, not significant.

It has already been studied earlier which tissue(s) and developmental stage(s) were affected by temperature in different crop plants. Abdel-Ghani et al. (2013) indicated that high temperatures may affect the development and function of the tapetum. Likewise, Satake and Hayase (1970) assumed that low temperatures led to malfunction and vacuolization of the tapetum (Abdel-Ghani et al. 2013). By contrast, the results of Bückmann et al. (2013, 2016) indicate that ambient temperature affects restoration of fertility just before anthesis in T- and S-cytoplasm

of maize. The fertility restoration observed in oilseed rape by Fan and Stefansson (1986) was manifested by altered development of anthers and elongation of stamens with a time interval of 10–14 days between temperature treatment and plant response in both CMS cytoplasm. The authors concluded that histologically, floral buds were at developmental stages prior to stamen differentiation and thus sterility was associated with failure of differentiation of archesporia. By analogy, temperature must also act at this stage to promote normal development in stamens (Fan and Stefansson 1986). Wang et al. (2014) studied the abortive process of anthers and pollen precursors in a cytoplasmic male sterile (SaNa-1A) and a fertile (SaNa-1B) line derived by somatic hybridization of *B. napus* and *Sinapis alba*. They observed that the anthers of SaNa-1A initially aborted at the late pollen mother cell (PMC) stage. Prior to that, the tapetum showed vacuolization and vacuolated PMCs were built. The microspores were released from less condensed tetrads and formed uninucleate pollen grains with no visible exine, which stopped growing into mature pollen. In contrast, in fertile line SaNa-1B vacuolization of tapetum occurred at the late tetrad stage. González-Melendi et al. (2008) found a premature death of tapetal cells in the ogu CMS of *B. napus* caused presumably by an autolysis process rather than programmed cell death, leading to the formation of sterile anthers. Laveau et al. (1989) studied the microsporogenesis in two sunflower lines containing different CMS systems from *Helianthus petiolaris* and *H. petiolaris fallax*, respectively, and found a vacuolization of endoplasmic reticulum during meiosis in one and an abnormal deposition of the endexine layer during vacuolization of the microspore in the other line.

Comparing the results of our study regarding the heat treatments DC 50 S and DC 50 R (starting at the same plant stage), it is obvious that only the long heat exposure caused significant fertility restoration. The treatment DC 50 R coincides with floret development, beginning between the first and second pollen mitoses and continuing throughout pollen maturation, flowering and seed formation. Therefore, it is concluded that the undesired fertility restoration must essentially be induced during pollen maturation or shortly before flowering. According to the plant developmental scales of Zadoks et al. (1974) and Gómez and Wilson (2012), microspores of restored barley plants must have been fully developed until reaching growth stages DC 50 to DC 55.

However, microscopy revealed (Fig. 4) that there are anthers which produce intact pollen grains but others which showed neither pollen nor remnants of aborted pollen. Abdel-Ghani et al. (2013) presented pictures of anthers, which were either yellowish and big and therefore said to be normal and fertile, or whitish and stunted and hence classified as sterile. Similar pictures were shown by Ui et al. (2014). Here, a clear difference was visible between anthers of CMS lines and maintainer and restorer lines, respectively. Whereas the latter showed yellow and fully bulged anthers containing fertile pollen, anthers of CMS lines were white, thin and without pollen grains. However, the *msm1* cytoplasm showed no significant influence on the glume, lemma, palea, pistil or other plant growth traits (Ui et al. 2014). These results suggest that CMS in barley must rather be induced in an earlier stage, since otherwise at least remains of pollen grains would have to be visible as shown by Chase (2007) for the S-cytoplasm in maize. Here, pollen grains collapse before the starch-filling stage and are thus degenerated but visible, which is compatible to the results of Bückmann et al. (2013, 2016).

Since increased fertility in our study occurred only in the group DC 50 R, treated from DC 41 until ripeness, heat-

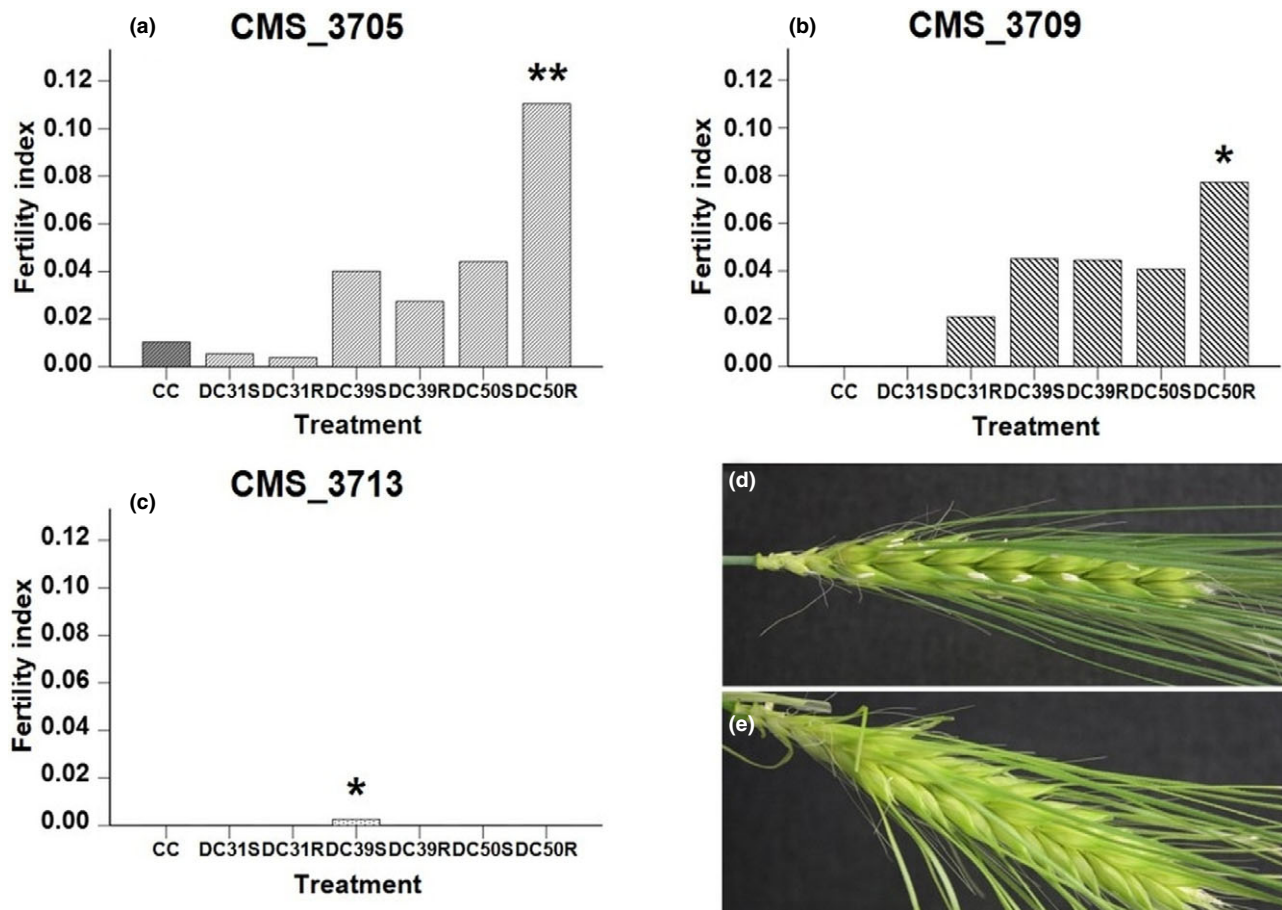


Fig. 3: Average fertility indexes of accessions CMS_3705 (a), CMS_3709 (b) and CMS_3713 (c). (d) Picture of a fertile spike showing anthers. (e) Picture of a sterile spike showing no anthers. (*significant at the 0.05 level; **significant at the 0.01 level compared with the control group). Error bars for Fertility index are not included due to the high standard deviation

Table 5: Duration (days) of elevated temperature applied in each accession and each short heat treatment (SD, standard deviation)

Line	Treatment	No. of plants	Days of heat treatment			
			Min	Max	Mean	SD
CMS_3705	DC 31 S	9	8	16	11.67	3.571
	DC 39 S	10	3	34	9.22	9.510
	DC 50 S	9	2	16	4.33	4.472
CMS_3709	DC 31 S	5	21	39	31.40	7.127
	DC 39 S	7	6	11	8.71	1.704
	DC 50 S	8	1	4	3.00	1.069
CMS_3713	DC 31 S	8	27	40	33.75	4.590
	DC 39 S	8	7	14	10.13	2.295
	DC 50 S	10	2	5	2.89	0.928

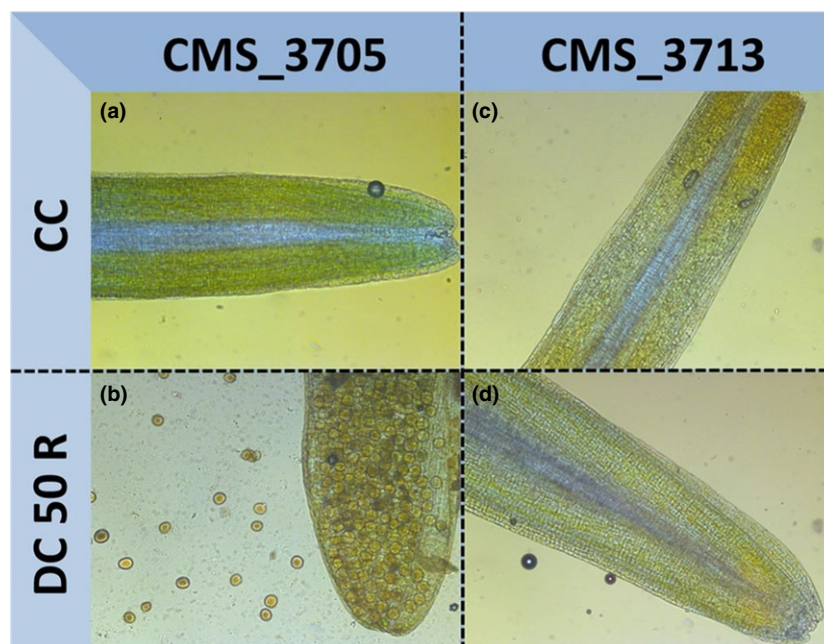
triggered fertility restoration evidently acts in a final phase of floret development. Combining the results for FT with microscopy, it is conceivable that the given CMS system must affect pollen development before meiosis, so that anthers stop development and no pollen would therefore be visible. However, elevated temperatures between developmental stages DC 41 and DC 69 then may cause a recovery of anther growth, so that meiosis and further developmental steps proceed delayed, but early enough that fertile pollen can be developed and fertility restoration occurs.

Heat stress counteracting spontaneous fertility restoration

Beside the treatment DC 50 R, also treatments DC 31 R and DC 39 R covered all developmental stages prior to the first until the second pollen mitosis, pollen maturation, flowering and seed formation. Thus, the respective plants were in contrast exposed to high temperatures starting from floret differentiation. Therefore, the absent fertility restoration in these treatments might be due to the extended heat stress, which may lead to phytohormone-triggered sterility as described in barley by Sakata *et al.* (2000). Consequently, the unwanted negative effect on pollen fertility or pollen viability, due to lower endogenous auxin levels of developing anthers, might have counteracted a possible fertility restoration of CMS barley. Sakata *et al.* (2000) observed three growing stages hypersensitive to high temperatures which resulted in abnormal anther and pollen development: (i) the early differentiation stage of the spike, around the five-leaf stage, (ii) the premeiotic stage of PMCs, and (iii) meiosis, between the six- and seven-leaf stage.

Detrimental effects of high temperatures on pollen viability were also described in *Sorghum bicolor* (Vara Prasad *et al.* 2006) and tomato (Firon *et al.* (2006). In cotton, Marshall *et al.* (1974) found that sterility increased with increasing temperature and day length. Whereas temperatures above 33°C were required for the expression of CMS in A lines, maintainer lines (B lines) became completely sterile at temperatures above 36°C. Downes

Fig. 4: Photomicrographs of anthers taken from lines CMS_3705 (a, b) and CMS_3713 (c, d). The two upper pictures are from control plants (CC), while the lower two were taken from plants after extended heat treatment starting shortly before growth stage DC 41 (DC 50 R)



and Marshall (1971) observed a sensitivity of *S. bicolor* to low temperature shortly before and during meiosis of PMCs, which resulted in an induced male sterility. Results of Brooking (1976) seem to restrict the temperature sensitivity to pre- or early meiotic stages in *S. bicolor*, while findings of Satake and Hayase (1970) in rice revealed that the greatest sensitivity occurred at microspore release from the tetrads. All these studies concerned cold-induced male sterility. Regarding heat, Abiko et al. (2005) found that the most sensitive period of barley begins at the five-leaf stage. An exposure to elevated temperatures (30/25°C day/night) for five days during this stage led to a complete disruption of pollen development so that anthers showed no pollen at all.

In the present study also no significantly increased fertility was observed in heat-treated groups DC 31 S and DC 39 S, and just a trend to a slightly higher fertility of sensitive CMS lines was seen in group DC 39 S. This could be explained by related findings in groundnut by Vara Prasad et al. (1999) and wheat by Saini and Aspinall (1982). The latter authors examined the influence of short high-temperature periods on the sporogenesis and found negative effects during the time of meiosis I and tetrad break-up (meiosis II), which should take place during treatment DC 39 S/R, but observed no effects at other stages. However, Abiko et al. (2005) described several transcripts to be upregulated in barley before the development and differentiation of anther wall layers under normal temperature regimes, but not under elevated temperatures, leading to the complete abortion of tapetum cells and PMCs. The failure of transcriptional reactivation when returning plants to normal temperature increased with the duration of elevated temperature and strongly correlated with the observation of male sterility. Consequently, also short periods of heat treatment can result in a sustained damage of male reproductive organs.

Among the fertility restoration of barley CMS lines, other characteristic parameters of cereal spikes, that is number of spikelets per spike (SP), kernels per spike (KS) and heading date (HD), were scored in our climate chamber trials to identify possible heat stress effects on spike formation. Early studies in wheat already showed that the final number of SP was lower at high temperatures, as low temperature allows a longer period of

spikelet differentiation (Friend et al. 1963, Friend 1965). A reduction in SP and KS due to high temperatures during early spike development was described for wheat (Johnson and Kanemasu 1983), and moreover, Thorne et al. (1968) reported an increase in kernel number and kernel yield under cool temperatures. In the present study, a drastic decrease in SP in all three CMS lines exposed to high temperatures at early growth stages (DC 31 S/R) occurred and confirms the results in wheat. Later heat treatments showed either a weaker decrease (DC 39 S, DC 39 R) or no significant difference of this trait (DC 50 S, DC 50 R) compared with the cool control (CC). Furthermore, in two CMS lines exposed to higher temperatures at DC 31 S the time until heading was significantly reduced, what agrees with the shortening of this phase induced by high temperatures in wheat reported by Stone (2000). We have observed an opposite effect in plants in treatment DC 31 R showing a significantly longer time until HD in all genotypes. These results suggest that a strong heat stress arose due to the treatment duration and plants suffered from these high temperatures, although drought or water deficit never occurred since the plants were always well watered. These results support the conclusions that plants treated from earlier developmental stages on (DC 31 R and DC 39 R) lack fertility restoration due to negative effects of constant heat stress on male reproductive organ development. A similar effect is visible when comparing the results of the climate chamber experiments with relatively constant high temperatures and the variable temperatures in the first glasshouse trial. Although temperatures of more than 40°C occurred, low temperatures during the night may have led to a sufficient recovery of the plants, resulting in a higher fertility index. Vice versa, constant high temperatures (high day temperatures combined also with high night temperatures) may have the same effect on fertility restoration than changing temperatures, but provide no time to sufficiently recover from heat stress. Consequently, FT in the first glasshouse trial was higher than in the climate chamber trials, since no heat stress counteracted the fertility restoration. However, due to the partially short duration of heat treatment, the relatively constant temperatures in the climate chamber trials were necessary to provide a clear distinction from the control group.

Finally, the exposure of heat stress during early developmental stages is neither recommendable for the selection nor for the identification of environmentally stable sterile CMS barley lines for hybrid breeding programmes. A phenotyping has rather to be conducted during the final phases of floret development, flowering and seed formation.

Conclusions

The thermosensitivity of the currently used barley CMS system is a major obstacle in hybrid seed production and the development of new hybrid varieties. Through its spontaneous and often unpredictable occurrence during backcrossing of CMS mother lines or the production of hybrid seeds, it can lead to a contamination with inbred seeds. Since the investigated spontaneous fertility restoration due to environmental conditions is difficult to phenotype in the course of breeding, further work should focus on the identification of genetic mechanisms behind this phenomenon to find candidate genes involved in instability. The collected phenotypic data can also be used to develop molecular markers for an efficient and effective marker-assisted selection of germplasm for the development of stable CMS and maintainer lines. Breeders can thus benefit from easily rejecting unfavourable genetic material from their breeding pools and introduce more hybrid barley varieties to the market. This can be one way to increase barley yield and yield stability in a changing environment.

