

Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung Groß-Lüsewitz der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin

## Untersuchungen über das Pollenschlauchwachstum bei verschiedenen *Trifolium*-Artkreuzungen

Von GERTRUD MÜLLER

In der Kulturpflanzenzüchtung prüft man heute in zunehmendem Maße die Möglichkeit, durch die Vereinigung erwünschter Eigenschaften in Art- und Gattungskreuzungen wirtschaftlich verwertbare Pflanzen zu erzielen.

Bei der Bearbeitung dieses für die Züchtung völlig neuen Ausgangsmaterials beschränkt man sich nicht mehr auf die synthetisch leicht herstellbaren Bastarde, sondern versucht, bei bisher erfolglosen Kreuzungen die Ursachen für das Mißlingen des Samensatzes zu überwinden.

Vorliegende Untersuchungen sollen zur Klärung der Ursachen für die ausbleibenden Kreuzungserfolge verschiedener, wirtschaftlich mehr oder weniger bedeutenden *Trifolium*-Arten mit angenäherter Chromosomenzahl beitragen.

Die Kleezüchtung hat mit ihren bisher als praktisch unkreuzbar geltenden Arten heute noch keine praktisch verwertbaren Erfolge aufzuweisen. Bei einigen Artkreuzungen konnte vereinzelter Samensatz erreicht werden, doch nur die auf der Pflanze erhaltenen künstlichen Artbastarde *T. pratense* × *T. medium* (zit. n. ULLMANN 1938, s. Handbuch für Pflanzenzüchtung 3, 1943, S. 96) und *T. uniflorum* × *T. repens* (PANDEY 1957) waren fertil.

Das Ausbleiben des Samensatzes nach der Bestäubung kann durch verschiedene Ursachen bedingt sein:

1. Durch Ursachen vor der Befruchtung (Hemmung des Pollenschlauchwachstums),
2. durch ein Unvermögen zur Befruchtung und
3. durch Ursachen nach der Befruchtung (Embryonenabort oder Nichtlebensfähigkeit des Samens).

Die unter 1. und 3. genannten Ursachen konnten bei einzelnen Art- bzw. Gattungskreuzungen experimentell überwunden werden. Die Pollenschläuche kurzgriffeliger Arten können die Befruchtung bei langgriffeligen Arten u. U. durchführen, nachdem die Griffel abgeschnitten bzw. mit nachträglichem Wiederaufpfropfen der Narbenteile gekürzt wurden (s. SACHET 1948, DAVIES 1957, SWAMINATHAN und RADHAKRISHNA 1957). Artkreuzungen mit durch Autopolyploidisierung angeglichenen Chromosomenzahlen brachten bei *Datura* keine besseren Ergebnisse im Pollenschlauchwachstum als die Kreuzung der diploiden Ausgangsformen (BUCHHOLZ und BLAKESLEE 1941). Auf der artfremden Narbe nicht auskeimender Pollen wurde von EVANS und DENWARD (1955) in einigen Fällen durch Hormonbehandlung der Narbe zum Keimen gebracht. Vff. berichten von Versuchen, durch Pfropfungen verschiedener Arten in der Gattung *Trifolium* über eine „vegetative Annäherung“ zu Erfolgen zu gelangen.

Dem Mißlingen von Art- und Gattungskreuzungen infolge Embryonenaborten konnte in zahlreichen Fällen durch künstliche Kultivierung der aus dem Endospermgewebe entfernten Embryonen begegnet

werden. In der Gattung *Trifolium* wurden durch Embryokulturen einige Hybriden erhalten (s. KEIM, 1953). Nur aus autopolyploidisierten *T. repens* × *T. nigrescens* erzielten BREWBAKER und KEIM (1953; zit. n. PANDEY 1957) jedoch fertile Hybriden.

Für vorliegende Arbeit wurden einige diploide und tetraploide Kleearten reziprok gekreuzt und das Pollenschlauchwachstum untersucht. Die Ergebnisse sollten eine Auswahl der Kombinationen ermöglichen, bei denen ein Pollenschlauchwachstum erfolgt und unter Voraussetzung der Verschmelzung von männlichem und weiblichem Geschlechtskern Hybridisierungserfolge evtl. mit Hilfe geplanter Embryonenkulturen zu erwarten sind.

