

Aus dem Max-Planck-Institut für Pflanzengenetik, Rosenhof über Ladenburg a. N. (bei Heidelberg)

## Das Verhalten der Chloroplastenzahlen in den Schließzellenpaaren von Zuckerrüben verschiedener Ploidiestufen vom Keimling bis zur blühenden Pflanze

Von THEODOR BUTTERFASS

Mit 2 Abbildungen

### Einleitung

Wie aus den Angaben zahlreicher Autoren hervorgeht (Zusammenstellung bei BUTTERFASS 1959), nimmt innerhalb von künstlich hergestellten (und wahrscheinlich auch von natürlich vorkommenden) polyploiden Reihen jeweils einer Pflanzenart die Chloroplastenzahl pro Zelle mit steigender Ploidiestufe anscheinend ausnahmslos zu. Eingehender untersucht wurde diese Zunahme in den Schließzellenpaaren der Spaltöffnungen von Zuckerrüben (MOCHIZUKI und SUEOKA 1955, BUTTERFASS 1958, 1959), wo man auf Grund der Chloroplastenzahlen die Ploidiestufen für manche Zwecke, z. B. Saatgutprüfungen, hinreichend genau bestimmen und so die mühsamen Chromosomenzählungen großenteils umgehen kann (BUTTERFASS 1958).

Die vorliegende Veröffentlichung enthält Chloroplastenzahlen aus erwachsenen Schließzellenpaaren verschiedener Stadien der Individualentwicklung von Zuckerrüben. Darüber gibt es bereits Angaben (MOCHIZUKI und SUEOKA 1955). Anhand der gewonnenen Werte wird untersucht, ob die Chloroplastenzahlen auch als individuelle Merkmale von Pflanzen derselben Ploidiestufe dienen können, und wie stark sie variieren. Ferner wird geprüft, ob die Bestimmbarkeit der Ploidiestufen von Zuckerrüben mit Hilfe der Chloroplastenzahlen unter den gegebenen Bedingungen merklich vom Alter der Pflanzen beeinflusst wird und gegebenenfalls wie stark, welche Blätter die zuverlässigsten Resultate bringen und wie man beim Bestimmen am besten vorgeht.

### Material und Methode

Als Versuchsmaterial dienten 200 Pflanzen der Handelssorte Kleinwanzlebener Polybeta aus einem Saatgutposten der Ernte 1957. Die Versuchsdaten sind in Tab. 1 zusammengefaßt. 4 Pflanzen gingen im Laufe des Versuchs ein; die übrigen konnten alle zum Schossen gebracht werden.

Tabelle 1. Die Versuchsdaten. (Für die Zählungen, die gewöhnlich zwei Tage dauerten, wird der erste Tag aufgeführt.)

Ausgesät in Pikierkisten	12. 12. 1958
Getopft	20. 1. 1959
Keimblätter $k$ untersucht	5. 2. 1959
Primärblätter $p$ untersucht	5. 3. 1959
Erste Folgeblätter $f_1$ untersucht	16. 3. 1959
Ins Freiland gepflanzt	15. 4. 1959
Folgeblätter $f_2$ untersucht	8. 5. 1959
Folgeblätter $f_3$ untersucht	8. 7. 1959
Folgeblätter $f_4$ (jung) untersucht	13. 7. 1959
Folgeblätter $f_5$ untersucht	2. 10. 1959
Eingetopft und ins Kalthaus gebracht	5. 11. 1959
Folgeblätter $f_6$ untersucht	2. 2. 1960
Folgeblätter $f_7$ untersucht	21. 4. 1960
Ins Freiland gepflanzt	22. 4. 1960
Brakteen $b$ untersucht	25. 6. 1960

2 Pflanzen waren auffallend schwächlich ausgebildet; da sich ihre Chloroplastenzahlen nicht abweichend verhielten, werden diese Pflanzen nicht gesondert aufgeführt.

Die Chromosomen aller Pflanzen wurden gezählt an Quetschpräparaten junger Blättchen nach Fixierung mit Alkohol-Eisessig (3:1) und Färbung mit Karmin-Essigsäure.

In den ersten 50 Pflanzen wurden möglichst genau die Chromosomenzahlen, in den übrigen Pflanzen nur die Ploidiestufen festgestellt. Unter den genau geprüften Pflanzen befanden sich 18 Tetraploide, von denen 3 hypo- und 3 hypertetraploid waren mit 35 bzw. 37 Chromosomen. Diese Aneuploiden hatten stellenweise etwas verkümmelte oder asymmetrische Blätter und blühten durchschnittlich ein wenig später; sonst aber machten sie habituell und im Pollenbild einen ziemlich normalen Eindruck, und auch ihre Chloroplastenzahlen unterschieden sich nicht erkennbar von den Chloroplastenzahlen der Euploiden. Die genauen Chromosomenzahlen werden deshalb nicht weiter berücksichtigt.

Eine Pflanze war bereits eingegangen, als die Chromosomen gezählt werden sollten. Sie mußte deshalb ganz wegleiben. Von den übrigen 199 Pflanzen waren 51 Pflanzen (25,6%) diploid, 69 (34,7%) triploid und 79 (39,7%) tetraploid.

Die Chloroplasten jeder Pflanze wurden gezählt in je 10 Schließzellenpaaren der unteren Epidermis der Keimblätter ( $k$ ), der Primärblätter ( $p$ ), der ersten Folgeblätter ( $f_1$ ), späterer Folgeblätter ( $f_2$  bis  $f_7$ ;  $f_7$  kurz vor dem Schossen) sowie 3—4 cm langer Blättchen aus der Blütenregion (Brakteen,  $b$ ). (Die Indexpfiffern 2—7 der Folgeblätter bezeichnen die Folge der Entnahmezeiten, nicht eine lückenlose Reihe aufeinanderfolgender Blätter.) Die Untersuchungszeiten sind aus Tab. 1 ersichtlich. Es wurde angestrebt, nur ausgewachsene und nicht überalterte Blätter zu verwenden; lediglich die Blätter  $f_4$  wurden ausnahmsweise dem Herz entnommen. Die Präparation erfolgte nach den Angaben von BUTTERFASS (1958). Untersucht wurde in Jod-Jodkalium-Pril (BUTTERFASS 1958). Das verwendete Objektiv hatte 45fache Eigenvergrößerung.

Die Zählbarkeit nahm zunächst mit fortschreitendem Alter der Pflanzen ab. In den Blättern  $f_3$  war sie noch einigermaßen gut, dann erst wieder in den Blättern  $f_7$  und in den Brakteen. Zeitweilig enthielten die Chloroplasten zu wenig Stärke; so waren die Blätter  $f_4$  zu jung, und die Blätter  $f_5$  und  $f_6$  wurden im Herbst und Winter entnommen. In der zweiten Hälfte der Versuchszeit waren die Pflanzen stark mit Rübenmosaikvirus verseucht. (Wenn dieses Virus anwesend ist, können die Chloroplasten in den Schließzellen verklumpen oder sich sogar auflösen.) Sobald die Zählbarkeit besser wurde (in den Blättern  $f_7$ ), streuten die gewonnenen Werte nicht mehr so stark, ein Hinweis darauf, daß vorher die Zählfehler zu groß geworden waren. Weil die aus den Blättern

$f_4$ ,  $f_5$  und  $f_6$  erhaltenen Chloroplastenzahlen also unzuverlässig sind, werden sie hier nicht wiedergegeben.

Den Variationskoeffizienten von Tab. 9 liegen Pflanzenwerte zugrunde, die sich auf Zählungen oder Messungen an 10 Schließzellenpaaren oder Pollenkörnern stützen. Die Längen der Schließzellenpaare und die Durchmesser der Pollenkörner wurden, soweit die Variation der Volumina untersucht werden sollte, vor dem Mitteln in die 3. Potenz erhoben (vgl. unten).

Der Pollen wurde bei allen Pflanzen im Lauf von 2 Tagen entnommen, und zwar aus Antheren sich eben öffnender Blüten. Da die Pollenkörner am Ende der Blütezeit einer Pflanze im Mittel um  $\frac{1}{3}$  kleiner zu sein pflegen als am Anfang und nicht alle Pflanzen am gleichen Tag mit der Blüte begonnen hatten, enthält der hier angegebene Variationskoeffizient eine Komponente „verschiedener Entwicklungszustand der Pflanzen“ und bezieht sich also auf die Population unter den gegebenen Bedingungen zu einem bestimmten chronologischen Zeitpunkt.