Acknowledgements

This project was part of the collaborative project 'HybGPS' carried out in cooperation with German Seed Alliance GmbH funded by the German Federal Ministry of Food and Agriculture and coordinated by the Federal Agency of Renewable Resources (FNR). Thanks are due to the companies Ackermann Saat-zucht GmbH & Co. KG, Deutsche Saatveredelung AG (DSV), Nordsaat Saat-zuchtgesellschaft mbH, Saaten Union Recherche s.a.s. (SU), W. von Borries-Eckendorf GmbH & Co. KG (WvB) for their support and cooperation. We are particularly grateful to Dr. Jutta Ahlemeyer, Dr. Jens Vaupel and Astrid Hoffmann (DSV), Dr. Laszlo Cselenyi (WvB), Dr. Charles Snijders (SU) and Dr. Eberhard Laubach (Nordsaat) for supporting this study and for valuable discussions. We also thank Annette Plank, Birgit Keiner, Lisa Unterberg, Petra Kretschmer, Jurek Elsermann and Bruno Kezeya for their valuable experimental assistance and Isabelle Deppé for designing the DC scale depiction.

References

Abdel-Ghani, A. H., F. P. Frey, and H. K. Parzies, 2013: Effect of temperature on the expression of cytoplasmic male sterility in cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breed.* **132**, 42–47.

Abiko, M., K. Akibayashi, T. Sakata, M. Kimura, M. Kihara, K. Itoh, E. Asamizu, S. Sato, H. Takahashi, and A. Higashitani, 2005: High-temperature induction of male sterility during barley (*Hordeum vulgare* L.) anther development is mediated by transcriptional inhibition. *Sex. Plant Reprod.* **18**, 91–100.

Ahokas, H., 1979: Cytoplasmic male sterility in barley. III. Maintenance of sterility and restoration of fertility in the *msm1* cytoplasm. *Euphytica* **28**, 409–419.

Brooking, I. R., 1976: Male sterility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench induced by low night temperature. I Timing of the stage of sensitivity. *Aust. J. Plant Physiol.* **3**, 589–596.

Bückmann, H., A. Hüsken, and J. Schiemann, 2013: Application of cytoplasmic male sterility (CMS) as a reliable biological confinement method for the cultivation of genetically modified maize in Germany. *J. Agric. Sci. Technol. A* **3**, 385–403.

Bückmann, H., K. Thiele, A. Hüsken, and J. Schiemann, 2014: Influence of air temperature on the stability of cytoplasmic male sterility (CMS) in maize (*Zea mays* L.). *AgBioForum* **17**, 205–212.

Bückmann, H., K. Thiele, and J. Schiemann, 2016: Influence of soil moisture and air temperature on the stability of cytoplasmic male sterility (CMS) in maize (*Zea mays* L.). *Agric. Sci.* **7**, 70–81.

Bundessortenamt, 2015: Beschreibende Sortenliste Getreide, Mais, Öl- und Faserpflanzen, Leguminosen, Rüben, Zwischenfrüchte. Bundesortenamt, Hannover, Germany, ISSN 21 90-61 30

Chase, C. D., 2007: Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends Genet.* **23**, 81–90.

Chen, L., and Y.-G. Liu, 2014: Male sterility and fertility restoration in crops. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**, 579–606.

Cheng, S.-H., J.-Y. Zhuang, Y.-Y. Fan, J.-H. Du, and L.-Y. Cao, 2007: Progress in research and development on hybrid rice: a super-domesticated in China. *Ann. Bot.* **100**, 959–966.

Downes, R. W., and D. R. Marshall, 1971: Low temperature induced male sterility in *Sorghum bicolor*. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* **11**, 352–356.

Fan, Z., and B. R. Stefansson, 1986: Influence of temperature on sterility of two cytoplasmic male-sterility systems in rape (*Brassica napus* L.). *Can. J. Plant Sci.* **66**, 221–227.

Feng, P. C. C., Y. Qi, T. Chiu, M. A. Stoecker, C. L. Schuster, S. C. Johnson, A. E. Fonseca, and J. Huang, 2014: Improving hybrid seed production in corn with glyphosate-mediated male sterility. *Pest Manag. Sci.* **70**, 212–218.

Firon, N., R. Shaked, M. M. Peet, D. M. Pharr, E. Zamski, K. Rosenfeld, L. Althan, and E. Pressman, 2006: Pollen grains of heat tolerant tomato cultivars retain higher carbohydrate concentration under heat stress conditions. *Sci. Hortic.* **109**, 212–217.

Friend, D. J. C., 1965: Ear length and spikelet number of wheat grown at different temperatures and light intensities. *Can. J. Bot.* **43**, 345–353.

Friend, D. J. C., J. E. Fisher, and V. A. Helson, 1963: The effect of light intensity and temperature on floral initiation and inflorescence development in Marquis wheat. *Can. J. Bot.* **41**, 1663–1674.

Gómez, J. F., and Z. A. Wilson, 2012: Non-destructive staging of barley reproductive development for molecular analysis based upon external morphology. *J. Exp. Bot.* **63**, 4085–4094.

González-Melendi, P., M. Uyttewaal, C. N. Morcillo, J. R. H. Mora, S. Fajardo, F. Budar, and M. M. Lucas, 2008: A light and electron microscopy analysis of the events leading to male sterility in Ogu-INRA CMS of rapeseed (*Brassica napus*). *J. Exp. Bot.* **59**, 827–838.

Gupta, S. K., K. N. Rai, and M. S. Kumar, 2010: Effect of genetic background on fertility restoration of pearl millet hybrids based on three diverse cytoplasmic-nuclear male-sterility systems. *J. SAT Agric. Res.* **8**, 1–4.

Hanson, M. R., and S. Bentolila, 2004: Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* **16**, 154–169.

Hockett, E. A., K. Aastveit, and K. M. Gilbertson, 1989: Selfing behavior of cytoplasmic male sterile barley in Norway and the United States. *Heredity* **111**, 159–165.

Horn, R., K. J. Gupta, and N. Colombo, 2014: Mitochondrion role in molecular basis of cytoplasmic male sterility. *Mitochondrion* **19**, 198–205.

Johnson, R. C., and E. T. Kanemasu, 1983: Yield and development of winter wheat at elevated temperatures. *Agron. J.* **75**, 561–565.

Kempe, K., and M. Gils, 2011: Pollination control technologies for hybrid breeding. *Mol. Breeding* **27**, 417–437.

Laveau, J. H., C. Schneider, and A. Berville, 1989: Microsporogenesis abortion in cytoplasmic male sterile plants from *H. petiolaris* or *H. petiolaris fallax* crossed by sunflower (*Helianthus annuus*). *Ann. Bot.* **64**, 137–148.

Longin, C. F. H., J. Mühleisen, H. P. Maurer, H. Zhang, M. Gowda, and J. C. Reif, 2012: Hybrid breeding in autogamous cereals. *Theor. Appl. Genet.* **125**, 1087–1096.

Marshall, D. R., N. J. Thomson, G. H. Nicholls, and C. M. Patrick, 1974: Effect of temperature and day length on cytoplasmic male sterility in cotton (*Gossypium*). *Aust. J. Agric. Res.* **25**, 443–447.

Matsui, K., Y. Mano, S. Taketa, N. Kawada, and T. Komatsuda, 2001: Molecular mapping of a fertility restoration locus (*Rfm1*) for

- cytoplasmic male sterility in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor. Appl. Genet. **102**, 477–482.
- Mühleisen, J., H. P. Maurer, G. Stiewe, P. Bury, and J. C. Reif, 2013: Hybrid breeding in barley. Crop Sci. **53**, 819–824.
- Mühleisen, J., H.-P. Piepho, H. P. Maurer, Y. Zhao, and J. C. Reif, 2014: Exploitation of yield stability in barley. Theor. Appl. Genet. **127**, 1949–1962.
- Reddy, B. B., and M. V. Reddi, 1972: Studies on the breakdown of male sterility and other related aspects in certain cytoplasmic male-sterile lines of pearl millet (*Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb). Andhra Agric. J. **17**, 173–180.
- Saini, H. S., and D. Aspinall, 1982: Abnormal sporogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by short periods of high temperature. Ann. Bot. **49**, 835–846.
- Sakata, T., H. Takahashi, I. Nishiyama, and A. Higashitani, 2000: Effects of high temperature on the development of pollen mother cells and microspores in barley *Hordeum vulgare* L. J. Plant. Res. **113**, 395–402.
- Satake, T., and H. Hayase, 1970: Male sterility caused by cooling treatment at the young micro-spore stage in rice plants. 5. Estimations of pollen developmental stage and the most sensitive stage to coolness. Proc. Crop Sci. Soc. Jpn. **39**, 468–473.
- Schnable, P. S., and R. P. Wise, 1998: The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends Plant Sci. **3**, 175–180.
- Sharma, R. K., and E. Reinbergs, 1976: Male sterility genes in barley and their sensitivity to light and temperature intensity. Indian J. Genet. Plant Breed. **36**, 59–63.
- Stone, P., 2000: The effects of heat stress on cereal yield and quality. In: A. S. Basra (ed.), Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress, 243–291. Food Products Press, Binghamton, NY.
- Suneson, C. A., 1940: A male sterile character in barley: a new tool for the plant breeder. J. Hered. **31**, 213–214.
- Thorne, G. N., M. A. Ford, and D. J. Watson, 1968: Growth, development, and yield of spring wheat in artificial climates. Ann. Bot. **32**, 425–446.
- Ui, H., M. Sameri, M. Pourkheirandish, M.-C. Chang, H. Shimada, N. Stein, T. Komatsuda, and H. Handa, 2014: High-resolution genetic mapping and physical map construction for fertility restorer *Rfm1* locus in barley. Theor. Appl. Genet. **128**, 283–290.
- Vara Prasad, P. V., P. Q. Craufurd, and R. J. Summerfield, 1999: Fruit number in relation to pollen production and viability in groundnut exposed to short episodes of heat stress. Ann. Bot. **84**, 381–386.
- Vara Prasad, P. V., K. J. Boote, and L. Hartwell Allen Jr, 2006: Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain-sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] are more severe at elevated carbon dioxide due to higher tissue temperatures. Agric. For. Meteorol. **139**, 237–251.
- Wang, J., Y. Gao, Y. Kong, J. Jiang, A. Li, Y. Zhang, and Y. Wang, 2014: Abortive process of a novel rapeseed cytoplasmic male sterility line derived from somatic hybrids between *Brassica napus* and *Sinapis alba*. J. Integr. Agric. **13**, 741–748.
- Zadoks, J. C., T. T. Chang, and C. F. Konzak, 1974: A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Res. **14**, 415–421.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Mean values and standard deviations (SD) for time to heading (HD), spikelets per spike (SP) and fertility index (FT) (CC = cool control; DC 31, DC 39 and DC 50, developmental stages of treatment according to Zadoks et al. (1974); S = Short heat treatment; R = Heat treatment until ripeness; SD = Standard deviation).

5. Diskussion

5.1 Heterosis als Möglichkeit der Ertragssteigerung in Wintergerste

Heterosis bezeichnet das Phänomen, dass die Nachkommen von Kreuzungen zwischen Inzuchtlinien eine höhere phänotypische Leistung zeigen als die Eltern (Birchler et al. 2003, Schnable und Springer 2013). Dieser Effekt ist Grundlage der Hybridzüchtung.

Wie einleitend dargestellt, existieren eine Reihe positiver Beispiele innerhalb der Kulturarten, in denen Hybridzüchtung und der damit verbundene Heterosiseffekt zu einer erheblichen Steigerung der Flächenerträge beigetragen hat. Die bislang bei Gerste beobachtete mittlere Heterosis liegt nach Longin et al. (2012) und Mühleisen et al. (2013a) bei ca. 10% für die Korntragsleistung und konnte mit 9,2% auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden (Bernhard et al. 2017a). Auch die in anderen autogamen Spezies beobachteten heterotischen Effekte untermauern dieses Ergebnis. So konnten Corbellini et al. (2002) eine Heterosis relativ zum Elternmittel (MPH) von 15% in Brotweizen sowie Fischer et al. 2010 und Oettler et al. 2005 von 8,6% bzw. 10,3% in Triticale feststellen. Neben dem Korntrag wurden in verschiedenen Studien auch Ertragskomponenten wie die Anzahl der Ähren pro m² ($\ddot{A}_{m^2}$), das Hektolitergewicht (HLG) und die Tausendkornmasse (TKM) festgehalten und zwischen Hybriden und Elternlinien verglichen. Die in der vorliegenden Studie errechneten Heterosis-Effekte (Bernhard et al. 2017a) konnten in vielen Fällen die in der Literatur beschriebenen Werte bestätigen. So fanden Corbellini et al. (2002) in Brotweizen ebenfalls nur eine leicht positive MPH für das HLG, während Zhang et al. (2015) und Oettler et al. (2005) eine positive MPH für die TKM in Gerste bzw. Triticale fanden, die in der vorliegenden Studie hingegen nicht signifikant unterschiedlich war. Bezüglich der $\ddot{A}_{m^2}$ konnten in der vorliegenden Studie keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden und auch in der Literatur existieren divergente Angaben. Während Oettler et al. (2005) von einer negativen MPH für $\ddot{A}_{m^2}$ in Triticale berichteten, konnten Zhang et al. (2015) in Gerste keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl ährentragender Halme pro Pflanze zwischen Hybriden und Elternlinien feststellen. Es zeigte sich jedoch, dass Hybriden eine MPH von nahezu 10% und eine BPH von über 5% für die Anzahl Körner pro Ähre aufwiesen und damit signifikant über den Elternlinien lagen (Bernhard et al. 2017a). Dies geht einher mit den Ergebnissen von Oettler et al. (2005), die in Triticale eine MPH von 4,4% bzgl. der Anzahl Körner pro Ähre fanden. Auf Basis dieser Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass die Überlegenheit im Korntrag der in der vorliegenden Arbeit geprüften Hybriden hauptsächlich auf eine erhöhte Kornzahl pro Ähre zurückzuführen ist.

Neben der Untersuchung der Korntragsleistung von Gersten-Testhybriden stand in der vorliegenden Studie die Untersuchung der Biomasse-Ertragsleistung sowie der

diesbezügliche heterotische Effekt im Vordergrund. Hierfür existierten bis dato keine Ertragsdaten aus praxisnahen, wiederholten Exaktversuchen. Die in der vorliegenden Arbeit festgestellten TM-Erträge der Hybriden lagen im Durchschnitt 9,1% über dem der Elternlinien, wodurch die Heterosis für den TM-Ertrag vergleichbar mit der für den Kornertrag ist (Bernhard et al. 2017a) und zu einer deutlichen Überlegenheit der Hybriden führt. Die Untersuchungen zeigen, dass die Biomasse- und TM-Erträge bei Hybriden deutlich gesteigert sind, jedoch können sie lediglich mit den Ergebnissen von Zhang et al. (2015) verglichen werden, die den TM-Ertrag von Einzelpflanzen untersuchten. Hierbei wurde im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen eine geringe MPH und eine negative BPH festgestellt. Ergebnisse von Losert et al. (2016) zeigten allerdings eine positive Heterosis für den TM-Ertrag in Wintertriticale, wodurch die vorliegenden Ergebnisse zu Wintergerste bestätigt werden können. Als ertragsbestimmende Merkmale wurden des Weiteren die Pflanzenlänge und die Anzahl Ähren pro m² festgehalten. Hier zeigten Hybriden eine deutliche Heterosis für das Merkmal Pflanzenlänge (Bernhard et al. 2017a), was in mehreren Quellen ebenfalls für verschiedene Spezies wie Weizen (Corbellini et al. 2002, Longin et al. 2013), Triticale (Oettler et al. 2005, Losert et al. 2016) und auch für Gerste (Longin et al. 2012) berichtet wird. Aber auch für die Ä_{m²} konnte in dem Versuch zur Biomasse-Ertragsleistung eine deutliche Ausprägung der Heterosis (MPH: 14,5%; BPH: 8,3%) festgestellt werden (Bernhard et al. 2017a). Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt schlussendlich, dass der höhere TM-Ertrag der Hybriden auf eine gesteigerte Wüchsigkeit der gesamten Pflanze zurückzuführen ist und erwartungsgemäß nicht einem einzigen Merkmal zugeschrieben werden kann. Zusätzlich wirkt sich der gesteigerte Kornertrag ebenfalls positiv auf den höheren TM-Ertrag der Hybriden im Vergleich zu den Elternlinien aus.