### Material und Methode

Folgende reziproke Kreuzungen wurden untersucht:

*T. pratense* (2n = 14) × *T. alexandrinum* (2n = 16),  
*T. pratense* (2n = 14) × *T. hybridum* (2n = 16),  
*T. pratense* (4n = 28) × *T. hybridum* (4n = 32),  
*T. pratense* (4n = 28) × *T. repens* (2n = 32),  
*T. alexandrinum* (2n = 16) × *T. hybridum* (2n = 16)  
und *T. hybridum* (4n = 32) × *T. repens* (2n = 32);

desgleichen folgende 3 Kombinationen mit

*T. resupinatum* (2n = 16) als Pollenelter:  
*T. pratense* (2n = 14), *T. alexandrinum* (2n = 16)  
und *T. hybridum* (2n = 16).

Die Herkünfte der Kleearten waren folgende:

2n *T. pratense*: Lembkes Rotklee  
4n *T. pratense*: 4n Lembkes Rotklee  
2n *T. hybridum*: Mitteldeutscher Schwedenklee  
4n *T. hybridum*: 4n Mitteldeutscher Schwedenklee  
2n *T. repens*: Mecklenburger Weißklee  
2n *T. alexandrinum*: aus Zürich-Oerlikon, Herkunft unbekannt  
2n *T. resupinatum*: früher Typ, aus Washington.

Die mütterlichen Blüten wurden nach mehrtägiger Isolierung vor dem Bestäuben kastriert. Bei *T. pratense* und *T. alexandrinum* geschah das durch Entfernen der bei heruntergezogenem Schiffchen von gerade geöffneten Blüten freigelegten Antheren mit der ständig in Alkohol „desinfizierten“ Pinzette. Die von WILLIAMS (1954) angegebene Kastrationsmethode durch Abziehen der gesamten Blumenkrone im Knospenstadium wurde bei *T. hybridum* und *T. repens* angewandt.

Die Kastration ist auch bei Beachtung größter Sorgfalt kaum ganz fehlerfrei durchzuführen. Die in allen Kombinationen bei einigen Griffeln in geringem Maße vorkommenden Mischbestäubungen lassen sich bei unterschiedlicher Pollenkorngröße feststellen. Die Ergebnisse von Kreuzungen zwischen in der Pollenkorngröße nicht deutlich unterscheidbaren Arten wurden mit Vorbehalt gewertet.

Das Kastrieren und Bestäuben wurde an abgeschnittenen Blütenstengeln vorgenommen und diese bei 27° und 70–90% Luftfeuchte unter Tageslicht im Brutschrank gehalten. In Übereinstimmung mit den Erfahrungen von SCHLECHT (1922) war das Auskeimen der Pollenkörner bei dieser Luftfeuchtigkeit nicht behindert.

3, 24 und 48 Stunden nach der Bestäubung wurden jeweils 8–10 Griffel für 1 bis mehrere Stunden in Alkohol-Eisessig = 3:1 fixiert, 1½ Stunden in 35%iger Essigsäure bei 60° hydrolisiert, in Pufferlösung gründlich ausgewaschen und mit Lacmoid-Martiusgelb nach NEBEL (1931) im gequetschten Ganzpräparat in 2–4facher Wiederholung auf das erfolgte Pollenschlauchwachstum hin untersucht.

Im Gegensatz zu innerartlichen Rotkleebestäubungen lagerten die Pollenschläuche bei den geprüften zwischenartlichen Kreuzungen nur in seltenen Fällen Kallose ab. Diese färbt sich nach der Behandlung leuchtend blau.

In den dick- und kurzgriffeligen *T. hybridum* und *T. repens* sind die Pollenschläuche im Quetschpräparat nicht nachweisbar. Es ist nur (nach 3 Stunden) festzustellen, ob sie durch die Narbenpapillen hindurch in den Griffel und nach 24 Stunden in den Fruchtknoten eingewachsen sind. In die Mikropylen eingewachsene Pollenschläuche sind nicht immer zu finden. ATWOOD (1941) rechnet mit einem Schließen der Mikropylen nach erfolgter innerartlicher Befruchtung ab 20 Stunden nach dem Bestäuben. Aus Samenanlagen, an denen im Versuch keine Mikropylen festzustellen waren, wurde mit Vorbehalt auf stattgefundene Befruchtung geschlossen.

