

Die Auslese tetraploider Formen von *Lupinus angustifolius* nach Röntgenbestrahlung und Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen mit den diploiden Ausgangsformen

FRITZ ZACHOW

Institut für Pflanzenzüchtung Gülzow-Güstrow der Deutschen Akademie
der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin

Selection of tetraploid forms of *Lupinus angustifolius* after X-radiation and results of comparative studies with the diploid parental strains

Summary. After X-radiation some mutants with broader leaves were selected from different X_2 -generations of *Lupinus angustifolius*. The pollen grains deviated much from their normal form and it was supposed that they were tetraploids. Comparative studies with the parental forms and counting of chromosomes proved seven mutant strains to be tetraploid. Measurements of plant height and counts of seed setting permit drawing a conclusion on the yield capacity of the tetraploids.

Die experimentelle Erzeugung polyploider Formen ist bei den Lupinenarten außerordentlich schwierig. Polyploidisierungsversuche mit *Lupinus luteus* (TROLL u. Mitarb. 1963) ergaben in Müncheberg keine lebensfähigen künstlichen Polyploide. Die behandelten Pflanzen starben vor dem Erreichen der Blühphase ab. Gleiche Reaktionen wurden nach Colchicinbehandlungen von *Lupinus luteus* und *Lupinus angustifolius* in Gülzow-Güstrow beobachtet. STRAUB dagegen verfügte über blühfähige tetraploide Süßlupinen, wie aus der 1950 veröffentlichten Abbildung tetraploider Pollenkörner ersichtlich ist. Über die Entstehungsursache und den Verbleib dieser Tetraploiden wurden jedoch keine weiteren Angaben gemacht.

Schwierigkeiten bei der Polyploidisierung bestehen nicht nur bei der Gattung *Lupinus*, sondern finden sich auch bei anderen großkörnigen Leguminosen. WERNER (1939, 1940) sowie MÜNTZING und RUNGQUIST (1939) berichten über negative Ergebnisse bei *Pisum sativum*. STRAUB (1940) konnte erst durch Anwendung einer besonderen Behandlungsmethode zwei lebensfähige tetraploide *Pisum*-Pflanzen erzeugen. Colchicinbehandlungen durch WEICHSEL (1940) blieben bei *Glycine hispida* und *Vicia sativa* erfolglos, während bei *Vicia faba* nach ansprechender Colchicinwirkung keine Weiterentwicklung stattfand und Pflanzen mit Chimärencharakter keinen Ansatz ergaben. HERTZSCH (1951) induzierte durch Colchicin bei *Vicia villosa* verschiedene Polyploidiestufen, wobei die polyploiden Pflanzen jedoch im Verlauf weniger Generationen zu 2n Pflanzen herabregulierten. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von HERTZSCH hat NORDENSKIÖLD (1953) bei experimentellen Tetraploiden von *Vicia sativa* eine stabile Konstanz der chromosomalen Verhältnisse festgestellt.

Spontan entstandene tetraploide Lupinen zeichnen sich durch eine größere Vitalität aus. Eine im Freiland durch TROLL (1959) aufgefundene tetraploide Pflanze von *Lupinus albus* konnte einige Jahre erhalten werden, während nach Auslese einer tetraploiden Form von *Lupinus luteus* aus einer F_1 -Generation es TROLL, JAGODA und KUNZE (1963) möglich war, tetraploides Material aufzubauen.

Nach Röntgenbestrahlung wurden im Jahre 1960 im Institut für Pflanzenzüchtung Gülzow-Güstrow aus verschiedenen X_2 -Generationen von *Lupinus angustifolius* 19 Pflanzen ausgelesen, die sich durch eine auffallende Vergrößerung der Blattbreite und Blüte auszeichneten. Starker Virusbefall führte bei 11 Pflanzen zum frühzeitigen Absterben, so daß kein keimfähiges Saatgut geerntet werden konnte; die übrigen 8 Pflanzen wurden nachkommenschaftsweise vermehrt und bis 1964 im Mutantensortiment erhalten, ohne daß eine nähere Analyse stattfand. Pollenmessungen ergaben eine stark vom Normalen abweichende Pollenform, was zu der Vermutung führte, daß die Breitblättrigkeit auf einer Veränderung des Genombestandes beruht. Vergleichende Untersuchungen mit den diploiden Ausgangsformen sollten deshalb diese Hypothese überprüfen.

Tabelle 1. Abstammungsübersicht der untersuchten Mutantenstämme.

Ausgangsmaterial	Parz.-Nr. X_2 1960	Anzahl der ausgelesenen Pflanzen	Nr. der Mutanten
Gülzower Rote Bittere	2310	3	115/60
Gülzower Rote Bittere	2254	1	116/60
Mutation albus	2837	3	127/60 128/60
Gülz. St. 57	2411	6	121/60
Kreuzungssaatgut: Mut. alb. × Rote Bittere	3008	1	124/60
F_1 -Saatgut: Mut. alb. × St. 57	3413	5	130/60 131/60

Die Abstammung der 8 breitblättrigen Mutantenstämme geht aus der Tab. 1 hervor. Die Stämme 115/60 und 116/60 entstanden aus der 'Gülzower Roten Bitteren', einer alkaloidhaltigen Zuchtsorte, die seit 1949 als Sorte in der DDR zugelassen ist. 127/60 und 128/60 wurden aus einer weißblütigen-weißsamigen alkaloidhaltigen Form ausgelesen, die im Sortiment unter der Bezeichnung „Mutation albus“ geführt wird. 121/60 geht auf einen alkaloidhaltigen Zuchtstamm zurück, der aus einer Kreuzung mit spanischen Herkünften entwickelt und besonders auf Kleinsamigkeit selektiert ist. Die restlichen Mutantenstämme 130/60, 131/60, und 124/60 gingen nicht aus homozygotem Material hervor, sondern entstammen Kreuzungen der „Mutation albus“ mit dem „Gülzower Stamm 57“ bzw. mit der 'Roten Bitteren', wobei von der 1. Kombination F_1 -Saatgut und von der 2. Kombination Kreuzungskörner mit Röntgenstrahlen behandelt wurden. Im Verlauf der Vermehrungsgenerationen wurden letztere Mutanten auf einen einheitlichen Typ selektiert, so daß die nachfolgenden Untersuchungen an weitgehend ausgeglichener Material vorgenommen werden konnten.

**Vergleichende Untersuchungen
an verschiedenen Organen**

1. Blattlänge und Blattbreite

Die Messung der Blattlänge und Blattbreite erfolgte an 7- und 9fingerigen Laubblättern. Von 10 Pflanzen wurden vergleichbar inserierte Blätter ausgewählt und die Länge und die größte Breite aller Fiederblättchen ermittelt. Die durchschnittlichen Meßwerte und die Signifikanz der Differenzen zu den Ausgangsformen sind für die 7fingerigen Blätter in der Tab. 2 angegeben. Während bei den Ausgangs-

gehend überein, die Mittelwerte der Fiederblättchenlängen stiegen weiter an, während bei den Blattbreiten nur eine geringe Abweichung zu den 7fingerigen Blättern nachzuweisen war.

