

# DER ZÜCHTER

34. BAND

1964

HEFT 4

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

## Methodische Untersuchungen zur Ploidiebestimmung an Ruhekernen\*

### I. *Trifolium pratense* und *Trifolium hybridum*

Von ALOIS REITBERGER

Mit 7 Textabbildungen

#### I. Einleitung

Die Züchtung von künstlich polyploid gemachten Kulturpflanzensorten gewinnt ständig an Bedeutung. Damit wird die Aufgabe gestellt, zur Ploidiebestimmung für jede Species ein möglichst brauchbares Verfahren auszuarbeiten. Dieses sollte sicher, leicht, rasch und billig sein. Dabei sollte eine Ploidiebestimmung für jedes Entwicklungsstadium und bei jeder Pflanze einer Probe ausführbar sein, gegebenenfalls ohne stärkere Schädigung der Pflanzen.

Die Auszählung der Chromosomen in den Mitosen und Meiosen ist zwar die sicherste Methode der Ploidiebestimmung, doch ist sie bekanntlich mit Schwierigkeiten verbunden; so ist es im allgemeinen nicht leicht, auszählbare Teilungsstadien aufzufinden. Wir haben deshalb verschiedene Arten von Kulturpflanzen auf die Möglichkeit hin untersucht, die Ploidiestufe an nicht in Teilung befindlichen Zellkernen, den Ruhekernen, zu erkennen. Dafür kommen in diesen heteropyknotischen Körpern, die Chromozentren, in Betracht, nicht selten auch die Nucleolen. Bei Cruciferen hängt die Chromozentrenanzahl in bestimmter Weise von der Genomanzahl ab (REITBERGER 1949). Bei *Beta vulgaris* ist die Feststellung der Anzahl der Trabantenchromozentren ein geeigneter Weg zur Bestimmung der Ploidiestufe ( $2x$ ,  $3x$  oder  $4x$ , REITBERGER 1956). Für jede Species muß das tauglichste Verfahren ausgearbeitet werden; dabei sind die verschiedenen Gewebe und Organe einer Pflanze für die Ploidiebestimmung verschieden geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Methoden der Ploidiebestimmung berichtet, die für *Trifolium pratense* (Rotklee) und *Tr. hybridum* (Schwedenklee) ausgearbeitet und für zweckmäßig befunden wurden. In weiteren Veröffentlichungen soll über entsprechende methodische Untersuchungen bei verschiedenen Cruciferen und Gramineen berichtet werden.

### II. *Trifolium pratense*

Beim Rotklee besteht unser Verfahren der Ploidiebestimmung darin, daß bei geeigneten Organen und Geweben die in den Ruhekernen vorkommende Höchstzahl der nucleolusassoziierten Chromozentren, von uns T-Chromozentren (= T) genannt, festgestellt wird. Sie stimmt mit der Ploidiestufe der betreffenden Einzelpflanze überein. Die T-Chromozentren sind heteropyknotische Körper, die auf bestimmte heterochromatische Abschnitte der nucleo-

lusbildenden Chromosomen zurückgehen; beim Rotklee (und Schwedenklee) ist in jedem haploiden oder  $1x$ -Chromosomensatz ein solches Chromosom zugegen ( $2n = 2x = 14$  nach DARLINGTON u. WYLIE 1955. Vgl. die  $4x$ -Metaphase der Abb. 1).

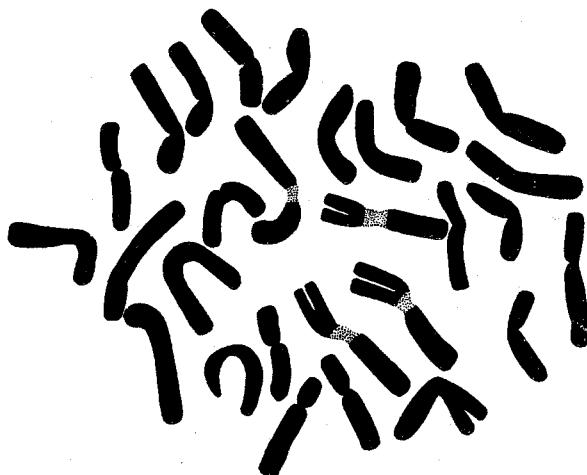


Abb. 1. *Tr. pratense*. Metaphase aus einer Wurzelspitze einer Tetraploiden. AE, KE; 6000fach.