Das Volumen der Schließzellen wurde nicht zu ermitteln versucht. Es wurde vielmehr vereinfachend angenommen, daß alle Schließzellen einer Ploidiestufe untereinander ähnlich sind und daß somit jedes Volumen proportional ist der 3. Potenz der Länge. Unter dieser Voraussetzung kann man aus den Längen den Variationskoeffizienten des Volumens berechnen, ohne das Volumen selbst zu kennen.

Die Refraktometerwerte der ausgewachsenen Rübenkörper wurden im Preßsaft von Rübenbrei gemessen. Der Rübenbrei war in üblicher Weise (vgl. KNAPP 1958) mit Hilfe einer schrägen Bohrung durch die Rüben gewonnen worden.

Ein praktischer Hinweis sei noch angefügt. Bei Chloroplastenzählungen können die Deckgläser durch viel billigere und nur einmal zu verwendende Polyvinylchlorid-Folien ersetzt werden. Bewährt hat sich die PVC-Hartfolie glasklar, 0,1 mm dick, Type 1000 T, von Kalle A.G., Wiesbaden-Biebrich. Die Folie wird 120 cm breit auf Rollen geliefert und muß selbst geschnitten werden. 1 kg umfaßt etwa 6 m<sup>2</sup>. Trübe Stellen kommen vor und sind zu verwerfen. Man schneidet immer nur einen kleinen Vorrat und bewahrt die Stückchen staubfrei auf. Falls sie etwas gewölbt sind, verwendet man die konkave Seite nach unten. Die Bilder sind zwar ein wenig schlechter als bei Verwendung von Glas; man bemerkt den Unterschied aber nur bei sorgfältigem Vergleich. Auch zum chromosomalen Bestimmen der Ploidiestufe sind die Folien geeignet; sie können aber nach längerem Liegen der Präparate gelegentlich abspringen.

### Ergebnisse

Abb. 1 zeigt die Häufigkeitsdiagramme der Chloroplastenzahlen in den zu verschiedenen Zeiten entnommenen Blättern und Tab. 2 die dazugehörigen Mittelwerte. Die Schließzellen der Keimblätter ent-

Tabelle 2. Die mittleren Chloroplastenzahlen in den Schließzellenpaaren bei verschiedenem Pflanzenalter.

Blatt	2x			3x			4x		
	n	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	n	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	n	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
k	51	12,44	0,172	69	16,91	0,186	79	20,79	0,181
p	51	14,79	0,170	69	20,29	0,166	77	24,64	0,197
f <sub>1</sub>	51	13,69	0,193	69	20,18	0,158	79	24,61	0,211
f <sub>2</sub>	51	15,35	0,171	69	20,33	0,199	79	24,10	0,224
f <sub>3</sub>	51	15,97	0,193	69	21,23	0,182	79	25,42	0,261
f <sub>7</sub>	51	16,35	0,221	68	22,70	0,261	78	27,92	0,287
b	51	14,65	0,205	67	19,95	0,180	78	24,91	0,282
p—b		15,13			20,78			25,27	

halten am wenigsten Chloroplasten, und die Variationsbreiten der Chloroplastenzahlen in diesen Zellen greifen stärker übereinander als bei anderen Blättern. In den Primärblättern und in den ersten Folgeblättern sind die Ploidiestufen am deutlichsten getrennt. Die Variationsbreiten der Triploiden und Tetraploiden überlappen sich in allen Blättern viel stärker als die der Diploiden und Triploiden.

Die Chloroplastenzahlen nehmen von der diploiden bis zur tetraploiden Stufe, wie schon MOCHIZUKI und SUEOKA (1955) gefunden haben und wie aus Tab. 2 leicht ermittelt werden kann, anscheinend nicht streng linear zu. Der Mittelwert der Triploiden liegt ungefähr um 0,5 (0,17—1,03) Chloroplasten über dem Mittel aus Diploiden und Tetraploiden.

Diese Erscheinung, die bei Beta-Rüben die Regel darstellt, schließt nicht aus, daß es in Wirklichkeit die Tetraploiden sind, die von der gedachten Linearität abweichen, sei es aus sachlichen Gründen, sei es infolge von Zählfehlern, die sicher um so größer werden, je mehr Chloroplasten vorhanden sind. Wäre nämlich in jedem tetraploiden Schließzellenpaar durchschnittlich nur 1 Chloroplast mehr vorhanden als festgestellt wurde, so wäre das Phänomen verschwunden, falls die Chloroplasten der Triploiden richtig gezählt sind. Der Umstand jedoch, daß beim Betrachten aller bekannten Ploidiestufen von haploid bis oktoploid eine ungefähr lineare Beziehung zwischen Chloroplastenzahlen und Ploidiestufen besteht (BUTTERFASS 1959), spricht vorläufig gegen den Verdacht, es könnten nur Zählfehler ausschlaggebend sein. Andererseits sind die Pflanzenzahlen auf pentaploider, hexaploider und oktoploider Stufe noch viel zu klein, als daß sichere Schlüsse möglich wären.

Tab. 3 zeigt die Werte von Tab. 2, bezogen jeweils auf den Mittelwert aus den Blättern p bis b einer Ploidiestufe, der auf jeder Stufe = 100 gesetzt wurde. Die Keimblätter enthalten um etwa 18% weniger Chloroplasten, während die Mittelwerte der übrigen Blätter um höchstens 10,5% von den Bezugswerten abweichen.

Tabelle 3. Die relativen Chloroplastenzahlen in den Schließzellenpaaren der Blätter im Vergleich zum Gesamtmittelwert aus den Blättern p bis b, der auf jeder Ploidiestufe = 100 gesetzt wurde.

Blätter	2x	3x	4x	Mittel
k	82,2	81,4	82,3	82,0
p	97,8	97,6	97,5	97,6
f <sub>1</sub>	90,5	97,1	97,4	95,0
f <sub>2</sub>	101,5	97,8	95,4	98,2
f <sub>3</sub>	105,6	102,2	100,6	102,8
f <sub>7</sub>	108,1	109,2	110,5	109,3
b	96,8	96,0	98,6	97,1
p—b	100,0	100,0	100,0	100,0

Tab. 4 gibt die Häufigkeiten der einzelnen Chloroplastenzahlen in je 510 Schließzellenpaaren (jeweils 10 Paare aus 51 Pflanzen) verschiedener Blätter und verschiedener Ploidiestufen wieder. Aus der Häufigkeitstafel kann man entnehmen, wie stark die Chloroplastenzahlen der drei Ploidiestufen übereingreifen, wenn man auf Mittelwertbildung verzichtet außer der, die im Zählen in Schließzellenpaaren statt in einzelnen Schließzellen besteht. Immerhin erreicht die Variationsbreite in diploiden Schließzellenpaaren in keinem Fall das Häufigkeitsmaximum der Tetraploidzahlen und umgekehrt.

Tab. 5 bringt einen Vergleich der Chloroplastenzahlen ausgewählter Pflanzengruppen. Innerhalb jeder Ploidiestufe wurden die 15 Pflanzen mit den wenig-