2. Blattdicke

Außer der Vergrößerung der Blattspreite war bei den Mutantenstämmen auch eine fühlbar erhöhte Blattdicke festzustellen. Durch Messung von 40 Fiederblättchen 7fingeriger Laubblätter wurde nachgeprüft, ob bei der Blattdicke signifikante Abwei-

Tabelle 2. Blattlänge und Blattbreite bei 7fingerigen Blättern.

Nr.	n	Blattlänge in cm					Blattbreite in cm					Längen: Breiten- Index
		\bar{x}	s	D	t	P%	\bar{x}	s	D	t	P%	
Mut. albus	70	2,89	0,57	—	—	—	0,51	0,06	—	—	—	5,66
Rote Bittere	70	3,29	0,52	+0,40	4,35	<0,10	0,61	0,06	+0,10	10,00	<0,10	5,39
St. 57	70	3,44	0,70	+0,55	5,14	<0,10	0,60	0,08	+0,09	7,50	<0,10	5,73
124/60	70	3,21	0,57	+0,32	3,33	0,10	0,74	0,08	+0,23	19,17	<0,10	4,34
127/60	70	3,67	0,54	+0,78	8,39	<0,10	0,75	0,11	+0,24	16,00	<0,10	4,89
128/60	70	3,52	0,55	+0,63	6,70	<0,10	0,72	0,12	+0,21	13,13	<0,10	4,89
130/60	70	3,28	0,61	+0,39	3,94	<0,10	0,68	0,11	+0,17	11,33	<0,10	4,82
131/60	70	3,61	0,64	+0,72	7,06	<0,10	0,72	0,13	+0,21	12,35	<0,10	5,01
Rote Bittere	70	3,29	0,52	—	—	—	0,61	0,06	—	—	—	5,39
124/60	70	3,21	0,57	-0,08	0,87	36,80	0,74	0,08	+0,13	10,83	<0,10	4,34
115/60	70	3,94	0,51	+0,65	7,47	<0,10	0,88	0,13	+0,27	15,88	<0,10	4,47
116/60	70	3,70	0,51	+0,41	4,71	<0,10	0,81	0,13	+0,20	11,76	<0,10	4,57
St. 57	70	3,44	0,70	—	—	—	0,60	0,08	—	—	—	5,73
121/60	70	3,79	0,65	+0,35	3,18	0,14	0,79	0,11	+0,19	11,88	<0,10	4,80
130/60	70	3,28	0,61	-0,16	1,45	13,20	0,68	0,11	+0,08	5,00	<0,10	4,82
131/60	70	3,61	0,64	+0,17	1,50	13,20	0,72	0,13	+0,12	6,67	<0,10	5,01

formen zwischen der 'Gülzower Roten Bitteren' und dem „Stamm 57“ in der Blattlänge und Blattbreite keine gesicherten Differenzen vorliegen, zeichnen sich die Fiederblättchen der „Mutation albus“ durch eine signifikant geringere Größe aus. Die Meßwerte der aus Kreuzungen hervorgegangenen Mutanten wurden daher mit beiden Elternformen verglichen, um nachzuweisen, daß die beobachteten Merkmalsveränderungen nicht durch einfache Aufspaltungsvorgänge bedingt sind.

Die Unterschiede in der Blattbreite zwischen den Ausgangsformen und den Mutanten (Abb. 1) weisen eine sehr gute Signifikanz auf, wobei die Zunahme der Blattbreite annähernd gleich groß ist, sowohl bei Mutanten, die von der schmalblättrigen „Mutation albus“ abstammen als auch bei Mutanten, die aus den breitblättrigen Formen 'Gülzower Rote Bittere' und „St. 57“ hervorgingen. Die nach Kreuzungen ausgelesenen Mutanten zeigen beim Vergleich mit der „Mutation albus“ ein ähnliches Verhalten, während beim Vergleich mit den anderen Eltern (Rote Bittere bzw. St. 57) eine deutlich verringerte Zunahme der Blattbreite zu erkennen ist.

Die Blattlänge ist im Verhältnis zur Blattbreite nur wenig erhöht, was besonders beim Vergleich mit dem „Stamm 57“ augenscheinlich wird. Aber auch bei den übrigen Mutanten hat die Breite stärker zugenommen als die Länge, wie aus dem Längen: Breiten-Index zu entnehmen ist. Die Indices der Mutanten liegen bedeutend unter denen der Ausgangsformen. Gleiche Ergebnisse fanden auch TROLL und Mitarbeiter (1963) bei polyploider *Lupinus luteus*.

Die Auswertung der Meßergebnisse an 9fingerigen Blättern stimmte mit denen an 7fingerigen weit-

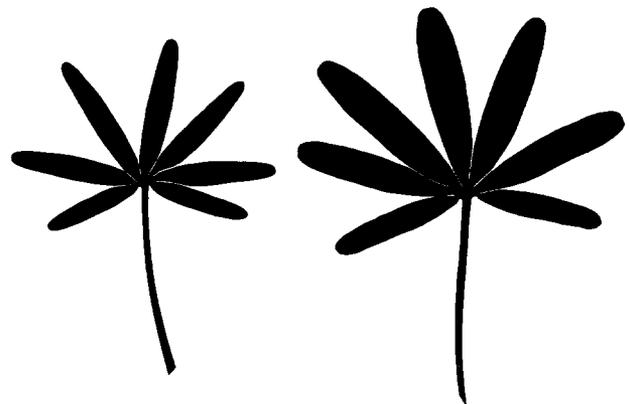


Abb. 1. 7fingerige Laubblätter verschiedener Valenzstufen; links: diploid (Gülzower Rote Bittere); rechts: tetraploid (St. 115/60).

chungen zu den Ausgangsformen vorhanden sind. Die ermittelten Meßwerte und die Ergebnisse der statistischen Auswertung wurden in der Tab. 3 zusammengestellt. Während die errechneten Differenzen bei den Ausgangsformen innerhalb der Fehlergrenze liegen, war bei den Mutantenstämmen eine sehr gut zu sichernde Verstärkung der Blattdicke um 30–40% nachzuweisen. Nur die Nr. 124/60 bildet eine Ausnahme; die Vergrößerung der Blattspreite wird bei diesem Stamm von keiner wesentlichen Zunahme der Blattdicke begleitet.