Als Untersuchungsmaterial dienten eine diploide und drei tetraploide Sorten. Bei der Ermittlung der angegebenen Prozentzahlen wurden nur zufallsgemäß herausgegriffene Ruhekerne analysiert. Gleichlaufend mit T-Chromozentrenzählungen wurden Chromosomenzählungen an Wurzel- und Sproßvegetationspunkten von 37 Diploiden und 204 Polyploidien ausgeführt.

Bei der Ploidiebestimmung liegen zwei Aufgaben vor: 1. die Ploidiebestimmung beim Saatgut, wobei es nicht darauf ankommt, die Pflanzen am Leben zu erhalten; 2. die Feststellung der Ploidie bei in verschiedenen Entwicklungsstadien befindlichen Einzelpflanzen, die zur Weiterzucht verwendet werden sollen.

#### A. Ploidiebestimmung beim Saatgut

Hierfür eignen sich nach unseren Befunden besonders gut die Ruhekerne der Wurzelhaube (Kalyptra) der Hauptwurzel von Keimlingen, die in Glasschalen herangezogen werden; daneben sind noch andere Gewebe solcher Keimpflanzen brauchbar, wenn auch weniger gut.

#### 1. Kulturmethode

Bei der Anzucht der Keimlinge in der Glasschale sollen bis zur Fixierung optimale Keimungsbedingun-

\* Herrn Professor Dr. HANS BAUER zur Vollendung seines 60. Lebensjahres gewidmet.