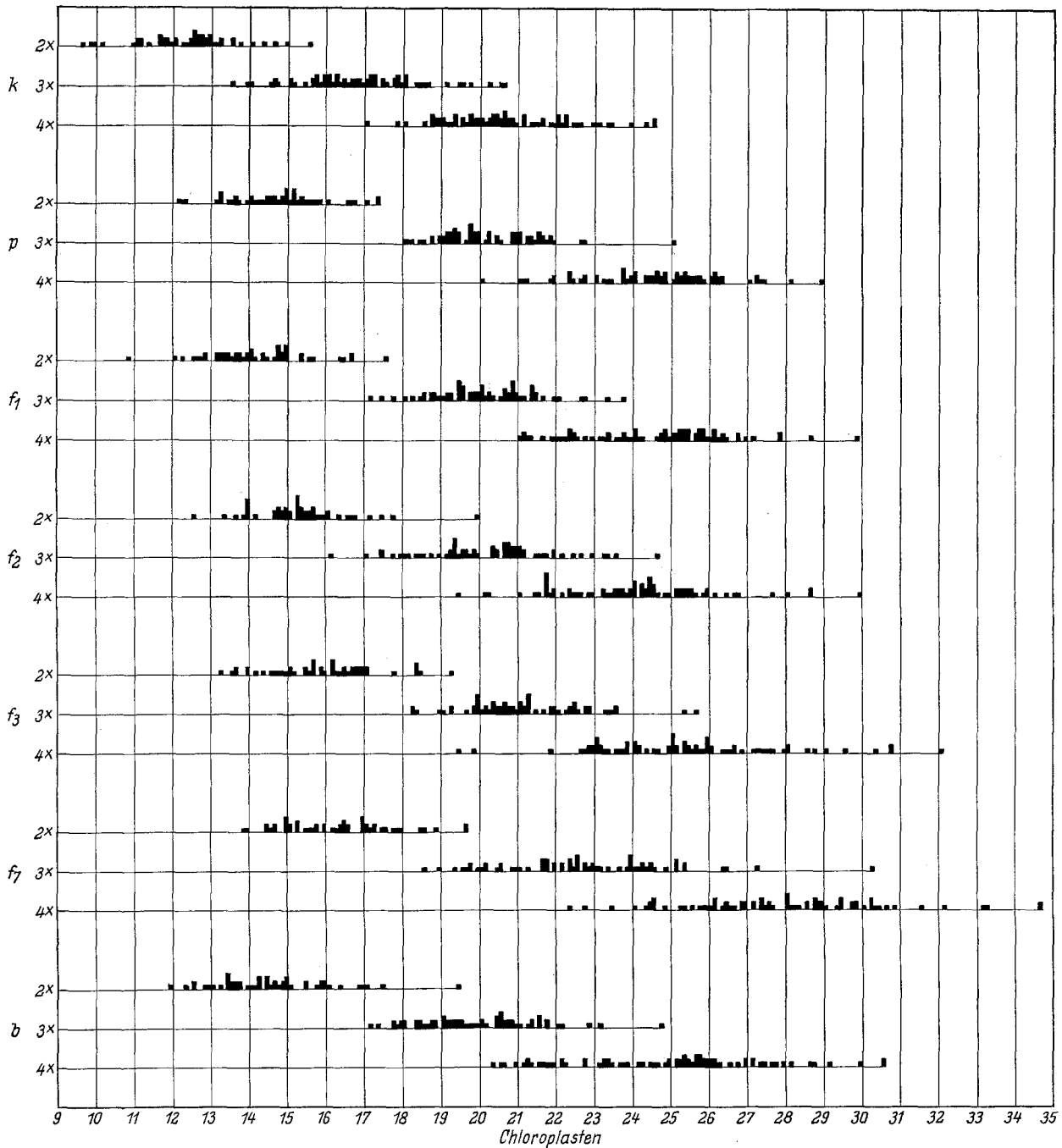


Abb. 1. Häufigkeitsdiagramme der mittleren Chloroplastenzahlen aus je 10 Schließzellenpaaren aller untersuchten Pflanzen in verschiedenen Blattsorten, nach Ploidiestufen getrennt. Die Symbole für die Blattsorten sind auf Tab. 1 und im Text (S. 62) erklärt.

sten Chloroplasten in den Schließzellenpaaren der Primärblätter ausgewählt (Pflanzengruppe A) und den 15 Pflanzen mit den meisten Chloroplasten in den Schließzellenpaaren der Primärblätter (Pflanzengruppe B) gegenübergestellt. Es war nun zu prüfen, ob sich die Auslese nach den Zahlen in den Primärblättern auch noch an den Chloroplastenzahlen anderer Blätter derselben Pflanzen nachweisen läßt und gegebenenfalls bis zu welchem Abstand von den Primärblättern. Wie Tab. 5 zeigt, sind die Differenzen aus A und B in der Tat meist recht gut signifikant.

Man kann die Pflanzen natürlich auch anhand der Chloroplastenzahlen der Keimblätter (Tab. 6) oder der Brakteen (Tab. 7) auslesen. Ein überschlagsmäßiger Vergleich der Signifikanzen, entweder durch Addition der zusammengefaßten P-Werte (letzte Zeile von

Tab. 5: 0,012; Tab. 6: 0,061; Tab. 7: 0,012) oder durch Addition der einzelnen P-Werte (Tab. 5: 1,533; Tab. 6: 2,261; Tab. 7: 1,523) lehrt, daß Primärblätter (Tab. 5) und Brakteen (Tab. 7) ähnlich gute Werte ergaben, während die Auslese nach den Chloroplastenzahlen der Keimblätter (Tab. 6) zu einem weniger signifikanten Ergebnis führte. Demnach eignen sich im vorliegenden Fall die Chloroplastenzahlen der Keimblätter weniger gut zum Charakterisieren ganzer Pflanzen. Das stimmt überein mit der Erfahrung, daß auch andere Merkmale auf frühen Stadien der Rübenentwicklung eine besonders große phänotypische Variabilität zeigen (SAVITSKY 1940).

In Tab. 8 sind die Variationskoeffizienten  $\frac{100 \cdot s}{\bar{x}}$  der Chloroplastenzahlen für alle Blattsorten und Ploidiestufen aufgeführt. Im ganzen gesehen sind die



Berechnung gemachten Voraussetzung mit stärkeren Fehlern behaftet. Es wird aber deutlich, daß auch die Volumina der Schließzellen und der Pollenkörner von Pflanze zu Pflanze viel stärker schwanken als die Chloroplastenzahlen in den Schließzellenpaaren.

Auf den ersten Blick mag es vielleicht willkürlich erscheinen, die Variationskoeffizienten der Volumina und nicht die der Längen oder Durchmesser aufzuführen. Es ist aber zweckmäßiger, Chloroplastenzahlen mit Zellvolumina zu vergleichen, weil dabei sofort klar wird, daß Chloroplastenzahl und Zell-, „größe“ (d. h. Zellvolumen) verschieden stark variieren, also nicht unmittelbar kausal verknüpft sein können. Auch das Rübengewicht ist angenähert ein Volumen- und kein Längenwert, und der Refraktometerwert bezieht sich ebenfalls auf ein Volumen. Die Variationskoeffizienten der Längen und der Durchmesser betragen auf den drei Ploidiestufen: Schließzellenlänge in Keimblättern: 5,8; 5,3; 6,9%. In Folgeblättern: 6,6; 5,8; 4,6%. Pollenkordurchmesser: 8,9; 14,5; 6,5%. Die niedrigen Werte dürfen nicht zu der Annahme verleiten, diese Größenmerkmale seien ebenso gut oder sogar besser für die Ploidiebestimmung geeignet als die Chloroplastenzahlen, denn die Pollenkordurchmesser z. B. stiegen von 24,0 ( $2x$ ) über 24,7 ( $3x$ ) auf nur 29,7  $\mu$  ( $4x$ ) an, also erheblich weniger als die Chloroplastenzahlen.

## Diskussion

### I. Die Chloroplastenzahl als Merkmal

Eine bestimmte Zuckerrübenpflanze enthält eine ganz bestimmte und nur wenig von der Umwelt abhängige Anzahl von Chloroplasten in den Schließzellenpaaren, und diese Zahl erhält man schon annähernd durch Zählen der Chloroplasten von nur 10 Schließzellenpaaren in irgend einem Blatt an einer einzigen Blattstelle. Auch das (vielleicht nur unter den vorliegenden Umständen; vgl. MOCHIZUKI und SUEOKA 1955) stärker abweichende Verhalten der Keimblätter ändert an dieser Feststellung nichts Grundsätzliches. Die gute relative Konstanz der Chloroplastenzahl in den Schließzellenpaaren fiel bereits MOCHIZUKI und SUEOKA (1955) auf. Sie wird besonders deutlich bei der Gegenüberstellung der Variationskoeffizienten der Chloroplastenzahl mit solchen anderer Merkmale (Tab. 9). Der Variationskoeffizient des Refraktometerwerts (Tab. 9: 5,5%; nach KNAPP 1958: 5%) entspricht dem des Zuckergehalts nach SAVITSKY (1940: in einer Population 5,8%; in Klonen 4,4—7,2%) und erlaubt daher einen Vergleich der Daten von Tab. 9 mit denen von SAVITSKY (1940; auszugsweise und vereinfacht wiedergegeben bei KNAPP 1958). Nach SAVITSKY weisen alle (mehr als 60!) aufgezählten Merkmale und Indices in Rübenklonen und -populationen 1,5—15mal so große Variationskoeffizienten auf wie der Zuckergehalt. Man darf daraus schließen, daß die Chloroplastenzahl der Schließzellenpaare mit einem Variationskoeffizienten, der nach eigenen Erfahrungen (Tab. 9) nur wenig und vielleicht nicht einmal signifikant über dem des Refraktometerwerts liegt, zu den konstantesten quantitativen Merkmalen gehört, die man bei Zuckerrüben kennt.