3. Schließzellengröße

Beim Übergang von einer Valenzstufe zur nächsthöheren findet eine bedeutende Vergrößerung der Schließzellen statt, so daß polyploide Formen durch vergleichende Messungen aufgefunden werden kön-

Tabelle 3. *Blattdicke bei 7fingerigen Blättern.*

Nr.	n	\bar{x} in mm	s	D	s_d	t	P%
Mut. albus	40	0,38	0,04	—	—	—	—
Rote Bittere	40	0,37	0,05	-0,01	0,010	1,00	31,70
St. 57	40	0,39	0,03	+0,01	0,008	1,25	19,30
124/60	40	0,39	0,03	+0,01	0,008	1,25	19,30
127/60	40	0,55	0,05	+0,17	0,010	17,00	<0,10
128/60	40	0,52	0,04	+0,14	0,009	15,56	<0,10
130/60	40	0,53	0,05	+0,15	0,010	15,00	<0,10
131/60	40	0,54	0,05	+0,16	0,010	16,00	<0,10
Rote Bittere	40	0,37	0,05	—	—	—	—
115/60	40	0,51	0,02	+0,14	0,009	15,56	<0,10
116/60	40	0,48	0,05	+0,11	0,011	10,00	<0,10
124/60	40	0,39	0,03	+0,02	0,009	2,22	2,80
St. 57	40	0,39	0,03	—	—	—	—
121/60	40	0,49	0,03	+0,10	0,007	14,29	<0,10
130/60	40	0,53	0,05	+0,14	0,009	15,56	<0,10
131/60	40	0,54	0,05	+0,15	0,009	16,67	<0,10

Tabelle 4. *Schließzellengröße der Spaltöffnungen 7fingeriger Laubblätter.*

Nr.	n	\bar{x} in Teilstrichen	s	D	s_d	t	P%
Mut. albus	50	20,74	1,31	—	—	—	—
124/60	50	19,80	1,23	-0,94	0,24	3,92	<0,10
127/60	50	29,28	1,59	8,54	0,29	29,45	<0,10
128/60	50	28,60	1,80	7,86	0,33	23,82	<0,10
130/60	50	26,80	1,71	6,06	0,30	20,20	<0,10
131/60	50	25,98	1,51	5,24	0,28	18,71	<0,10
Rote Bittere	50	19,70	1,49	—	—	—	—
115/60	50	30,14	2,36	10,44	0,40	26,10	<0,10
116/60	50	28,46	2,61	8,76	0,44	19,90	<0,10
124/60	50	19,80	1,23	0,10	0,27	0,37	68,80
St. 57	50	19,86	1,93	—	—	—	—
121/60	50	25,94	1,77	6,08	0,37	16,40	<0,10
130/60	50	26,80	1,71	6,94	0,37	18,80	<0,10
131/60	50	25,98	1,51	6,12	0,35	17,50	<0,10

nen. STRAUB (1950) und SCHWANITZ (1952) weisen jedoch darauf hin, daß die Größe der Schließzellen einer Pflanze stark variiert, so daß nur gleichwertige Blätter für die Messungen herangezogen werden sollten. Zur Untersuchung der Schließzellengröße des vorliegenden Materials wurde die Epidermis der Blattunterseite des mittleren Fiederblättchens bei vergleichbaren 7fingerigen Laubblättern abgezogen, auf den Objektträger in einen Wassertropfen gebracht und die Messung der Schließzellen bei 280-facher Vergrößerung vorgenommen.

essigsäure zur Messung zu bringen. Die gleiche Methode wurde auch von TROLL und Mitarb. (1963) bei den Pollenkornvergleichen diploider und tetraploider *Lupinus luteus* angewendet. Da bei Lupinen der Übergang von der diploiden zur tetraploiden Genomstufe eine auffallende Veränderung der Pollenform hervorruft (Ab. 2 und Abb. 3) und diese Veränderung bei der Messung in Karminessigsäure durch Quellvorgänge nicht mehr so deutlich in Erscheinung tritt, erfolgte die Messung trockener Pollenkörner.

Tabelle 5. *Ergebnisse der Pollenkornmessungen.*

Nr.	n	Pollenkornlänge					Pollenkornbreite					Längen: Breiten- Index
		\bar{x} in Teilstr.	s	D	P%	\bar{x} in Teilstr.	s	D	t	P%		
Mut. albus	50	49,42	1,14	—	—	—	25,38	1,19	—	—	—	1,95
124/60	50	50,36	2,00	0,94	2,85	0,52	28,36	3,35	2,98	5,96	<0,10	1,78
127/60	50	54,28	4,21	4,86	7,84	<0,10	37,86	4,94	12,48	17,33	<0,10	1,43
128/60	50	54,22	3,41	4,80	9,43	<0,10	35,56	6,36	10,18	11,07	<0,10	1,52
130/60	50	53,42	4,55	4,00	6,06	<0,10	37,22	4,85	11,84	16,68	<0,10	1,44
131/60	50	49,32	6,30	-0,10	0,11	92,00	36,00	6,71	10,62	11,06	<0,10	1,37
Rote Bittere	50	49,90	0,83	—	—	—	26,14	1,61	—	—	—	1,91
115/60	50	56,06	4,25	6,16	10,10	<0,10	35,54	4,68	9,40	13,43	<0,10	1,58
116/60	50	54,14	3,78	4,24	7,71	<0,10	36,08	5,29	9,94	12,74	<0,10	1,50
124/60	50	50,36	2,00	0,46	1,48	13,20	28,36	3,35	2,22	4,19	<0,10	1,78
St. 57	50	50,94	1,85	—	—	—	25,92	1,09	—	—	—	1,97
121/60	50	52,90	4,36	1,96	2,13	2,80	40,20	5,47	14,28	18,08	<0,10	1,32
130/60	50	53,42	4,55	2,48	3,59	<0,10	37,22	4,85	11,30	16,14	<0,10	1,44
131/60	50	49,32	6,30	-1,62	1,74	7,20	36,00	6,71	10,08	10,50	<0,10	1,37

Die in der Tab. 4 angeführten Messungsergebnisse sind in Teilstrichen angegeben, wobei ein Teilstrich = 2,07 μ beträgt. Die Schließzellengröße der Ausgangsformen verhält sich zu den Schließzellengrößen der Mutantenstämme wie 1:1,2 bis 1,4, ein Verhältnis, das nach STRAUB (1950) für den Vergleich diploider mit tetraploiden Schließzellen charakteristisch ist. Der Stamm 124/60 unterscheidet sich wiederum von den übrigen Mutanten, seine Schließzellen sind entweder gleich oder signifikant kleiner als die der Eltern 'Rote Bittere' und 'Mutation albus'. Dieses Ergebnis deutet an, daß die Merkmalsveränderung dieses Stammes wahrscheinlich nicht auf einer Erhöhung des Genombestandes beruht, sondern genbedingt ist.

4. Pollenkorngröße

Ebenso wie die Schließzellengröße sind auch die Pollenkorngröße und die Pollenkornform charakteristische Merkmale zur Bestimmung der Valenzstufe, wobei auch bei dieser Eigenschaft entsprechend den Untersuchungen von SCHWANITZ (1952) zu berücksichtigen ist, daß vergleichbare Blüten zur Pollenkornuntersuchung ausgewählt werden.

Zur Feststellung der Pollengröße empfiehlt STRAUB (1950), die reifen Pollen in einem Tropfen Karmin-

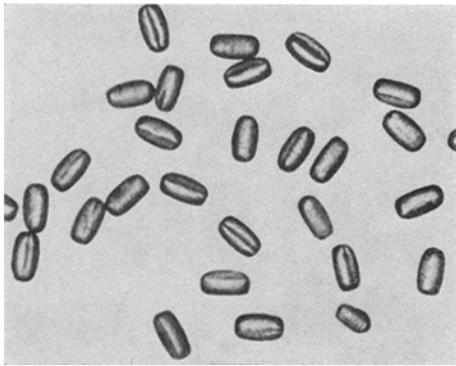


Abb. 2. Pollenkörner diploider Formen von *Lupinus angustifolius*.