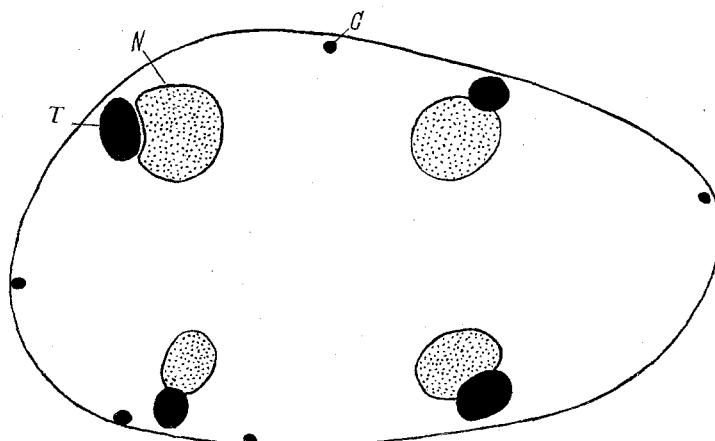


Abb. 2

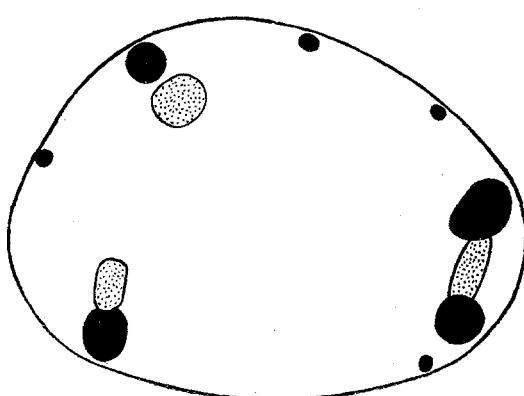


Abb. 3

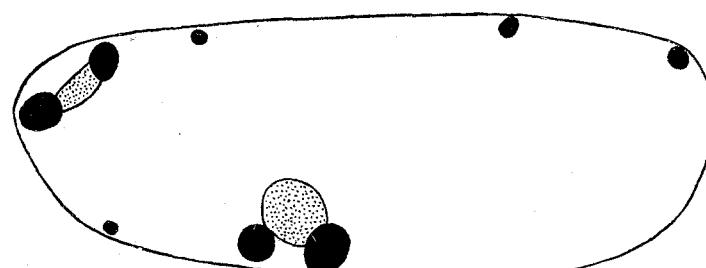


Abb. 4

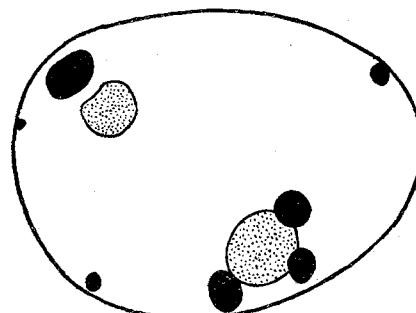


Abb. 5

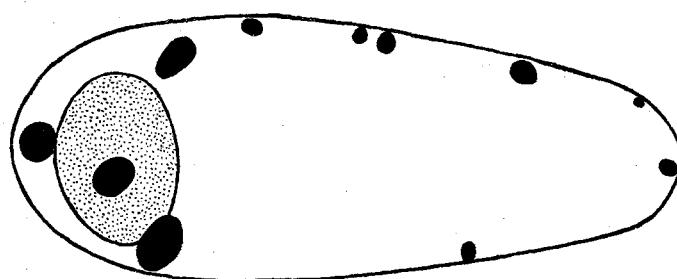


Abb. 6

Abb. 2--6. *Tr. pratense*. Ruhekerne aus einer Wurzelhaube einer Tetraploidie mit je 4 T-Chromozentren und 4 bis 1 Nucleolen.  
T T-Chromozentrum, N Nucleolus, C Chromatinpartikel.  
Alkohol-Formol, KE; 6000fach.

gen gegeben sein, damit etwaige Selektionswirkungen zugunsten bestimmter Ploidiestufen möglichst ausgeschaltet werden. Dieser Forderung wird nach unseren Versuchen folgendes Anzuchtverfahren gerecht, das zudem auch in mikrotechnischer Hinsicht vorteilhaft ist: Man hält die Glasschale, in der die Samenkörner auf feuchtes, sehr glattes Filtrierpapier gelegt worden sind, (im Dunkeln) in einer Wechseltemperatur ( $30^{\circ}\text{C}$  6 h, ungefähr  $20^{\circ}$  18 h) oder dauernd in Zimmertemperatur; in beiden Fällen sind Keimungsprozentsätze, Wachstumsgeschwindigkeit usw. ungefähr die gleichen. Nach etwa 48 h erreicht die Hauptwurzel die für die karyologische Untersuchung der Wurzelhaube wohl günstigste Länge von 8 mm, worauf fixiert wird. Diese Länge erreicht man bei einer Dauertemperatur von  $30^{\circ}$  schon einige Stunden früher; bei (über 2 Jahre) altem Saatgut jedoch sind die beiden erstgenannten Temperaturen besser.

## 2. Mikroskopische Technik

Um eine Mikrotechnik zu finden, die eine sichere, leichte und gute Darstellung vor allem der T-Chromozentren der Wurzelhaube gewährleistet, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Neben anderm ist eine kontrastreiche Färbung der T sowie eine Mazeration erforderlich, die weder zu schwach noch zu

stark ist. Am meisten zu empfehlen dürfte folgendes Verfahren sein: Ganze Keimlinge werden 2 h oder länger mit Alkohol-Eisessig (= AE) 3 : 1 fixiert; darin kann man sie bei Zimmertemperatur auch (jahrelang) aufbewahren. Gefärbt werden sie mit Karminessigsäure (= KE), und zwar in einem Glasgefäß bei  $80^{\circ}\text{C}$  1 oder mehr h. Hierauf bringt man sie in Zimmertemperatur. Dann werden die Wurzelspitzen auf dem Objektträger in KE abgeschnitten, mit dem Deckglas bedeckt und gequetscht, wobei man vorher gar nicht oder nur mäßig klopft. Keimlinge, die nach etwa 8 h noch nicht zu Präparaten verarbeitet werden konnten, überführt man aus der KE in eine Mischung aus 1 Teil KE und 3 Teilen 45%iger Essigsäure, worin sie verschlossen bei Zimmertemperatur mehrere Monate ohne Beeinträchtigung der Färbung und Mazeration aufbewahrt werden können. Mikroskopiert wird zunächst mit einem schwachen Objektiv (etwa 3,5mal), hierauf mit einer Ölimmersion (100mal). Die KE kann mehrmals verwendet werden.

Wenn man statt der KE Orcein verwendet, erreicht man eine brauchbare Färbung und Mazeration auch ohne Erhitzung. Bekannt ist die Orcein-Färbung nach „Fixierung“ mit Salzsäure-Alkohol. Bessere Präparate jedoch, die fast so gut wie die schönsten KE-Präparate sind, liefert das folgende, auch in anderer Hinsicht vorteilhaftere Verfahren, das von SHARMA u. SHARMA (1958) angegeben und von uns abgeändert wurde: Man fixiert

die Keimlinge 2 h oder (wohl besser) länger mit AE (3:1); dann überführt man sie in eine gleichzeitig färbende und mazerierende Mischung, die aus 1 Teil  $\frac{1}{1}$  n Salzsäure und 19 Teilen einer 1%igen Lösung von Orcein (Gurr, London) in 45%iger Essigsäure besteht. Etwa 10 min später kann man mit der Herstellung der Präparate beginnen, wobei die Wurzelspitzen auf dem Objektträger, bevor man das Deckglas auflegt, in Tropfen der genannten Mischung oder in Tropfen einer 1%igen Lösung von Orcein in 45%iger Essigsäure gelegt werden. Die Keimlinge kann man in der Mischung (1:19) wochenlang aufbewahren.

