

(Aus der Dienststelle für Pflanzenzüchtung und Vererbungslehre der Biologischen Reichsanstalt, Berlin-Dahlem).

## Versuche zur Erzeugung polyploider Rassen bei der Gattung *Ornithopus*<sup>1</sup>.

Von **M. Klínkowski** und **R. Griesinger**.

### Einleitung.

In unserer vorhergehenden gemeinsamen Arbeit über die Geographie und Cytologie des europäischen Formenkreises der Gattung *Ornithopus* (2) war auch von den Schwierigkeiten bei der Durchführung erfolgreicher Kreuzungsversuche die Rede. Als ein aussichtsreicher Weg hier weiterzukommen wurde die Herstellung polyploider Formen durch Colchicinbehandlung nach der Methode von BLAKESLEE und AVERY (1) bezeichnet. Zunächst war zu prüfen, ob überhaupt bei den Arten der Gattung *Ornithopus* durch Colchicin polyploide Zellen und Gewebe hergestellt werden können und welches die hierzu am besten geeigneten Verfahren und Lösungskonzentrationen sind. Über die bisherigen Ergebnisse der von KLINKOWSKI zu diesem Zweck angestellten, derartigen Versuche soll im folgenden berichtet werden.

### Experimentelle Untersuchungen.

In einem Vorversuch wurde geprüft, ob eine mehrtägige Quellung von Serradellasamen in doppelt destilliertem Wasser und in einer 2,5%igen Traubenzuckerlösung einen nachteiligen Einfluß auf die Keimung ausübt. Es ergab sich, daß auch nach viertägiger Einwirkung die auf Filtrierpapier ausgelegten Samen beider Versuchsreihen hundertprozentig keimten.

Darauf wurde Ende August 1938 ein Versuch zur Ermittlung der für die Erzielung polyploider Formen optimalen Colchicinkonzentration angesetzt. Je 50 Samen von *Ornithopus sativus* BROU. einer russischen Herkunft wurden 24 Stunden in Schalen mit einer wässrigen 0,1-, 0,2-, 0,4-, 0,8- und 1,2%igen Colchicinlösung gelegt. Gleichzeitig wurde ein Kontrollversuch mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt. Vier Tage nach dem Auslegen keimten die mit

Wasser behandelten Samen, einen Tag später die in Colchicinlösung getauchten, und zwar in allen Konzentrationen zum normalen Prozentsatz (ungefähr 90%). Sieben Tage nach der Aussaat waren die „colchicinierten“ Pflanzen etwa 1 cm (die Kontrollen 3 cm) hoch gewachsen, Keimblätter und Stengel deutlich verdickt und von dunkelgrüner Farbe. Im Konzentrationsbereich von 0,1—0,4% waren die Wurzeln normal ausgebildet, bei 0,8 und 1,2% erreichten sie jedoch nur eine Länge von wenigen Millimetern. Einen Tag darauf begannen 36 Sämlinge der Kontrolle und 16 der mit 0,1%iger Lösung behandelten mit der Entwicklung des ersten Fiederblättchens. Später gingen alle Sämlinge der Reihen 0,4—1,2% Konzentration und auch alle Pflanzen, die in Nährlösung und dann in Töpfe kamen, ein.

Daraufhin wurde ein Versuch mit unterschiedlichen Behandlungszeiten angesetzt, wobei je 125 Samen in eine 0,4%ige Colchicinlösung und ebenso viele als Kontrolle in doppelt destilliertes Wasser eingetragen wurden. In Abständen von 8 Stunden, 1, 2, 4 und 6 Tagen wurden je 25 Samen entnommen und zur Keimung ausgelegt. Erst nach 6tägiger Einlagerung zeigten sowohl die behandelten Samen, wie auch die Kontrollen eine wesentliche Keimschädigung (28%, 24%). Die nur 8 Stunden in der Lösung verbliebenen Samen ergaben Keimlinge, welche die bereits geschilderten Verdickungen auch schon deutlich zeigten.