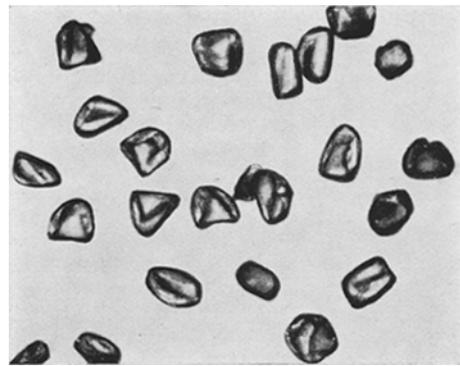


Abb. 3. Pollenkörner tetraploider Formen von *Lupinus angustifolius*.

Der Pollen wurde aus voll entfalten Blüten des Haupttriebes entnommen und bei 50-facher Vergrößerung bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Teilstrichwerten in der Tab. 5 angegeben. Die Mittelwerte der Pollenlängen sind bei den Mutantenstämmen nur wenig größer als die der Ausgangsformen. Bei den Stämmen 124/60 und 131/60 besteht jedoch fast kein Unterschied zu den Kreuzungseltern.

Eine bedeutende Zunahme erfährt dagegen die Breite der Pollenkörner, so daß die Differenzen zu den Ausgangsformen stets sehr gut signifikant sind. Die sich aus der Breitenzunahme ergebende Veränderung der Pollenform spiegelt sich charakteristisch in einer Verkleinerung des Längen:Breiten-Indexes wieder. Während bei normalen diploiden Formen ein Verhältnis von 1:2 vorhanden ist, beträgt es bei den Mutantenstämmen etwa 1:1,4 bis 1,5. Nur der Stamm 124/60 nimmt im Längen:Breiten-Index eine Mittelstellung ein. Schon aus den Ergebnissen der Blattdicken- und Stomata-Messungen ergibt sich recht eindeutig, daß der Stamm 124/60 von den übrigen breitblättrigen Mutanten abweicht und wahrscheinlich einen anderen Genombestand aufweist. Die Pollenkornmessungen verstärken diesen Verdacht, lassen jedoch auch erkennen, mit welchem großen Unsicherheitsfaktor Pollenkornvergleiche zur Bestimmung der Polyploidie-Stufe behaftet sind. Auch der Stamm 124/60 weicht in der Pollenkornbreite und damit auch in der Pollenkornform signifikant von den beiden Ausgangsformen ab.

5. Ergebnisse der Chromosomenzählungen

Wenn auch die im vorhergehenden Teil beschriebenen Organvergleiche es sehr wahrscheinlich machen, daß mit Ausnahme des Stammes 124/60 die aufgefundenen breitblättrigen Mutanten Polyploide sind, so ist doch nur durch zytologische Untersuchungen eine einwandfreie Klärung der chromosomalen Verhältnisse möglich.

Zur Chromosomenzählung wurden Samen auf Filterpapier angekeimt und die Wurzelspitzen in Carnoygemisch fixiert. Zur Verkürzung der Chromo-

somen wurden die Wurzelspitzen für 24 Stunden im Kühlschrank bei einer Temperatur von +2 °C aufbewahrt, eine Methode, die bereits TUSCHNIAKOWA (1935) sowie TROLL und Mitarbeiter (1963) bei Lupinen mit gutem Erfolg anwendeten. Die Färbung erfolgte in Karminessigsäure unter Zugabe geringer Spuren Eisen-III-Chlorid. Zur Untersuchung wurden Quetschpräparate nach den von GEITLER (1949) angegebenen Methoden angefertigt.

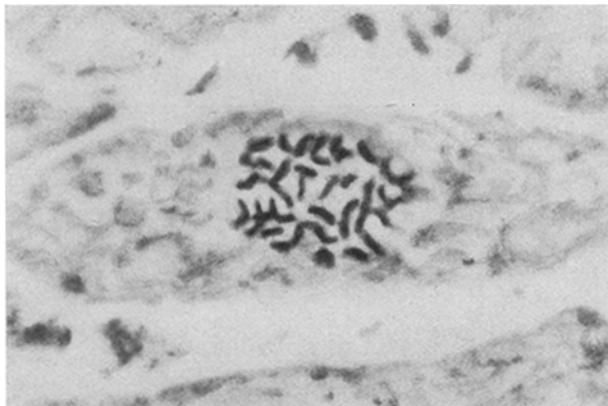
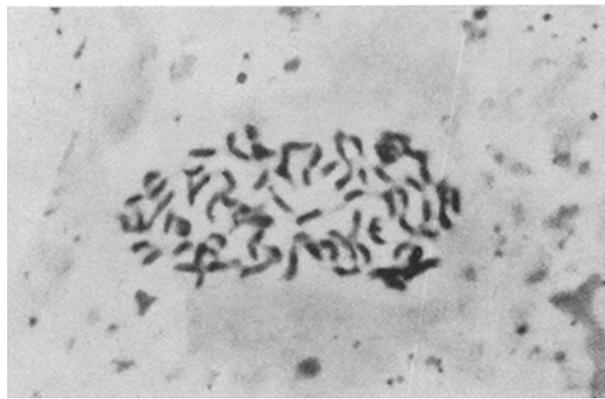
Die Chromosomenzahl von *Lupinus angustifolius* wird von WINGE (1925) und TUSCHNIAKOWA (1935) mit $2n = 40$ angegeben, während KAWAKAMI (1930) $2n = 48$ feststellte. Diese unterschiedlichen Angaben lassen erkennen, daß exakte Chromosomenzählungen schon bei diploiden Formen äußerst schwierig sind und diese Schwierigkeiten bei polyploiden durch die Vielzahl der Chromosomen erheblich zunehmen. Wenn deshalb die Zählungsergebnisse auch nicht immer die bei Tetraploiden erwartete Zahl von $2n = 80$ ergeben, so ist eine Unterscheidung von diploiden Formen jedoch mit großer Genauigkeit möglich (Tab. 6, Abb. 4 u. 5).

Die Chromosomenzählungen bestätigten die Ergebnisse der Organvergleiche, daß die Breitblättrigkeit auf eine Veränderung der Valenzstufe zurückzuführen ist. Gleichzeitig zeigten die Chromosomenzählungen am Beispiel des Stammes 124/60 aber auch, daß die Vergrößerung der Blattspreite nicht immer ihre Ursache in einer erhöhten Chromosomenzahl hat, sondern auch genbedingt sein kann, wie schon die Auffindung der Latifolius-Mutante durch HACKBARTH-TROLL (1955) nachwies.

Aus den wenigen bisher vorliegenden Angaben kann geschlossen werden, daß die Lupine mit zu den Arten gehört, bei denen lebensfähige Polyploide durch Colchicinbehandlung sehr schwer zu erzeugen sind. Spontane Polyploide besitzen wahrscheinlich eine

Tabelle 6. Ergebnisse der Chromosomenzählungen.

