

Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung der Friedrich-Schiller-Universität Jena in Dornburg/Saale

## Eine neue Methode zur Colchicinierung von Gramineen und großkörnigen Leguminosen

Von GERHARD SCHUMANN

Mit 5 Abbildungen

Zur experimentellen Erzeugung polyploider Pflanzen sind, seit Einführung der Colchicinmethode durch BLAKESLEE und AVERY (2) sowie durch NEBEL (5) im Jahre 1937, eine Anzahl weiterer Behandlungsmethoden beschrieben worden. Wichtig für den Erfolg jeder Colchicinierung ist es, daß das Agens in das embryonale Gewebe gelangt. Eine wirksame Applikation des Colchicins gestaltet sich darum um so einfacher, je leichter man die Sproßmeristeme erreichen kann. Bei einer Anzahl von Nutzpflanzen, besonders aber bei den Gramineen, war man bisher wegen der schwer zugänglichen Plumula vorwiegend auf Samen- bzw. Wurzelbehandlung angewiesen. Erfolgt Samenquellung in Colchicinlösung, so werden wohl alle Vegetationspunkte vom Colchicin erreicht, jedoch werden meist die Keimwurzeln so stark geschädigt, daß nur eine geringe Erfolgsquote zu erwarten ist. STRAUB (7) rechnet bei diesem Verfahren mit 95% absterbenden Keimlingen. Genomverdoppelungen an wertvollem Kreuzungsmaterial, das meist nur in geringer Menge vorhanden ist, wird man mit Hilfe anderer Verfahren zu erzeugen suchen. Die Arbeiten von GYÖRFFY (4) auf diesem Gebiet waren daher von entscheidender Bedeutung. Er praktizierte eine Behandlung der Sproßspitzen mit Wattebüschen, die mit einer Colchicinlösung getränkt wurden. Hierdurch wird eine Schädigung der Wurzeln vermieden. Nach diesem Prinzip sind eine Reihe anderer Verfahren entwickelt worden, die mit größerem Erfolg besonders bei dicotylen Pflanzen anwendbar sind.

Die in der Literatur für Gramineen angegebenen Möglichkeiten zur Polyploidisierung brachten in eigenen Versuchen keine befriedigenden Ergebnisse. Durch Injektion von Colchicin nach OLTSMANN (6) in die Basis der Sprosse von *Lolium* und *Festuca* wurden die Pflänzchen durch den gewaltsamen Eingriff so geschädigt, daß sie bald danach eingingen. Nach der von ESSER (3) beschriebenen Eintauchmethode konnten bei den benutzten Gräsern ebenfalls keine polyploiden Pflanzen erzeugt werden. Die Samen, die entlang des inneren Randes einer in Erde versenkten Petrischale auf feuchtem Zellstoff ausgelegt werden, müssen mit ihren Würzelchen über den Schalenrand in die Erde wachsen. Kurz bevor das erste Blatt die Koleoptile durchbricht, wird der Zellstoff entfernt und in die Petrischale so viel Colchicinlösung gegeben, bis die Keimspitzen und Karyopsen bedeckt sind. Die Lösung wurde jedoch in unseren Versuchen in kurzer Zeit — wahrscheinlich durch Kapillarität (die Pflanzen legten sich ganz dicht an den Schalenrand) — aus der Schale in den Boden geleitet. Andere Forscher ließen die Colchicinlösung über die Wurzeln älterer Pflanzen aufnehmen. WELLENSIEK (11) brachte die Wurzeln geteilter Getreidepflanzen in eine wäßrige Colchicinlösung. Um die Wurzelschädigung in erträglichen Grenzen zu halten, führte er eine fraktionierte Be-

handlung durch. Zwischenzeitlich setzte er die Pflanzen wieder in Wasser.