Neben der geschilderten Methode der Samenbehandlung wurde auch versucht, das meristematische Gewebe von Blütenknospen zu beeinflussen, um eventuell über diploide Gametenzellen zu polyploiden Pflanzen zu gelangen. Zu diesem Zweck wurden Tauchversuche mit sehr jungen Blütenknospen durchgeführt. Je drei Blütenzweige wurden für 24 Stunden in Gläsern mit Colchicinlösungen der Konzentrationen 0,01, 0,02, 0,04, 0,08 und 0,12% getaucht. Sämtliche Pflanzen gingen leider ein. Da alle diese Versuche am Ende der Vegetationsperiode des Jahres 1938 angestellt wurden, war es nicht

<sup>1</sup> Diese Arbeit wurde durchgeführt mit Unterstützung des Forschungsdienstes und der Deutschen Forschungsgemeinschaft, denen an dieser Stelle herzlichst gedankt sei.

mehr möglich, die Pflanzen weiterzuerhalten. Die Arbeiten wurden deshalb abgebrochen, um sie im Frühjahr 1939 in größerem Umfang wieder aufzunehmen.

Im März dieses Jahres wurde nochmals ein größerer Tauchversuch mit 50 Pflanzen von *Ornithopus sativus* und 25 von *O. compressus* angesetzt. Die Blüten sprosse wurden diesmal bei der Konzentration 0,02% für die Zeit von ein bis vier Stunden abgestuft dem Vakuum der Wasserstrahlpumpe ausgesetzt, um das auf die sich teilenden Zellen wirksame Agens möglichst nahe an die meristematischen Gewebe der jungen Knospen heranzubringen.



Abb. 1. *Ornithopus sativus* BROT. Links Keimling aus unbehandeltem Samen, rechts aus mit 0,1% iger Colchicininlösung behandeltem Samen. Beide 17 Tage alt.

Mehrere Kontrollpflanzen wurden mit destilliertem Wasser in gleicher Weise behandelt, um ein Vergleichsmaterial bei der Prüfung der Nachkommenschaft zu haben. Diesmal gelang es bei

einer Anzahl der Versuchspflanzen, von den getauchten Sprossen Samen zu ernten.

Selbstverständlich wurden auch von unbehandelten Sprossen derselben Pflanzen Hülsen als Vergleichssaatgut genommen. Über das Ergebnis dieses



Abb. 2. *Ornithopus sativus* BROT. Kümmerform aus mit 0,1% iger Colchicininlösung behandeltem Samen. Alter 4 Monate.

Versuches lassen sich erst nach der Aussaat des Erntegutes Angaben machen.

Aus den bisherigen mit der Samenbehandlungsmethode erzielten Ergebnissen ging deutlich hervor, daß 0,1% ige Colchicininlösungen am besten geeignet sind, um noch lebens- und entwicklungsfähige Pflanzen mit äußerlich deutlich erkennbarer Wirkung zu erhalten. So wurde am 11. Februar 1939 ein größerer derartiger Versuch angesetzt, bei dem 500 Samen von *O. sa-*