Mut. albus	Chromosomenzahl verschiedener Wurzelspitzen									
Mut. albus	40									
Rote Bittere	40									
Gülz. St. 57	40									
115/60	79	83	78	81	82	76	84	80	78	82
116/60	80	79	80	79	82	83	80	80	82	81
121/60	85	80	76	79	82	78	79	75	75	79
124/60	48	46	41	39	40	40	41	39	40	40
127/60	79	78	85	80	81	79	85	80	78	83
128/60	83	81	78	78	76	82	74	76	82	78
130/60	81	76	80	80	76	78	80	81	80	78
131/60	83	81	84	85	82	83	82	80	83	84

Abb. 4. Chromosomensatz einer diploiden Pflanze von *Lupinus angustifolius*.Abb. 5. Chromosomensatz einer tetraploiden Pflanze von *Lupinus angustifolius*.

größere Vitalität, wurden aber bisher auch sehr selten aufgefunden. Es ist deshalb bemerkenswert, daß nach Röntgenbestrahlung gleichzeitig mehrere Polyploide auftraten, über deren Entstehungsursachen keine genauen Angaben gemacht werden können. Mit Sicherheit läßt sich jedoch nachweisen, daß diese polyploiden Formen nicht durch einfache Vermehrung einer zufällig im Material vorhandenen spontanen Polyploiden hervorgegangen sind. Aus der Abstammungsübersicht (Tab. 1) ist zu entnehmen, daß die 7 durch Chromosomenzählungen als Tetraploide bestätigten Mutantenstämme nicht von einer Ausgangspflanze abstammen. Die Auslese erfolgte in fünf verschiedenen X_2 -Parzellen, die aus fünf X_1 -Einzelpflanzen hervorgingen und außerdem noch zu drei verschiedenen Sorten bzw. Stämmen gehörten. Da das Saatgut, aus dem diese Mutterpflanzen erwachsen, mit einer Röntgendosis von 20 kr behandelt wurde, besteht die Möglichkeit, daß die X_1 -Pflanzen unreduzierte Gameten ausbildeten. Nimmt man diese Entstehungsursache an, so müssen unreduzierter Pollen und unreduzierte Eizellen in einer Blüte entstanden sein, da *Lupinus angustifolius* unter den Umweltverhältnissen von Gülzow ein obligater Selbstbefruchter ist (ZACHOW 1958).

In einigen X_2 -Parzellen wurden mehrere polyploide Pflanzen aufgefunden, was nur möglich war, wenn gleichzeitig mehrere Blüten einer Einzelpflanze unreduzierte Gameten ausbildeten. Beruht die Entstehung der polyploiden *Lupinus angustifolius* auf der Verschmelzung unreduzierter Gameten und liegen damit meiotische Polyploide vor, so ist es nach den Untersuchungen von BECKER (1960, 1962), SKIEBE (1956, 1958), JAHR (1962) und JAHR, SKIEBE und STEIN (1963) sehr wahrscheinlich, daß diese meiotischen Polyploide den mitotischen in der Leistung überlegen sind. Direkte Vergleiche zwischen meiotischen und mitotischen Polyploiden sind jedoch nicht möglich,

denn die erzeugten mitotischen Polyploiden hatten eine so geringe Vitalität, daß sie nicht lebensfähig waren. Diese Erscheinung könnte als Beweis gelten, daß die ausgelesenen polyploiden Stämme auf meiotischem Wege entstanden sind, denn in der Vitalität und Leistung sind sie allen bisherigen mitotischen Polyploiden außerordentlich überlegen.

Als weitere Entstehungsursache könnte auch bei einer oder mehreren somatischen Zellen im Verlauf der Mitose eine Verdopplung der Chromosomen erfolgt sein, so daß die Möglichkeit der Bildung tetraploider Seitensprosse gegeben war. Diese Bildungsursache hat sicherlich nur eine geringe Wahrscheinlichkeit, denn das sich bildende Gewebe hätte fast immer Chimärencharakter gehabt und die polyploiden Zellen wären auf Grund der geringeren Teilungsrates von den diploiden überwachsen worden.

Die Frage, ob die Röntgenstrahlen tatsächlich das auslösende Agens waren oder ob noch andere Begleitfaktoren zu der Erhöhung der Valenzstufe führten, kann nicht eindeutig beantwortet werden und müßte erst Aufgabe weiterer Untersuchungen sein.

6. Wuchshöhenvergleiche

Über die praktische Bedeutung der polyploiden schmalblättrigen Lupinen sind noch keine genauen Angaben möglich, denn exakte Ertragsprüfungen liegen bisher nicht vor. Da die Grünmasse die Hauptnutzungsrichtung darstellt, bestehen jedoch direkte Beziehungen zwischen Wuchshöhe und Leistung. Bei einigen polyploiden Stämmen und den entsprechenden diploiden Ausgangsformen wurde deshalb die Wuchshöhe 14 Tage vor Beginn der Blüte und während der Vollblüte ermittelt (Tab. 7). Zur Zeit der ersten Messung waren die Mutantenstämme den Ausgangsformen signifikant überlegen, während beim zweiten Meßdatum nur noch geringe Wuchshöhenunterschiede bestanden, die im Verlauf der weiteren

Tabelle 7. Wuchshöhenvergleich bei diploiden und tetraploiden Pflanzen von *Lupinus angustifolius*.

Nr.	n	1. Messung am 2. 6. 1965						2. Messung am 20. 6. 1965					
		\bar{x} in cm	s	D	s_d	t	P%	\bar{x} in cm	s	D	s_d	t	P%
Mut. albus	20	10,85	1,424	—	—	—	—	40,05	2,655	—	—	—	—
127/60	20	14,50	1,153	3,65	0,410	8,902	<0,10	41,70	2,364	1,65	0,795	2,075	4,90
128/60	20	14,40	1,196	3,55	0,416	8,432	<0,10	41,35	1,861	1,30	0,725	1,793	8,30
Rote Bittere	20	14,50	1,609	—	—	—	—	51,45	3,412	—	—	—	—
115/60	20	17,55	1,097	3,05	0,435	7,011	<0,10	51,55	2,568	0,10	0,955	0,105	92,00
116/60	20	16,80	1,321	2,30	0,465	4,946	<0,10	48,95	3,103	2,50	1,031	2,425	2,10

Entwicklung immer mehr ausgeglichen wurden. Dieses Ergebnis berechtigt zu der Schlußfolgerung, daß die polyploiden Formen den diploiden im Grünmasseertrag mindestens ebenbürtig sind, und wenn man weiterhin berücksichtigt, daß eine Vergrößerung und Verdickung der Blattspreiten und Sproßteile bei den polyploiden Formen vorhanden ist, kann auch mit einer erhöhten Grünmasseproduktion gerechnet werden.