Im praktischen Anbau spielt die *mid-parent* bzw. *best-parent* Heterosis in der Entscheidung zwischen Hybriden und Liniensorten eine untergeordnete Rolle. Hier steht neben den Saatgutkosten lediglich der Vergleich der Ertragsleistung und Ertragsstabilität zwischen Hybriden und den besten Liniensorten im Vordergrund. Mühleisen et al. (2013a) berechneten diese „kommerzielle Heterosis“ (*commercial heterosis*, CH) anhand der Leistungsdifferenz einer Hybride zu der besten Liniensorte und ermittelten eine mittlere CH von 2,7% hinsichtlich des Kornertrags bei Gerste. In der vorliegenden Studie lag dieser Wert im Mittel über alle Hybriden bei -0,9% mit einer Spanne von -7,1% bis 5,4%, wobei die Linie mit der besten Kornertragsleistung im Mittel 90,3 dt/ha erzielte und die beste Testhybride 95,2 dt/ha. Letztendlich ist dieser Vergleich der besten Sorten in der Praxis allein maßgeblich. Hinsichtlich des TM-Ertrags zeigten die Testhybriden im Mittel eine CH von -0,8% mit einer Spanne von -13,1% bis 10,3%, wobei die beste Hybride hier 14,5 t/ha und die beste Linie 13,18 t/ha erreichte (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die Hybridzüchtung in Gerste bislang noch kein Garant für eine sichere Ertragssteigerung darstellt, durch zielgerichtete Selektion jedoch

bereits deutlich überlegene Hybridsorten erstellt werden können. Verglichen mit den bereits realisierten heterotischen Effekten von fremdbefruchtenden Arten, ist dieser bei Selbstbefruchtern (ausgenommen dem Reis) bislang dennoch weitaus geringer einzustufen. Dies wurde von Oettler et al. (2015) und Mühleisen et al. (2013a) für Weizen und Triticale teilweise auf eine fixierte Heterosis, die in allopolyploiden Spezies durch Interlocus-Interaktionen zwischen homoeologen Genen vermutet wird, zurückgeführt. Aufgrund der Diploidie kann die Heterosis in Gerste jedoch nicht einer fixierten Heterosis zugeschrieben werden. Überdies ist die Wirksamkeit einer „fixierten Heterosis“ nicht erwiesen, und die vergleichbare Ausprägung der Heterosis in Weizen, Triticale und Gerste bestätigt ihre Existenz jedenfalls vorläufig nicht.

Alternativ könnte die geringe genetische Distanz der Elternlinien in Kombination mit dem geringen Dominanz-Grad und günstigen additiv x additiv Epistasie-Effekten eine Erklärung für die geringere Heterosis in autogamen Getreidearten liefern (Longin et al. 2012, Mühleisen et al. 2013a). Der geringe Grad an Dominanzeffekten geht dabei vermutlich auf die autogame Vermehrung der Gerste zurück. Laut der Dominanzhypothese (Charlesworth und Willis 2009), der zufolge die Heterosis die Kehrseite der Inzuchtdepression bildet, müsste bei wiederholter Selbstbefruchtung ein Rückgang der Vitalität und Ertragsfähigkeit zu verzeichnen sein. Da dies jedoch bei selbstbefruchtenden Kulturarten wie Weizen oder Gerste nicht der Fall ist, kann angenommen werden, dass hier eine starke Selektion gegenüber rezessiven Allelen stattgefunden hat, wodurch Dominanzeffekte an Bedeutung verloren haben. Bei Nichtvorhandensein bzw. bei nur geringer Inzuchtdepression dürfte demnach auch nur vergleichsweise geringe Heterosis zu erwartet sein.

Boeven et al. (2016) fassten zusammen, dass neben den Dominanzeffekten auch unterschiedliche Allelfrequenzen der Elternlinien die Heterosis beeinflussen. Unterschiede in den Allelfrequenzen korrespondieren wiederum mit der genetischen Distanz, sodass diese als Prädiktor für die Hybridleistung verwendet werden kann. So konnten sowohl bei Mais (Smith et al. 1990, Melchinger 1993, 1999; Reif et al. 2003; vgl. Boeven et al. 2016) als auch bei Brassicaceen (Yu et al. 2005, Teklewold und Becker 2006), Reis (Liu und Wu 1998) und Sonnenblume (Cheres et al. 2000) Korrelationen zwischen genomischer bzw. phänotypischer Distanz und Heterosis bzw. Hybridleistung gefunden werden. Dabei stand die Stärke der Ausprägung stark in Abhängigkeit von dem jeweiligen betrachteten Merkmal. Auch in der vorliegenden Studie konnten schwache positive Korrelationen zwischen der genetischen Distanz und der MPH für Kornertag errechnet werden (Bernhard et al. 2017a), was die Vermutung nahelegt, dass durch eine Erhöhung der genetischen Distanz auch eine höhere Heterosis erreicht werden könnte. Eine enge genetische Basis der Elternlinien im jeweiligen Material dürfte im Umkehrschluss zu fehlender Korrelation mit der Heterosis führen (vgl. Boeven et al. 2016). Die mittlere genetische Distanz zwischen den Eltern-Pools der

vorliegenden Arbeit war nur geringfügig höher als die mittlere genetische Distanz innerhalb der Pools (Bernhard et al. 2017a), wodurch die Annahme einer zu geringen Poolbildung bestärkt wird. Dem zufolge dürfte durch die Erstellung genetisch diverserer Pools die Hybridzüchtung in autogamen Getreidearten vermutlich erheblich effizienter (Longin et al. 2012) und die Selektion überlegener Hybriden effektiver werden (Reif et al. 2007, Gowda et al. 2012). Als Beispiele können hier die Studien von Dudley et al. (1991) und Dhillon et al. (1993) angeführt werden, die einen Ertragsvorteil von 21% bei Hybriden aus der Kreuzung zwischen den Pools *Reid Yellow Dent* und *Lancaster Sure Crop* bzw. von 16% in *Flint x Dent* – Hybriden, verglichen mit Paarungen innerhalb der Pools, feststellen konnten (vgl. Reif et al. 2005).

Die Möglichkeit einer Ertragssteigerung durch Erhöhung der genetischen Distanz kann aus Abbildung 5 abgelesen werden. Hier sind die genetischen Distanzen der Elternkomponenten der jeweils fünf ertragsstärksten und schwächsten bzw. der fünf Hybriden mit dem höchsten bzw. niedrigsten Heterosiseffekt dargestellt. Die Methode der Berechnung ist bei Bernhard et al. (2017a) umfassend beschrieben. Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich zwar nicht signifikant, jedoch ist deutlich zu sehen, dass die Höhen der genetischen Distanzen zumindest für die TM-Ertragsleistung und die MPH für dieses Merkmal bei ertragsstärkeren Sorten tendenziell höher ist (TM-Ertragsleistung: $p = 0,128$; MPH für TM-Ertrag: $p = 0,073$).

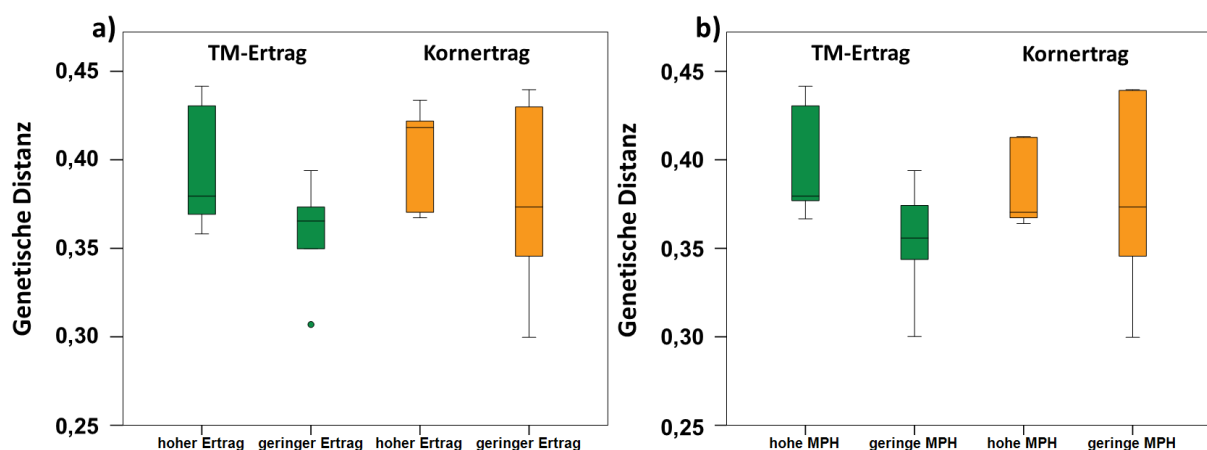


Abbildung 5: Genetische Distanzen der fünf Hybriden mit der höchsten und der fünf Hybriden mit der niedrigsten a) Ertragsleistung bzw. b) *mid-parent* Heterosis (TM- vs. Kornertrag, modifiziert nach Bernhard et al. 2017a).

Im Gegensatz dazu war hinsichtlich der genetischen Distanzen zwischen den Elternkomponenten für die Kornertragsgruppen bzw. die Gruppen mit hoher oder niedriger MPH kein Trend zu einer höheren genetischen Distanz erkennbar (Kornertragsleistung:

$p = 0,430$; MPH für Kornertag: $p = 0,844$). Dieser Umstand kann möglicherweise durch die starke Selektion auf das Merkmal Ertrag und die daraus resultierende geringe phänotypische Variabilität erklärt werden. Während die schwächste Hybride lediglich einen 12% geringeren Kornertag aufweist, beträgt der prozentuale TM-Ertragsunterschied hingegen 21%. Dies kann jedoch nicht auf den gelegentlich vermuteten und angeblich durch Züchtung verursachten Verlust an genetischer Diversität zurückgeführt werden. Wie Malysheva-Otto et al. (2007) beschrieben, gingen zwischen 1900 – 1929 und 1980 - 2000 in europäische Gerstensorten zwar 15,7% der Allele verloren, jedoch traten in Sorten des jüngsten Zulassungszeitraums auch immerhin 33,2% neue Allele auf. Hieraus ergibt sich mithin ein dynamisches System, das vermutlich auf ökonomische und strukturelle Veränderungen in der Landwirtschaft zurückzuführen ist. Wouw et al. (2010) führten eine Meta-Analyse hinsichtlich der genetischen Diversität verschiedener Kulturpflanzen durch und fanden ebenfalls keine signifikante Reduktion der allelischen Diversität zwischen 1929 und den 1990er Jahren. Die genetische Diversität innerhalb eines Genpools ist allerdings nicht gleichzusetzen mit der speziellen genetischen Diversität zweier Elternkomponenten für die Erzeugung ertragreicher Hybridsorten, da sie lediglich das Vorhandensein unterschiedlicher Allele in einem vorhandenen Set beschreibt, jedoch weder die Kombination innerhalb eines Genotyps noch die Einteilung in Pools mit hoher Kombinationseignung betrachtet. Diese Tatsache steht somit nicht im Widerspruch zu der Annahme, dass durch eine langjährige Linienzüchtung und dem regen Austausch von Zuchtmaterial über Unternehmens- und Landesgrenzen hinweg eine „Homogenisierung“ der genetischen Diversität in europäischen Elitelinien stattgefunden hat.

Somit schließen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse eine weitere erfolgreiche Steigerung des Heterosiseffekts und eine Steigerung des Ertragsvorteils von Hybriden gegenüber Liniensorten jedenfalls nicht aus. Die schwache Korrelation der Heterosis mit der genetischen Distanz der Elternlinien zeigt weiterhin, dass durch Bildung genetisch divergenter Pools ein höherer Heterosiseffekt erreicht werden könnte. Somit könnte durch Hybridzüchtung bei Berücksichtigung der diskutierten Punkte eine deutliche Biomasse- und Kornertagssteigerung im Wintergerstenanbau realisiert werden.

5.2 Kombinationseignung und Heterotische Pools in der Hybridzüchtung autogamer Getreidearten

In der Hybridzüchtung stehen neben der Eigenleistung und der genetischen Distanz der Elternlinien weitere Prädiktoren zur Verfügung, mit denen die Hybridleistung vorausgesagt werden kann und dadurch eine sichere Selektion der Elternlinien möglich ist. Die allgemeine Kombinationseignung (GCA) gibt dabei den generellen Ertragsvorteil von Hybriden mit dem

betrachteten Elter im Vergleich zu dem Mittelwert der Population an. Dadurch können Elternlinien bereits vorselektiert und kombiniert werden, ohne dass die betreffende Hybride direkt erzeugt und getestet werden muss. Die GCA lässt sich dabei auf additive Geneffekte zurückführen, die an dem heterotischen Effekt für das betrachtete Merkmal beteiligt sind (Gregorio und Senadhira 1993, Zhang et al. 2015). Als zweite Kennzahl findet die spezifische Kombinationseignung (SCA), die auf nicht-additive Geneffekte zurückzuführen ist, Anwendung in der Hybridzüchtung. Diese beschreibt den Ertragsvorteil einer spezifischen Kreuzung zweier Elternlinien im Vergleich zu der Gesamtpopulation (Gregorio und Senadhira 1993). In der vorliegenden Studie konnte sowohl ein signifikanter Einfluss der Summe der elterlichen GCA (GCA_{Sum}) als auch der SCA auf den TM-Ertrag festgestellt werden (Bernhard et al. 2017a). Der in der Literatur beschriebene hauptsächliche Einfluss additiver Geneffekte auf die Ausprägung des Kornertrags, wie von Corbellini et al. (2002) in Brotweizen und von Zhang et al. (2015) in Gerste gezeigt, konnte hier nicht bestätigt werden. An der Ausprägung des TM-Ertrags sind jedoch sowohl additive als auch nicht-additive Geneffekte beteiligt (vgl. Madić et al. 2014). Durch die Berechnung des Varianzverhältnisses von GCA_{Sum} / SCA ($\sigma^2_{GCA} / \sigma^2_{SCA}$), wie von Corbellini et al. (2002), Madić et al. (2014), und Zhang et al. (2015) für verschiedene Merkmale durchgeführt, kann weiterhin geschlossen werden, dass die SCA und damit nicht-additive Geneffekte den überwiegenden Einfluss auf die TM-Ertragsbildung haben. Diese Annahme wird durch die enge Korrelationen zwischen SCA und Hybridleistung für Korn- und TM-Ertrag unterstützt, während hingegen sowohl GCA_{Sum} als auch die mittlere Elternleistung eine schwächere bzw. vernachlässigbare Korrelation mit den Hybridleistungen zu Korn- und TM-Ertrag aufwiesen (Bernhard et al. 2017a). Deshalb stellen die mittlere Elternleistung ebenso wie die GCA_{Sum} bislang unzureichende Prädiktoren für die Hybridleistung dar, so dass die SCA in der Hybridzüchtung stets mitberücksichtigt werden muss. Dies wiederum setzt die Testung einer hohen Anzahl an Hybriden voraus, was einen hohen Aufwand und eine geringe Züchtungseffizienz mit sich bringt. Für eine effiziente und effektive Hybridzüchtung wäre im Umkehrschluss eine verlässliche Vorhersage mittels GCA_{Sum} bzw. mittlerer Elternleistung ein deutlicher Vorteil.