Mittels der angegebenen Methoden der KE- und Orcein-Färbung werden neben den T-Chromozentren auch die Chromosomen genügend gefärbt. Wenn man bei einem Präparat nach der T-Auszählung stark klopft und dann quetscht, ist also grundsätzlich auch noch eine Zählung der Chromosomen möglich. Diese braucht man vor der Fixierung nicht durch Kälte oder Chemikalien zu verkürzen.

Statt der Deckgläser können Polyvinylchlorid-Folien verwendet werden, wie sie BUTTERFASS (1961) vorgeschlagen hat. Sie sind beträchtlich billiger und auch in anderer Hinsicht vorteilhafter. Für Massenuntersuchungen kann man sich zweckmäßigsterweise 18 mm breite und 60 mm lange Folien zurechtschneiden, unter denen 8 aneinander gereihte Wurzelspitzen Platz haben.

### 3. Karyologische Befunde

Der vordere zentrale Teil der Wurzelhaube besteht aus Zellen, die zahlreiche Stärkekörper enthalten. Die übrigen Wurzelhaubenzellen besitzen nur wenige oder keine. Ihre Länge (und damit ihr Alter) nimmt von der Spitze der Wurzel nach hinten sowie von innen nach außen zu. Für die Ploidiebestimmung eignen sich von ihnen die kurzen Zellen besser als die langen, weil sie öfter als diese die Höchstzahl der T-Chromozentren aufweisen; außerdem sind gelegentlich lange Zellen schon abgestorben. Die kurzen Zellen sind ferner auch den erwähnten Zellen mit den vielen Stärkekörpern vorzuziehen, weil diese die Sicht auf die T-Chromozentren beeinträchtigen können. Damit die Wurzelhaubenzellen leicht aufzufinden sind, sollen ihre Lagebeziehungen zueinander und zu den übrigen Teilen der Wurzelspitze erhalten bleiben, weshalb man nicht oder nur mäßig klopft.

Wie die Abb. 2–6 veranschaulichen, sind in den Ruhekernen der Wurzelhaube Nucleolen (N) zu beobachten, ferner T-Chromozentren (T) und schließlich kleine, hier nur wenig interessierende Chromatinpartikeln (C) wechselnder Größe und Anzahl. Was die Nucleolen anlangt, so sind bei den di-, tri- und tetraploiden Keimlingen 1 bis 2 bzw. 1 bis 3 und 1 bis 4 (Abb. 2–6) vorhanden. Ihre Höchstzahl stimmt also mit der Ploidiestufe der betreffenden Pflanze überein, und sie können somit grundsätzlich zur Ploidiebestimmung dienen (von Aneuploidien sei hier abgesehen). Dieses Verfahren ist aber für die Praxis nur wenig brauchbar, u. a. weil jene Höchstzahl in zu wenigen Kernen auftritt. Während es keinen Nucleolus gibt, dem nicht wenigstens 1 T-Chromozentrum aufsitzt, kommen T-Chromozentren vor, die nicht mit einem Nucleolus verbunden sind; das kommt dadurch zustande, daß Nucleolen immer kleiner werden können, bis sie schließlich verschwinden (was wir auch im Sproß beobachtet haben). Die Wurzelhaubenzellen können völlig nucleolenlos werden; die Anzahl solcher Zellen nimmt dabei mit steigendem Zellalter zu. Die Nucleolen stören niemals bei der Auszählung der T-Chromozentren, auch dann nicht, wenn solche von ihnen überdeckt werden; denn die Nucleolen färben sich mit der oben angegebenen Mikrotech-

nik normalerweise nur schwach oder überhaupt nicht an (Abb. 7). Will man sie mit KE dagegen intensiv färben, so fixiert man vorher zweckmäßig mit Alkohol-Formol 2 : 1 (Abb. 2–6).

