

duction and phenotypes of wheat-rye chromosome addition lines. *Heredity* **12**, 301—315 (1958). — 3. HYDE: Addition of individual *Haynaldia villosa* chromosomes to hexaploid wheat. *Am. J. Bot.* **40**, 174—182 (1953). — 4. JENKINS, B. C., and E. E. LAURIE: Some alien chromosome addition to common wheat. *Proc. X International Congress of Genetics* **2**, 134 (1958). — 5. KNOTT, D. R.: The effect on wheat of an *Agropyron* chromosome carrying rust resistance. *Proc. X International Congress of Genetics* **2**, 148 (1958). — 6. OHLENDORF, A.: Cytologische Untersuchungen an Weizen-Queckenbastarden. *Der Züchter* **22**, 34—59 (1952). — 7. OHLENDORF, A.: Weitere cytologische Untersuchungen an Weizen-Quecken-Bastarden. *Der Züchter* **25**, 332—351 (1955). — 8. O'MA-

RA: Cytogenetic studies in *Triticale*. I. A method for determining the effects of individual Secalechromosomes on *Triticum*. *Genetics* **25**, 401—408 (1941); II. The kinds of intergeneric chromosome addition. *Cytologia* **16**, 225—232 (1951). — 9. SEARS, E. R.: The aneuploids of common wheat. *Mo. Agric. Expt. Sta. Res. Bull.* **572**, 1—58 (1954). — 10. SEARS, E. R.: The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat. *Brookhaven Symp. in Biology* **9**, 1—22 (1956). — 11. SCHLEHUBER, A. M., and E. E. SEBESTA: Progress in wheat-grass breeding. *Proc. Okla. Acad. Sci.* **39**, 6—16 (1959). — 12. BAKSHI, J. S., and A. M. SCHLEHUBER: Identification of a substituted chromosome pair in a *Triticum-Agropyron* Line. *Proc. Okla. Acad. Sci.* **39**, 16—21 (1959).

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

Die Erzeugung und Erkennung von Tetraploiden bei Gramineen

Von HORST TIEMANN

Mit 7 Abbildungen

Bei den Monokotylen ist die Genomverdoppelung wegen des schwer zugänglichen Vegetationskegels schwierig. Von ESSER (1), HULEWICZ (3), MYERS (6), WIT (8), WIT und SPECKMANN (9) wird die Anwendung von Colchicin nach verschiedenen Methoden empfohlen, während nach KOSTOFF (4) die Gramineen sehr stark auf Acenaphthen reagieren. Da bei der praktischen Züchtung mit einem großen Ausgangsmaterial gearbeitet werden muß, sind ergiebige und leicht anwendbare Behandlungsmethoden notwendig. Auch müssen die erzeugten Polyploiden leicht und schnell, möglichst ohne zytologische Untersuchung, erkannt werden. In vorliegenden Untersuchungen wurden daher verschiedene bekannte Methoden zur Verdoppelung des Genoms bei Gramineen vergleichsweise angewandt und die Brauchbarkeit verschiedener Merkmale zur Bestimmung des polyploiden Materials geprüft.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an *Lolium multiflorum* var. *westerwoldicum* mit $n = 7$ der Sorte „Bernburger“ durchgeführt. Folgende Methoden wurden angewandt:

Methode I — Behandlung angekeimter Samen mit Colchicin

Entsprechend der von WIT und SPECKMANN (8, 9) angewandten Methode wurden Samen in Wasser angekeimt und anschließend bei einer Keimwurzellänge von 1—2 mm in wäßrige Lösungen mit 0,05; 0,1 und 0,2% Colchicin getaucht. Nach 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 24 Stunden wurden die Keimlinge aus der Colchicininlösung genommen, mit Wasser ab gespült und in Erde ausgelegt.

Methode II — Behandlung trockener Samen mit Colchicin

In Anlehnung an die von MYERS (6) beschriebene Methode wurden die Samen direkt in wäßrigen Lösungen mit 0,05; 0,1 und 0,2% Colchicin eingequollen. Nach 2, 4, 6, 8, 10, 15, 25, 30 und 35 Stunden wurden die Samen herausgenommen, mit Wasser ab gespült und in Erde ausgelegt.