*tivus* und ebenso viele von *O. compressus* nach 8stündiger Vorquellung in Wasser für 24 Stunden mit einer solchen Lösung behandelt wurden. Für *O. sativus* ergab die am 21. März vorgenommene Durchsicht 231 deutlich veränderte Jungpflanzen, für *O. compressus* 114. Alle diese Pflanzen wurden eingetopft. Der Rest war normal ausgebildet, nicht gekeimt oder eingegangen. Abb. 1 zeigt einen normalen Sämling der Wasserkontrolle im Vergleich zu einer durch Colchicin deutlich beeinflussten Keimpflanze. Freilich handelt es sich bei diesen Merkmalen zunächst um die schon öfters in der Literatur geschilderten, allgemein durch Colchicin bewirkten Veränderungen, die sich bei den meisten Pflanzen im Laufe der weiteren Entwicklung wieder verlieren. So war es auch in diesem Versuch bei *O. compressus*. Nach drei Monaten zeigte keine einzige Pflanze mehr Besonderheiten. Auch die meisten Individuen von *O. sativus* hatten nach dieser Zeit ihr normales Aussehen wieder angenommen. Einige wenige verhielten sich jedoch anders. In Abb. 2 sehen wir eine sehr stark geschädigte Pflanze, die es in viermonatiger Entwicklungszeit nicht weiter als bis zur Ausbildung einiger stark deformierter Fiederblättchen brachte und später, ohne zu blühen, einging. Einen anderen dreieinhalb Monate alten Vertreter aus diesem Versuch gibt Abb. 3 wieder. Es ist hier deutlich zu erkennen, daß neben stark verkrüppelten Sprossen auch ein ganz normaler Trieb hervorgewachsen ist. Daß aber auch diese Pflanze sehr zurückgeblieben ist, zeigt die gleichalte in Abb. 4 rechts wiedergegebene Pflanze. Diese unterscheidet sich zwar in ihrem Habitus von der zum Vergleich mitabgebildeten, nicht behandelten Kontrollpflanze sehr deutlich, ist aber andererseits doch schon bis zur Blütenbildung gelangt. Aus dem ganzen Bestand der mit 0,1% Colchicininlösung behandelten *O. sativus*-Pflanzen konnten vier Vertreter herausgelesen werden, die im Aussehen erheblich von normalwüchsigen Formen abwichen, aber doch noch reichlich Blüten ausbildeten. Die Blüten waren vergrößert und vor allem die Kelche stark verbreitert. Diesen vier Pflanzen wurde nun besonderes Augenmerk zugewandt.

Die mikroskopische Untersuchungen des reifen Pollen ergab einerseits viele kleine und mißgestaltete Körner. Andererseits aber stellte sich heraus, daß die gut ausgebildeten im Vergleich zum Pollen der unbehandelten Kontrollen ganz bedeutend vergrößert waren. Die Ergebnisse aus Einzelmessungen von je 250 Pollenkörnern sind in dem in Abb. 5 wiedergegebenen Dia-

gramm graphisch dargestellt. Die Mittelwerte und mittleren Fehler der beiden Kurven wurden ebenfalls errechnet und im Diagramm vermerkt. Wie aus dem Verlauf der Kurven zu erwarten war, sind die Mittelwerte fehlerstatistisch gesichert verschieden.

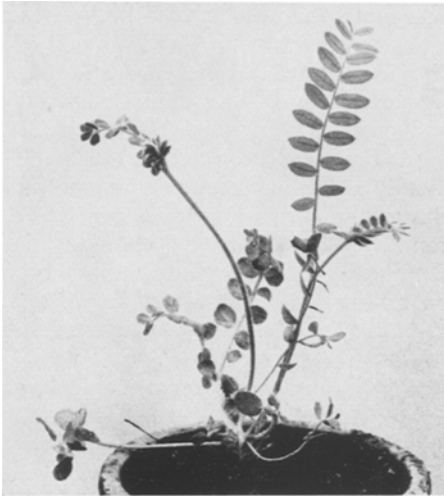


Abb. 3. *Ornithopus sativus* BROT. Wie bei Abb. 2. Alter  $3\frac{1}{2}$  Monate.

Die vier stark veränderten Pflanzen warfen die Knospen der ersten Blütenstände ab, erst die nachfolgenden Knospen kamen zum Er-

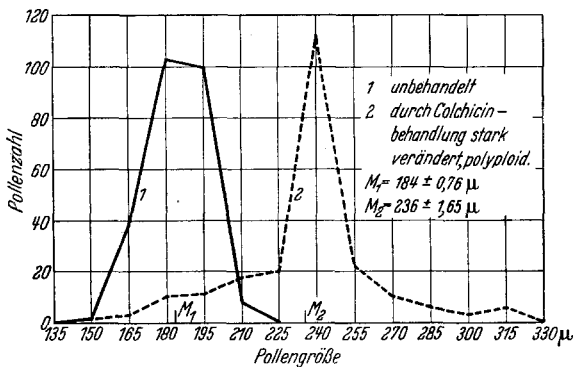


Abb. 5. *Ornithopus sativus* BROT. Kurven aus Pollenmessungen (je 250 Körner) von unbehandelten und mit 0,1% Colchicin behandelten Pflanzen. Kurve 2 stammt von Polyploiden und ist fehlerstatistisch gegen Kurve 1 gesichert.

blühen, setzten aber nur teilweise Früchte an. Die ausgewachsenen Hülsen enthielten wenige, bedeutend vergrößerte Samen. Die Abb. 6 zeigt zwei derartige Hülsen mit zwei und drei Samen, im Vergleich zu Hülsen der unbehandelten *O. sativus*-Pflanzen. Im ganzen konnten bis zum Absterben der Pflanzen doch eine ganze Anzahl

Samen geerntet werden, die im nächsten Frühjahr ausgelegt werden sollen.