Bei der Herstellung polyploider Gräser konnte ein Verfahren entwickelt werden, bei dem eine Wurzelschädigung weitgehend vermieden, gleichzeitig aber das schwer zugängliche, teilungsfähige Sproßgewebe vom Mitosegift erreicht werden kann. Diese Kombination ließ sich ermöglichen, indem man an Keimpflanzen, die vom Samen noch ernährt werden, die Karyopse entfernt und somit den Nährstoffstrom unterbricht. Bringt man nun an die Samenansatzstelle einen Tropfen Colchicin-Traganthschleim, dann wird dieser statt der Nährstoffe aufgenommen und gelangt an die Vegetationspunkte, ohne die Wurzeln allzu stark zu schädigen. Bereits die ersten Versuche an *Lolium perenne* ergaben von 45 behandelten Pflanzen 18 cytologisch bestätigte Tetraploide. Als weitere Stütze soll das TKG angeführt werden, das sich bei diesen Pflanzen in der C<sub>1</sub> um absolut 1,45 g erhöht hatte. Auch in der C<sub>2</sub> war das TKG fast doppelt so hoch (rel. = 192) wie bei den Kontrollen.

Die Methode wurde inzwischen verfeinert und soll an Hand neuer experimenteller Daten nachstehend beschrieben werden. Die Samen der zu behandelnden Pflanzen werden in halb gefüllte Aussaat-schalen auf humose Gartenerde, in einem Abstand von 2 × 2 cm, flach ausgelegt. Die Schalen feuchtet man gut an und deckt sie mit einer Glasscheibe ab. Nach 2—3 Tagen sind — bei einer Temperatur von 18—24 °C — die ersten Wurzeln sichtbar. Dringen diese nicht von selbst in den Boden, muß man mit einem Pikierholz nachhelfen. 8—10 Tage nach der Aussaat (bei Gramineen muß das erste Blatt etwa 2 cm länger als die Koleoptile sein) entfernt man mit einer Präpariernadel den Samen einschließlich Scutellum, legt um die Pflanze eine dünne Kunststoff-Folie und bringt mit einer Lanzettnadel einen Tropfen zähflüssiger Colchicin-Traganthlösung auf die Samenansatzstelle (Abb. 1). Die Folie schirmt den Boden ab, so daß kein Colchicin in die Erde gelangen kann. Danach wird die Aussaat-schale, die vor der Behandlung noch einmal gut angefeuchtet worden war, mit einer Glasscheibe für 24 Stunden wieder abgedeckt. Dadurch wird erneut ein wasserdampfgesättigter Luftraum geschaffen, der den Colchicin-Traganthschleim nicht austrocknen läßt. Traganth als Trägersubstanz hat sich bei diesen Versuchen ausgezeichnet bewährt. Das Mittel ist leicht löslich, es erstarrt nicht, behält darum lange die dickflüssig schleimige Konsistenz bei, haftet gut und trocknet nur langsam aus (SCHWANITZ (8)).

Nach der Einwirkungszeit, die bei den einzelnen Objekten zu variieren sein wird, häufelt man, um eine bessere Wurzelbildung zu ermöglichen, an die Pflanzen etwas Erde. Acht bis zehn Tage nach der Colchicinierung ist der Erfolg in Form von Verdickungen im Bereich der Koleoptile sichtbar (Abb. 2

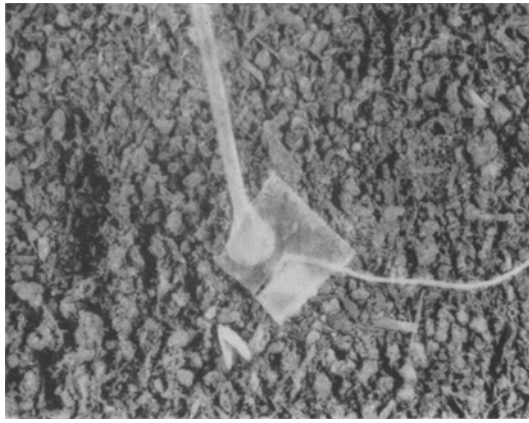


Abb. 1. Der Samen ist mit einer Präpariernadel vom Sproß getrennt worden, um die Pflanze ist eine Kunststoff-Folie gelegt. Mit einer Lanzett-nadel wird ein Colchicin-Traganth-Tropfen auf die Samen-ansatzstelle gebracht. Objekt: *Festuca pratensis*.

und 3). Die optimale Konzentration der Colchicinlösung muß für jede Art empirisch ermittelt werden, sie wird allgemein zwischen 0,25% und 0,1% liegen.