Methode III — nach HULEWICZ (3)

Die Samen wurden zehn Minuten in einer 0,1%igen Sublimatlösung gewaschen, mit destilliertem Wasser ab gespült und auf Filtrierpapier in Petrischalen angekeimt. Die gekeimten Samen wurden in neue Petrischalen, die zur Hälfte mit 1,3%igem Agar mit 50%iger Knopscher Lösung gefüllt waren, umgesetzt. Nachdem die Koleoptilen eine Länge von etwa 1,5 cm erreicht hatten, wurden die Petrischalen mit 0,05 und 0,1%igen Colchicininlösungen gefüllt und die Koleoptilen kurz über dem Vegetationskegel unter der Oberfläche der Colchicininlösung abgeschnitten. Nach 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 24 Stunden wurden die Colchicininlösungen abgegossen, die Sämlinge mit Wasser ab gespült und in Erde gepflanzt.

Methode IV — nach ESSER (1)

Eine Petrischale wurde in humose Erde in einem Blumentopf bis zu ihrem oberen Rand eingedrückt. Die Samen wurden im Abstand von 1 cm am inneren Schalenrand auf feuchtem Filtrierpapier ausgelegt. Die Koleorrhizen zeigten zum Schalenrand. Die Wurzeln wuchsen über den Schalenrand in die Erde. Kurz vor Erscheinen des ersten Blattes wurde das Filtrierpapier entfernt, die Koleoptilen aufgeritzt und unmittelbar über dem Vegetationskegel abgeschnitten. Die Keimlinge hingen jetzt an ihren Wurzeln am Innenrand der Petrischale. Die Schale wurde soweit mit einer 0,5%igen Colchicininlösung gefüllt, daß Keimspitzen und Samen völlig, die Wurzeln aber noch nicht eingetaucht waren. Nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 24 Stunden wurden die Jungpflanzen herausgenommen, mit Wasser ab gespült und in Erde gepflanzt.

Methode V — Behandlung angekeimter Samen mit Acenaphthen (Dampfmethode)

In Petrischalen wurden je 1,2 g pulverisiertes Acenaphthen gestreut, mit Filtrierpapier bedeckt und mit Wasser gut angefeuchtet. Die Schalen wurden mit angekeimten Samen (Wurzellänge 1—2 mm) belegt und während der Behandlungszeit geschlossen gehalten. Nach 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Tagen wurden die Keimlinge herausgenommen, mit Wasser ab gespült und in Erde umgesetzt.

Methode VI — Behandlung angekeimter Samen mit Acenaphthen (Kontaktmethode)

Petrischalen wurden mit 2 Scheiben Filtrierpapier ausgelegt, mit Wasser angefeuchtet und mit angekeimten Samen belegt. 1,2 g pulverisiertes Acenaphthen wurde auf die Keimlinge gestreut. Während der Behandlungszeit blieben die Schalen geschlossen. Nach 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Tagen wurden die Keimlinge herausgenommen, mit Wasser abgespült und in Erde umgesetzt.

Methode VII — Behandlung trockener Samen mit Acenaphthen. Behandlung wie bei Methode V

Methode VIII — Behandlung trockener Samen mit Acenaphthen. Behandlung wie bei Methode VI

Nach 1958 durchgeführten Vorversuchen wurden die beschriebenen Methoden im April 1959 an je 100 Samen angewandt. Je die Hälfte der Samen bzw. Keimlinge wurde bei 15—18° und bei 28—30 °C behandelt. Die Sämlinge und die Kontrollpflanzen wurden in mit Erde gefüllten Pikierkästen im Gewächshaus angezogen, im Juni in Frühbeetkästen gepflanzt und nach der Samenreife im September geerntet¹. Durch visuelle Beurteilung der Blatt- und Blütenstandgröße sowie durch Stomata-, Blattdicken- und Pollenmessungen wurden die wahrscheinlich diploid gebliebenen Pflanzen vorselektiert.

Bei mindestens 5 Samen jeder geernteten Einzelpflanze wurden die Chromosomen in Wurzelspitzen-Präparaten gezählt und daraus die Wirksamkeit der Behandlungsmethoden und der Vorselektion bestimmt.