### Ergebnisse

Der Zeitbedarf zum Durchwachsen der bei lang- und kurzgriffeligen Kleearten sehr unterschiedlichen Entfernungen zwischen Narbe und Mikropylen ist annähernd gleich. Unter optimalen Bedingungen beträgt er 3–6 Stunden (ATWOOD 1941). Die absolute Wachstumsgeschwindigkeit der Pollenschläuche von kurzgriffeligen Arten ist im arteigenen Griffel demnach viel geringer als die von Rotklee.

Die Pollenschlauchuntersuchungen brachten bei den einzelnen Artkreuzungen folgende Ergebnisse:

#### 2n *T. pratense* × 2n *T. alexandrinum*

Nach 3 Stunden waren die Griffel zu  $\frac{2}{3}$  ihrer Länge von mehreren Pollenschläuchen durchwachsen — bei der ersten Probe in allen Griffeln unter starker Kalloseablagerung, während diese in einer zweiten Probe völlig fehlte. 8 Stunden nach dem Bestäuben waren die Griffel von einigen Pollenschläuchen durchwachsen. Größere Pollenschlauchzahlen endeten nach 24 und 48 Stunden in etwa  $\frac{3}{4}$  Griffellänge. In Mikropylen eingewachsene Pollenschläuche wurden nicht beobachtet, die Befruchtung wird aber gut für möglich gehalten.

#### 2n *T. alexandrinum* × 2n *T. pratense*

Der Rotkleepollen keimte nicht oder trieb nur kurze Pollenschlauchstümpfe aus, die nicht in das Griffelgewebe einwachsen.

#### 2n *T. pratense* × 2n *T. hybridum*

Das Pollenschlauchwachstum war anfänglich gut, aber etwas unregelmäßig. Die längsten Pollenschläuche erreichten  $\frac{2}{3}$  Griffellänge. Nach längeren Zeitabständen waren die Griffel nicht durchwachsen. Es ist kaum mit Befruchtung zu rechnen.

#### 2n *T. hybridum* × 2n *T. pratense*

Der Rotkleepollen keimte nicht oder nur in ganz kurzen Pollenschlauchstümpfen aus.

#### 4n *T. pratense* × 4n *T. hybridum*

Trotz niedriger Keimprozent wuchsen die Pollenschläuche anfänglich gut. Nach 5 Stunden war der Griffel von einigen Pollenschläuchen fast durchwachsen, während einige Pollenschläuche bei  $\frac{2}{3}$ - bis  $\frac{3}{4}$ -Griffellänge endeten. Eine Befruchtung wird in einzelnen Fällen für möglich gehalten.

#### 4n *T. hybridum* × 4n *T. pratense*

Die Pollenschläuche erreichten die 2- bis 4fache Länge des Pollenkorndurchmessers und konnten in den oberen Griffelteil teilweise eindringen. Einwachsen in den Fruchtknoten erfolgte nicht.

#### 4n *T. pratense* × 2n *T. repens*

Die Pollenkörner keimten recht gut und wuchsen kräftig. Ihre Länge war jedoch nach 4 Stunden in  $\frac{3}{4}$ -Griffellänge erschöpft. Es ist mit keiner Befruchtung zu rechnen.

#### 2n *T. repens* × 4n *T. pratense*

Den kurzen Pollenschlauchstümpfen gelang das Durchwachsen der Narbe in den oberen Griffelteil nicht.

#### 2n *T. alexandrinum* × 2n *T. hybridum*

Nach 3 Stunden waren die Griffel bis  $\frac{2}{3}$  Länge durchwachsen. Mit einem Durchwachsen der Griffel in einem längeren Zeitintervall ist in seltenen Fällen evtl. zu rechnen.

#### 2n *T. hybridum* × 2n *T. alexandrinum*

Den kurzen Pollenschläuchen gelang es nicht, in den Griffel einzudringen. Meist platzten sie in der Narbe.

#### 4n *T. hybridum* × 2n *T. repens*

Es keimten nur wenige Pollenkörner. Die kurzen Pollenschläuche wurden in der Narbe gehemmt.