Unterschiede der Chloroplastenzahl zwischen Ploidiestufen haben sicher andere Ursachen als solche Unterschiede zwischen Pflanzen derselben Stufe, worauf bereits ELLERTON und HENDRIKSEN (1959) hinweisen, und diese gewiß zum Teil andere Ursachen als Unterschiede zwischen Blättern einer Pflanze. Daß die Chloroplastenzahlen pro Zelle anscheinend in allen Pflanzenarten mit steigender Ploidiestufe

zunehmen (BUTTERFASS 1959), spricht gegen eine enge Verknüpfung der Chloroplastenzahlen mit bestimmten Genen und eher für eine allgemeinere Bindung an die Genomzahl. Normen für die Chloroplastenzahl jeder Zellsorte einer Ploidiestufe ergeben sich aus dem Zusammenwirken von Chromosomenzahl und Lage und Beschaffenheit der betreffenden Zellsorte, z. B. als Schließzellen in der unteren Blattepidermis. Die Wirkungen sowohl des zufälligen Genotypus (Qualität der Allele) als auch der Umgebung überlagern sich dieser gedachten Grundzahl, und das Ergebnis tritt irgendwann im Lauf der Ontogenese, vielleicht erst in den ausdifferenzierten Zellen, zutage.

Für die kleineren Unterschiede der Chloroplastenzahl zwischen Pflanzen derselben Ploidiestufe kommen dreierlei Ursachen in Betracht:

1. Die Umwelt kann wirken, vielleicht nur auf eine spezifisch empfindliche Entwicklungsphase. Die Pflanzen des vorliegenden Versuchs sind zwar mehrfach ausgepflanzt und wieder eingetopft worden, und kein Einfluß der Pflanzstellen auf die Chloroplastenzahlen war zu irgend einer Zeit sicher festzustellen. Das schließt aber die Möglichkeit einer Beeinflussung durch die Umwelt nicht aus. Daß die Chloroplastenzahlen durch die Umwelt modifiziert werden können, ist ja bekannt (vgl. die Diskussion bei BUTTERFASS 1959), und auf solche Einflüsse geht sicher ein Teil der Variabilität zwischen den Blättern einer Pflanze und wohl auch zwischen den Schließzellenpaaren eines Blattes zurück. Für Unterschiede zwischen den Pflanzen werden die Hauptursachen aber andere sein.

2. Der Genotypus kann beteiligt sein in dem Sinne, daß bestimmte Gene oder Gengruppen oder plasmatische Erbfaktoren zum Zustandekommen einer bestimmten, von der anderer Pflanzen derselben Species abweichenden Chloroplastenzahl merklich beitragen. Verschiedene Mutanten derselben Ploidiestufe besitzen oft verschieden viel Chloroplasten in bestimmten Zellen, so bei dem Laubmoos *Physcomitrium piriforme* (BARTHELMESS 1941), bei Farnen (ANDERSSON-KOTTÖ 1931, DÖPP 1936, ROTTMANN 1939, KNUDSON 1940, MALY 1951), bei *Zea* (EYSTER 1929), *Epilobium* (MICHAELIS 1958) und *Antirrhinum* (BUTTERFASS, unveröff.). In manchen Fällen ändert sich offenbar nur der Zerteilungsgrad, und ein Beispiel kennt man sogar, wo dafür ein bestimmtes Gen verantwortlich ist (ANDERSSON-KOTTÖ 1931). In anderen Fällen ändert sich wahrscheinlich auch das Plastidomvolumen.

Als sicher darf gelten, daß auch bei Zuckerrüben die Chloroplastenzahlen je nach Erbanlagen etwas schwanken können. Weil aber Zuckerrüben weder Haplonten noch Selbstbefruchter sind, sie die betreffenden Anlagen also meist im heterozygoten Zustand besitzen, fallen Änderungen weniger auf. Extreme Formen sind wahrscheinlich nicht so gut lebensfähig und verschwinden deshalb schnell wieder. Gewinnung und Erhaltung solcher Formen sind bisher bei Zuckerrüben nicht versucht worden. ELLERTON und HENDRIKSEN (1959) berichten von einer diploiden Zuckerrübenfamilie, die sich von anderen Familien durch eine um 1,5 erhöhte Chloroplastenzahl in den Schließzellenpaaren abhob. Dieser Wert erscheint gering, wenn man bedenkt, daß sich Diplo-

ide und Triploide im Mittel um 5—6 Chloroplasten unterscheiden.

3. Der Genotypus kann beteiligt sein in dem Sinne, daß eine gesteigerte Heterozygotie die Chloroplastenzahlen in bestimmter Richtung verschiebt. Ein Teil der Veränderungen der Chloroplastenzahlen wäre dann als Heterosiseffekt zu beschreiben. Es bleibt zu untersuchen, ob ein solcher Einfluß wirklich vorhanden ist. Einige Beobachtungen deuten aber darauf hin, daß Heterozygotie möglicherweise die Chloroplastenzahl steigert (vgl. SCHWANITZ 1932, MICHAELIS 1951). Auch die Tatsache, daß triploide Zuckerrüben fast stets etwas mehr Chloroplasten zu enthalten scheinen, als ihrer Mittelstellung zwischen Diploiden und Tetraploiden entsprechen würde, obwohl über weitere Ploidiestufen gesehen (vgl. BUTTERFASS 1959) anscheinend eine ungefähr lineare Beziehung besteht, könnte man vielleicht als Indiz für eine Steigerung der Chloroplastenzahl durch Heterozygotie auffassen. Das würde voraussetzen, daß Triploide tatsächlich für die untersuchten Merkmale heterozygoter sind als ihre Eltern, eine Annahme, die zwar nicht bewiesen ist, die man aber so lange als richtig annehmen kann, wie man damit rechnet, daß trotz der allgemein sehr starken Heterozygotie der Rüben doch die Heterozygotie von Zuchtstämmen, auch von diploiden, bei Kreuzung mit anderen Zuchtstämmen noch gesteigert wird. Die Frage der guten Leistungseigenschaften triploider Rüben hat damit nicht unbedingt etwas zu tun.

Über Unterschiede der Zahl der Schließzellenchloroplasten innerhalb von Individuen seien noch einige ergänzende Bemerkungen angefügt, um zu zeigen, daß, wie nicht anders zu erwarten, die Mannigfaltigkeit der Ausprägung auch dieses Merkmals überaus groß ist. Bei den Pflanzen der vorliegenden Arbeit enthielten die Schließzellen der Keimblätter von Zuckerrüben weniger Chloroplasten als die Schließzellen späterer Blätter. Das beobachtet man in der Regel auch unter anderen Bedingungen und bei anderen Sorten von *Beta vulgaris*. Die Schließzellen der Keimblätter einiger Cruciferen (*Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*) enthielten dagegen bei mehreren Prüfungen um  $\frac{1}{3}$  bis  $\frac{1}{5}$  mehr Chloroplasten als die übrigen Blätter. Bei *Trifolium*-Arten dagegen waren die Zahlen in Keim-, Primär- und Folgeblättern ziemlich gleich. Bei Zuckerrüben enthalten die Schließzellen über den Blattrippen im Durchschnitt mehr Chloroplasten als die übrigen Schließzellen (MOCHIZUKI und SUEOKA 1955, BUTTERFASS 1958). Die Grenze ist aber nicht scharf. Bei *Fagus sylvatica* sind die Schließzellen der Sonnenblätter mit mehr Chloroplasten ausgestattet als die der Schattenblätter (BUTTERFASS 1959). Schon viel früher hat BUDDE (1923) in den Palisadenzellen von Sonnenblättern der Buche und in Palisaden- und Schwammparenchymzellen der Sonnenblätter von *Prunus serotina* mehr Chloroplasten vorgefunden als in Schattenblättern. Der Außeninfluß ist evident. Die Schließzellenpaare der „Unterblätter“ von *Selaginella martensii*, um abschließend noch ein ganz anderes Beispiel zu nennen, enthielten bei einer Prüfung (BUTTERFASS unveröff.) fast doppelt so viele Chloroplasten (etwa 16) wie die der kleineren „Oberblätter“ (8—9). Bei *Selaginella kraussiana* dagegen waren die Zahlen in

den beiden Blattyten gleich (14—15). Außerdem kamen bei beiden Arten unmittelbar neben den normalen Schließzellen, deren Chloroplasten viel Stärke enthielten, noch Schließzellenpaare vor, in denen keine Chloroplasten erkennbar waren. Ausmaß und Richtung solcher möglichen Abweichungen sind bei den allermeisten Pflanzenarten noch unbekannt. Die Frage nach der Natur und Wirkungsweise der zugrundeliegenden Ursachen ist die Frage nach den treibenden Kräften der Differenzierung überhaupt.