Ergebnisse

Die behandelten Pflanzen wurden in 3 Gruppen eingeteilt:

1. Pflanzen, die vollkommen den Kontrollen gleichen, 2. Pflanzen, die infolge zu starker Spindelgiftwirkung eingingen, und 3. Pflanzen, die verändert und entwicklungsfähig waren.

Die offensichtlich durch das Zellgift veränderten Pflanzen der Gruppe 3 zeigten gegenüber den unbehandelten neben einer allgemeinen Wachstumsverzögerung verdickte Koleoptylen und keulenförmig angeschwollene Wurzelspitzen (Abb. 1). Etwa 3 Wochen nach der Behandlung setzten sie ihr Wachstum wieder normal fort.

Merkmale zur Unterscheidung diploider und tetraploider Pflanzen in der C₀-Generation

An vollständig entwickelten Organen der veränderten und an den unbehandelten Pflanzen wurden Unterscheidungsmerkmale zwischen diploiden und tetraploiden Pflanzen ermittelt, um eine Vorselektion der Diploiden durchführen zu können. Diese Vorselektion ist nützlich, da haploide Gameten den in der C₀-Generation schon geringen Samenansatz der Tetraploiden weiter vermindern (HERTZSCH, 2) und die zeitaufwendige karyologische Untersuchung an weniger Pflanzen durchgeführt zu werden braucht.

Als brauchbare Merkmale zur Vorselektion erwiesen sich neben der Blatt- und Blütenstandgröße

¹ Fräulein LIESELOTTE MAASS sei an dieser Stelle herzlich für ihre gewissenhafte Mitarbeit gedankt.

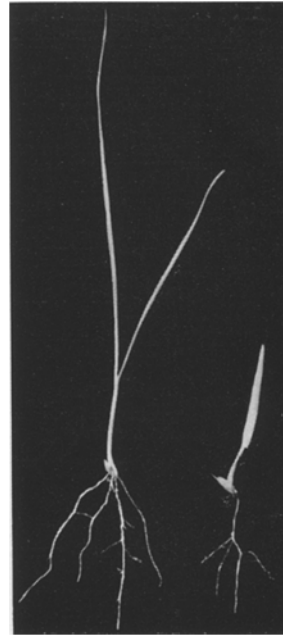


Abb. 1. Gleichaltrige Pflanzen. — Links: unbehandelt; rechts: behandelt.



Abb. 2. Blütenstände. — Links: diploid; rechts: tetraploid.



Abb. 3. Stomata. — Links: diploid; rechts: tetraploid. (Vergr. 150 X)

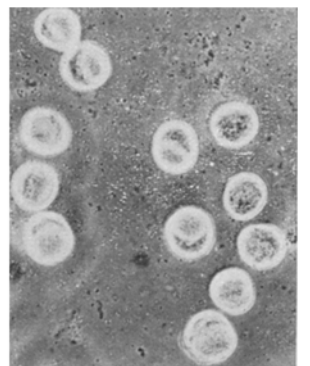
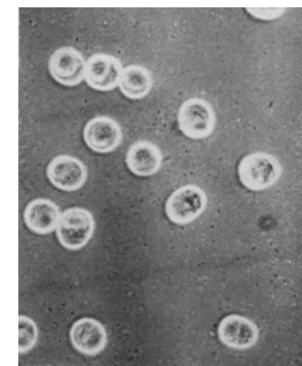
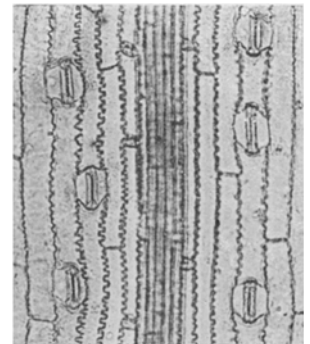


Abb. 4. Pollenkörner. — Links: diploid; rechts: tetraploid. (Vergr. 150 X)

(Abb. 2) die Größe der Stomata und der Pollenkörner sowie die Blattdicke (Tab. 1, Abb. 3 und 4).

Tabelle 1. Morphologische Unterschiede zwischen diploiden und tetraploiden Pflanzen (relative Mittelwerte aus 50 Messungen).