Die Colchicin-Traganthlösung muß frei von Luftblasen sein, man vermeide darum jedes Rühren. Zwei Tage vor Gebrauch des Agens trägt man auf die Colchicinlösung eine dünne Schicht von gemahltem Traganth auf, das bald danach mit der Flüssigkeit eine zähe Masse bildet.

Von 38 Roggenpflänzchen, die auf diese Weise mit einer Konzentration von 0,25% colchiciniert wurden, waren nach 8 Wochen 31 Pflanzen noch lebend. Die eingegangenen Pflanzen bildeten statt eines neuen Blattes nur eine starke Verdickung am Vegetationspunkt. Zur Feststellung der Polyploidie wurden an den 31 Pflanzen zunächst Messungen an Spaltöffnungen vorgenommen, wie sie GYÖRFFY (4) und SCHWANITZ (9 u. 10) empfohlen haben. Die Messungen erfolgten am 4. Blatt. 29 Pflanzen hatten gegenüber den Kontrollen mit  $p = < 0,10\%$  gesichert größere Schließzellen. Die Stomata der übrigen zwei Pflanzen waren zwar nicht signifikant größer, doch lagen ihre arithmetischen Mittel über dem Durchschnitt der Kontrollen. Die mittlere Länge der Schließzellen der colchicinierten Pflanzen zu den Kontrollen verhält sich wie 1,3:1. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Chromosomenzählungen an Wurzelspitzen ersichtlich, die an elf Pflanzen mit verschiedenen großen Spaltöffnungen vorgenommen wurden. Die Wurzeln wurden in Carnoy fixiert und nach 24 Stunden die Chromosomen nach der Karminessigsäure-Methode gefärbt und gezählt. Alle untersuchten Pflanzen waren polyploid, hatten jedoch mehr oder weniger stark mixochimäre Gewebe gebildet.

Die für Gramineen beschriebene Methode wurde in weiteren Versuchen an großkörnigen Leguminosen erprobt. Nachdem Pflanzen von *Vicia faba* und *Vicia sativa* in gleicher Weise wie Roggen herangezogen wurden, erfolgte am 9. Tag nach der Aussaat die Colchiciniierung. Die Samen wurden mit einer Rasierklinge vom Sproß getrennt und auf die Ansatzstelle ein Tropfen Colchicin-Traganthschleim gebracht. Der Erfolg dieser Induktion ließ sich aus arbeitstechnischen Gründen nur an *Vicia faba* näher untersuchen. Die Behandlung erfolgte mit 0,25 prozentiger Lösung. Die karyologischen Untersuchungen wurden an jungen Blättern acht Wochen alter Pflanzen vorgenommen.

Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, können 7 Pflanzen als tetraploid, 8 Pflanzen als mixoploid angesprochen werden (Abb. 4). Insgesamt wurden 40 Sämlinge colchiciniert, von denen leider durch starken Brennfleckenbefall (*Glomerella lindemuthiana*) 25 abstarben. Da die eingegangenen Pflanzen in habitueller Hinsicht den untersuchten Polyploiden entsprachen (gestauchte Sproßachse, monströse Blätter (Abb. 5)), kann auch bei Leguminosen mit einem positiven Ergebnis gerechnet werden. Besonders bemerkenswert ist der Umstand, daß alle untersuchten Seitentriebe in ihrem Polyploidiegrad mit dem Hauptsproß übereinstimmen. Das deutet darauf hin, daß bei dem frühen Behandlungszeitpunkt dieser Methode keine oder nur wenige diploide Sektoren entstehen. Bei den bisher gebräuchtem Verfahren besteht meist die Gefahr, daß der polyploide Hauptsproß von den diploiden Nebensprossen überwuchert wird.