### Cytologische Untersuchungen.

Wenn auch die im vorhergehenden Teil ge-



Abb. 4. *Ornithopus sativus* BROT. Links unbehandelt, rechts blühende, polyploide Pflanze aus mit 0,1% iger Colchicininlösung behandeltem Samen. Beide  $3\frac{1}{2}$  Monate alt.

schilderten morphologischen Besonderheiten mit Colchicin behandelter Pflanzen eine deutliche und bleibende Wirkung nicht mehr bezweifeln



Abb. 6. *Ornithopus sativus* BROT. Links zwei Hülsen von unbehandelten, rechts von polyploiden Pflanzen. Etwa 2 : 1 vergr.

lassen, so war doch eine cytologische Untersuchung, die GRIESINGER ausführte, zur Klärung der chromosomalen Verhältnisse notwendig.

Von den vier deutlich geschädigten, erwachsenen Pflanzen wurden Wurzelspitzen entnommen und zu Mikrotompräparaten verarbeitet. Die Prüfung der Schnitte lieferte ein unerwartetes

Ergebnis. Sämtliche Wurzeln wiesen die normale Chromosomenzahl  $2n = 14$  auf. Dieser Befund überraschte im Hinblick auf das stark veränderte Aussehen und Verhalten der geprüften Pflanzen. Deshalb wurden noch einige Blütenknospen entnommen und zu Schnittpräparaten verarbeitet. Die Untersuchung dieser Präparate erbrachte ein wesentlich anderes Ergebnis. Sowohl die vegetativen Mitosen des Knospengewebes, wie auch die meiotischen Teilungen ließen eine bedeutend erhöhte Chromosomenzahl erkennen. Genaue Zählungen begünstigten großen Schwierigkeiten, doch schien es sehr bald, als ob die Chromosomenzahl mehr als  $4n = 28$  betrage und außerdem in einzelnen Zellen und Geweben unterschiedlich sei. Eine sehr günstige, vegetative Äquatorialplatte (Abb. 7) wurde zu fast genau 56 Chromosomen gezählt, es handelt sich also um eine oktaploide

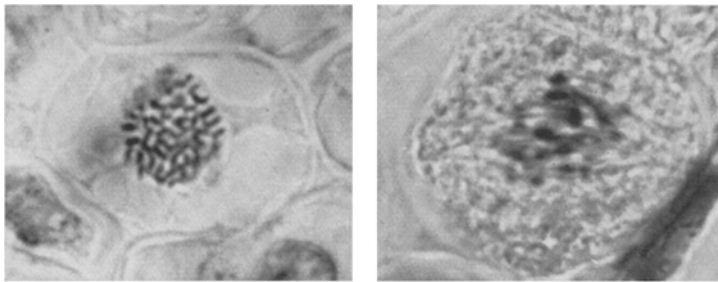


Abb. 7. *Ornithopus sativus* BROT. Links vegetative Zelle aus Knospengewebe mit etwa 53 Chromosomen (nur ein Teil liegt in der Schärfeebene). Rechts Anaphase I einer Pollenmutterzelle von einer polyploiden Pflanze. Die Chromosomen sind über den ganzen Spindelkörper verteilt. Vergrößerung: 1:1750.

Zelle. In demselben Schnitt zeigten andere Zellen etwa 26 oder gar nur 16 Chromosomen, also beinahe die diploide Zahl. Hieraus folgt, daß nicht alle Zellen die gleiche Chromosomenzahl besaßen.