Unter Nichtberücksichtigung von Epistasie nimmt das Verhältnis von Additivvarianz (σ^2_{GCA}) zu Dominanzvarianz (σ^2_{SCA}) mit zunehmender genetischer Differenzierung der Elternpopulationen zu (Reif et al. 2007, Gowda et al. 2012, Longin et al. 2012). Im Umkehrschluss bedeutet das, dass ein geringes $\sigma^2_{GCA} / \sigma^2_{SCA}$ Verhältnis möglicherweise durch eine begrenzte genetische Differenzierung der Elternpools bedingt ist (vgl. Longin et al. 2013). Damit könnte die Bildung divergenter heterotischer Gruppen nicht nur, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, den Heterosiseffekt für Ertragsparameter erhöhen, sondern im gleichen Zuge die Vorhersage der Hybridleistung auf Basis der GCA verbessern (Reif et al. 2007, Longin et al. 2012, Zhao et al. 2015). Als heterotische Gruppen werden dabei Gruppen

verwandter oder nicht verwandter Genotypen derselben oder verschiedener Populationen beschrieben, die eine ähnliche Kombinationseignung und Heterosis zeigen, wenn sie mit einer genetisch unterscheidbaren heterotischen Gruppe gekreuzt werden (Melchinger und Gumber 1998, vgl. Reif et al. 2005). Bei der Wahl der heterotischen Gruppen zur Erzeugung von Hybriden gelten die von Melchinger und Gumber (1998) und Reif et al. (2005) beschriebenen Kriterien: (i) hohe durchschnittliche Leistung und hohe genetische Varianz der Hybridpopulation in der jeweiligen Zielregion, (ii) hohe *per se* Leistung und gute Adaptation der Elternpopulationen sowie (iii) ein höheres $\sigma^2_{GCA} / \sigma^2_{SCA}$ Verhältnis (vgl. Fischer et al. 2010). Ein so gebildetes spezielles Paar heterotischer Gruppen, das durch Kreuzung zu einer ausgeprägten Heterosis und Hybridleistung führt, wird dabei als heterotisches Muster (*heterotic pattern*) bezeichnet (Melchinger und Gumber 1998, Reif et al. 2005, Zhao et al. 2015). Auch Kempe et al. (2014) messen der Bildung heterotischer Pools, wie sie derzeit noch nicht existieren, eine hohe Bedeutung in der Hybridweizenzüchtung bei. Dies wurde bspw. durch die Ergebnisse von Fischer et al. (2010) gezeigt, die durch die Bildung heterotischer Pools mittels eines Enumerationsalgorithmus die MPH für den Kornertrag von Wintertriticale um 24% steigern sowie das $\sigma^2_{GCA} / \sigma^2_{SCA}$ Verhältnis um das 1,7-fache (verglichen mit ungruppierten Kreuzungen) erhöhen konnten. In Kreuzungen zwischen deutschen und kanadischen Sommerrapslinien mit chinesischen Semi-Wintertypen fanden Qian et al. (2007) eine durchschnittliche MPH von 15%. Sie konnten ebenfalls feststellen, dass hauptsächlich GCA-Effekte zu der Hybridleistung beitrugen und weniger SCA-Effekte. Sie stellten jedoch keine Korrelation zwischen genomischer Distanz der Eltern und der Hybridleistung bzw. Heterosis fest, was die Autoren mit der großen Diversität zwischen den gewählten Genpools begründeten. Eine hohe Korrelation zwischen genomischer Distanz und Hybridleistung kann folglich nur in Material aus Kreuzungen mit unterschiedlich hoher genomischer Distanz beobachtet werden, was jedoch nicht der Annahme widerspricht, dass die Hybridleistung, wie von Kempe et al. (2014) berichtet, mit steigender genetischer Distanz zunimmt.

Zusätzlich zu einer Ertragssteigerung würde auch die Etablierung von Wachstumsmerkmalen wie Pflanzenlänge sowie von Blüten- (z.B. Offenblütigkeit, Antherenexposition) und Blühcharakteristiken (z.B. Blühzeitpunkt und -dauer) durch die Bildung heterotischer mütterlicher bzw. väterlicher Pools vereinfacht werden (Longin et al. 2012). So konnte auch in der vorliegenden Arbeit ein verspäteter Blühzeitpunkt der Restorerlinien im Vergleich zu den Maintainerlinien beobachtet werden (Bernhard et al. 2017a). Die Züchtung auf solche synchronisierten Wachstumsmerkmale ist neben der Heterosis, wie für Triticale von Yeung und Larter (1972) beschrieben, ebenfalls essentiell für eine erfolgreiche Hybridsaatgutproduktion.

Die Bildung genetischer Pools würde weiterhin durch eine hohe Korrelation zwischen der Elternleistung *per se* und deren GCA erleichtert werden. Damit wäre der *per se* Zuchtwert

einer Linie gleichzusetzen mit ihrem Hybridzuchtwert (vgl. Gowda et al. 2012), wodurch stets geeignete Elternlinien für die Anwendung in der Linien- und in der Hybridzüchtung simultan selektiert werden könnten. Die aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangenen Pearson-Korrelationen zeigten Werte von $r = 0,708$ (Kornertrag) und $r = 0,638$ (TM-Ertrag) zwischen der Ertragsleistung und der GCA der Restorerlinien und von $0,634$ (Kornertrag) und $0,441$ (TM-Ertrag) zwischen der Ertragsleistung und der GCA der Maintainerlinien (Bernhard et al. 2017a). Dreisigacker et al. (2005) fanden, zum Vergleich, eine signifikante Korrelation von $0,86$ zwischen der mittleren Elternleistung und der GCA in Sommerweizen. Obwohl die Korrelationen auf der Restorerseite noch etwas höher sind als auf der Maintainerseite, reicht eine solche Korrelation nicht aus um einzig anhand der Elternleistung Hybridkreuzungen identifizieren zu können. Deshalb sollte ein Hybridzüchtungsprogramm getrennt von der Linienzüchtung und nicht wie bisher eher als Ableger durchgeführt werden (vgl. Gowda et al. 2012).

Neben dem Anteil der GCA und damit der additiven Effekte an der Merkmalsausprägung ist weiterhin die Umweltstabilität von großer Bedeutung für die Verlässlichkeit der GCA als Prädiktor. In der vorliegenden Studie konnte sowohl für die väterliche als auch für die mütterliche GCA eine höchst signifikante Umweltinteraktion hinsichtlich der TM-Ertragsleistung festgestellt werden (Bernhard et al. 2017a). Studien von Mühleisen et al. (2013a) für den Kornertrag in Gerste, von Gowda et al. (2012) in Winterweizen und von Oettler et al. (2005) in Triticale ergaben ebenfalls signifikante GCA x Umwelt – Interaktionen. Dies führt, ähnlich wie bei einem hohen SCA-Effekt in der Hybridzüchtung, zu einem erhöhten Aufwand, da Umwelteffekte stets durch mehrortige und mehrjährige Feldversuche dezimiert werden müssen. Eine Selektion geeigneter Elternlinien sollte folglich auch die Stabilität der GCA als Selektionskriterium einschließen.

In der vorliegenden Studie (Bernhard et al. 2017a) konnten somit entscheidende Erkenntnisse bezüglich des Anteils von GCA und SCA an der Merkmalsausprägung für Korn- und TM-Ertrag gewonnen werden. Sie zeigen, dass in derzeitigen Hybridzüchtungsprogrammen die Dominanzeffekte einen erheblichen Einfluss auf die Heterosis des TM-Ertrags haben. Hierdurch konnte geschlussfolgert werden, dass besonders die Bildung genetisch divergenter heterotischer Pools zur Steigerung des $\sigma^2_{GCA} / \sigma^2_{SCA}$ Verhältnisses beitragen würde. Dadurch wären neben höheren heterotischen Effekten auch eine effizientere Elternkomponententestung und damit eine vereinfachte Selektion geeigneter Hybriden möglich. Wintergerste könnte durch derart verbesserte Hybridzüchtungsprogramme zu einem wertvollen Bestandteil des Artenspektrums für die Biogasproduktion werden und dabei gleichzeitig eine nicht zu unterschätzende Steigerung ihrer Kornertragsleistung erfahren.

5.3 Untersuchung der spontanen thermosensitiven Fertilitätsrestauration des *msm1*-Sterilitätssystems in Gerste

Ein erhebliches Hindernis der erfolgreichen Hybriderstellung in Wintergerste stellt derzeit die spontane thermosensitive Fertilitätsrestauration dar. Eine gezielte Bearbeitung dieses Merkmals erfordert sowohl fundierte Kenntnisse über den Wirkmechanismus des verwendeten *msm1*-Cytoplasmas als auch über die physiologischen Stadien, die von einer solchen spontanen, temperaturabhängigen Fertilitätsrestauration betroffen sind. Hinsichtlich der CMS in Gerste sind bisher weder die genauen Wirkmechanismen noch die beteiligten Gene bekannt. Eine Zuordnung des *msm1*-Sterilitätssystems zu den in der Einleitung dargestellten Wirkmechanismen war deshalb bislang nicht möglich. Um das CMS-System in Gerste ausgiebig mit bekannten Systemen aus anderen Kulturpflanzen vergleichen zu können, sind eingehende Untersuchungen hinsichtlich der genotypischen Variation und des Entwicklungsstadiums, in dem Umwelteinflüsse zur spontanen Fertilitätsrestauration führen, notwendig. Bislang konnten lediglich wenige Hinweise aus phänotypischen Studien als Ansatzpunkt für eingehendere Untersuchungen des Sterilitätssystems abgeleitet werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, sowohl genotypische Variation hinsichtlich der spontanen Fertilitätsrestauration in modernen CMS-Mutterlinien aufzudecken, als auch die Entwicklungsstadien der Sterilitätsinduktion und der spontanen thermosensitiven Fertilitätsrestauration in Gerste zu untersuchen. Wie bei Bernhard et al. (2017b) dargestellt, wurden unterschiedliche CMS-Mutterlinien in Gewächshaus- und Klimakammerversuchen für eine möglichst genaue Investigation der genannten Merkmale angebaut. Dabei sollte zunächst durch mikroskopische Aufnahmen der Antheren steriler Kontrollpflanzen das Stadium der Sterilitätsinduktion anhand der vorhandenen Pollenstrukturen eingegrenzt werden. Wie auch bereits von Abdel-Ghani et al. (2013) und Ui et al. (2014) gezeigt, waren die sterilen Antheren der Gersten-CMS-Mutterlinien weißlich und verkümmert, wohingegen fertile Antheren größer waren und eine gelbliche Farbe aufwiesen. Da sowohl das Antherengewebe nicht vollständig ausgebildet zu sein schien als auch keine Pollenvorstufen bzw. degenerierte Mikrosporen in den Antheren sichtbar waren, konnte zunächst darauf geschlossen werden, dass bei Gerste eine sporophytische Hemmung der Pollenbildung vorliegt (Abbildung 6).

Chase (2007) sieht die Degeneration der Antheren, die Kennzeichen eines PCD oder eines nekrotischen Zelltods trägt, als eine Möglichkeit der phänotypischen Ausprägung von CMS. Das konnte beispielweise von Balk und Leaver (2001) im PET1-Cytoplasma der Sonnenblume gezeigt werden, wo die Sterilität durch Letalität der Tapetumzellen hervorgerufen wurde. Der Zelltod begann hierbei im Pachytän-Stadium der Meiozyten und führte im Tetradenstadium zur vorzeitigen Degeneration des somatischen Antherengewebes.



Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahme der Anthere einer cytoplasmatisch-kerngenisch männlich sterilen Gersten-Mutterlinie. Antheren steriler Mutterlinien zeigten unter Kontrollbedingungen keinerlei pollenähnliche Strukturen (modifiziert nach Bernhard et al. 2017b).

Bereits Ahokas (1978) untersuchte die Zytologie der Antheren steriler (*msm1*-Cytoplasma), fertiler und restaurierter (*Rfm1*-Restorergeren) Gersten und konnte dabei eine erhöhte Produktion und eine unkontrollierte Sekretion von Sporopollenin durch das Tapetum in den Antheren der CMS-Linie feststellen. Das überschüssige Sporopollenin sammelte sich in den Kammern der Antheren, welche schließlich kollabierten. Daraus schloss er einen möglichen Energieverlust durch die Biosynthese der Sporopollenin-Vorstufen, sodass die Sterilität durch unzureichende Energiebereitstellung durch das Tapetum hervorgerufen werden könnte. Die eigenen Beobachtungen in der vorliegenden Studie lassen zwar keine genaue Eingrenzung der Sterilitätsursache zu, erlauben jedoch ebenfalls den Schluss auf eine Degeneration des Antherengewebes. Weiterhin zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deutlich, dass die Degeneration hier spätestens zum Tetradenstadium der PMZ stattfinden muss, da sonst in den Aufnahmen degenerierte Mikrosporen zu erkennen sein müssten (Bernhard et al. 2017b). Die Synthese der Sporopollenin-Vorstufen beginnt jedoch nach Dickinson und Bell (1976), Ariizumi und Toriyama (2011) und Shi et al. (2015) nach Beendigung der Meiose und eine Anlagerung von Sporopollenin findet dann nach Dickinson und Bell (1976) und El-Ghazaly und Jensen (1986) im direkten Anschluss an das Entlassen der Mikrosporen aus den Tetraden statt. Die in der vorliegenden Arbeit (Bernhard et al. 2017b) gewonnenen Ergebnisse deuten jedoch eher auf einen Zeitpunkt vor dem Tetradenstadium hin, da in sterilen Antheren ansonsten Tetraden- oder sogar erste Mikrosporenstrukturen zu erkennen gewesen sein müssten. Um das genaue Stadium des Mikrosporenaborts genauer eingrenzen zu können und

dadurch Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus des *msm1*-Cytoplasmas ziehen zu können, sind jedoch eingehendere Untersuchungen nötig.

Des Weiteren sollte in der vorliegenden Arbeit durch Transfer der CMS-Mutterlinien zwischen einer Klimakammer mit Kontrollbedingungen (16°C / 16 h; 12°C / 8 h) und einer Klimakammer mit erhöhten Temperaturen (30°C / 16 h; 24°C / 8 h) zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Zeitpunkt der spontanen temperaturabhängigen Fertilitätsrestauration eingegrenzt und dadurch eine umfassendere Studie des Phänotyps und des genetischen Hintergrundes ermöglicht werden. Zunächst konnte dadurch die von Abdel-Ghani et al. (2013) beschriebene spontane Restauration steriler Linien trotz Abwesenheit des bekannten Restorergens *Rfm1* bestätigt werden. Die Restauration trat dabei nach einer Behandlung mit erhöhter Temperatur auf und führte in einem Teil der untersuchten Linien zur Ausbildung fertiler Antheren und eines deutlichen Kornansatzes (Abdel-Ghani et al. 2013; Bernhard et al. 2017b). Bislang wurde dieser Effekt der Umwelt auf die Ausprägung männlicher Sterilität hauptsächlich in kerngenischer männlicher Sterilität beschrieben und je nach Einflussfaktor als photoperiodisch-sensitive kerngenische männliche Sterilität (PGMS) oder Temperatur-sensitive kerngenische männliche Sterilität (TGMS) bezeichnet. Besonders in der Zwei-Linien-Hybridzüchtung bei Reis finden TGMS- und PGMS-Systeme heute Anwendung (Guo und Liu 2012) und auch in der Hybridzüchtung von Raps findet ein solches System, das als Männliche Sterilität Lembke (MSL; Stiewe et al. 2008) bekannt ist, breite Anwendung (Abbadi und Leckband 2011). Der erste Bericht über eine spontane Reis-Mutante (Nongken 58S), deren Fertilität hauptsächlich durch die Photoperiode reguliert wurde, erschien 1973. Im Jahr 1988 wurde die Temperatur-sensitive kerngenisch männlich sterile *indica* Reis-Mutante AnNong S-1 (*O. sativa* ssp. *indica*) entdeckt. Diese ist unter hohen Temperaturen (33°C) männlich steril, während sie beim Anbau unter niedrigeren Temperaturen (24°C) Fertilität aufweist. Die Fertilitätsrestauration konnte dabei sowohl bei der photosensitiven als auch bei der temperaturabhängigen Mutante auf die prämeiotischen Stadien eingegrenzt werden (Li et al. 2007). Auch in Weizen wurde eine TGMS beschrieben, die bei Temperaturen von unter 10°C zum Zeitpunkt der Ährchendifferenzierung steril und bei Temperaturen über 10°C zum gleichen Zeitpunkt fertil wurde. Diese Fertilitätsrestauration wurde dabei von einem einzigen rezessiven Gen (*wtms1*) kontrolliert (Xing et al. 2003). Laut Sreenivasulu und Schnurbusch (2012) fällt der Zeitpunkt der Ährchendifferenzierung dabei mit dem Zeitpunkt bzw. dem Stadium der Bestockung zusammen.

Auch in einigen anderen CMS-Systemen verschiedener Kulturpflanzen konnte, wie eingangs beschrieben, bereits ein Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Fertilitätsrestauration beobachtet werden (vgl. Bückmann et al. 2013, 2016 und Fan und Stefansson 1986). Die Wirkmechanismen, die ausgelöst durch einen Umwelteinfluss wie Temperatur, zur Restauration der männlichen Sterilität führen, sind bislang nicht ausreichend erforscht. Jedoch

sind ihre Ausprägungen vergleichbar mit denen bekannter Restorer Gene (Rf) in CMS-Systemen bzw. den Auswirkungen bestimmter Temperaturen oder Photoperioden in umweltabhängigen genischen männlichen Sterilitätssystemen.