## II. Die Ploidiebestimmung durch Zählen der Schließzellenchloroplasten

Abb. 2 gibt die Häufigkeitsdiagramme so wieder, wie sie tatsächlich erhalten werden, wenn man die Ploidiestufen nicht kennt, und unterscheidet sich von Abb. 1 nur dadurch, daß die Pflanzen nicht nach Ploidiestufen getrennt eingetragen sind. Die eingezeichneten Markierungen werden weiter unten besprochen werden.

Die beste Zuordnung der Pflanzen zu den Ploidiestufen wird man dort erwarten dürfen, wo die drei Häufigkeitsschwerpunkte<sup>1</sup> am deutlichsten hervortreten: in den Primärblättern, den ersten Folgeblättern und den Brakteen. Es gilt nun, nach dem Häufigkeitsdiagramm zu entscheiden, welche Pflanzen als sicher bestimmt gelten dürfen und welche ein zweites Mal geprüft werden müssen. Bisher (BUTTERFASS 1959) wurden die Unsicherheitszonen nach dem subjektiven Eindruck irgendwo zwischen dem mehr oder weniger deutlich erkennbaren Häufigkeitsschwerpunkten abgegrenzt. Dieses Vorgehen befriedigt nicht. Im folgenden soll nun ein Verfahren geschildert werden, wie man als Unsicherheitszonen möglichst genau die wirklichen Mischzonen erfassen kann.

Ausgangspunkt ist die Erfahrung, daß der jeweilige Häufigkeitsschwerpunkt der Werte einer Ploidiestufe ungefähr in der Mitte der Variationsbreite der Werte dieser Stufe liegt, daß die Verteilungen also ungefähr symmetrisch sind (vgl. Abb. 1). Gewöhnlich kann man die Lage der Häufigkeitsschwerpunkte einigermaßen erkennen, sofern nicht weniger als 100 Pflanzen untersucht worden sind. Aus der Variation der Diploiden nach unten und der der Tetraploiden nach oben kennt man also etwa die ganzen Variationsbreiten der Diploiden und Tetraploiden. Oft ist es vorteilhaft, den Häufigkeitsschwerpunkt der Triploiden nicht unmittelbar zu schätzen, sondern ihn nach der empirischen Formel

$$schw_{3x} \approx \frac{schw_{2x} + schw_{4x}}{2} + 0,5 \quad (\text{vgl. S. 63})$$

annähernd zu berechnen oder wenigstens die unmittelbare Schätzung auf diese Weise zu kontrollieren und,

<sup>1</sup> Unter Häufigkeitsschwerpunkten sollen die gedachten und zu schätzenden Gipfel der Häufigkeitsverteilungen bei viel größerer Anzahl von Meßwerten, als hier zur Verfügung stehen, verstanden werden, Punkte, die im betrachteten Fall nicht unbedingt einen Meßwert enthalten müssen, wenn nur die Punktdichte in der Nachbarschaft entsprechend groß ist, und die, weil die Häufigkeitsverteilungen der Pflanzenwerte ungefähr symmetrisch sind (Abb. 1), etwa mit den Mittelwerten zusammenfallen. Da man es mit Meßwerten zu tun hat, von denen man normalerweise nicht sicher weiß, zu welcher der 3 Ploidiestufen sie gehören, kann man die Häufigkeitsschwerpunkte zwar schätzen, nicht aber genauer numerisch berechnen.

wenn nötig, zu verbessern. Die Variation der Triploiden nach unten läßt sich meist einigermaßen abschätzen, da Triploide und Diploide in der Regel nur wenig übereinandergreifen; damit kennt man auch die ungefähre Variationsbreite der Triploiden.

Abb. 2 soll verdeutlichen, wie die Abgrenzung vorgenommen werden kann. Die Pfeile bezeichnen die angenommenen Schwerpunkte, wobei  $schw_{2x}$  und  $schw_{4x}$  unmittelbar geschätzt sind und  $schw_{3x}$  nach der Faustformel errechnet ist. Natürlich brauchen die Schwerpunkte nicht genau so angenommen zu

kannten; dieser Umstand führt zu Fehlbestimmungen, die man in Kauf nehmen muß.

Rein schematisch kann man aber nicht immer vorgehen. Wenn z. B. der Häufigkeitsschwerpunkt der Tetraploiden kaum zu erkennen ist (Abb. 2, Blätter  $f_7$ ), wird man sich daran erinnern, daß der Mittelwert der Diploiden um etwa 5,5—6,5 Chloroplasten tiefer und der der Tetraploiden um etwa 4—5 Chloroplasten höher liegt als der Mittelwert der Triploiden, und wird prüfen, ob der Schätzwert für den gesuchten Schwerpunkt der Lage der anderen Schwerpunkte,

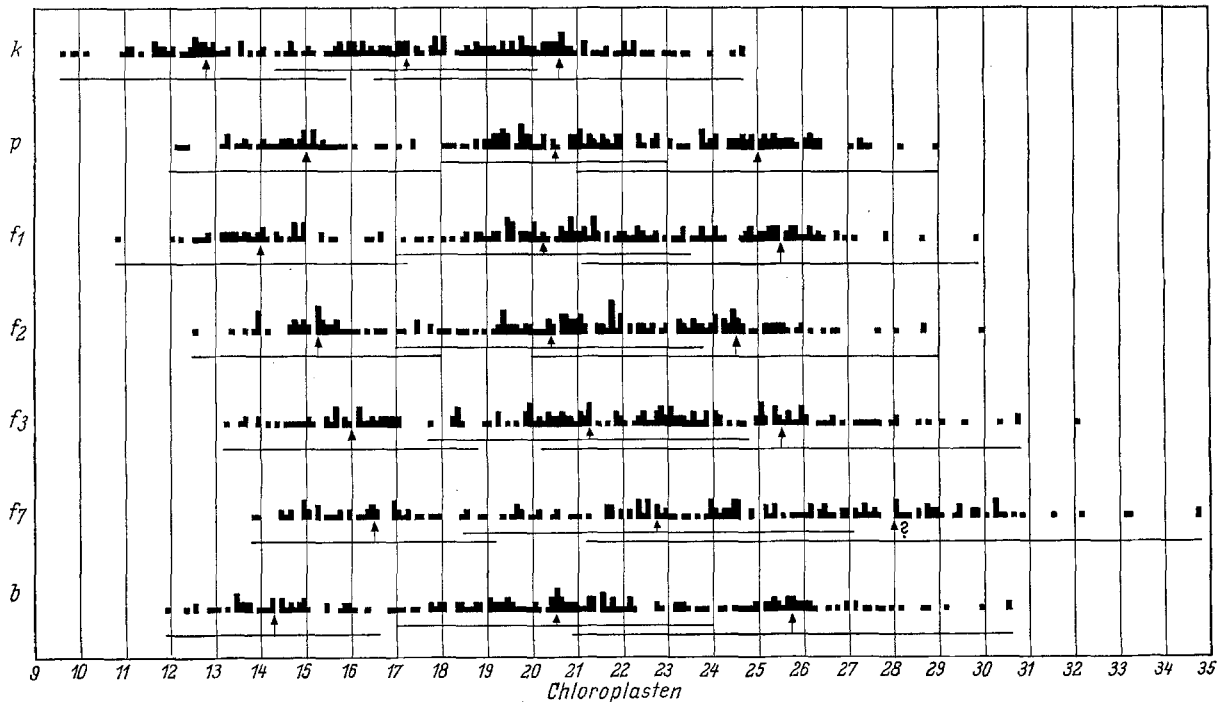


Abb. 2. Wie Abb. 1, aber unter der Annahme zusammengestellt, die Ploidiestufen seien unbekannt. Die Abbildung soll verdeutlichen, wie Sicherheits- und Unsicherheitszonen abgegrenzt werden können. Näheres im Text.

werden, wie es geschehen ist. Abweichungen um 0,5 Chloroplasten von dieser Annahme, und um mehr wird es sich meist nicht handeln, ändern das Bild nicht grundsätzlich. Alle diese Abgrenzungen enthalten ein subjektives Moment, das kaum auszuschalten sein wird. Solange man noch wenig Erfahrung hat, fasse man die Zonen lieber etwas weiter.