#### 2n *T. repens* × 4n *T. hybridum*

Es wurden einige kallosehaltige Pollenschläuche gefunden und nach 24 und 64 Stunden in Mikropylen eingewachsene Pollenschläuche (pro Kapsel in 1 Mikropyle). Da sich die Pollenkorngößen dieser beiden Arten nur ungenügend unterscheiden, ist dieses positive Ergebnis wegen der Möglichkeit der Mischbestäubung mit einigem Vorbehalt zu werten.

#### 2n *T. pratense* × 2n *T. resupinatum*

In 3 Stunden wurden die Griffel zu  $\frac{2}{3}$  durchwachsen. Das weitere Wachstum erfolgte sehr langsam. Eine Befruchtung wird in seltenen Fällen evtl. für möglich gehalten.

#### 2n *T. alexandrinum* × 2n *T. resupinatum*

In 3 Stunden erreichten die Pollenschläuche  $\frac{2}{3}$  bis ganze Griffellänge, teilweise unter mäßiger Kalloseablagerung. Die Befruchtung wird für möglich gehalten.

#### 2n *T. hybridum* × 2n *T. resupinatum*

Nach 3–4 Stunden war der Griffel fast ganz durchwachsen. Es ist in einigen Fällen mit Befruchtung zu rechnen.

### Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchungen gestatten die Trennung der Kreuzungen in zwei Gruppen: In einigen Kreuzungen wachsen die Pollenschläuche nicht im artfremden Griffel, in den übrigen findet ein unterschiedlich starkes Pollenschlauchwachstum statt. Bei einzelnen dieser letzten Kombinationen erreichen die Pollenschläuche den Fruchtknoten in der Regel nicht, während bei anderen Kreuzungen die Pollenschläuche die Samenanlagen wahrscheinlich verschiedenen häufig befruchten (vgl. BUCHHOLZ, WILLIAMS und BLAKESLEE 1935).

Die von ULLMANN (zit. n. Handb. f. Pflanzenzüchtg. 1943) als erfolgreich aufgeführten reziproken Kreuzungen *T. pratense* × *T. hybridum* weisen im Vergleich zu dem negativen Ergebnis der Pollenschlauchuntersuchungen besonders bei *T. hybridum* × *T. pratense* darauf hin, daß in diesem Fall eine Befruchtung nur durch ein außergewöhnliches Verhalten der Pollenschläuche zustande kommen konnte.

Trotz Auswahl der Kreuzungspartner nach gleicher oder angenäherter Chromosomenzahl erfolgte das Pollenschlauchwachstum in den reziproken Kreuzungen unterschiedlich.

Bei Beteiligung von polyploidisierten Kreuzungspartnern sind bei vorliegenden Kombinationen keine grundsätzlich besseren Bastardierungserfolge zu erwarten als bei den diploiden Ausgangsformen.

Als eine Möglichkeit, die erfolgte Befruchtung und eine unterschiedliche Befruchtungshäufigkeit genauer als durch die Untersuchungen des Pollenschlauchwachstums nachzuweisen, wird das Vermessen der Samenanlagen einer größeren Anzahl bestäubter Griffel von kastrierten und auf der Pflanze belassenen Blüten durch einige Tage gesehen.

Bei den Kleearten mit kleinem Pollen (*T. hybridum* und *T. repens*) wäre in den Kreuzungen mit *T. pratense* als Mutterpflanze zu prüfen, ob nach Griffelkürzungen ein Einwachsen der Pollenschläuche in den Fruchtknoten zu erzielen ist.

Zusammenfassend läßt sich feststellen: Wahrscheinlich ist der Kreuzungserfolg bei vielen *Trifolium*-Arten in erster Linie von einem unregelmäßigen Pollenschlauchwachstum abhängig, während Postfertilisationsstörungen erst sekundär wirksam werden.