Da nicht alle der hier untersuchten Gerstenlinien mit einem erhöhten Kornansatz auf die Behandlung mit höheren Temperaturen reagierten, kann von einer signifikanten genetischen Variation ausgegangen werden. Dies konnte bereits von Abdel-Ghani et al. (2013) gezeigt werden und ist von großer Bedeutung für die Hybridgerstenzüchtung, da es die Möglichkeit der Verbesserung der Züchterpools durch zielgerichtete Selektion einschließt. In der vorliegenden Studie (Bernhard et al. 2017b) wurde jedoch zusätzlich zur genetischen Variation das Entwicklungsstadium der spontanen Fertilitätsrestauration untersucht. Hierbei konnte die höchste Thermosensibilität des *msm1*-Systems in Gerste in der Behandlung der Pflanzen mit erhöhten Temperaturen vom Stadium des Ährenschwellens bis zur Reife eingegrenzt werden. Diese Behandlung umfasste hinsichtlich der Ährenentwicklung die Stadien der Blütenentwicklung, beginnend zwischen erster und zweiter Pollenmitose über Pollenreife, Blüte und Kornwachstum (vgl. Gómez und Wilson 2012). Die temperaturbedingte Fertilitätsrestauration tritt somit effektiv erst in der finalen Phase der Blütenentwicklung auf, wobei sie hier zur Bildung von funktionalen Pollenkörnern und zu einem signifikanten Anstieg des Kornansatzes führt (Bernhard et al. 2017b). Da, wie in Abbildung 6 zu sehen, die Antheren stabil-steriler Pflanzen keinerlei Pollenstrukturen zeigten, kann einerseits zwar geschlossen werden, dass das *msm1*-System, wie zuvor beschrieben, spätestens zum Tetradenstadium in die Antherenentwicklung eingreift, andererseits werfen diese Ergebnisse jedoch auch die Frage auf, wie die zuvor gehemmte Pollenentwicklung durch die spätere Einwirkung höherer Temperaturen fortgesetzt werden und zur Bildung eines befruchtungsfähigen Pollens führen kann (Abbildung 7).

Auch bei der von Ahokas (1978) vermuteten Sterilitätsinduktion durch eine erhöhte Produktion von Sporopollenin müsste somit ein Abbruch durch den Einfluss höherer Umgebungstemperaturen und eine Fortsetzung des Pollenwachstums möglich sein. Eine nachhaltige Schädigung des Antherengewebes, im speziellen des Tapetums, dürfte in jedem Falle zuvor nicht stattgefunden haben, da die Antheren dann nicht mehr funktional wären.

Anhand des Vergleichs der kurzzeitigen und der dauerhaften Behandlung zum Ährenschieben lässt sich annehmen, dass eine Fertilitätsrestauration womöglich eher zum Zeitpunkt der Pollenreife (nach Abschluss der zweiten Mitose) stattfindet, da die kurzzeitige Behandlung (DC 41 – 50) keine signifikant höhere Fertilität bewirkte (Bernhard et al. 2017b). Dies würde jedoch wiederum der Annahme widersprechen, dass die umweltbedingte Fertilitätsrestauration kurz nach der Sterilitätsinduktion folgt.

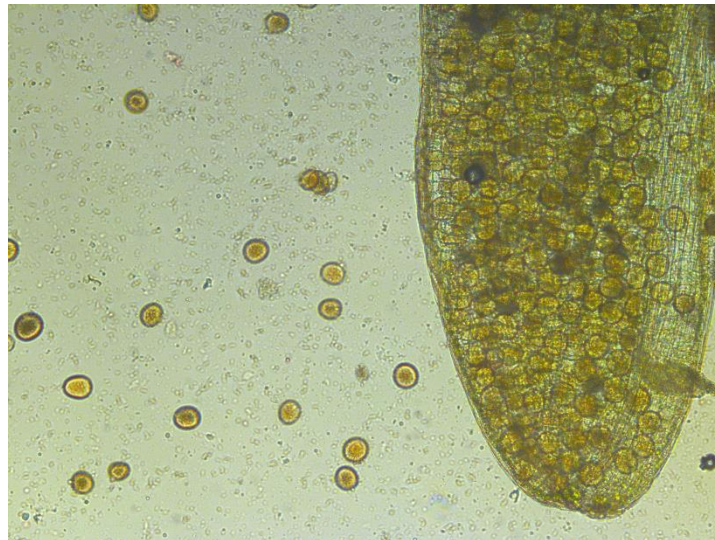


Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahme der Anthere einer thermosensitiven cytoplasmatisch-kerngenisch männlich sterilen Gersten-Mutterlinie nach Einwirkung von erhöhter Temperatur vom Stadium des Ährenscheidens bis zur Reife. Antheren, deren Fertilität temperaturinduziert restauriert wurde, wiesen eine deutliche Mikrosporenbildung auf (modifiziert nach Bernhard et al. 2017b).

Eine Schädigung des Tapetums und der Mikrosporen dürfte dennoch nicht stattgefunden haben, bzw. müsste reversibel sein. Da jedoch kein Zusammenhang zwischen der Dauer der Temperatureinwirkung und der Fertilität festgestellt werden konnte (Bernhard et al. 2017b), wird die Annahme bekräftigt, dass einzig der Zeitpunkt der Temperatureinwirkung den unterschiedlichen Grad der Fertilitätsrestauration bestimmt, und der Fertilitätsgrad von der Dauer der Temperatureinwirkung unabhängig ist. Song et al (2013) beschrieben ein Zwei-Linien-Hybridsystem in Weizen, bei dem die CMS auf *Aegilops kotschy* zurückgeht. Hierbei blieben die Weizenlinien bei Anbaubedingungen von unter 18°C männlich steril, konnten jedoch bei Temperaturen von über 20°C zum Entwicklungsstadium 45-52 partiell restauriert werden. Song et al. (2014) war es möglich die Abweichungen in der Pollenentwicklung einer ähnlichen sterilen Linie auf das binukleare Stadium des Pollens zu begrenzen, da hier erste sterile Antheren auftraten. Nur wenige Pollen durchliefen die zweite Mitose, wodurch die meisten Pollen hüllenartige Strukturen ohne Protoplast aufwiesen. Bei diesen Untersuchungen trat die Restauration folglich vermutlich zu einem ähnlichen Stadium wie in der vorliegenden Studie auf (Bernhard et al. 2017b), jedoch waren Überreste degenerierter Pollen erkennbar, was wiederum auf einen späteren Zeitpunkt der Sterilitätsinduktion hinweist. Dies ist ein weiteres Anzeichen dafür, dass Sterilitätsinduktion und Fertilitätsrestauration in diesem CMS-System bei Wintergerste zeitlich weiter auseinanderliegen dürften.

Die genetische Determination der spontanen umweltbedingten Fertilitätsrestauration in Gerste ist bislang gänzlich ungeklärt. Es kann jedoch aufgrund der Abwesenheit des bekannten Restorergens (*Rfm1*) angenommen werden, dass weitere Gene mit vergleichbarer Wirkung vorliegen müssen. Ahokas (1980) untersuchte 82 *H. spontaneum*-Akzessionen hinsichtlich ihrer Restaurationsfähigkeit und fand heraus, dass 38% der Akzessionen Maintainereigenschaft und 14% Restorereigenschaft besaßen, während der größte Teil (48%) partielle Restorer waren. Der Autor konnte so 14 Restorer Gene sowie drei Fälle von Allelismus des *Rfm1a*-Gens beschreiben. Weiterhin schloss er aus den Ergebnissen, dass die partielle Restauration in den meisten Fällen von mehr als einem Allel bzw. Gen beeinflusst wurde, während die Restorer Gene, die zu einer vollständigen Restauration führten, auf einem einzelnen Locus beruhen sollten.

Kim et al. (2013) untersuchten eine thermo-sensitive CMS-Linie in *Capsicum annuum*, die bei Temperaturen oberhalb von 15°C männlich steril und bei Temperaturen unterhalb von 13°C männlich fertil war. Hierbei wurde die Sterilität durch eine abnormale Entwicklung der Tapetumzellen induziert, wobei ein Defekt in der Kallose-Biosynthese als Hauptgrund für die Sterilität vermutet wurde. Das fertilitätsrestaurierende Kerngen konnte von den Autoren als ein Allel (*Rf^{TCMS}*) am *Rf*-Lokus beschrieben werden, das rezessiv gegenüber dem *Rf*-Allel, jedoch dominant gegenüber dem *rf*-Allel war. Eine mögliche Begründung für die thermo-sensitive Fertilitätsrestauration der Gerste in Abwesenheit des *Rfm1*-Gens könnte demnach in einem oder mehreren, bislang unbekannten Restorer Genen im Kerngenom der Wintergerste sein. Eine eingehendere Untersuchung des genetischen Hintergrunds wäre mit Hilfe der hier vorgestellten Phänotypisierungsmethode durchführbar. Auf diese Weise könnten an der Instabilität beteiligte Gene kartiert und durch zielgerichtete Selektion aus den Materialpools entfernt werden.

Eine erhebliche Problematik bei der Phänotypisierung der CMS-Instabilität ergab sich jedoch durch den auftretenden Hitzestress. Dieser äußerte sich besonders in den Behandlungen zu frühen Entwicklungsstadien (DC 31, DC 39), ähnlich wie bei Friend et al. (1963) und Friend (1965) für Weizen beschrieben, durch die Reduzierung der Ährchenzahl pro Ähre und könnte somit auch zu einer Beeinträchtigung der Pollenvitalität, der Fertilität und folglich einer geringeren Kornzahl pro Ähre geführt haben (vgl. Johnson und Kanemasu 1983). In den Behandlungen zu Entwicklungsstadium DC 50 konnte hingegen keine Reduzierung der Ährchenzahl beobachtet werden. Die Temperatur-induzierte Sterilität könnte auf diese Weise einer Temperatur-induzierten Fertilitätsrestauration entgegengewirkt haben (Bernhard et al. 2017b). Sakata et al. (2000) beschrieben gerade die Stadien der frühen Ährendifferenzierung, der Phase direkt vor der Meiose sowie meiotischer Stadien der Pollenmutterzelle selbst als besonders sensibel gegenüber hohen Temperaturen. Die jeweiligen Pflanzen zeigten dadurch eine veränderte Antheren- und Pollenentwicklung, die zu einer Phytohormon-induzierten

Sterilität führte. Negative Effekte erhöhter Temperaturen wurden schon für *Sorghum bicolor* (Vara Prasad et al. 2006) und Tomaten (Firon et al. 2006) beschrieben. Bei Baumwolle konnten Marshall et al. (1974) eine durch erhöhte Temperaturen und größere Tageslänge verursachte Steigerung der Sterilität feststellen. Dabei waren Temperaturen von über 33°C notwendig für die Expression des CMS-Systems, wohingegen Temperaturen von über 36°C zu Sterilität der Maintainerlinien führten. Auch der entgegengesetzte Effekt wurde bereits in einer Vielzahl von Kulturpflanzen beschrieben. Brooking (1976) konnte das sensible Stadium gegenüber niedrigen Temperaturen in *Sorghum bicolor* auf das frühe Meiose-Stadium begrenzen, während Satake und Hayase (1970) in Reis die größte Sensibilität gegenüber niedrigen Temperaturen im Stadium der Freisetzung der Mikrosporen aus den Tetraden festmachen konnten.

Abiko et al. (2005) stellten fest, dass die größte Sensitivität von Gerste zum 5-Blatt-Stadium beginnt. Eine Einwirkung von erhöhten Temperaturen (30°C Tag; 25°C Nacht) zu diesem Stadium für eine Dauer von fünf Tagen führte zu einem Abbruch der Pollenentwicklung. Der Anbau unter konstant hohen Temperaturen war für die Durchführung der Versuche jedoch unabdingbar, da aufgrund der teilweise relativ kurzen Behandlungsdauer eine klare Abgrenzung zu den Kontrollbedingungen erreicht werden musste. Eine Selektion thermostabiler CMS-Mutterlinien sollte demnach zu einem späten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung erfolgen, da sie zu einem frühen Zeitpunkt durch Hitzestresseinwirkung verfälscht werden kann. Unabhängig von dem aufgetretenen Hitzestress konnten mittels der hier durchgeführten Phänotypisierung sowohl eine klare genotypische Variation als auch deutliche Unterschiede zwischen den Zeitpunkten der Temperaturbehandlung festgestellt werden.

5.4 Folgerungen aus den durchgeführten Studien

Hybridzüchtung ist, wie vielfach gezeigt werden konnte, eine sehr vielversprechende Möglichkeit einer Steigerung der wirtschaftlichen Flächenerträge auch in autogamen Getreidearten. Gerade bei der Wintergerste lassen sich hierdurch nicht nur die Korn- sondern auch die Biomasseerträge deutlich steigern, wodurch die Wintergerste als Winterzwischenfrucht zur Nutzung als Biogassubstrat erheblich an Bedeutung gewinnt. Wie aus den durchgeführten Versuchen und aus Vergleichen mit aktueller Literatur hervorgeht, ist besonders der derzeitige Mangel einer ausreichenden Poolbildung als Hauptgrund für eine bisher noch relativ geringe Heterosis zu nennen. Hier könnten durch Steigerung der genetischen Distanz der Elternlinien womöglich deutlich höhere Heterosiseffekte und dadurch bedingte Ertragsvorteile gegenüber Liniensorten erreicht werden. Um

Hybridzüchtungsprogramme jedoch erfolgreich etablieren zu können, ist eine entsprechende Fokussierung der Züchtung notwendig.

Das derzeitige Hauptproblem für die Erzeugung stabiler CMS-Mutterlinien und eine darauf basierende, sichere Erstellung von Hybridsorten mit einer hohen Hybridität ist die Instabilität des verwendeten *msm1*-Cytoplasmas. Die vorliegende Arbeit hat erheblich zur Erforschung dieser Problematik beigetragen. Anhand einer umfassenden Phänotypisierung konnte die genetische Variation als Grundlage der züchterischen Bearbeitung für das Merkmal der spontanen thermosensitiven Fertilitätsrestauration charakterisiert werden. Ferner konnten die Entwicklungsstadien, zu denen das CMS-System die Sterilität verursacht und die spontane Fertilitätsrestauration eintritt, eingegrenzt werden. Durch diese neuen Erkenntnisse ist nun eine detailliertere Untersuchung der Wirkmechanismen möglich, um zukünftig ein besseres Verständnis der spontanen umweltabhängigen Fertilitätsrestauration im CMS-System der Gerste zu erhalten. Des Weiteren ist eine umfassendere Phänotypisierung der Meiose und Pollenbildung zur Identifizierung der genetischen Faktoren, die dieses komplexe Merkmal determinieren, unabdingbar, um daraus diagnostische Marker für eine markergestützte Selektion und effiziente Hybridgerstenzüchtung zu entwickeln.

6. Zusammenfassung

Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ist, gemessen an der Produktionsmenge, das weltweit fünftwichtigste Getreide. Neben der Verwendung in Brau- und Brennprozessen und in der menschlichen Ernährung wird speziell Wintergerste vorrangig als Futtermittel eingesetzt. Neben diesen Verwertungsrichtungen, bei denen das Hauptaugenmerk auf der Erzielung eines hohen Kornetrags liegt, bietet die Biogasproduktion ein weiteres Einsatzgebiet, in dem Wintergerste zur Ernte als Ganzpflanzensilage Anwendung finden und zur Diversifizierung der Pflanzenartenauswahl beitragen kann.

Entscheidend für die Konkurrenzfähigkeit von Wintergerste als Ganzpflanzensilage ist die Steigerung der derzeit vergleichsweise geringen Trockenmasseerträge. Wie in anderen Kulturen gezeigt wurde, konnten jedoch durch den Anbau von Hybridsorten und dem damit verbundenen Heterosiseffekt neben der Steigerung von Kornträgen auch die Trockenmasseerträge erheblich erhöht werden. Die Hybridzüchtung wurde durch das in den 1970er Jahren in Wildgerste (*Hordeum spontaneum*) entdeckte und in den 1990er Jahren in europäisches Elitematerial eingekreuzte cytoplasmatisch-kerngenische männliche Sterilitätssystem (CMS) auch in Gerste ermöglicht. Da die Hybridzüchtung in Gerste, wie auch in anderen autogamen Getreidearten, eine noch sehr junge Methode ist und derzeit noch eine untergeordnete Rolle spielt, sollte der Ertragsvorteil von Hybriden gegenüber den Elternlinien in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dazu wurden in mehrortigen und mehrjährigen Feldversuchen 97 faktorielle Testhybriden auf ihren Korn- und Trockenmasseertrag hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Erzielung eines Ertragsvorteils von ca. 10% gegenüber den Elternlinien für beide Merkmale durchaus realisierbar ist, und sich Produktivität und Konkurrenzfähigkeit auf diese Weise signifikant verbessern lassen. Des Weiteren konnte aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass besonders die enge genetische Basis der Elternlinien verbunden mit dem Nichtvorhandensein genetisch differenzierter heterotischer Pools als Hauptgründe für den im Vergleich zu fremdbefruchtenden Arten relativ geringen Heterosiseffekt zu nennen sind. Hier wären durch gezielte Züchtung genetisch diverser Elternlinien sowohl mit einer hohen Leistung *per-se* als auch einer hohen allgemeinen und speziellen Kombinationseignung durchaus höhere Heterosiseffekte erzielbar. Dadurch kann die Entwicklung von Zweinutzungssorten sowohl für die Körnernutzung als auch für die Nutzung als Ganzpflanzensilage erheblich verbessert werden.