Wenn die Gesamtzahl der Pflanzen groß genug ist, empfiehlt es sich, besonders weit nach oben variierende einzelne tetraploide Pflanzen bei der Bestimmung der Variationsbreite nicht mit zu berücksichtigen, sondern sich dann lieber an die Pflanzen zu halten, die die zweitweiteste Entfernung vom Schwerpunkt einnehmen. Das ist z. B. bei den Blättern  $f_2$  und  $f_3$  (Abb. 2) geschehen, weil die Variationsbreite und vor allem die Überlappungszone sonst zu groß geworden wäre, nicht aber bei den Blättern  $f_1$ , weil sie hier ohnehin kleiner war. Ein genaues Rezept läßt sich aber nicht geben.

Hat man die Variationsbreiten der drei Ploidiestufen auf die beschriebene Weise ungefähr ermittelt, so werden alle Pflanzen der Überlappungszonen sowie Pflanzen, die gelegentlich zwischen den Variationsbreiten übrigbleiben können, als unsicher gerechnet. Gewiß ist die Variation in der unbekanntem Richtung in Wirklichkeit doch oft größer als in der be-

falls man diese ungefähr erkennen kann, relativ etwa entspricht. Im Zweifelsfalle wird man den Schwerpunkt der Diploiden lieber etwas höher und den der Tetraploiden lieber etwas tiefer schätzen, weil sich dadurch die Gefahr von Fehlbestimmungen vermindert; der Anteil der Unsicheren nimmt dann allerdings zu.

Tabelle 10. Der Anteil an falsch und nicht sicher bestimmten Pflanzen am Ergebnis, wenn die Zonen abgegrenzt werden, wie auf Abb. 2 geschehen.

Blätter	n	Im Ergebnis sind	
		falsch (%)	unsicher (%)
$k$	199	3	41
$p$	197	1	16
$f_1$	199	1,5	18
$f_2$	199	2	39
$f_3$	199	2,5	43
$f_7$	197	2	42
$b$	196	3,5	20

Die auf Abb. 2 vorgenommene Abgrenzung hätte zu Ergebnissen geführt, wie sie in Tab. 10 zusammengestellt sind. Werden die Chloroplasten der nicht sicher bestimmten Pflanzen ein zweites Mal gezählt (BUTTERFASS 1958), so vermindert sich die Zahl der Unsicheren in günstigen Fällen zwar auf ein Drittel oder weniger, in anderen Fällen, wenn die Unsicher-

heitszonen sehr breit sind, vielleicht auf zwei Drittel bis die Hälfte. Die eine oder andere Pflanze wird dabei noch falsch bestimmt. Da also schließlich auf jeden Fall ein Teil der Pflanzen mit einer anderen Methode bestimmt werden muß, ist es wohl zweckmäßiger, auf weitere Chloroplastenzählungen bei den Unsicheren überhaupt zu verzichten und diese Pflanzen entweder durch Zählen der Trabanten-Chromocentren (REITBERGER 1956) oder chromosomal zu bestimmen. Man vermeidet so die Gefahr, daß durch Zweitzahlungen vergleichsweise viel zusätzliche Fehler in das Ergebnis gelangen. Der Fehleranteil aus den (z. B. 20%) Zweitbestimmungen kann nämlich, absolut gesehen, ebenso groß oder sogar größer werden als der aus den 80% angenommenen Erstbestimmungen.

Der Anteil an falsch bestimmten Pflanzen ist im untersuchten Beispiel (Analyse von Saatgut) bei Verwendung von Primärblättern und ersten Folgeblättern so klein, daß die Mühe, das Ergebnis ein bißchen zu verbessern, etwa durch Wahl größerer Unsicherheitszonen oder überhaupt durch Verzicht auf den Gebrauch dieser Schnellmethode der Ploidiebestimmung, in keinem vernünftigen Verhältnis mehr zu den Fehlern der Probenahme und den rein statistischen Unsicherheiten steht (vgl. STAUDE 1959). Außerdem heben sich bei Saatgutprüfungen, wo es nur auf die prozentualen Anteile der Ploidiestufen in den Posten ankommt, einem der wichtigsten Anwendungsgebiete einer Schnellmethode, Fehlbestimmungen zum Teil gegenseitig auf. Den restlichen Fehler kann man vernachlässigen, sofern man geeignete Blätter verwendet hat und die Zählungen von einer guten und eingearbeiteten Kraft ausgeführt worden sind; nicht jede technische Hilfskraft erreicht nach kurzer Einarbeitungszeit die guten Ergebnisse des vorliegenden Versuchs.

Daß in der ersten Zeit bei tetraploiden Pflanzen zu wenig Chloroplasten gezählt werden, wodurch die Zahl der als triploid bestimmten Pflanzen zu groß wird, beobachtet man regelmäßig beim Einarbeiten von Hilfskräften. In den ersten Wochen ist auf diese Fehlermöglichkeit besonders zu achten.

Wenn auch (Tab. 10) die Zahl der Fehlbestimmungen je nach Blattsorte nicht stark verschieden ist, können doch über 40% der Pflanzen ohne sicheres Ergebnis bleiben, so bei Verwendung der Keimblätter oder der Blätter  $f_2$ — $f_7$ . Einerseits erfordert die Nachbestimmung dieser Pflanzen sehr viel Zeit, andererseits birgt ein so großer Anteil zweifelhafter Pflanzen die Gefahr in sich, daß die Zahl der Fehlbestimmungen bei der zweiten Prüfung unerwünscht zunimmt, falls wieder Chloroplasten gezählt werden, wobei trotzdem noch viele Pflanzen unsicher bleiben und auf andere Weise bestimmt werden müssen. Deshalb sind allein die Primärblätter und die ersten Folgeblätter und allenfalls noch die Brakteen des beschriebenen Versuchs für Chloroplastenzählungen gut geeignet, nicht aber die Keimblätter. ELLERTON und HENDRIKSEN (1959) erhielten dagegen gerade mit Keimblättern befriedigende Resultate. Woran das liegt, ist schwer zu entscheiden, zudem diese Autoren nicht angeben, aus wieviel Schließzellenpaaren jeder Pflanze ihre Werte gewonnen wurden. Vielleicht spielt die Art der Anzucht auch eine Rolle.

Es ist anzunehmen, daß unter bestimmten Wachstumsbedingungen auch bei feldmäßig angebauten Rü-

ben die Abgrenzungen zwischen den Ploidiestufen undeutlicher werden können. Die frühere Bemerkung (BUTTERFASS 1958), wonach die Untersuchungen auch noch an Feldrüben vor der Ernte ausgeführt werden können, ist also dahingehend einzuschränken, daß dabei unter Umständen sehr viele Pflanzen nachbestimmt werden müssen.

Zweifel können entstehen, wenn ein Saatgutposten vorwiegend derselben Ploidiestufe angehört, z. B. größtenteils triploid ist. Dann prägt sich nur ein einziger Häufigkeitsschwerpunkt aus. Pflanzen, die nach beiden Seiten um mehr als 2 Chloroplasten von diesem Schwerpunkt entfernt sind, sollten dann nicht mehr als sicher eingestuft werden mit Ausnahme der Pflanzen, deren Mittelwerte wenigstens 4—5 Chloroplasten Abstand vom Hauptschwerpunkt haben und die zu den angrenzenden Ploidiestufen gerechnet werden können. Je nach der Zahl dieser Pflanzen ist es oft zweckmäßiger, sämtliche Pflanzen mit mehr als 2 Chloroplasten Abstand vom Hauptschwerpunkt als unsicher zu rechnen.

Aus dem Versuch ergibt sich, daß die generell ablehnende Haltung von GRAF (1959) gegenüber Chloroplastenzählungen als einer Möglichkeit der Ploidiebestimmung an Handelssorten unberechtigt ist. Das unbefriedigende Ergebnis, zu dem GRAF gekommen ist, beruht auf einer falschen Anwendung des von BUTTERFASS (1958) angegebenen Verfahrens. Einige Gesichtspunkte, die unbedingt berücksichtigt werden müssen, wenn ein brauchbares Ergebnis erzielt werden soll, seien hier noch einmal hervorgehoben und mit einigen Ergänzungen versehen.

1. Die Ploidiestufen müssen mit Hilfe eines Häufigkeitsdiagramms für jeden untersuchten Posten neu abgegrenzt werden. Die Grenzen kann man nicht aus der Literatur entnehmen. Wie sich inzwischen gezeigt hat, ist es nicht zweckmäßig, mit den Chloroplastenzählungen eines Postens mehrere Personen zu betreiben; die unvermeidlichen persönlichen Zählfehler verwischen nämlich sonst das Diagramm und erschweren die Abgrenzung. Die Pflanzenzahlen sind gewöhnlich zu klein, als daß man, was sonst erforderlich wäre, für mehrere Personen je ein eigenes Häufigkeitsdiagramm aufstellen könnte.