Merkmale	diploid	:	tetraploid
Stomatalänge	1	:	1,27
Stomatabreite	1	:	1,38
Pollenlänge	1	:	1,20
Pollenbreite	1	:	1,14
Blattdicke	1	:	1,26

Die nachträglich durchgeführte karyologische Untersuchung ergab, daß nach diesen morphologischen Merkmalen etwa 80% der Diploiden unter den veränderten Pflanzen vor dem Aufblühen erkannt wurden (Tab. 2). Die Schärfe der Vorselektion wird weitgehend durch den Zweck der Polyploidisierung bestimmt.

Soll umfangreiches polyploides Material für die praktische Züchtung erzeugt werden, wird man die

technisch schwer zu handhaben, wobei Methode III günstiger als IV zu beurteilen ist.

Nach Anwendung der Methode II wurden neben diploiden nur ein geringer Anteil mixoploider Pflanzen festgestellt. Die Schwierigkeit liegt hier in der richtigen Dosierung des Colchicins.

Der im allgemeinen günstigen Wirkung des Colchicins steht eine weniger günstige des Acenaphthens gegenüber. Die nach den Methoden V—VIII be-

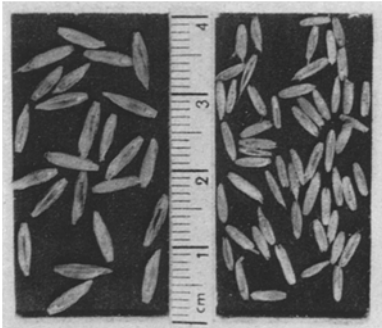


Abb. 5. Samen. — Links: tetraploid; rechts: diploid.

mixoploiden Pflanzen und damit einen höheren Prozentsatz entfernen können, während man bei wissenschaftlichen Untersuchungen, wo jedes auch nur teilweise tetraploide Individuum von Interesse ist, nur die absolut sicher als diploid erkannten Pflanzen eliminieren wird. Der tatsächliche Anteil tetraploider Pflanzen kann nur durch die karyologische Untersuchung festgestellt werden.

Nach der Samenernte der C_0 -Pflanzen gibt die Samengröße einen guten Anhaltspunkt zur Einschränkung des zytologisch zu untersuchenden Materials (Abb. 5).

Wirkungsgrad der angewandten Behandlungsmethoden

Gemessen am Anteil tetra- und mixoploider Pflanzen in der C_0 -Generation waren in vorliegenden Untersuchungen die Colchicinbehandlungsmethoden I, III und IV am wirkungsvollsten. Mit 12% tetraploiden und 22% mixoploiden Pflanzen brachte die Methode I den höchsten Anteil an Polyploiden (Abb. 6). Die Methoden III und IV ergaben fast die gleiche Ausbeute, sind jedoch sehr arbeitsaufwendig und

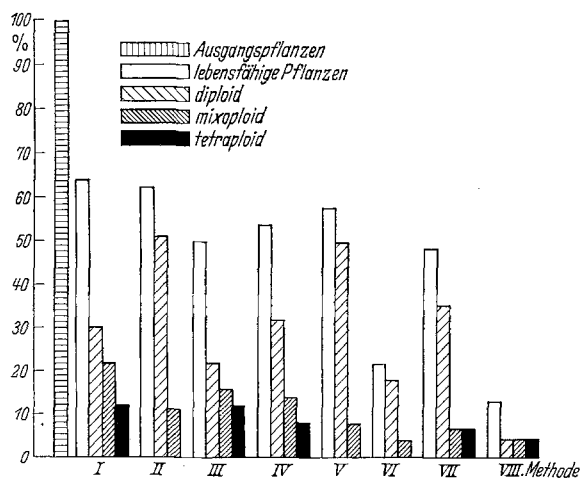


Abb. 6. Wirkungsgrad der günstigsten Variante bei den angewandten Behandlungsmethoden (in % der Ausgangspflanzen).

Tabelle 2. Anteil erkannter diploider Pflanzen nach Stomata-, Blattdicken- und Pollenmessungen.