7. Vergleich der Ansatzverhältnisse

Ebenso wie die Wuchshöhenmessungen einen Anhaltspunkt über die zu erwartende Grünmasseleistung liefern, gestatten vergleichende Auszählungen der Ansatzverhältnisse Rückschlüsse auf die Kornertragsleistung. Unter diesem Gesichtspunkt wurden bei den polyploiden Stämmen, die von der 'Roten Bitteren' und der „Mutation albus“ abstammten, vergleichende Auszählungen durchgeführt. Die Polyploiden des „Stammes 57“ konnten in diese Untersuchung nicht einbezogen werden, da vergleichbares Material nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Zunächst wurde festgestellt, ob entsprechend den Ergebnissen von SCHWANITZ (1949) auch bei den polyploiden Lupinen die Anzahl der gebildeten Blüten herabgesetzt wird. Die vergleichenden Auszählungen (Tab. 8) wurden nur am Haupttrieb vorgenommen, da die Blüten der Seitentriebe auch bei den Diploiden nicht immer voll zur Ausbildung kommen, so daß exakte Zählungen nur sehr schwer möglich sind. Bei drei der geprüften Stämme ließ sich eine signifikante Verminderung der Blütenzahl nachweisen, während der Stamm 127/60 keine gesicherte Abnahme zur Ausgangsform zeigte. Die Blüten der Polyploiden waren gegenüber den diploiden Blüten bedeutend vergrößert (Abb. 6), wobei gleich den Fiederblättchen die Länge im Verhältnis weniger zugenommen hatte als die Breite (Abb. 7).

Für die Kornertragsleistung hat nach unseren langjährigen Beobachtungen bei schmalblättrigen Lupi-

Tabelle 8. Blütenzahl des Haupttriebes bei diploiden und tetraploiden Formen von *Lupinus angustifolius*.

Nr.	n	\bar{x}	s	sd	D	t	P%
Mut. albus	20	21,35	1,76	—	—	—	—
127/60	14	20,43	1,79	0,614	-0,92	1,50	14,30
128/60	16	18,06	1,55	0,579	-3,29	5,68	<0,10
Rote Bittere	19	19,44	2,73	—	—	—	—
115/60	17	16,04	3,27	0,993	-3,42	3,40	0,20
116/60	15	14,00	2,45	0,906	-5,44	6,00	<0,10

Tabelle 9. Hülsenanzahl des Haupttriebes bei diploiden und tetraploiden Formen von *Lupinus angustifolius*.

Nr.	n	\bar{x}	s	sd	D	t	P%
Mut. albus	20	6,45	1,44	—	—	—	—
127/60	14	4,43	1,87	0,567	-2,02	3,56	0,15
128/60	16	4,06	2,02	0,577	-2,39	4,14	<0,10
Rote Bittere	19	5,26	1,85	—	—	—	—
115/60	17	3,00	1,53	0,570	-2,26	3,97	<0,10
116/60	15	3,07	1,39	0,595	-2,19	3,81	<0,10

nen die Blütenproduktion nur eine untergeordnete Bedeutung, denn auch bei diploiden Formen ergeben weniger als 50% der vorhandenen Blüten Samenanatz (Tab. 9).

Bei den tetraploiden Pflanzen geht der Hülsenansatz jedoch noch weiter zurück, nur 25 bis 30% der ursprünglich ausgebildeten Blüten entwickeln samen tragende Hülsen.

Diese allgemein bei Polyploiden zu beobachtende verminderte Fruchtbarkeit beruht nach den Untersuchungen von SCHWANITZ (1949) unter anderem darauf, daß durch Vergrößerung der Zellen und dadurch bedingte morphologische und physiologische Veränderungen der Stoffwechsel und der Stofftransport bei den Polyploiden verschlechtert sind, so daß nicht alle Blüten ausreichend ernährt werden, was zum vorzeitigen Abwerfen der Blütenknospen führt.

Gleiche Verhältnisse fanden sich an den Seitentrieben, so daß die Gesamthülsenanzahl pro Pflanze eine erhebliche Verminderung erfährt (Tab. 10). Die geringe Fertilität erstreckt sich jedoch nicht nur auf den Hülsenansatz, sondern wie die durchschnittliche Kornzahl pro Pflanze ausweist, hat besonders die Kornzahl pro Hülse beträchtlich abgenommen. Während die Fertilität stark herabgesetzt wird,

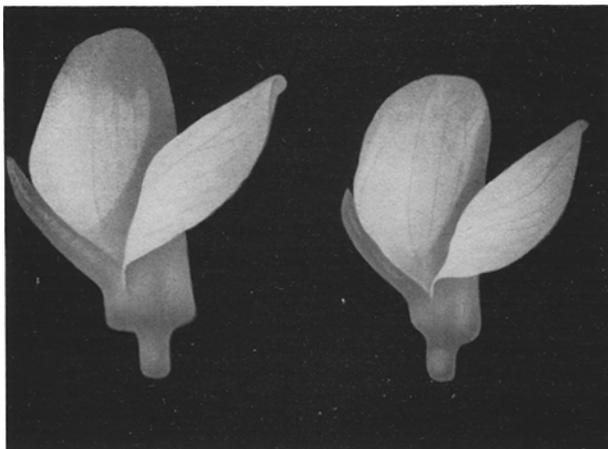


Abb. 6. Rechts: Blüte einer diploiden Form von *Lupinus angustifolius*; links: Blüte einer tetraploiden Form von *Lupinus angustifolius*.

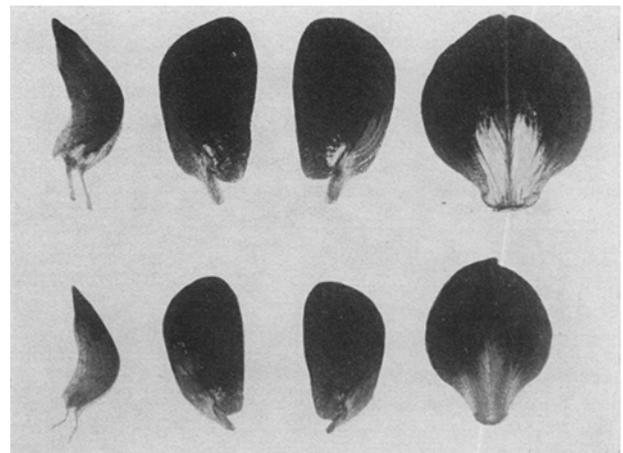
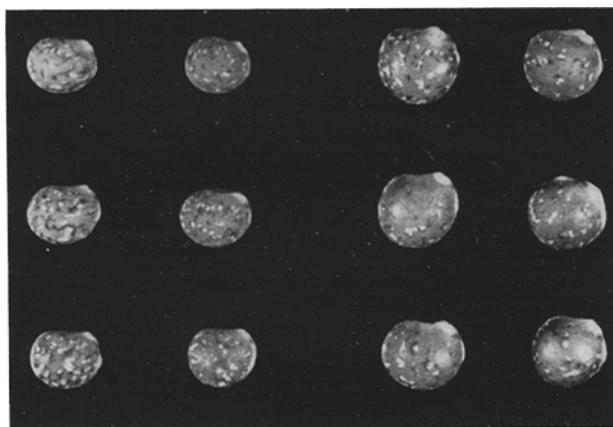


Abb. 7. Schiffchen, Flügel und Fahnen von Blüten verschiedener Valenzstufen; oben: tetraploid; unten: diploid.