2. Es ist nicht möglich, alle Pflanzen mit Sicherheit einer bestimmten Ploidiestufe zuzuordnen, wenn man nur Chloroplasten zählt. Nach der ersten Zählung bleiben wenigstens 10—20% der Pflanzen unsicher. Eine zweite Zählung vermindert diesen Prozentsatz, läßt ihn aber fast nie ganz verschwinden.

3. Beim Aufstellen eines Häufigkeitsdiagramms sollten die Mittelwerte der Pflanzen so eingetragen werden, wie sie anfallen, also mit einer Dezimale. Es ist unnötig, sie in Klassen einzuordnen. Wird die Klassenbreite zu groß gewählt (vgl. GRAF 1959), kann die Genauigkeit sogar erheblich leiden.

4. Die Chloroplasten müssen unbedingt in Schließzellenpaaren und dürfen nicht nur in einzelnen Schließzellen gezählt werden. Erstens wird so eine unbewußte Bevorzugung der jeweils höher- oder geringere Zahligen Paarhälfte vermieden, und zweitens erfaßt man mit 10 Schließzellenpaaren 20 Zellen. Für orientierende Untersuchungen mögen in manchen Fällen 10 Zellen ausreichen; dann darf man aber nicht 10 einzelne Zellen, sondern muß 5 Paare verwenden. (Bei BUTTERFASS (1958) steht auf Tab. 2 und an einer



Stelle des Textes versehentlich „Schließzellen“ statt „Schließzellenpaare“. In der ganzen Arbeit werden aber die Chloroplasten von Schließzellenpaaren aus gezählt und angegeben, wie an vielen Stellen ausdrücklich gesagt ist.) Eine viel zu große Variationsbreite der Chloroplastenzahlen in den Schließzellenpaaren erscheint, wenn man (Tab. 1 bei GRAF) die Einzelzellenwerte verdoppelt und dann als Paare auswertet.

5. Alle zu untersuchenden Blätter müssen einigermaßen ausgewachsen sein. Das ist weder bei Keimblättern nach 2—3 Tagen noch bei Primärblättern nach 3 Wochen der Fall, vollends nicht bei 14—16 °C (vgl. GRAF 1959.) Primärblätter können unter normalen Gewächshausbedingungen allerfrühestens nach 6 Wochen verwendet werden; besser wartet man 8—10 Wochen.

6. Ein brauchbares Ergebnis ist nur zu bekommen, wenn man die Chloroplasten gut zählen kann. Enthalten sie soviel Stärke, daß die Zählbarkeit nach Anfärbung mit Silbernitrat (Molisch-Reaktion) beeinträchtigt ist (GRAF 1959), so kann man mit Jod-Jodkalium färben (BUTTERFASS 1958), eine Möglichkeit, die auch nach Fixierung in 1—5%igem Formaldehyd noch besteht. Wenn lebendes Material weniger Stärke enthält, hat es sich bewährt, kurz mit 1%iger Silbernitratlösung auf dem Objektträger zu behandeln, dann mit einem großen Tropfen dest. Wasser auszuwaschen, die Waschflüssigkeit abzusaugen und durch einen Tropfen Hydrochinonlösung<sup>1</sup> (3%ig in dest. Wasser) zu ersetzen, in dem dann untersucht wird. Das Verfahren dauert etwas länger als bei Verwendung von Jod, gibt aber oft deutlichere Bilder. MARGARA, TOUVIN und SANDOZ (1957) empfehlen, das Material morgens für 1 h zu beleuchten, dann die Epidermisstücke zu entnehmen, 2—3 min lang mit 1%iger Silbernitratlösung (pH-Wert nicht zu klein, pH = 6,2 war gut) zu behandeln und dann in Glycerin oder auch (MARGARA und TOUVIN 1958) Paraffinöl zu untersuchen. Das Einbetten in ein stärker lichtbrechendes (und wegen der späteren Reinigung der Objektträger möglichst wasserlösliches) Medium bringt nach eigenen Erfahrungen auch nach Jod-Jodkalium-Färbung Vorteile.

Über den nötigen Zeitaufwand bei Serienuntersuchungen, der von vielen Umständen abhängt, läßt sich noch nichts Bestimmtes sagen. In der Regel dürfte er aber beträchtlich kleiner sein als beim Chromosomenzählen.

Die bereits von BUTTERFASS (1958) vorläufig untersuchten Handelssorten Kleinwanzlebener Polybeta und Maribo Polyploid hatten sich hinsichtlich der Bestimmbarkeit ihrer Ploidiestufen durch Chloroplastenzahlen nicht wesentlich von den sonst einheitlicheren Versuchsposten unterschieden. Die Befürchtung, die Chloroplastenzahlen von genetisch sehr heterogenem Material könnten vielleicht so stark streuen, daß sie sich zur Ploidiebestimmung nicht mehr eignen (BUTTERFASS 1958; ELLERTON und HENDRIKSEN 1959), hat sich bis heute nicht bestätigt. Selten kommen allerdings Versuchsposten vor, aus denen man Häufigkeitsdiagramme erhält, die zum Bestim-

men der Ploidiestufen ungeeignet sind, weil sie keine Schwerpunkte erkennen lassen.

Man darf also weiterhin hoffen, daß sich das richtig angewandte Verfahren der Ploidiebestimmung durch Zählen der Schließzellenchloroplasten bei *Beta*-Rüben in seiner ursprünglichen oder in sinnvoll abgewandelter Form in den allermeisten Fällen dort bewähren und behaupten wird, wo einige Prozent falsch bestimmte Individuen wenig stören, z. B. beim Prüfen von Saatgut.

Herrn Professor Dr. EDGAR KNAPP sowie allen meinen Kollegen am Rosenhof danke ich für fruchtbare Diskussionen und Fräulein BRIGITTE KITZKI für Hilfe bei den Arbeiten. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für eine Sachbeihilfe zu Dank verpflichtet.

### Zusammenfassung

In 199 Zuckerrübenpflanzen aus einem Saatgutposten der Sorte Kleinwanzlebener Polybeta, von denen 51 diploid, 69 triploid und 79 tetraploid waren, wurden die Chloroplasten der Schließzellenpaare in verschiedenartigen, ausgewachsenen Blättern gezählt. Die Ergebnisse werden eingehend besprochen.

1. In allen Blättern nahmen die Chloroplastenzahlen in bekannter Weise mit steigender Ploidiestufe zu, wobei die Ploidiestufen auf dem Häufigkeitsdiagramm der Chloroplastenzahlen in den Primärblättern und in den ersten Folgeblättern am deutlichsten getrennt waren.

2. Innerhalb jeder Ploidiestufe enthielten die Schließzellenpaare der Keimblätter um 18% weniger Chloroplasten als (im Mittel) die übrigen Blätter, während unter den letzteren je nach Blattsorte und Entnahmedatum nur Abweichungen um höchstens 10,5% von diesem Mittel beobachtet wurden.

3. Die interindividuellen Variationskoeffizienten der Chloroplastenzahlen in den Schließzellenpaaren schwankten, wenn als Pflanzenwerte die Mittel aus jeweils 10 Schließzellenpaaren eines Blattstücks zugrundegelegt wurden, je nach Ploidiestufe und Blattsorte von 6,3 bis 10,0% und waren bei den Triploiden am kleinsten. Ein Vergleich mit Variationskoeffizienten anderer Merkmale zeigt, daß die Chloroplastenzahlen in den Schließzellenpaaren jeweils einer Ploidiestufe zu den konstantesten quantitativen Merkmalen gehören, die man bei Zuckerrüben kennt.

4. Aus jeder Ploidiestufe wurden die 15 Pflanzen mit den wenigsten und die 15 Pflanzen mit den meisten Chloroplasten in den Schließzellenpaaren der Primärblätter herausgesucht. Die Chloroplastenzahlen dieser beiden Pflanzengruppen unterschieden sich auch in den anderen Blättern meist signifikant voneinander. Ähnliches galt, wenn die Pflanzen nach den Chloroplastenzahlen der Brakteen oder, in etwas geringerem Maße, wenn sie nach denen der Keimblätter herausgesucht worden waren. Die Chloroplastenzahl in den Schließzellen eines Blatts stellt also ein Merkmal dar, das mit bestimmter Wahrscheinlichkeit die ganze Pflanze auszeichnet und von anderen Pflanzen der gleichen Ploidiestufe unterscheidet. Die möglichen Ursachen solcher Verschiedenheiten der Chloroplastenzahlen innerhalb einer Ploidiestufe werden besprochen. Ein Einfluß des Genotyps darf als sicher gelten.