#### Literatur

1. ATWOOD, S. S.: Cytological basis for incompatibility in *Trifolium repens*. Am. J. Bot. 28, 551—557 (1941). — 2. BUCHHOLZ, J. T., and A. F. BLAKESLEE: Pollen-

tube growth in intra- and interspecific pollinations between balanced polyploids in *Datura*. Genetics 26, 142 (Abstr.) (1941). — 3. BUCHHOLZ, J. T., L. F. WILLIAMS and A. F. BLAKESLEE: Pollen-tube growth of ten species of *Datura* in interspecific pollinations. Proc. Nat. Acad. Sci. 21, 651—656 (1935). — 4. DAVIES, A. J. S.: Successful crossing in the genus *Lathyrus* through stylar amputation. Nature 180, 612 (1957). — 5. EVANS, H., and TH. DENWARD: Grafting and hybridization experiments in the genus *Trifolium*. Nature 175, 687 (1955). — 6. KEIM, W. F.: Interspecific hybridization in *Trifolium* utilizing embryo culture techniques. Agron. Journ. 45, 601—606 (1953). — 7. MÜLLER-STOLL, W. R., and G. LERCH: Über den physiologischen Charakter der Kallosebildung von Siebröhren und Pollenschläuchen und die Beziehungen zu den Zellvorgängen. Biol. Zbl. 76, 595—612 (1957). — 8. NEBEL, B. R.: Lacmoid-martius-yellow for staining pollentubes in the style. Stain. Techn. 6, 27—29 (1931). — 9. PANDEY, K. K.: A self-compatible hybrid from a cross between two self-incompatible species in *Trifolium*. J. Heredity 48, 278—281 (1957). — 10. SACHET, M. H.: Fertilization in six incompatible species crosses of *Datura*. Am. Journ. Bot. 35, 302—309 (1948). — 11. SCHLECHT, F.: Untersuchungen über die Befruchtungsverhältnisse bei Rotklee (*Trifolium pratense*). Z. Pflanzenzüchtg. 8, 121—157 (1922). — 12. SLOW, R. A.: A preliminary report on pollen-tube growth in red clover (*Trifolium pratense* L.). Bull. Welsh. Plant Breed. Sta. Ser. H. 12, 228—233 (1931). — 13. SWAMINATHAN, M. S., and MURTY B. RADHAKRISHNA: One-way incompatibility in some species crosses in the genus *Nicotiana*. Ind. Journ. of Genetics and Plant Breed. 17, 23—26 (1957). — 14. THOMPSON, W. P.: The causes of hybrid sterility and incompatibility. Proc. and Transactions of the R. Soc. Can. 34, Sect. 5, Ser. III, 1—13 (1940). — 15. WILLIAMS, W.: An emasculation technique for certain species of *Trifolium*. Agron. Journ. 46, 182—184 (1954).

## KURZE MITTEILUNGEN

### Fünf Jahre Arbeitsgemeinschaft für Krankheitsbekämpfung und Resistenzzüchtung bei Getreide und Hülsenfrüchten

Die Arbeitsgemeinschaft für Krankheitsbekämpfung und Resistenzzüchtung bei Getreide und Hülsenfrüchten, die im März 1954 in Weihenstephan gegründet wurde, trat am 27. November 1959 unter dem Vorsitz von Präsident Professor Dr. RICHTER zum fünften Male zu ihrer jährlichen Generalversammlung zusammen. Die Arbeitsgemeinschaft hat in den fünf Jahren ihres Bestehens ihre Existenzberechtigung erwiesen. Das angestrebte Ziel, die an der Resistenzzüchtung bei Getreide und Hülsenfrüchten beteiligten Züchter und die an der Erforschung der Getreide- und Leguminosenkrankheiten tätigen Wissenschaftler zu fruchtbarem Gedankenaustausch und gemeinsamer Arbeit zusammenzuführen, ist erreicht worden. Die Arbeitsgemeinschaft gliedert sich in folgende Gruppen:

- I. Brandkrankheiten, *Fusarium*, *Helminthosporium* (Professor Dr. BÖNING);
- II. Getreideroste, Getreidemehltau, *Septoria* (Professor Dr. HASSEBRAUK);
- III. Physiologische Resistenz (Dr. VON ROSENSTIEL);
- IV. Tierische Getreideschädlinge (Professor Dr. RADEMACHER);
- V. Leguminosenkrankheiten (Professor Dr. SCHEIBE).

Die Arbeitsgemeinschaft hat den ihr anfänglich gesteckten Rahmen längst gesprengt und erfreut sich heute auch der regen Mitarbeit zahlreicher Fachleute aus benachbarten Staaten. Die bisher erzielten Erfolge bieten die Gewähr, daß auch in Zukunft fruchtbare Arbeit geleistet wird.