Behandlungsmethode I bei 28—30 °C Varianten	Ausgangspflanzen Anzahl	Veränderte u. entwicklungsfähige Pflanzen Anzahl	davon			Von den Diploiden durch morphologische Merkmale erkannt	
			tetraploid Anzahl	mixoploid Anzahl	diploid Anzahl	Anzahl	%
0,05%/3 Std.	50	27	2	12	13	10	76,9
0,05%/4 Std.	50	32	6	11	15	12	80,0
0,05%/5 Std.	50	18	4	7	7	6	85,7

handelten Pflanzen zeigten zunächst ähnliche Wuchsdepressionen und Deformationen wie nach Colchicinwirkung. Der polyploide Habitus war jedoch in den folgenden Wochen nicht mehr erkennbar und nur wenige Pflanzen waren tetraploid bzw. mixoploid. Im Gegensatz zur Samenbehandlung mit Colchicin (Methode II) erwies sich die mit Acenaphthen (Methoden VII und VIII) als günstiger. Die Ursache hierfür dürfte die wesentlich langsamere Wirkung des Acenaphthens gegenüber Colchicin sein, worauf bereits LEVAN (5) und STRAUB (7) hinwiesen. Die Acenaphthen-Kontaktmethoden wirken stark schädigend auf die Keimlinge (Abb. 7). Die Wurzelspitzen verfärbten sich braun, und nach einer allgemeinen Wachstumshemmung sterben die Pflanzen ab.

Der Temperatureinfluß auf die Wirkung der Spindelgifte ist eindeutig. Die angewandten Methoden ergaben bei 28—30 °C während der Behandlung höhere Anteile polyploider Pflanzen als bei 15—18 °C. Als günstigste Colchicin-Konzentration erwies sich 0,05% bei eng umgrenzten Applikationszeiten. Geringe Konzentration und längere Einwirkung ergab in der Regel ein besseres Ergebnis als umgekehrt. Die Varianten der geprüften Behandlungsmethoden mit dem größten Wirkungsgrad sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Besprechung der Ergebnisse

Innerhalb einer Grassamenprobe liegt unterschiedliche Keimschnelligkeit vor. Werden angekeimte Samen in Colchicin-Lösungen eingetaucht, können Keimlinge gleicher Entwicklungsstufe dem Spindelgift ausgesetzt und recht einheitliche Wirkungen erzielt werden. Die Konzentration der Lösung und die Behandlungsdauer können so auf den Entwicklungsstand der Keimlinge abgestimmt werden, daß sich die Wirkung in einer einmaligen Teilungsbeeinflussung erschöpft. Hierin liegt wahrscheinlich die Ursache für die günstige Ausbeute an Polyploiden bei Behandlungsmethode I.

Werden trockene Samen direkt in wäßrigen Colchicin-Lösungen angekeimt, wird infolge der unterschiedlichen Keimschnelligkeit bei den schnell keimenden Samen der Spindelfaser-Mechanismus zu stark, bei den langsam keimenden zu schwach oder

Tabelle 3. Anteil diploider, mixoploider und tetraploider Pflanzen bei den Behandlungsvarianten mit dem höchsten Anteil tetraploider bzw. mixoploider Pflanzen (Ausgangspflanzen = 100%).

Behandlungsmethode (bei 28—30°C)	Colchicinkonzentr. %	Applikationsdauer Std.	Lebensfähige Pflanzen %	diploid %	mixoploid %	tetraploid %
I	0,05	3	82,0	54,0	24,0	4,0
	0,05	4	64,0	30,0	22,0	12,0
	0,05	5	36,0	14,0	14,0	8,0
II	0,05	25	75,6	68,9	6,7	—
	0,05	30	62,2	51,1	11,1	—
	0,05	35	48,9	40,0	8,9	—
III	0,05	5	68,0	46,0	16,0	6,0
	0,05	6	50,0	22,0	10,0	12,0
	0,05	7	38,0	14,0	14,0	10,0
IV	0,05	4	64,0	44,0	16,0	4,0
	0,05	5	54,0	32,0	14,0	8,0
	0,05	6	44,0	26,0	12,0	6,0
V	—	24	92	88,0	4,0	—
	—	48	58,0	50,0	8,0	—
	—	72	28,0	22,0	6,0	—
VI	—	24	40,0	38,0	2,0	—
	—	48	22,0	18,0	4,0	—
	—	72	12,0	8,0	4,0	—
VII	—	48	82,2	71,1	8,9	2,2
	—	72	48,9	35,5	6,7	6,7
	—	96	31,1	20,0	6,7	4,4
VIII	—	48	33,3	26,7	4,4	2,2
	—	72	13,2	4,4	4,4	4,4
	—	96	6,6	2,2	2,2	2,2