Die bei einigen Arten vorhandenen Schwierigkeiten bei der Auslösung der Polyploidie können durch die beschriebene Methode überwunden werden. Es ist bei weitgehender Schonung der Wurzeln ohne Schwierigkeiten möglich, eine große Anzahl Pflanzen erfolgreich zu colchiciniieren. Bei optimaler Konzentration der Lösung und bei richtiger Anwendungszeit (die Samen haben dann 30 bis 40% ihrer Trockensubstanz verloren) ist mit einem hohen Prozentsatz Polyploider zu rechnen. Das Verfahren wird sich besonders günstig bei der Erzeugung amphidiploider Art- und Gattungsbastarde verwenden lassen. Solche



Abb. 2. Verdickung der Sproßbasis. Die jüngsten Blätter schieben sich durch die aufgeplatzte Koleoptile seitlich hervor. Aufnahme: 10 Tage nach der Colchiciniierung. Objekt: *Festuca pratensis*.



Abb. 3. Verdickung der Sproßbasis. Aufnahme: 10 Tage nach der Colchiciniierung. Objekt: *Triticum monococcum*.

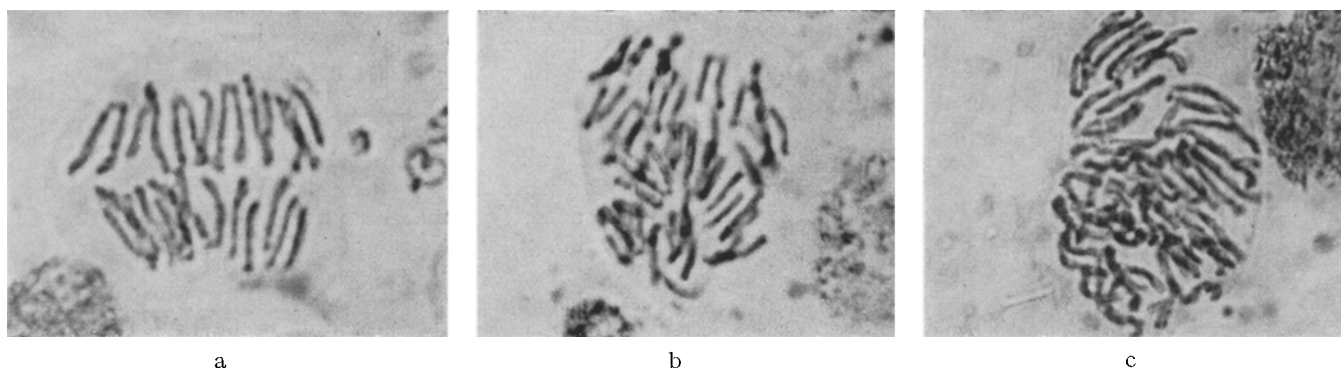
Abb. 4. Polypleide Zellen von *Vicia faba*. Aufnahme: 8 Wochen nach der Colchicinierung. a) tetraploid, b) u. c) hochpleid.

Tabelle 1. Ergebnisse der Spaltöffnungsmessungen und karyologischen Untersuchungen an Roggenwurzelspitzen und Ackerbohnen-Blattmeristemen.

Pflanzen Nr.	Länge der Spaltöffnungen (Teilstriche)	Anzahl d. untersucht. Wurzelspitzen bzw. Blattmeristeme	Anzahl d. auszählbaren Meta-phasepl.	diploide Zellen	tetra-pleide Zellen	hoch-pleide Zellen
<b>Roggen</b>						
23	21,3 ± 0,26	3	6	—	5	1
15	19,7 ± 0,32	4	27	1	20	6
2	19,0 ± 0,15	4	9	1	8	—
26	18,2 ± 0,27	3	7	1	5	1
30	17,6 ± 0,64	3	5	—	3	2
21	17,0 ± 0,37	2	7	—	2	5
6	16,0 ± 0,36	3	18	5	13	—
19	15,7 ± 0,43	2	12	—	10	2
24	15,4 ± 0,10	2	4	—	3	1
29	14,3 ± 0	3	8	4	4	—
17	13,7 ± 0,16	3	11	2	9	—
Kontr.	13,3 ± 0,21	—	—	—	—	—
<b>Ackerbohnen</b>						
1	—	2	7	1	3	3
2	—	3	18	12	6	—
3	—	2	11	—	11	—
4	—	2	6	—	6	—
5	—	2	9	—	8	1
6	—	2	9	1	6	2
7	—	3	10	2	7	1
8	—	2	18	3	13	2
9	—	2	7	—	7	—
10	—	2	11	—	11	—
11	—	2	7	—	7	—
12	—	2	21	5	16	—
13	—	2	14	4	10	—
14	—	2	4	—	4	—
15	—	2	5	1	4	—