Die meiotischen Teilungen sind stark gestört und deshalb für Zählungen unbrauchbar. Die Chromosomen wandern im ersten meiotischen Teilungsschritt nicht gleichzeitig zu den Spindelpolen, sondern sind fast über den ganzen Spindelkörper verteilt (Abb. 7). Hierbei bleiben auch Chromosomen liegen. Der zweite Teilungsschritt verläuft dann regelmäßiger. Im Gefolge dieser anormalen Teilungen entstehen sehr verschieden große Pollenkörner, die wohl auch sehr verschiedene Chromosomenzahlen besitzen. Kleinkerne und Brückenbildung zwischen zwei Kernen kamen auch zur Beobachtung. Genaueres hierüber läßt sich aber erst sagen, wenn die wenigen, stark vergrößerten Samen zur Keimung gebracht und diese Pflanzen dann zu

Chromosomenzählungen an Hand von Wurzelspitzen zur Verfügung stehen.

#### Wichtigste Versuchsergebnisse.

Aus den geschilderten Versuchsergebnissen geht hervor, daß es auch bei der Gattung *Ornithopus* möglich ist, durch Behandlung mit Colchicin polyploide Zellen und Gewebe zu erzeugen. Zunächst wurde das für die Art *O. sativus* BROT. experimentell und cytologisch sichergestellt. Bei dieser Art hat unter Anwendung der Samenvorbehandlung eine Colchicininlösung in der Konzentration 0,1% die besten Erfolge gezeigt. Bei höherprozentigen Lösungen tritt eine Schädigung der Wurzeln ein, so daß die Keimlinge schließlich zugrunde gehen. Ob bei anderen Arten der Gattung *Ornithopus* die Versuchsbedingungen eventuell anders gewählt werden müssen, soll vor allem für *O. compressus* L. noch geklärt werden. Aus einem mit 500 Samen von *O. sativus* angesetzten Versuch gelang es, vier habituell deutlich veränderte Pflanzen bis zur Samenreife durchzubringen. Diese Pflanzen wurden auch cytologisch untersucht. Zu unserer Überraschung wiesen die Wurzelspitzen ausnahmslos diploide Gewebe auf. Die daraufhin vorgenommene Prüfung meristematischer Gewebe junger Blütenknospen ergab, daß diese aus polyploiden Zellen aufgebaut waren. Es wurden aber — soweit

das spärliche, für die cytologische Untersuchung zur Verfügung stehende Material dazu ausreichte — sehr verschiedene Chromosomenzahlen festgestellt bis zu einer oktaploiden Zelle. Meistens lagen die Werte über der tetraploiden Zahl  $4n = 28$ . Die Verhältnisse liegen also offenbar so, daß sich multivalente Sprosse gut zu entwickeln vermögen, daß aber Wurzeln mit erhöhten, vor allem aneuploiden Chromosomenzahlen nicht imstande sind, ein richtiges Wurzelsystem zu bilden, weshalb solche Pflanzen wohl schon früh absterben. Im nächsten Frühjahr sollen die erheblich vergrößerten Samen der polyploiden Pflanzen zur Keimung ausgelegt werden. An den sich hieraus entwickelnden  $F_1$ -Selbstungspflanzen wird die cytologische Untersuchung weitergeführt werden.

#### Zusammenfassung.

Bei *Ornithopus sativus* BROT. wurden durch Behandlung von Samen mit 0,1%iger Colchicin-

lösung polyploide Pflanzen erhalten, von denen auch deutlich vergrößerte Samen geerntet werden konnten.

Die cytologische Untersuchung dieser Formen ergab für die Wurzelspitzen die normale diploide Zahl  $2n = 14$ , während im Blütengewebe polyploide Zellen mit sehr verschiedenen Chromosomenzahlen gefunden wurden. Die Reduktionsteilungen wiesen na-

mentlich im ersten Teilungsschritt erhebliche Störungen auf.

#### Literatur.

1. BLAKESLEE, A. F., u. G. A. AVERY: Methods of inducing doubling chromosomes in plants. J. Hered. 28, 395 (1937).

2. GRIESINGER, R., u. M. KLINKOWSKI: Geographie und Cytologie des europäischen Formenkreises der Gattung *Ornithopus*. Züchter 11, 147 (1939).

## Ein züchterisch brauchbares Verfahren zur Auslese cumarinarmer Formen beim Steinklee (*Melilotus*).

Von **Max Ufer**, Berlin.