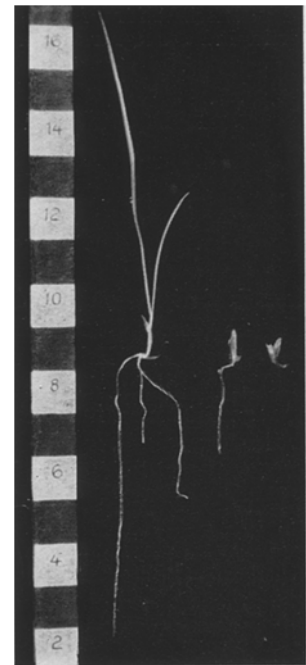


Abb. 7. Entwicklung gleichaltriger Pflanzen nach der Dampf- und Kontaktmethode. — Links: Kontrolle; Mitte: Dampfmethode; rechts: Kontaktmethode.

überhaupt nicht beeinflusst. Die geschädigten Keime sind nicht lebensfähig, die anderen unverändert und daher die Ausbeute an polyploiden Pflanzen gering, wie die Behandlungsmethode II eindeutig zeigt.

Durch Spindelgifte geschädigte Keimwurzeln entwickeln sich kaum oder nur zögernd. Die Behandlungsmethoden III und IV legen besonderen Wert auf den Schutz der Keimwurzeln, während bei den Methoden I und II das Colchicin gleichzeitig auf Sproß und Wurzel einwirken kann. Beim Ankeimen der Samen in Colchicininlösungen wird das Wurzelsystem besonders stark geschädigt. Karyologische Untersuchungen dieser im Wuchs gehemmten Wurzeln ergaben, daß hier vorwiegend tetraploide und oktaploide Zellen vorhanden waren. Dagegen setzten sich die Keimwurzeln der nach Methode I behandelten Samen aus diploiden und tetraploiden Zellen zusammen und entwickelten sich gut.

Zusammenfassung

Zur Genomverdoppelung bei Gramineen wurden vergleichsweise verschiedene Methoden angewandt. Die Colchicinmethoden ergaben einen größeren Anteil polyploider Pflanzen als die mit Acenaphthen.

Am ergiebigsten und am leichtesten anwendbar war die Behandlung angekeimter Samen in 0,05%iger wäßriger Colchicin-Lösung, 4 Stunden bei 28—30 °C. Zur Unterscheidung diploider und tetraploider Pflanzen sind Größe der Stomata, Pollenkörner, Blütenstände und Samen sowie die Blattdicke brauchbare Merkmale.

Literatur

1. ESSER, K.: Eine Eintauchmethode zur Colchicinbehandlung. *Der Züchter* 23, 148—150 (1953).
2. HERTZSCH, W.: Beobachtungen an künstlich hergestellten polyploiden Futterpflanzen. 3. Welsches Weidelgras (*Lolium multiflorum*). *Zeitschr. f. Pflanzenzüchtung* 41, 271—293 (1959).
3. HULEWICZ, D.: Eine neue Methode zur Colchicinbehandlung der Gräser. *Der Züchter* 27, 299—300 (1957).
4. KOSTOFF, D.: Irregular mitosis and meiosis induced by acenaphthene. *Nature* 141, 1144—1145 (1938).
5. LEVAN, A.: The effect of acenaphthene and colchicine on mitosis of *Allium* and *Colchicum*. *Hereditas* (Lund) 26, 262—276 (1940).
6. MYERS, W. M.: Colchicine induced tetraploid in perennial ryegrass. *J. Hered.* 30, 499—504 (1939).
7. STRAUB, J.: Wege zur Polyploidie. 2. Aufl. Naturwiss. Verl. Berlin (1950).
8. WIT, F.: De perspectieven van chromosomenverdubbeling voor de veredeling van raaigrassen en rode klaver. *Landb. Tijdschr.* 66, 533—536 (1954).
9. WIT, F., and G. J. SPECKMANN: Tetraploid westerwolth's ryegrass. *Euphytica* 4, 245—253 (1955).