Ein weiterer bedeutender Grund für die derzeit noch geringe Anzahl an Hybrid-Wintergerstensorten ist die Instabilität des CMS-Systems. Diese führt in Abhängigkeit von Umgebungstemperatur und Photoperiode zu einer spontanen Fertilitätsrestauration der sterilen Mutterlinien, wodurch sowohl die Erhaltung der Mutterlinien selbst als auch die

Erzeugung von reinem Hybridsaatgut erheblich erschwert wird. Obwohl diese Umstände seit der Entdeckung des Hybridsystems bekannt waren, sind bislang keine genetisch determinierten Ursachen für die spontane Fertilitätsrestauration bekannt.

Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, genotypische Unterschiede zwischen CMS-Mutterlinien aufzudecken sowie die Eingrenzung dieses Vorgangs auf ein Entwicklungsstadium zu ermöglichen. Dadurch sollten sich wiederum Rückschlüsse auf die Wirkmechanismen und die involvierten genetischen Hintergründe ziehen lassen. Anhand von drei sterilen Mutterlinien, die in Klimakammerversuchen zu verschiedenen Entwicklungsstadien einer erhöhten Temperatur ausgesetzt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass neben temperatursensitiven Linien auch solche existieren, die trotz Temperaturreiz steril blieben und keinerlei Kornansatz zeigten. Es konnte ebenfalls anschaulich gezeigt werden, dass die Antheren dieser Pflanzen keinerlei Pollen-ähnliche Strukturen aufwiesen, was die Annahme bekräftigt, dass das CMS-System die Entwicklung der Antheren und Pollen vermutlich vor dem Tetradenstadium einschränkt, wodurch es nicht zur Ausbildung von Mikrosporen kommt. Bei Linien wiederum, die mit einer spontanen Fertilitätsrestauration auf eine erhöhte Umgebungstemperatur reagierten, konnte gezeigt werden, dass hier hingegen Mikrosporen in den Antheren enthalten sind. Das temperaturanfällige Stadium der spontanen Fertilitätsrestauration ließ sich weiterhin auf das Entwicklungsstadium der Pollenreife (nach Abschluss der zweiten Mitose) begrenzen, da eine erhöhte Temperatur ausschließlich zu diesem Stadium zu einem signifikant höheren Kornansatz führte.

Die in der vorliegenden Arbeit erlangten Erkenntnisse konnten einerseits erheblich zu einem verbesserten Verständnis der Heterosis in Wintergerste beitragen und Hinweise auf mögliche Ursachen für den derzeit vergleichsweise geringen Heterosiseffekt liefern. Des Weiteren tragen die Ergebnisse bzgl. der spontanen Fertilitätsrestauration maßgeblich zur Eingrenzung der temperaturabhängigen Entwicklungsstadien bei und ermöglichen eine gezielte Phänotypisierung möglicher stabiler Mutterlinien. Gerade hierfür kann durch die Entwicklung und den zukünftigen Einsatz molekularer Marker eine effiziente Selektion geeigneter Elternkomponenten und dadurch eine erfolgreiche Hybridgerstenzüchtung ermöglicht werden.

7. Summary

Barley (*Hordeum vulgare* L.), measured by the production quantity, is the world's fifth most important cereal. Besides its usage in brewing and distilling processes and in human nutrition, especially winter barley is mainly grown for animal feed. In addition to these production purposes, where the focus is on a high grain yield, winter barley can be used as whole plant silage for the bioenergy production and thereby contribute to a diversification of the energy crop repertoire. Most important for the competitiveness of winter barley as whole plant silage is the increase of the – to date still relatively low – dry matter yields. As shown for other crops, the cultivation of hybrids and the thereby exploited heterosis effect could lead to a significantly higher grain and dry matter yield.

Hybrid breeding in barley was enabled by the cytoplasmic male sterility system (CMS) found in the 1970th in wild barley (*Hordeum spontaneum*) and crossed into European elite material in the 1990th. Because hybrid breeding in barley, as in other autogamous cereals, is a very young method, which currently plays only a minor role, this study aimed to investigate the yield advantage of hybrids compared to parental lines.

A total of 97 factorial test hybrids were analyzed for their grain and dry matter yields in multi environmental field trials. It was shown that a yield advantage of approx. 10% compared to the parental lines is feasible for both traits and that the productiveness and competitiveness of barley can thus be significantly increased. Furthermore, it could be concluded from the results that especially the narrow genetic basis of the parental lines combined with missing genetically diverse heterotic pools are the main reasons for the relatively low heterotic effect compared to allogamous species. Breeding focused on genetic diverse parental lines with a high yield performance *per-se* and high general and specific combining abilities can lead to a higher heterosis, and thus the development of dual-purpose varieties for grain and whole plant silage production can be considerably improved.

A further substantial reason for the low number of hybrid winter barley varieties is the instability of the CMS system. This matter leads to a spontaneous fertility restoration of sterile mother lines in dependence to the ambient temperature and the photoperiod and thus to aggravated maintenance of mother lines and development of true hybrid seeds.

Although these circumstances were known since the discovery of the hybrid system, the genetically determinant cause for the spontaneous fertility restoration is still unknown. This study therefore aimed to reveal genotypic differences between CMS mother lines and to identify the developmental stage in which this process occurs, enabling conclusions about the mechanisms and their genetic background. Using three sterile mother lines, which were grown

in climate chambers and exposed to higher temperature at different developmental stages, it could be shown that, besides temperature sensitive maternal lines, stable maternal lines also existed that remained sterile despite the temperature treatment and showed no kernel setting. Anthers of these plants were free of pollen-related structures. This supports the assumption that the CMS system suppresses the development of the anthers and pollens prior to the tetrad stage, and thus formation of anthers and microspores does not occur. However, lines that reacted with fertility restoration to a higher ambient temperature developed microspores within the anthers. Furthermore, the developmental stage affected by the temperature could be restricted to the stage of pollen maturation (after the second mitosis), because a higher temperature only led to a significantly higher kernel setting when occurring during this stage.

The insights obtained in this study could – on the one hand – contribute to an improved knowledge of heterosis in winter barley and deliver indications on possible reasons for the relatively low heterotic effect. On the other hand, the results regarding the spontaneous fertility restoration contribute significantly to the restriction of the temperature dependent developmental stage and facilitate a directed phenotyping of stable mother lines. Especially for this purpose, the development and future usage of molecular markers can enable an efficient selection of appropriate parental components and thereby a successful hybrid barley breeding.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 5: Darstellung eines Ährchens einer sechszeiligen Wintergerste in der a) Außenansicht und der b) Innenansicht (LB = Laterale Blütchen, ZB = Zentrales Blütchen, Gr = Granne, Ra = Rachis [Spindel], DS = Deckspelze, VS = Vorspelze).

Abbildung 2: Durchschnittliche jährliche Produktionsmengen der führenden Gerstenproduzenten in den Jahren 2010 – 2014 in Millionen Tonnen (Quelle: www.fao.org).

Abbildung 3: Schematische Darstellung verschiedener Ebenen (*G* = genomisch Ebene, *R* = mRNA-Ebene, *P* = Proteinebene, *M* = Metabolische Ebene) von Mitochondrien-Kerngen-Interaktionen im System der cytoplasmatisch-kerngenischen männlichen Sterilität (CMS). (*MSG* = Kerngene, die Mitochondrien-gerichtete Proteine codieren (Mitochondrion-sorting genes), *TSRF* = Gewebespezifischer Regulationsfaktor, *mtETC* = Mitochondriale Elektronentransportkette, *PCD* = Programmierter Zelltod, *RF proteins* = Restorerproteine, (Quelle: Chen und Liu 2014).

Abbildung 4: Darstellung des Drei-Linien-Hybridzüchtungsschemas. Das Restorer-gen-freie Kerngenom (*rfm1/rfm1*) des Mutterlinien-Pools wird mittels Rückkreuzung in das Plasma des CMS-Donors mit beliebigem Kerngenom (N) überführt (z.B. bei der Erstellung einer neuen Mutterlinie). Durch Kreuzung der entstandenen sterilen Mutterlinie mit der fertilen Maintainerlinie (normales Cytoplasma, N) kann die Mutterlinie rückgekreuzt bzw. stabil erhalten werden. Durch Kreuzung der sterilen Mutterlinie mit der Restorerlinie (Vater-Pool) kann durch das homozygote, dominante Restorer-gen (*Rfm1/Rfm1*) eine fertile F₁-Hybride (*rfm1/Rfm1*, *msm1*-Plasma) erstellt werden.

Abbildung 5: Genetische Distanzen der fünf Hybriden mit der höchsten und der fünf Hybriden mit der niedrigsten a) Ertragsleistung bzw. b) *mid-parent* Heterosis (TM- vs. Kornertrag, modifiziert nach Bernhard et al. 2017a).

Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahme der Anthere einer cytoplasmatisch-kerngenisch männlich sterilen Gersten-Mutterlinie. Antheren steriler Mutterlinien zeigten unter Kontrollbedingungen keinerlei pollenähnliche Strukturen (modifiziert nach Bernhard et al. 2017b).

Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahme der Anthere einer thermosensitiven cytoplasmatisch-kerngenisch männlich sterilen Gersten-Mutterlinie nach Einwirkung von erhöhter Temperatur vom Stadium des Ährenswellens bis zur Reife. Antheren, deren Fertilität temperaturinduziert restauriert wurde, wiesen eine deutliche Mikrosporenbildung auf (modifiziert nach Bernhard et al. 2017b).

Tabellen:

Tabelle 2: Erträge verschiedener Biogaskulturen und Erst- und Zweitfruchtkombinationen (modifiziert nach Walter und Zürcher 2013).

9. Abkürzungsverzeichnis

$\ddot{A}_{m^2}$	Ähren pro m ²
BPH	<i>best-parent heterosis</i>
CH	Kommerzielle Heterosis (<i>commercial heterosis</i>)
CHA	Chemische Hybridisierungsmittel (<i>chemical hybridization agents</i>)
CMS	Cytoplasmatisch-kerngenische männliche Sterilität
DC	Entwicklungsstadium
DH	Doppel-Haploide
GCA	Allgemeine Kombinationseignung (<i>general combining ability</i>)
GCA _{Sum}	Summe der elterlichen GCA
GMS	kerngenische männliche Sterilität
GPS	Ganzpflanzensilage
HLG	Hektolitergewicht
MPH	<i>mid-parent heterosis</i>
MSL	Männliche Sterilität Lembke
<i>msm1</i>	<i>male sterile maternal 1</i>
PCD	Programmierter Zelltod (<i>programmed cell death</i>)
PGMS	photoperiodisch-sensitive kerngenische männliche Sterilität
PPR	<i>Pentatricopeptide repeat</i>
<i>Rfm1</i>	<i>Restorer of fertility in msml</i>
SCA	Spezielle Kombinationseignung (<i>specific combining ability</i>)
TGMS	Temperatur-sensitive kerngenische männliche Sterilität
TKM	Tausendkornmasse
TM	Trockenmasse
TS	Trockensubstanz
σ^2_{GCA}	Varianz der elterlichen GCA _{Sum}
σ^2_{SCA}	Varianz der SCA

10. Literaturverzeichnis

- Abbadì, A. and G. Leckband (2011): Rapeseed Breeding for Oil Content, Quality, and Sustainability. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113:1198-1206.
- Abdel-Ghani, A.H., F.P. Frey, and H.K. Parzies (2013): Effect of Temperature on the Expression of Cytoplasmic Male Sterility in Cultivated Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding* 132(1):42-47.
- Abel, S., C. Möllers, and H.C. Becker (2005): Development of Synthetic *Brassica napus* Lines for the analysis of "Fixed Heterosis" in Allopolyploid Plants. *Euphytica* 146:157-163.
- Abiko, M., K. Akibayashi, T. Sakata, M. Kimura, M. Kihara, K. Itoh, E. Asamizu, S. Sato, H. Takahashi, and A. Higashitani (2005): High-Temperature Induction of Male Sterility During Barley (*Hordeum vulgare* L.) Anther Development is Mediated by Transcriptional Inhibition. *Sexual Plant Reproduction* 18:91-100.
- Ahokas, H. (1978): Cytoplasmic Male Sterility in Barley II. Physiology and Anther Cytology of *msm1*. *Hereditas* 89:7-21.
- Ahokas, H. (1979): Cytoplasmic Male Sterility in Barley III. Maintenance of Sterility and Restoration of Fertility in the *msm1* Cytoplasm. *Euphytica* 28:409-419.
- Ahokas, H. (1980): Cytoplasmic Male Sterility in Barley. Part 7: Nuclear Genes for Restoration. *Theoretical and Applied Genetics* 57:193-202.
- Allaby, R.G. (2015): Barley Domestication: The End of a Central Dogma? *Allaby Genome Biology* 16:176.
- Ariizumi, T. and K. Toriyama (2011): Genetic Regulation of Sporopollenin Synthesis and Pollen Exine Development. *Annual Review of Plant Biology* 62:437-460.
- Badr, A., K. Müller, R. Schäfer-Pregl, H. El Rabey, S. Effgen, H.H. Ibrahim, C. Pozzi, W. Rohde, and F. Salamini (2000): On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). *Mol. Biol. Evol.* 17(4):499-510.
- Baik, B.-K. and S.E. Ullrich (2008): Barley for Food: Characteristics, Improvement, and Renewed Interest. *Journal of Cereal Science* 48:233-242.
- Baik, B.-K., C.W. Newman, and R.K. Newman (2011): Food Uses of Barley. In: S.E. Ullrich (ed.), *Barley: Production, Improvement, and Uses*, Blackwell Publishing Ltd, Chichester, United Kingdom.
- Balk, J. and C.J. Leaver (2001): The PET1-CMS Mitochondrial Mutation in Sunflower Is Associated with Premature Programmed Cell Death and Cytochrome C Release. *The Plant Cell* 13:1803-1818.
- Baranwal, Y.K., V. Mikkilineni, U.B. Zehr, A.K. Tyagi, and S. Kapoor (2012): Heterosis: Emerging Ideas about Hybrid Vigour. *Journal of Experimental Botany* 63:6309-6314.

- Becker, H. (2011): Pflanzenzüchtung. 2. Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Bernhard, T., W. Friedt, K.P. Voss-Fels, M. Frisch, R.J. Snowdon, and B. Wittkop (2017a): Heterosis for Biomass and Grain Yield Facilitates Breeding of Productive Dual-Purpose Winter Barley Hybrids. *Crop Science*.
- Bernhard, T., W. Friedt, R.J. Snowdon, and B. Wittkop (2017b): New Insights into Genotypic Thermodependency of Cytoplasmic Male Sterility for Hybrid Barley Breeding. *Plant Breeding* 136:8-17.
- Birchler, J.A., D.L. Auger, and N.C. Riddle (2003): In Search of the Molecular Basis of Heterosis. *The Plant Cell* 15:2236-2239.
- Boeven, P.H.G., C.F.H. Longin, and T. Würschum (2016): A Unified Framework for Hybrid Breeding and the Establishment of Heterotic Groups in Wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 129:1231-1245.
- von Bothmer, R., K. Sato, T. Komatsuda, S. Yasuda, and G. Fischbeck (2003): The Domestication of Cultivated Barley. In: R. von Bothmer, T. van Hintum, H. Knüpfler und K. Sato (eds.), *Diversity in Barley (Hordeum vulgare)*, ELSEVIER SCIENCE B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- von Bothmer, R. and T. Komatsuda (2011): Barley Origin and Related Species. In: S.E. Ullrich (ed.), *Barley: Production, Improvement, and Uses*, Blackwell Publishing Ltd, Chichester, United Kingdom.
- Brooking, I.R. (1976): Male Sterility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench Induced by Low Night Temperature. I Timing of the Stage of Sensitivity. *Australian Journal of Plant Physiology* 3(5):589-596.
- Buckler, E.S., J.B. Holland, P.J. Bradbury, C.B. Acharya, P.J. Brown, C. Browne, E. Ersoz, S. Flint-Garcia, A. Garcia, J.C. Glaubitz, M.M. Goodman, C. Harjes, K. Guill, D.E. Kroon, S. Larsson, N.K. Lepak, H. Li, S.E. Mitchell, G. Pressoir, J.A. Peiffer, M. Oropeza Rosas, T.R. Rocheford, M.C. Roday, S. Romero, S. Salvo, H. Sanchez Villeda, H.S. da Silva, Q. Sun, F. Tian, N. Upadaya, D. Ware, H. Yates, J. Yu, Z. Zhang, S. Kresovich, and M.D. McMullen (2009): The Genetic Architecture of Maize Flowering Time. *Science* 325:714-718.
- Bückmann, H., A. Hüsken, and J. Schiemann (2013): Application of Cytoplasmic Male Sterility (CMS) as a Reliable Biological Confinement Method for the Cultivation of Genetically Modified Maize in Germany. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 3, 385-403.
- Bückmann, H., K. Thiele, A. Hüsken, and J. Schiemann (2014): Influence of Air Temperature on the Stability of Cytoplasmic Male Sterility (CMS) in Maize (*Zea mays* L.). *AgBioForum* 17(2), 205-212.