5. In Fortsetzung einer früheren Arbeit wurde die Frage untersucht und eingehend diskutiert, wie und

<sup>1</sup> Herrn M. DESPREZ, Cappelie par Templeuve, danke ich für den Hinweis auf die Verwendung einer Entwicklerlösung.

wie sicher man durch Zählen der Schließzellenchloroplasten die Ploidiestufe bestimmen kann. Am besten eignen sich dazu Primär- und erste Folgeblätter. Ein Verfahren wird angegeben, wie auf weniger subjektive Weise als bisher ermittelt werden kann, welche der Pflanzen, in denen die Zahl der Chloroplasten in den Schließzellenpaaren festgestellt wurde, mit hoher Wahrscheinlichkeit einer bestimmten Ploidiestufe zugeordnet werden dürfen und welche nicht. Bei der Anwendung dieses Verfahrens auf die Pflanzen des vorliegenden Versuchs wurden mit Hilfe der Chloroplastenzahlen in den Schließzellenpaaren der Primär- und ersten Folgeblätter 1 bzw. 1,5% der Pflanzen falsch bestimmt. 16 bzw. 18% der Pflanzen brachten kein brauchbares Ergebnis; ihre Ploidiestufe wird am besten durch Zählen der Trabanten-Chromocentren in Ruhekernen oder der Chromosomen nach einem der üblichen Verfahren ermittelt.

#### Literatur

- ANDERSSON-KOTTÖ, I.: The genetics of ferns. *Bibliotheca genetica* 8, 269—294 (1931). — 2. BARTHELMESS, A.: Mutationsversuche mit einem Laubmoos. *Physcomitrium piriforme*. II. Morphologische und physiologische Analyse der univalenten und bivalenten Protonemen einiger Mutanten. *Z. induct. Abst. Vererbungsl.* 79, 153—170 (1941). — 3. BUDDÉ, H.: Beiträge zur Anatomie und Physiologie des Blattes auf Grund volumetrischer Messungen. *Bot. Archiv* 4, 443—487 (1923). — 4. BUTTERFASS, TH.: Die praktische Ermittlung des Ploidiegrads von Zuckerrüben durch Zählen der Schließzellen-Chloroplasten. *Züchter* 28, 309—314 (1958). — 5. BUTTERFASS, TH.: Ploidie und Chloroplastenzahlen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 72, 440—451 (1959). — 6. DÖPP, W.: Gestaltung und Organbildung innerhalb der Gametophytgeneration der Polypodiaceen unter besonderer Berücksichtigung genetischer Gesichtspunkte. *Beitr. Biol. Pfl.* 24, 201—238 (1936). — 7. ELLERTON, S., and A. J. TH. HENDRIKSEN: Note on the probable cause of the occurrence of tetraploid plants in commercial triploid varieties of sugar beet. *Euphytica* 8, 99—103 (1959). — 8. EYSTER, W.: Variation in size of plastids in genetic strains of *Zea Mays*. *Science (N. Y.) N. S.* 69, 48 (1929). — 9. GRAF, A.: Bestimmung des Ploidiegrades in Zuckerrüben-Gebrauchssaatgut. *Zucker* 12, 344—349 (1959). — 10. KNAPP, E.: *Beta*-Rüben. Bes. Zuckerrüben. *Handb. Pflanzenzüchtung*, 2. Aufl., Band III, 196—284 (1958). — 11. KNUDSON, L.: Permanent changes of chloroplasts induced by X-rays in the gametophyte of *Polypodium aureum*. *Bot. Gaz.* 101, 721—758 (1940). — 12. MALY, R.: Cytomorphologische Studien an strahleninduzierten, konstant abweichenden Plastidenformen bei Farnprothallien. *Z. induct. Abst. Vererbungsl.* 83, 447—478 (1951). — 13. MARGARA, J., et H. TOUVIN: La polyploidie chez la betterave sucrière. *Compt. rend. acad. agricult. France* 44, 172—176 (1958). — 14. MARGARA, J., H. TOUVIN et J. SANDOZ: Recherches sur la selection de la betterave sucrière. IV. Études sur la polyploidie. *Publ. Inst. Techn. Français Betterave Industr.* 1957, *Trav. effect.*, 23—24 (1957). — 15. MICHAELIS, P.: Plasmavererbung und Heterosis. *Z. Pflanzenzücht.* 30, 250—275 (1951). — 16. MICHAELIS, P.: Untersuchungen zur Mutation plasmatischer Erbtäger, besonders der Plastiden. II. Teil. *Planta* 51, 722—756 (1958). — 17. MOCHIZUKI, A., and N. SUEOKA: Genetic studies on the number of plastid in stomata. I. Effects of autopolyploidy in sugar beets. *Cytologia (Tokyo)* 20, 358—366 (1955). — 18. REITBERGER, A.: Ruhekernuntersuchungen bei gesunden und viruskranken Diploiden und Polyploiden von *Beta vulgaris*. *Züchter* 26, 106—117 (1956). — 19. ROTTMANN, W.: Versuche zur Gewinnung abweichender Formen mit Farnsporen und -Gametophyten. *Beitr. Biol. Pfl.* 26, 1—80 (1939). — 20. SAVICKIJ (jetzt SAVITSKY), V. F.: Izmenčivost' u *Beta vulgaris* L. *Sveklodvodstvo* Bd. I, 552—580. Kiev (1940). — 21. SCHWANITZ, F.: Experimentelle Analyse der Genom- und Plasmonwirkung bei Moosen. V. Protonemaregeneration aus Blättchen, Chloroplastengröße, Chloroplastenzahl, assimilatorische Relation. *Z. induct. Abst. Vererbungsl.* 62, 232—248 (1932). — 22. STAUDE, H.: Toleranzen bei Stichprobenprüfungen von Ploidiegradbedingungen im Handel mit anisoploidem Zuckerrüben-saatgut. *Beitr. z. Rübenforsch.* 3, 29—50 (Wiss. Abh. Nr. 41 Dtsch. Akad. Landwirtschaftswiss. Berlin) (1959).

Aus der Bundesanstalt für Tabakforschung, Forchheim

## Genetische Analyse einer Y-Virus-(Rippenbräune) resistenten Mutante der Tabaksorte Virgin A

Von G. KOELLE

Mit 2 Abbildungen

Unter der Aufzucht röntgenbestrahlter Samen der Y-Virus-(Rippenbräune-) anfälligen Tabaksorte Virgin A traten 1954 3 Pflanzen auf, deren Blätter etwas dunkler waren und die keinerlei Anzeichen von Rippenbräune aufwiesen (KOELLE, Tabakforschung Nr. 24, 1958). Aus den Nachkommen einer dieser Pflanzen konnten u. a. wieder dunkler grüne, nicht befallene Pflanzen ausgelesen werden, deren Nachkommen wiederum einheitlich dunkler und feldresistent waren und die — bis zur  $X_4$ -Generation geprüft — nicht mehr weiter aufspalteten, also homozygot waren.

Die genetische Analyse des Unterschieds zwischen dieser Mutante und ihrer Ausgangsform Virgin A ließ nach der Kreuzung beider Typen eine 3:1-Spaltung mit Dominanz der Virgin A-Merkmale erkennen. Die  $F_1$  war uniform, Virgin A ähnlich. Die  $F_2$  spaltete auf in 912 Virgin A ähnliche und 288 reine Mutantentypen. Eine dihybride Spaltung ließe in  $1/16$  aller Pflanzen der  $F_2$ , das sind 75, Mutantentypen erwarten. Die

gefundene Zahl liegt sehr viel näher bei 300, d. h. der bei einer monohybriden Spaltung erwarteten.

	nicht befallen	befallen	Summe
erwartet bei monohybrider Spaltung	300	900	1200
gefunden	288	912	1200

$$\chi^2 = 0,64 \quad P = \text{zwischen } 50\% \text{ und } 30\%$$

Die Annahme einer monohybriden Spaltung ist damit gut gesichert. Die Mutante unterscheidet sich also von ihrer Ausgangsform Virgin A nur in den Allelen eines einzigen Genortes.

Die Mutantentypen waren in der  $F_2$  leicht zu erkennen, da sie im Gegensatz zu Virgin A und  $F_1$  weder Rippenbräune noch andere viröse Symptome erkennen ließen, höchstens in seltenen Fällen ein Eichblattmuster. Außerdem war ihr Wuchs gegenüber Virgin A