Nachdem bereits an verschiedenen Orten (4, 5, 6) kurz auf ein von mir ausgearbeitetes Massenverfahren zum Nachweis des Cumarins im Steinklee hingewiesen worden ist, ist es nunmehr an der Zeit, diese für Zuchtzwecke geeignete Methode etwas eingehender an dieser Stelle zu behandeln. Bei dieser Gelegenheit sei nochmals dankbar erwähnt, daß auch diese Methode letzten Endes der Anregung und Initiative ERWIN BAURS ihre Entstehung verdankt. Von BAUR wurde mir seinerzeit die Züchtung eines cumarinfreien Steinklees übertragen. Es war seine Auffassung, daß es mit Hilfe einer geeigneten Auslesemethode gelingen würde, unter vielen Millionen der infolge ihres Cumarin gehalts bitteren Steinkleepflanzen auch einige „süße“, cumarinfreie Formen zu finden. Wenn das gesteckte Ziel in Müncheberg bisher nicht erreicht worden ist, so liegt dies nicht an der Verknennung der Möglichkeiten und falschen Wegen, sondern an Verhältnissen, die mit den behandelten Fragen nicht im Zusammenhang stehen.

Wertvolle chemische Vorarbeiten für die Lösung der gestellten Aufgabe sind von verschiedenen Autoren geleistet worden (1, 2, 3, 7, 8). Unter diesen hat jedoch nur OBERMAYER (3) seine Untersuchungen auf das züchterische Problem ausgerichtet. OBERMAYER hat die Bedeutung der Züchtung eines cumarinarmen Steinklees erkannt und entsprechend eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Cumarins ausgearbeitet und deren Anwendung in der Züchtung empfohlen. Diese Methode, die weiter unten beschrieben werden soll, hat zweifellos ihren Wert, kann aber wegen ihrer Zeitdauer und relativen Kompliziertheit bei der Züchtung nur zur Prüfung bereits ausgelesener cumarinarmer Formen herangezogen werden. Es galt

daher, andere Wege mehr quantitativer Art zu beschreiten.

Eine beliebte Methode zum Nachweis des Cumarins ist die Mikrosublimation. Das Cumarin sublimiert bei  $75^{\circ}\text{C}$ , und es ist möglich, aus fein zerschnittenen welkenden Steinkleeblättern durch Sublimation das Cumarin zum Auskry stallisieren zu bringen. Das Steinklee-Cumarin bildet recht charakteristische spieß- bzw. nadel förmige Krystalle. Es lag nahe, das Sublimationsverfahren züchtungstechnisch durchzubilden, doch wurde bald erkannt, daß hier sehr enge Grenzen gesteckt waren. Einen Schritt weiter hingegen führten mich die Untersuchungen WUITES (8) und WILLIAMSONS (7), die feststellten, daß die Natriumverbindung des Cumarins mit verschiedenen Metallsalzen Niederschläge gibt. Da Fällungsmethoden meistens ein klares Urteil gestatten, wurden die eigenen Versuche in dieser Richtung fortgesetzt, ohne jedoch zu einem in technischer und wirtschaftlicher Hinsicht befriedigenden Resultate zu führen.

Trotzdem wiesen diese Arbeiten der schließlich endgültig angenommenen Methode den Weg. Es ist bekannt<sup>1</sup>, daß sich Cumarin besonders in Alkalien löst. Bei Erwärmung des Cumarins mit Kali- oder Natronlauge wird die Lösung gelblich und zeigt keine Fluoreszenz. Kocht man das Cumarin jedoch längere Zeit mit konzentrierteren Alkalien, so stellt sich eine auffallende hell gelblich-grüne Fluoreszenz ein. Diese Fluoreszenz ist bekannt von der Orthocumarsäure, die im Gegensatz zum Cumarin geruch- und geschmacklos ist. Dadurch, daß es möglich ist, das nichtfluoreszierende Cumarin in die fluo-

<sup>1</sup> Vgl. BEILSTEIN, Handb. d. organ. Chemie, S. 1630, und ROSENTHALER, Nachweis organischer Verbindungen. Stuttgart 1914, S. 381.