- Bückmann, H., K. Thiele, and J. Schiemann (2016): Influence of Soil Moisture and Air Temperature on the Stability of Cytoplasmic Male Sterility (CMS) in Maize (*Zea mays* L.). *Agricultural Sciences* 7, 70-81.
- Bundessortenamt (2016): Beschreibende Sortenliste Getreide, Mais, Öl- und Faserpflanzen, Leguminosen, Rüben, Zwischenfrüchte 2016. Bundessortenamt, Hannover, Germany.
- Cheres, M.T., J.F. Miller, J.M. Crane, and S.J. Knapp (2000): Genetic Distance as a Predictor of Heterosis and Hybrid Performance Within and Between Heterotic Groups in Sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 100:889-894.
- Charlesworth, D. and J.H. Willis (2009): The Genetics of Inbreeding Depression. *Nature Reviews Genetics* 10:783-796.
- Chase, C.D. (2007): Cytoplasmic Male Sterility: A Window to the World of Plant Mitochondrial-Nuclear Interactions. *Trends in Genetics* 23(2):81-90.
- Chen, L. and Y.-G. Liu (2014): Male Sterility and Fertility Restoration in Crops. *Annual Review of Plant Biology* 65:579-606.
- Chen, Z.J. (2010): Molecular Mechanisms of Polyploidy and Hybrid Vigor. *Trends in Plant Science* 15:57-71.
- Cheng, S.-H., J.-Y. Zhuang, Y.-Y. Fan, J.-H. Du, and L.-Y. Cao (2007): Progress in Research and Development on Hybrid Rice: A Super-domesticated in China. *Annals of Botany* 100:959-966.
- Corbellini, M., M. Perenzin, M. Accerbi, P. Vaccino, and B. Borghi (2002): Genetic Diversity in Bread Wheat, as Revealed by Coefficient of Parentage and Molecular Markers, and its Relationship to Hybrid Performance. *Euphytica* 123:273-285.
- Dawson, I.K., J. Russell, W. Powell, B. Steffenson, W.T.B. Thomas, and Robbie Waugh (2015): Barley: A Translational Model for Adaptation to Climate Change. *New Phytologist* 206:913-931.
- Devos, K.M. (2005): Updating the 'Crop Circle'. *Current Opinion in Plant Biology* 8:155-162.
- Dewey, R.E., D.H. Timothy, and C.S. Levings (1987): A Mitochondrial Protein Associated with Cytoplasmic Male Sterility in the T Cytoplasm of Maize. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 84:5374-5378.
- Dhillon, B.S., J. Boppenmaier, W.G. Pollmer, R.G. Herrmann, and A.E. Melchinger (1993): Relationship of Restriction Fragment Length Polymorphisms Among European Maize Inbreds with Ear Dry Matter Yield of their Hybrids. *Maydica* 38:245-248.
- Dickinson, H.G. and P.R. Bell (1976): The Changes in the Tapetum of *Pinus banksiana* Accompanying Formation and Maturation of the Pollen. *Annals of Botany* 40:1101-1109.

- Downes, R.W. and D.R. Marshall (1971): Low Temperature Induced Male Sterility in *Sorghum bicolor*. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry 11, 352-356.
- Dreisigacker, S., A.E. Melchinger, P. Zhang, K. Ammar, C. Flachenecker, D. Hoisington, and M.L. Warburton (2005): Hybrid Performance and Heterosis in Spring Bread Wheat, and their Relations to SSR-based Genetic Distances and Coefficients of Parentage. Euphytica 144:51–59.
- Ducos, E., P. Touzet, and M. Boutry (2001): The Male Sterile G Cytoplasm of Wild Beet Displays Modified Mitochondrial Respiratory Complexes. The Plant Journal 26(2):171-180.
- Dudley, J.W., M.A. Saghai-Maroo, and G.K. Rufener (1991): Molecular Markers and Grouping of Parents in a Maize Breeding Program. Crop Science 31:718-723.
- Duvick, D.N., J.S.C. Smith, and M. Cooper (2004): Long-term Selection in a Commercial Hybrid Maize Breeding Program. In: J. Janick (ed.) Plant Breeding Reviews: Part 2: Long-term Selection: Crops, Animals, and Bacteria. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey, pp. 109-151.
- El-Ghazaly, G. and W.A. Jensen (1986): Studies of the Development of Wheat (*Triticum aestivum*) Pollen. Grana 25:1-29.
- Fan, Z. and B.R. Stefansson (1986): Influence of Temperature on Sterility of Two Cytoplasmic Male-Sterility Systems in Rape (*Brassica napus* L.). Canadian Journal of Plant Science 66, 221-227:
- Feng, P.C.C., Y. Qi, T. Chiu, M.A. Stoecker, C.L. Schuster, S.C. Johnson, A.E. Fonseca, and J. Huang (2014): Improving Hybrid Seed Production in Corn with Glyphosate-Mediated Male Sterility. Pest Management Science 70:212-218.
- Firon, N., R. Shaked, M.M. Peet, D.M. Pharr, E. Zamski, K. Rosenfeld, L. Althan, and E. Pressman (2006): Pollen Grains of Heat Tolerant Tomato Cultivars Retain Higher Carbohydrate Concentration Under Heat Stress Conditions. Scientia Horticulturae 109:212-217.
- Fischer, S., H.P. Maurer, T. Würschum, J. Möhring, H.-P. Piepho, C.C. Schön, E.-M. Thiemt, B.S. Dhillon, E.A. Weissmann, A.E. Melchinger, and J.C. Reif (2010): Development of Heterotic Groups in Triticale. Crop Science 50:584-590.
- Forster, B.P., E. Heberle-Bors, K.J. Kasha, and A. Touraev (2007): The Resurgence of Haploids in Higher Plants. TRENDS in Plant Science 12(8):368-375.
- Friend, D.J.C. (1965): Ear Length and Spikelet Number of Wheat Grown at Different Temperatures and Light Intensities. Canadian Journal of Botany 43(3):345-353.

- Friend, D.J.C., J.E. Fisher, and V.A. Helson (1963): The Effect of Light Intensity and Temperature on Floral Initiation and Inflorescence Development in Marquis Wheat. *Canadian Journal of Botany* 41(12):1663-1674.
- Fujii, S. and K. Toriyama (2009): Suppressed Expression of Retrograde-Regulated Male Sterility Restores Pollen Fertility in Cytoplasmic Male Sterile Rice Plants. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 106:9513-9518.
- Fujii, S., T. Kazama, M. Yamada, and K. Toriyama (2010): Discovery of Global Genomic Re-Organization Based on Comparison of Two Newly Sequenced Rice Mitochondrial Genomes with Cytoplasmic Male Sterility-Related Genes. *BMC Genomics* 11:209.
- Gómez, J.F. and Z.A. Wilson (2012): Non-Destructive Staging of Barley Reproductive Development for Molecular Analysis Based Upon External Morphology. *Journal of Experimental Botany* 11:4085-4094.
- González-Melendi, P., M. Uyttewaal, C.N. Morcillo, J.R.H. Mora, S. Fajardo, F. Budar, and M.M. Lucas (2008): A Light and Electron Microscopy Analysis of the Events Leading to Male Sterility in Ogu-INRA CMS of Rapeseed (*Brassica napus*). *Journal of Experimental Botany* 59(4), 827-838.
- Gowda, M., C.F.H. Longin, V. Lein, and J.C. Reif (2012): Relevance of Specific Versus General Combining Ability in Winter Wheat. *Crop Science* 52:2494-2500.
- Gregorio, G.B. and D. Senadhira (1993): Genetic Analysis of Salinity Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 86:333-338.
- Guo, J.X. and Y.G. Liu (2012): Molecular Control of Male Reproductive Development and Pollen Fertility in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology* 54:967-978.
- Hanson, M.R., and S. Bentolila (2004): Interactions of Mitochondrial and Nuclear Genes That Affect Male Gametophyte Development. *Plant Cell* 16:154-169.
- Herrmann, A. (2013): Biogas Production from Maize: Current State, Challenges and Prospects. 2. Agronomic and Environmental Aspects. *Bioenergy Research* 6:372-387.
- Hockett, E.A., K. Aastveit, K.M. Gilbertson (1989): Selfing Behavior of Cytoplasmic Male Sterile Barley in Norway and the United States. *Hereditas* 111:159-165.
- Horn, R., K.J. Gupta, and N. Colombo (2014): Mitochondrion Role in Molecular Basis of Cytoplasmic Male Sterility. *Mitochondrion* 19:198-205.
- Horn, R. and W. Friedt (1999): CMS Sources in Sunflower: Different Origin but Same Mechanism? *Theoretical and Applied Genetics* 98:195-201.
- Horsley, R.D., J.D. Franckowiak, and P.B. Schwarz (2009): Barley. In: M.J. Carena (ed.), *Cereals, Handbook of Plant Breeding*, Springer Science + Business Media, LLC 2009, Dordrecht Heidelberg London New York.
- Johnson, R.C., and E.T. Kanemasu (1983): Yield and Development of Winter Wheat at Elevated Temperatures. *Agronomy Journal* 75:561-565.

- Jordan, D.R., R.R. Klein, K.G. Sakreowski, R.G. Henzell, P.E. Klein, and E.S. Mace (2011): Mapping and Characterization of Rf₅: A New Gene Conditioning Pollen Fertility Restoration in A₁ and A₂ Cytoplasm in Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Theoretical and Applied Genetics 123:383-396.
- Jørgensen, J.H. (1992): Discovery, Characterization and Exploitation of Mlo Powdery Mildew Resistance in Barley, Euphytica 63:141-152.
- Kaul, M.L.H. (1988): Male Sterility in Higher Plants. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Kempe, K. and M. Gils (2011): Pollination Control Technologies for Hybrid Breeding. Molecular Breeding 27(4):417-437.
- Kempe, K., M. Rubtsova, and M. Gils (2014): Split-gene System for Hybrid Wheat Seed Production. PNAS 111:9097-9102.
- Kilian, B., H. Özkan, C. Pozzi, and F. Salamini (2009): Domestication of the Triticeae in the Fertile Crescent. In: C. Feuillet, G.J. Muehlbauer (eds.), Genetics and Genomics of the Triticeae, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 7, Springer Science + Business Media, LLC 2009, Dordrecht Heidelberg London New York.
- Kim, Y.M., Y.D. Jo, J.-K. Kwon, I.T. Kim, and B.-C. Kang (2013): Characterization and Inheritance of a Novel Thermo-Sensitive Restoration of Cytoplasmic Male Sterility in *Capsicum annuum*. Scientia Horticulturae 164:512-520.
- Klein, R.R., J.E. Mullet, D.R. Jordan, F.R. Miller, W.L. Rooney, M.A. Menz, C.D. Franks, and P.E. Klein (2008): The Effect of Tropical Sorghum Conversion and Inbred Development on Genome Diversity as Revealed by High-Resolution Genotyping. Crop Science 48(S1):12-26.
- Kubo, T., K. Kitazaki, M. Matsunaga, H. Kagami, and T. Mikami (2011): Male Sterility-Inducing Mitochondrial Genomes: How do They Differ?. Critical Reviews in Plant Sciences 30:378-400.
- Lázaro, J.J., A. Jiménez, D. Camejo, I. Iglesias-Baena, M. del Carmen Martí, A. Lázaro-Payo, s. Barranco-Medina, and F. Sevilla (2013): Dissecting the Integrative Antioxidant and Redox Systems in Plant Mitochondria. Effect of Stress and S-Nitrosylation. Frontiers in Plant Science 4:460.
- Lee, S.-L.J., H.E. Warmke (1979): Organelle Size and Number on Fertile and T-Cytoplasmic Male-Sterile Corn. American Journal of Botany 66:141-148.
- Levings, C.S. (1993): Thoughts on Cytoplasmic Male Sterility in CMS-T Maize. The Plant Cell 5:1285-1290.
- Li, S., D. Yang, and Y. Zhu (2007): Characterization and Use of Male Sterility in Hybrid Rice Breeding. Journal of Integrative Plant Biology 49:791-804.

- Liu, X.C. and J.L. Wu (1998): SSR Heterogenic Patterns of Parents for Marking and Predicting Heterosis in Rice Breeding. *Molecular Breeding* 4:263-268.
- Liu, F., X. Cui, H.T. Horner, H. Weiner, and P.S. Schnable (2001): Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Activity is Required for Male Fertility in Maize. *The Plant Cell* 13:1063-1078.
- Longin, C.F.H., M. Gowda, J. Mühleisen, E. Ebmeyer, E. Kazman, R. Schachschneider, J. Schacht, M. Kirchhoff, Y. Zhao, and J.C. Reif (2013): Hybrid Wheat: Quantitative Genetic Parameters and Consequences for the Design of Breeding Programs. *Theoretical and Applied Genetics* 126:2791-2801.
- Longin, C.F.H., J. Mühleisen, H.P. Maurer, H. Zhang, M. Gowda, and J.C. Reif (2012): Hybrid Breeding in Autogamous Cereals. *Theoretical and Applied Genetics* 125:1087-1096.
- Losert, D., H.P. Maurer, S. Weissmann, and T. Würschum (2016): Hybrid Breeding for Biomass Yield in Winter Triticale: I. Hybrid Performance, Trait Correlations and Heterosis. *Plant Breeding*.
- Luo, D., H. Xu, Z. Liu, J. Guo, H. Li, L. Chen, C. Fang, Q. Zhang, m. Bai, N. Yao, H. Wu, C. Ji, H. Zheng, Y. Chen, S. Ye, X. Li, X. Zhao, R. Li, and Y.-G. Liu (2013): A Detrimental Mitochondrial-Nuclear Interaction Causes Cytoplasmic Male Sterility in Rice. *Nature Genetics* 45:573-577.
- Madić, M.R., D.S. Djurović, D.S. Knezević, A.S. Paunović, and S.T. Tanasković (2014): Combining Abilities for Spike Traits in a Diallel Cross of Barley. *Journal of Central European Agriculture* 15(1):108-116.
- Malysheva-Otto, L., M.W. Ganai, J.R. Law, J.C. Reeves, and M.S. Röder (2007): Temporal Trends of Genetic Diversity in European Barley Cultivars (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular Breeding* 20:309-322.
- Marshall, D.R., N.J. Thompson, G.H. Nicholls, and C.M. Patrick (1974): Effect of Temperature and Day Length on Cytoplasmic Male Sterility in Cotton (*Gossypium*). *Australian Journal of Agricultural Research* 25(3):443-447.
- Mascher, M., V.I. Schuenemann, U. Davidovich, N. Marom, A. Himmelbach, S. Hübner, A. Korol, M. David, E. Reiter, S. Riehl, M. Schreiber, S.H. Vohr, R.E. Green, I.K. Dawson, J. Russell, B. Kilian, G.J. Muehlbauer, R. Waugh, T. Fahima, J. Krause, E. Weiss, and N. Stein (2016): Genomic Analysis of 6,000-year-old Cultivated Grain Illuminates the Domestication History of Barley. *Nature Genetics* 48(9):1089-1093.
- Matsui, K., Y. Mano, S. Taketa, N. Kawada, and T. Komatsuda (2001): Molecular Mapping of a Fertility Restoration Locus (*Rfm1*) for Cytoplasmic Male Sterility in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 102(4):477-482.
- Mayr, E. (1986): Joseph Gottlieb Kölreuter's Contributions to Biology. *Osiris* 2:135-76.