Tabelle 10. Vergleich der Ansatzverhältnisse bei diploiden und tetraploiden Pflanzen von *Lupinus angustifolius*.

Nr.	n	Hülsenzahl/Pflanze				Kornzahl/Pflanze				Kornzahl/Hülse			
		\bar{x}	s	D	P%	\bar{x}	s	D	P%	\bar{x}	s	D	P%
Mut. albus	20	30,20	10,00	—	—	123,50	39,40	—	—	4,40	1,05	—	—
127/60	14	15,80	7,90	-14,40	<0,10	30,50	16,28	-93,00	<0,10	1,92	0,33	-2,48	<0,10
128/60	16	12,90	6,20	-17,30	<0,10	25,60	13,60	-97,90	<0,10	1,94	0,32	-2,46	<0,10
Rote Bittere	19	15,47	6,07	—	—	61,20	20,20	—	—	4,01	0,49	—	—
115/60	17	10,29	5,05	-5,18	0,90	16,23	9,80	-44,97	<0,10	1,47	0,33	-2,54	<0,10
116/60	15	6,53	3,23	-8,94	<0,10	9,93	5,39	-51,27	<0,10	1,56	0,51	-2,45	<0,10

steigt die Tausendkornmasse von den 2 n- zu den 4 n-Samen bedeutend an (Abb. 8, Tab. 11). Diese Zunahme der Samengröße beruht teilweise auf einer Erhöhung des Volumens der polyploiden Zellen, teilweise wird sie nach unseren Vorstellungen aber auch durch die geringe Kornzahl pro Hülse verursacht.

Abb. 8. Links: diploide, rechts: tetraploide Samen von *Lupinus angustifolius*.Tabelle 11. TKM-Werte diploider und polyploider Formen von *Lupinus angustifolius*.

Nr.	TKM in Gramm			Differenz zu der Ausgangsform
	1964	1965	Ø	
Mut. albus	162,33	173,60	167,97	—
124/60	213,33	218,75	216,04	+48,07
127/60	240,67	189,30	214,99	+47,02
128/60	256,67	221,60	239,14	+71,17
130/60	157,14	161,29	159,22	-8,75
131/60	182,22	166,70	174,46	+6,49
Gülz. Rote Bittere	179,33	205,60	192,47	—
115/60	265,33	238,81	252,07	+59,60
116/60	265,00	250,00	257,50	+65,03
124/60	213,33	218,75	216,04	+23,57
Stamm 57	152,33	137,00	144,67	—
121/60	231,25	250,00	240,63	+95,96
130/60	157,14	161,29	159,22	+14,55
131/60	182,22	166,70	174,46	+29,79

Verstärkt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß bei dem diploiden Mutantenstamm 124/60, der gleich den Polyploiden ebenfalls nur eine sehr geringe Kornzahl pro Hülse besitzt, die Tausendkornmasse auch stark erhöht ist.

Wie zu erwarten, sind die Voraussetzungen zur Erzeugung befriedigender Kornerträge weit ungünstiger als bei der Grünmasse. Durch züchterische Maßnahmen läßt sich die Fertilität sicher erheblich verbessern, denn die angeführten Ergebnisse wurden von Material gewonnen, das noch keiner intensiven

züchterischen Bearbeitung unterworfen wurde. Nach unserer Meinung haben die polyploiden *Lupinus angustifolius* jedoch nicht die größte Bedeutung für die direkte praktische Nutzenanwendung, sondern ihr Einsatz zur Bereicherung der Formfülle könnte größeren Nutzen bringen. Artkreuzungen, die bisher trotz umfangreicher Versuche von GOLLMICK (1937) und JARANOWSKI (1962) auf diploider Basis nicht gelangen, sind vielleicht auf tetraploider Basis leichter möglich. Gelingt auf diesem Wege eine Artbastardierung, so kann für die weitere Entwicklung der Süßblupine die von der praktischen Züchtung so dringend benötigte Erweiterung der Formenmannigfaltigkeit geschaffen werden.

Zusammenfassung

Nach Röntgenbestrahlung wurden aus verschiedenen X_2 -Generationen von *Lupinus angustifolius* mehrere breitblättrige Mutanten ausgelesen. Die stark vom Normalen abweichende Pollenform ließ vermuten, daß eine Erhöhung der Valenzstufe vorlag. Durch vergleichende Untersuchungen mit den Ausgangsformen und durch Chromosomenzählungen wurden sieben Mutantenstämme als Tetraploide bestätigt. Wuchshöhenmessungen und Auszählungen der Ansatzverhältnisse gestatten Schlußfolgerungen über die zu erwartende Leistungsfähigkeit der Tetraploiden.

Literatur

1. BECKER, G.: Darwin und die Pflanzenzüchtung. Dtsch. Akad. Landwirtschaftswiss. Berlin u. Vorträge 4, 99–113 (1960). — 2. BECKER, G.: Rettich und Radies (*Raphanus sativus* L.). Handb. Pflanzenzüchtg. 2. Aufl. Bd. 4, 23–78 (1962). — 3. GEITLER, L.: Schnellmethoden der Kern- u. Chromosomenuntersuchung. Wien: Springer-Verlag 1949. — 4. GOLLMICK, F.: Über Artkreuzungen bei Lupinen. Der Züchter 9, 65–68 (1937). — 5. HACKBARTH, J., und H. J. TROLL: Einige Spontanmutationen von *Lupinus luteus* und *Lupinus angustifolius*. Z. f. Pflanzenzüchtg. 34, 409–420 (1955). — 6. HACKBARTH, J., und H. J. TROLL: Lupinen als Körnerleguminosen. In: KAPPERT-RUDOLF, Handb. d. Pflanzenzüchtg. 2. Aufl. Bd. 4. Berlin: Verlag P. Parey 1959. — 7. HERTZSCH, W.: Beobachtungen an polyploider *Vicia villosa*. Z. Pflanzenzüchtg. 30, 210–217 (1951). — 8. JAHR, W.: Befruchtungsbiologie u. Allopolyploidie bei der Artkreuzung Sommerraps \times Chinakohl (*Brassica napus* f. *typica* Pospichal \times B. *pekinensis* Rupr. var. *cylindrica* Tsen et Lee). Der Züchter 32, 216–225 (1962). — 9. JAHR, W., K. SKIEBE und H. STEIN: Bedeutung von Valenzkreuzungen für die Polyploidiezüchtung. Z. Pflanzenzüchtg. 50, 26–33 (1963). — 10. JARANOWSKI, J.: Fertilization and Embryo Development in the Genus *Lupinus* Tourn. Part I. Seed Development in Cases of Autogamy. Genetica Polonica 3, 209–246 (1962). — Part II. Fertilization and Embryo Development following reciprocal species Hybridization. Genetica Polonica 3, 333–368 (1962). — 11. KAWAKAMI, S.: Chromosome numbers in Spatiinac-Leguminosae. Botanic. Mag. 5, 52 (1930). — 12. MÜNT-