Bastarde sind im diploiden Zustand meist steril. In den seltensten Fällen war es bisher möglich, solche Kreuzungen für die praktische Züchtung überhaupt auszunutzen, obwohl gerade sie ein wertvolles Ausgangsmaterial darstellen (BECKER und SKIEBE (1)).

Die neue Methode ist dadurch charakterisiert, daß sie im Prinzip das Colchicin in den Nährstoffstrom bringt, wodurch ein Transport an die Meristeme von selbst erfolgt. Daher kann der Anwendungsbereich auch noch erweitert werden. So ist es zum Beispiel möglich, an Knollengewächsen Behandlungen vorzunehmen, indem man in Nähe der Blattprimordien einen Teil vom Knollenfleisch abnimmt und auf diese Schnittfläche bei hoher Luftfeuchtigkeit den Colchicin-Traganthschleim bringt. In Tastversuchen wurde an Cyclamensämlingen, nachdem das erste Blatt ergrünt war, ein Segment vom Knollenfleisch abgeschnitten. Auf die Wundfläche wurde, wie oben

beschrieben, das Behandlungsmedium gebracht. Die folgenden Blätter zeigten das typische Bild von Colchicinmorphosen.

Schließlich sei noch bemerkt, daß der Colchicinverbrauch sehr gering ist. Bei einer Konzentration

Abb. 5. Polypleide Pflanzen von *Vicia faba*. Aufnahme: 8 Wochen nach der Colchicinierung.

von 0,25% können mit einem Gramm Colchicin etwa 3400 Pflanzen behandelt werden. Auch liegt die Arbeitsproduktivität recht hoch. Eine geübte Kraft kann in einer Stunde 60 Pflanzen behandeln.

#### Literatur

1. BECKER, G., und K. SKIEBE: Eine neue Methode der Colchicinbehandlung. *Der Züchter* 25, 161—163 (1955).
2. BLAKESLEE, A. F., and A. G. AVERY: Methods of inducing doubling of chromosomes in plants by treatment with colchicine. *J. Heredity* 28, 393—411 (1937).
3. ESSER, K.: Eine Eintauchmethode zur Colchicinbehandlung. *Der Züchter* 23, 148—150 (1953).
4. GYÖRFY, B.: Die Colchicinmethode zur Erzeugung polypleider Pflanzen. *Der Züchter* 12, 139—149 (1940).
5. NEBEL, B. R.: Mechanism of polyploidy through colchicine. *Nature* 140, 1101 (1937).
6. OLTSMANN, W.: Die Herstellung polypleider Pflanzen mit Hilfe der Colchicin-Injektion. *Der Züchter* 20, 209—210 (1950).
7. STRAUB, J.: Wege zur Polyploidie. 2. Aufl. Naturwiss. Verlag, Berlin 1950.
8. SCHWANITZ, F.: Eine neue wirkungsvolle und sparsame Methode der Colchicinbehandlung (Colchicin-Traganth-Schleim). *Der Züchter* 19, 301—302 (1949).
9. SCHWANITZ, F.: Untersuchungen an polypleiden Pflanzen. XIII. Zellgröße und Blütenfüllung. Untersuchungen an polypleiden Formen von *Bryophyllum daigremontianum* Hamel et Perrier sowie an gefüllten und ungefüllten Formen verschiedener Gartenpflanzen. *Der Züchter* 22, 244—254 (1952).
10. SCHWANITZ, F.: Einige kritische Bemerkungen zur Methode der Bestimmung der Polyploidie durch Messung der Pollen- und Spaltöffnungsgröße. *Der Züchter* 22, 273—275 (1952).
11. WELLENSIEK, S. J.: Methods of producing triticales. *J. Heredity* 38, 167—173 (1947).