- Melchinger, A.E (1993): Use of RFLP Markers for Analysis of Genetic Relationships Among Breeding Materials and Prediction of Hybrid Performance. In: Buxton, D.R., R. Shibles, R.A. Forsberg, B.L. Blad, K.H. Asay, G.M. Paulsen, and R.F. Wilson (eds.). International Crop Science I. CSSA, Madison, Wisconsin, pp. 621–628.
- Melchinger, A.E (1999): Genetic Diversity and Heterosis. Chapter 10. In: Coors, J.G. and S. Pandey (eds.). The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. CSSA, Madison, Wisconsin, pp. 99–118.
- Melchinger, A.E. and R.K. Gumber (1998): Overview of Heterosis and Heterotic Groups in Agronomic Crops. In: Lamkey, K.R. and J.E. Staub (eds.). Concepts and Breeding of Heterosis in Crop Plants. CSSA, Madison, Wisconsin, pp. 29-44.
- Merker, A. (1992): The Triticeae in Cereal Breeding. *Hereditas* 116:277-280.
- Morrell, P.L. and M.T. Clegg (2007): Genetic Evidence for a second Domestication of Barley (*Hordeum vulgare*) East of the Fertile Crescent. *PNAS* 104(9):3289-3294.
- Mühleisen, J., H.P. Maurer, G. Stiewe, P. Bury, and J.C. Reif (2013a): Hybrid Breeding in Barley. *Crop Science* 53(3):819-824.
- Mühleisen, J., H.-P. Piepho, H.P. Maurer, C.F.H. Longin, and J.C. Reif (2013b): Yield Stability of Hybrids Versus Lines in Wheat, Barley and Triticale. *Theoretical and Applied Genetics* 127(2):309-316.
- Mühleisen, J., H.-P. Piepho, H.P. Maurer, Y. Zhao, and J.C. Reif (2014): Exploitation of Yield Stability in Barley. *Theoretical and Applied Genetics* 127:1949-1962.
- Newman, C.W. and R.K. Newman (2006): A Brief History of Barley Foods. *Cereal Foods World* 51(1):4-7.
- Newton, A.C., A.J. Flavell, T.S. George, P. Leat, B. Mullholland, L. Ramsay, C. Revoredo-Giha, J. Russell, B.J. Steffenson, J.S. Swanston, W.T.B. Thomas, R. Waugh, P.J. White, and I.J. Bingham (2011): Crops that Feed the World 4. Barley: A Resilient Crop? Strengths and Weaknesses in the Context of Food Security. *Food Security* 3:141-178.
- Niu, Z., A. Jiang, W.A. Hammad, A. Oladzadabbasabadi, S.S. Xu, M. Mergoum, and E.M. Elias (2014): Review of Doubled Haploid Production in Durum and Common Wheat Through Wheat x Maize Hybridization. *Plant Breeding* 133:313-320.
- Oettler, G., S.H. Tams, H.F. Utz, E. Bauer, and A.E. Melchinger (2005): Prospects for Hybrid Breeding in Winter Triticale: I. Heterosis and Combining Ability for Agronomic Traits in European Elite Germplasm. *Crop Science* 45:1476-1482.
- Philipp, N., G. Liu, Y. Zhao, S. He, M. Spiller, G. Stiewe, K. Pillen, J.C. Reif JC, and Z. Li (2016): Genomic Prediction of Barley Hybrid Performance. *Plant Genome* 9(2):1-8.
- Pourkheirandish, M. and T. Komatsuda (2007): The Importance of Barley Genetics and Domestication in a Global Perspective. *Annals of Botany* 100:999-1008.

- Pourkheirandish, M., G. Hensel, B. Kilian, N. Senthil, G. Chen, M. Sameri, P. Azhaguvel, S. Sakuma, S. Dhanagond, R. Sharma, M. Mascher, A. Himmelbach, S. Gottwald, S.K. Nair, A. Tagiri, F. Yukuhiro, Y. Nagamura, H. Kanamori, T. Matsumoto, G. Willcox, C.P. Middleton, T. Wicker, A. Walther, R. Waugh, G.B. Fincher, N. Stein, J. Kumlehn, K. Sato, and T. Komatsuda (2015): Evolution of the Grain Dispersal System in Barley. *Cell* 162:527-539.
- Pring, D.R., W. Chen, H.V. Tang, W. Howad, and F. Kempken (1998): Interaction of Mitochondrial RNA Editing and Nucleolytic Processing in the Restoration of Male Fertility in Sorghum. *Current Genetics* 33:429-436.
- Qian, W., O. Sass, J. Meng, M. Li, M. Frauen, and C. Jung (2007): Heterotic Patterns in Rapeseed (*Brassica napus* L.): I. Crosses Between Spring and Chinese Semi-Winter Lines. *Theoretical and Applied Genetics* 115:27-34.
- Reddy, B.B., and M.V. Reddi (1972): Studies on the Breakdown of Male Sterility and Other Related Aspects in Certain Cytoplasmic Male-Sterile Lines of Pearl Millet (*Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb). *Andhra Agricultural Journal* 17(6), 173-180
- Reif, J.C., A.E. Melchinger, X.C. Xia, M.L. Warburton, D.A. Hoisington, S.K. Vasal, G. Srinivasan, M. Bohn, and M. Frisch (2003): Genetic Distance Based on Simple Sequence Repeats and Heterosis in Tropical Maize Populations. *Crop Science* 43:1275–1282.
- Reif, J.C., A.R. Hallauer, and A.E. Melchinger (2005): Heterosis and Heterotic Patterns in Maize. *Maydica* 50:215-223.
- Reif, J.C., F.-M. Gumpert, S. Fischer, and A.E. Melchinger (2007): Impact of Interpopulation Divergence in Additive and Dominance Variance in Hybrid Populations. *Genetics* 176:1931-1934.
- Rhoads, D.M., C.S. Levings, and J.N. Siedow (1995): URF13, a Ligand-Gated, Pore-Forming Receptor for T-Toxin in the Inner Membrane of CMS-T Mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 27(4):437-445.
- Riehl, S., M. Zeidi, and N.J. Conard (2013): Emergence of Agriculture in the Foothills of the Zagros Mountains of Iran. *Science* 341:65-67.
- Rollins, J.A., B. Drosse, M.A. Mulki, S. Grando, M. Baum, M. Singh, S. Ceccarelli, and M. von Korff (2013): Variation at the Vernalisation Genes *Vrn-H1* and *Vrn-H2* Determines Growth and Yield Stability in Barley (*Hordeum vulgare*) Grown under Dryland Conditions in Syria. *Theoretical and Applied Genetics* 126:2803-2824.
- Saha, D., A.M. Prasad, and R. Srinivasan (2007): Pentatricopeptide Repeat Proteins and Their Emerging Roles in Plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 45:521-534.

- Sakata, T., H. Takahashi, I. Nishiyama, and A. Higashitani (2000): Effects of High Temperature on the Development of Pollen Mother Cells and Microspores in Barley *Hordeum vulgare* L.. Journal of Plant Research, 113(4):395-402.
- Salamini, F., H. Özkan, A. Brandolini, R. Schäfer-Pregl, and W. Martin (2002): Genetics and Geography of Wild Cereal Domestication in the Near East. Nature Reviews Genetics 3:429-441.
- Satake, T. and H. Hayase (1970): Male Sterility Caused by Cooling Treatment at the Young Micro-Spore Stage in Rice Plants. 5. Estimations of Pollen Developmental Stage and the Most Sensitive Stage to Coolness. Proceedings of the Crop Science Society of Japan 39(4):468-473.
- Schnable, P.S., N.M. Springer (2013): Progress Toward Understanding Heterosis in Crop Plants. Annual Review of Plant Biology 64:71-88.
- Schnable, P.S., and R.P. Wise (1998): The Molecular Basis of Cytoplasmic Male Sterility and Fertility Restoration. Trends in Plant Science 3(5):175-180.
- Shi, J., M. Cui, L. Yang, Y.-J. Kim, and D. Zhang (2015): Genetic and Biochemical Mechanisms of Pollen Wall Development. Trends in Plant Science 20:11.
- Shull, G.H (1908): The Composition of a Field of Maize. Journal of Heredity 1:296-301.
- Smith, O.S., J.S.C. Smith, S.L. Bowen, R.A. Tenborg, and S.J. Wall (1990): Similarities Among a Group of Elite Maize Inbreds as Measured by Pedigree, F₁ Grain Yield, Grain Yield, Heterosis, and RFLPs. Theoretical and Applied Genetics 80:833-840.
- Song, X.Y., H.H. Qian, and L.L. Zhang (2014): Cytogenetic Analysis of Cytoplasmic Male Sterility in Wheat Line KTP116A and Molecular Mapping of Two Thermo-Sensitive Restoration Genes. Euphytica 196:129-136.
- Song, X.Y., L.L. Zhang, J.L. Zeng, H.H. Qian, H.B. Li, and B.R. He (2013): Development of Thermo-Sensitive Cytoplasmic Male Sterile (TCMS) Lines of Wheat Characterized by Complete Male Sterility at Lower-Temperatures and Partially Restored Fertility at Higher-Temperatures. Euphytica 192:393-399.
- Sreenivasulu, N. and T. Schnurbusch (2012): A genetic playground for enhancing grain number in cereals. Trends in Plant Science 17:91-101.
- Stiewe, G., S. Pleines, M. Coque, and J.J.L. Linders (2008): New Hybrid System for *Brassica napus*. U.S. Patent Application No. 12/600,481.
- Tang, H.V., W. Chen, and D.R. Pring (1999): Mitochondrial *orf107* Transcription, Editing, and Nucleolytic Cleavage Conferred by the Gene *Rf3* are Expressed in Sorghum Pollen. Sexual Plant Reproduction 12:53-59.
- Teklewold, A. and H.C. Becker (2006): Comparison of Phenotypic and Molecular Distances to Predict Heterosis and F₁ Performance in Ethiopian Mustard (*Brassica carinata* A. Braun). Theoretical and Applied Genetics 112:752-759.

- Troyer, A.F. (2006): Adaptedness and Heterosis in Corn and Mule Hybrids. *Crop Science* 46:528-543.
- Turner, A.S., S. Faure, Y. Zhang, and D.A. Laurie (2013): The Effect of Day-neutral mutations in Barley and Wheat on the Interaction Between Photoperiod and Vernalization. *Theoretical and Applied Genetics* 126:2267-2277.
- Ui, H., M. Sameri, M. Pourkheirandish, M.-C. Chang, H. Shimada, N. Stein, T. Komatsuda, and H. Handa (2014): High-resolution Genetic Mapping and Physical Map Construction for Fertility Restorer *Rfm1* Locus in Barley. *Theoretical and Applied Genetics* 128(2):283-290.
- Ullrich, S.E. (2011): Significance, Adaptation, Production, and Trade of Barley. In: S.E. Ullrich (ed.), *Barley: Production, Improvement, and Uses*, Blackwell Publishing Ltd, Chichester, United Kingdom.
- Uyttewaal, M., N. Arnal, M. Quadrado, A. Martin-Canadell, N. Vrielynck, S. Hiard, H. Gherbi, A. Bendahmane, F. Budar, and H. Mireau (2008): Characterization of *Raphanus sativus* Pentatricopeptide Repeat Proteins Encoded by the Fertility Restorer Locus for Ogura Cytoplasmic Male Sterility. *The Plant Cell* 20:3331-3345.
- Vara Prasad, P.V., K.J. Boote, and L. Hartwell Allen Jr (2006): Adverse High Temperature Effects on Pollen Viability, Seed-Set, Seed Yield and Harvest Index of Grain-Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] are More Severe at Elevated Carbon Dioxide Due to Higher Tissue Temperatures. *Agricultural and Forest Meteorology* 139(3-4):237-251.
- Vedel, F., M. Pla, V. Vitart, S. Gutierrez, P. Chétrit, R. De Paepe (1994): Molecular Basis of Nuclear and Cytoplasmic Male Sterility in Higher Plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 32:601-608.
- Walter, E. and A. Zürcher (2013): Entwicklung und Optimierung von standortangepassten Anbausystemen für Energiepflanzen im Fruchtfolge regime klimabegünstigter Lagen. Endbericht EVA II, FNR Förderkennzeichen 22013008, LTZ Augustenberg, Rheinstetten-Forchheim.
- Wang, J., Y. Gao, Y. Kong, J. Jiang, A. Li, Y. Zhang, and Y. Wang (2014): Abortive Process of a Novel Rapeseed Cytoplasmic Male Sterility Line Derived from Somatic Hybrids Between *Brassica napus* and *Sinapis alba*. *Journal of Integrative Agriculture* 13(4), 741-748.
- Weiland, P. (2003): Production and Energetic Use of Biogas from Energy Crops and Wastes in Germany. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 109:263-274.
- Whitford, R., D. Fleury, J.C. Reif, M. Garcia, T. Okada, V. Korzun, and P. Langridge (2013): Hybrid Breeding in Wheat: Technologies to Improve Hybrid Wheat Seed Production. *Journal of Experimental Botany* 64(18):5411-5428.

- Wise, R.P., C.R. Bronson, P.S. Schnable, and H.T. Horner (1999a): The Genetics, Pathology, and Molecular Biology of T-Cytoplasm Male Sterility in Maize. *Advances in Agronomy* 65:79-130.
- Wise, R.P., K. Gobelman-Werner, D. Pei, C.L. Dill, and P.S. Schnable (1999b): Mitochondrial Transcript Processing and Restoration of Male Fertility in T-Cytoplasm Maize. *Journal of Heredity* 90(3):380-385.
- van de Wouw, M., T. van Hintum, C. Kik, R. van Treuren, and B. Visser (2010): Genetic Diversity Trends in Twentieth Century Crop Cultivars: A Meta Analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 120:1241-1252.
- Xing, Q.H., Z.G. Ru, C.J. Zhou, X. Xue, C.Y. Liang, D.E. Yang, D.M. Jin, and B. Wang (2003): Genetic Analysis, Molecular Tagging and Mapping of the Thermo-Sensitive Genic Male-Sterile Gene (*wtms1*) in Wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 107:1500-1504.
- Yeung, K.C. and E.N. Larter (1972): Pollen Production and Disseminating Properties of Triticale Relative to Wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 52:569-574.
- Yu, C.Y., S.W. Hu, H.X. Zhao, A.G. Guo, and G.L. Sun (2005): Genetic Distances revealed by Morphological Characters, Isozymes, Proteins and RAPD Markers and their Relationships with Hybrid Performance in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 110:511-518.
- Zeng, X., H. Long, Z. Wang, S. Zhao, Y. Tang, Z. Huang, Y. Wang, Q. Xu, L. Mao, G. Deng, X. Yao, X. Li, L. Bai, H. Yuan, Z. Pan, R. Liu, X. Chen, Q. Wang, M. Chen, L. Yu, J. Liang, D. DunZhu, Y. Zheng, S. Yu, Z. Luo, X. Guang, J. Li, C. Deng, W. Hu, C. Chen, X. TaBa, L. Gao, X. Lv, Y.B. Abu, X. Fang, E. Nevo, M. Yu, J. Wang, and N. Tashi (2015): The Draft Genome of Tibetan Hulless Barley Reveals Adaptive Patterns to the Stressful Tibetan Plateau. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 112:1095-1100.
- Zhang, X., L. Lv, C. Lv, B. Guo, and R. Xu (2015): Combining Ability of Different Agronomic Traits and Yield Components in Hybrid Barley. *PloS one* 10(6):1-9.
- von Zitzewitz, J., P. Szűcs, J. Dubcovsky, L. Yan, E. Francia, N. Pecchioni, A. Casas, T.H.H. Chen, P.M. Hayes, and J.S. Skinner (2005): Molecular and Structural Characterization of Barley Vernalization Genes. *Plant Molecular Biology* 59:449-467.

11. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Rod Snowdon möchte ich für die Ermöglichung dieser spannenden Arbeit und für die gute fachliche Betreuung während meiner Doktorandenzeit sowie für die Übernahme des ersten Gutachtens danken.

Herrn Dir. u. Prof. Prof. Dr. Frank Ordon möchte ich für die fachliche Unterstützung und für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Herrn Dr. Benjamin Wittkop gilt mein besonderer Dank für die kompetente, wissenschaftliche und überaus freundschaftliche Unterstützung während meiner gesamten Doktorandenzeit. Auch für die Betreuung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der umfangreichen Versuche sowie für die Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt danke ich für die stetige fachliche Unterstützung, die zahlreichen Anregungen und Diskussionen und für die unermüdlichen Korrekturlesungen.

Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der *German Seed Alliance* durchgeführt. Ich möchte dabei vor allem Dr. Jutta Ahlemeyer, Astrid Hoffmann und Dr. Jens Vaupel (DSV), Dr. Laszlo Cselenyi (WvB), Dr. Eberhard Laubach (Nordsaat), Dr. Charles Snijders (SUR) und Dr. Markus Wolf (GSA) für die zahlreichen anregenden fachlichen Diskussionen und den Züchtungsunternehmen für die Durchführung der Feldversuche meinen Dank aussprechen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Annette Plank, Lisa Unterberg, Birgit Keiner, Stavros Tzigos, Petra Degen, Liane Renno, Swetlana Renner und Petra Kretschmer für die tatkräftige und engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und die Arbeit in Labor, Klimakammer und Gewächshaus sowie auf dem Feld.

Für die Durchführung der Feldversuche bedanke ich mich herzlich bei Dr. Lothar Behle-Schalk, Mario Tolksdorf, Kurt-Werner Franzmann, Karlheinz Balzer und Mechthild Schwarte. Auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Feldversuchsstationen Rauschholzhausen und Groß-Gerau gilt mein Dank.

Allen Kollegen und Mitarbeitern /-innen an der Professur für Pflanzenzüchtung möchte ich für die überaus lustige und angenehme tägliche Arbeitsatmosphäre danken. Besonders meinen

Kollegen Dr. Andreas Stahl, Dr. Steffen Windpassinger, Iulian Gabur und Dr. Kai Voss-Fels möchte ich für die freundschaftliche und unvergessliche Doktorandenzeit danken.

Allen voran möchte ich meiner Frau Julia und meinen Eltern für die Liebe und Unterstützung danken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

12. Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Timm Bernhard

Gießen, im April 2017