ZING, A., and E. RUNGQUIST: Note on some colchicine-induced polyploids. *Hereditas* **25**, 491–495 (1939). — 13. NORDENSKIÖLD, H.: An investigation into two tetraploid strains of vetches (*Vicia sativa*) and their hybrid products. *Kungl. Landbrukshögskolans Annaler* **19**, 209–225 (1953). — 14. SCHWANITZ, F.: Untersuchungen an polyploiden Pflanzen. V. Zur Sexualität polyploider Pflanzen. *Der Züchter* **19**, 344–359 (1949). — 15. SCHWANITZ, F.: Einige kritische Bemerkungen zur Methode der Bestimmung der Polyploidie durch Messung der Pollen und der Spaltöffnungsgröße. *Der Züchter* **22**, 273–275 (1952). — 16. SKIEBE, K.: Artbastardierung und Polyploidie in der Gattung *Cheiranthus* L. *Der Züchter* **26**, 353–363 (1956). — 17. SKIEBE, K.: Die Bedeutung von unreduzierten Gameten für die Polyploidiezüchtung bei der Fliederprimel (*Primula malacoides* Franchet). *Der Züchter* **28**, 353–359 (1958). — 18. STRAUB, J.: Die Auslösung von polyploiden *Pisum sativum*. *Berichte der Dtsch. Botan. Ges.* **58**, 430–436 (1940). — 19. STRAUB, J.:

Wege zur Polyploidie. Berlin: Verlag Gebr. Borntraeger 1950. — 20. TROLL, H. J., G. JAGODA und A. KUNZE: Polyploide *Lupinus luteus*. *Der Züchter* **33**, 184–190 (1963). — 21. TUSCHNIAKOWA, M.: Über die Chromosomen einiger *Lupinus*-Arten. *Der Züchter* **7**, 169–174 (1935). — 22. WEICHEL, G.: Polyploidie, veranlaßt durch chemische Mittel, insbesondere Colchicineinwirkung bei Leguminosen. *Der Züchter* **12**, 25–32 (1940). — 23. WERNER, G.: Untersuchungen über die Möglichkeit der Erzeugung polyploider Kulturpflanzen durch Colchicinbehandlung. *Der Züchter* **11**, 57–71 (1939). — 24. WERNER, G.: Zytologische Untersuchungen über die Wirkung des Colchicins bei zwei verschieden reagierenden Pflanzen, Lein und Erbse. *Biol. Zentralblatt* **60**, 86–103 (1940). — 25. WINGE, Ö.: Contributions to the knowledge of chromosome numbers in plants. *La Cellule* **35** (1925). — 26. ZACHOW, F.: Ergebnisse der Bestäubung mit Pollengemischen bei *Lupinus angustifolius* und *Lupinus luteus*. *Der Züchter* **28**, 241–252 (1958).

Über die „Schalen- und Fleischfestigkeit“ von Kartoffelknollen

G. MEINL und B. EFFMERT

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

On „firmness of skin and flesh“ of potato tubers

Summary. Skin firmness of tubers of the varieties 'Schwalbe' and 'Ora' was determined during growth and storage. Samples were measured once during growth, again after 2 to 5 days of storage at room temperature and once more after 3 days storage at 2 to 3 °C. Skin firmness reaches its maximum during tuber formation; at normal harvesting time it becomes minimal.

Skin firmness of the 'Schwalbe' variety could be increased in direct proportion to the amounts of nitrogen added. Different doses of P and K supplements, or a water supply to 50, 70 and 100% capacity had no effect on the firmness of the skin.

Measurements on the firmness of flesh showed some significant differences between varieties. The tissue near the end of the navel is as a rule firmer than that in the other parts of the tubers, the center being least firmness. Different doses of water supply and N, P and K effected no differences.

A correlation coefficient of 0,8 indicates a close relationship between skin and flesh firmness; but no correlation was found between the firmness of skin and flesh and injury to the tuber during harvesting.

Measurements of the internal pressure on skin and flesh can therefore not be used as a means of selecting for high resistance to injury during the harvesting process.

1. Einführung

Die fortschreitende Mechanisierung der Ernte- und Aufbereitungsverfahren hat bei der Kartoffel zu einer merklichen Zunahme der Beschädigungen geführt. Eine Einschränkung solcher Qualitätsminderungen ist sowohl über eine Veränderung der Maschinen- und Geräteteile als auch auf züchterischem Wege über eine Selektion auf „beschädigungsunempfindlichere“ Formen versucht worden. Während die erstgenannten Bemühungen in großem Umfang seit etwa zehn Jahren betrieben werden (s. HESEN, 1960a, b; ULRICH, 1962, dort auch weitere Literatur), gibt es nur wenige Studien, die sich mit der biologischen Seite dieses Problems, nämlich der Schalen- und Fleischfestigkeit der Kartoffelknolle, beschäftigen, obwohl wir über die Kork- und Wunderperidermbildungsvorgänge bereits recht gut informiert sind (s. u. a. BRAUN,

1951; DANERT, 1961; ROSENSTOCK, 1963; LANGE und ROSENSTOCK, 1963, 1965).

Ein Großteil der Schwierigkeiten bei der Ermittlung der Widerstandsfähigkeit der Knolle gegen Beschädigungen liegt unserer Meinung nach darin begründet, daß sich der Komplex der Widerstandsfähigkeit aus 3 Faktoren, nämlich einmal dem reinen Schalenwiderstand, der eigentlichen Schalenfestigkeit, 2. dem der Fleischfestigkeit und 3. dem der Fleischelastizität zusammensetzt. Die 3 Faktoren voneinander zu trennen ist experimentell nicht einfach. Eine weitere Schwierigkeit liegt darin, den Beschädigungsvorgang des jeweiligen Aggregates exakt zu simulieren und mit einer registrierenden Meßapparatur möglichst objektiv zu erfassen. Aber selbst wenn dies möglich wäre, so dürfte die Durchführung von Massentesten für züchterische Zwecke, die zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse liefern, sehr zeitaufwendig und kompliziert sein. Einen Hinweis in dieser Richtung geben die Untersuchungen von LÖÖW (1960), die jedoch im Rahmen der Kartoffelzüchtung weniger von Bedeutung sind.

Umfassende Berichte über das Problem der Schalenfestigkeitsbestimmung bei Kartoffeln haben LAMPE (1959a, b; 1960) und ULRICH (1962) gegeben. In ihren Mitteilungen werden neben eigenen Untersuchungsergebnissen besonders apparative und meßmethodische Probleme behandelt.

Bei der Ermittlung der Belastbarkeitsgrenze von Knollen wurden in der Regel folgende Apparaturen benutzt:

1. Fallapparate mit anschließender Feststellung der Verletzung (VOLBRACHT, 1952).

2. Festigkeitsprüfer nach WITZ (1954), die in verschiedenster Form — für unterschiedliche Zwecke abgewandelt — weiter verbessert wurden und auf deren Grundlagen auch die von LAMPE und ULRICH verwendeten Geräte basieren.

Beim Lampeschen Gerät wird ein Stift von 3 mm Durchmesser durch das Gewicht einer motorgetriebenen Laufgewichtswaage belastet. In dem Augen-