Die oben erwähnten Chromatinpartikeln der Wurzelhaubenkerne haben im gleichen Kern verschiedene Größe; die kleinsten von ihnen liegen an der Sichtbarkeitsgrenze. Die größten sind meist erheblich kleiner als die T-Chromozentren und so von diesen ohne weiteres unterscheidbar; nur in wenigen Kernen der Wurzelhaube (häufig dagegen in gewissen anderen Geweben) erreichen oder übersteigen sie die Größe von T-Chromozentren. Wenn sie dann von diesen auch nur schwer (sie haben häufig etwas unschärfere Umrisse als die T) oder gar nicht zu unterscheiden sind, täuschen sie trotzdem fast bei keinem

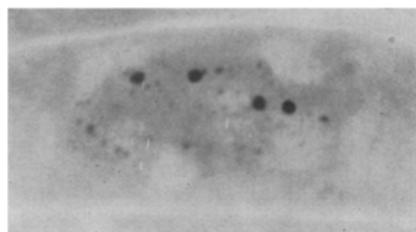


Abb. 7. *Tr. pratense*. Ruhekerne aus einer Wurzelhaube einer Tetraploidie mit 4 T-Chromozentren. AE, KE, 1500fach.

solchen Kern eine zu hohe T-Anzahl vor; denn in beinahe allen solchen Kernen sind zwischen den kleinsten Chromatinpartikeln und den T-Chromozentren gleitende Größenübergänge vorhanden, die von vornherein eine T-Auszählung unmöglich machen. Jeden Kern, der nicht auf den ersten Blick auszählbar ist, übergeht man einfach. Es finden sich ja immer noch genügend andere Kerne vor; beispielsweise sind im Blickfeld des Ortholux-Mikroskopes mit Objektiv 100mal und Okular 6mal (Leitz) durchschnittlich etwa ein Dutzend Wurzelhaubenkerne zu sehen.

Die T-Chromozentren der Wurzelhaubenzellen fallen, wie die Abb. 7 wohl erkennen läßt, sofort in die Augen, haben scharfe Umrisse, sind stark färbbar und groß (größer als in den Blattepidermiszellen von *Beta vulgaris*, REITBERGER 1956). Sie sind leichtzählbar, auch dann, wenn sie in einem Kern in verschiedenen optischen Ebenen liegen, was sich durch entsprechendes Quetschen weitgehend vermeiden läßt. In den di-, tri- und tetraploiden Wurzelhaubenzellen zählt man 1 bis 2 bzw. 1 bis 3 und 1 bis 4 T-Chromozentren. Kerne ohne jedes T kommen lediglich in den oben erwähnten abgestorbenen oder im Absterben begriffenen langen Wurzelhaubenzellen vor. Auf Grund der wechselnden Anzahl der T-Chromozentren und der Nucleolen ergeben sich bei jeder Ploidiestufe verschiedene Kerntypen (vgl. Abb. 2–6). Auf Gesetzmäßigkeiten in der Variabilität der T-Anzahl innerhalb einer Ploidiestufe und auf ihre Ursachen braucht nicht weiter eingegangen zu werden.

Trotz dieser Variabilität ist bei der Wurzelhaube ein sicheres Ergebnis bezüglich der Ploidiestufe gewährleistet. Denn erstens stimmt die T-Höchstzahl einer Wurzelhaube (nicht aber sämtlicher Organe und Gewebe) bei euploiden Pflanzen mit der Ploidiestufe der betreffenden Einzelpflanze in jedem Falle überein (also bei jeder Wurzel einer Pflanze, bei jeder Pflanze einer Ploidiestufe und bei jeder vorkommenden Ploidie).

Tabelle 1. T-Chromozentrenanzahlen bei *Trifolium pratense*.

Organ	$2n =$	Anzahl der Organe		Kerne in % mit						Mittlere T-Anzahl	Stichproben <sup>+</sup>
		Kerne		1 T	2 T	3 T	4 T	5 T	6 T		
Wurzelhaube	$2x$	8	2300	21	79	0	0	0	0	1,79	93
	(3x)	1	360	3	30	65	0,8	0	0	2,65	—
	4x	14	3760	4	19	40	36	0,53	0	3,10	1079
	(5x)	1	200	2	15	33	40	11	0	3,42	—
Keimstengel	$2x$	45	3857	12	87	0,29	0	0	0	1,88	65
	(3x)	1	100	10	49	41	0	0	0	2,31	—
	4x	98	4351	1	23	44	32	0,11	0	3,07	355
	(5x)	1	300	1	12	27	38	21	0,7	3,68	—
Keimblattstiell	$2x$	16	3720	21	79	0,13	0	0	0	1,79	8
	(3x)	1	300	6	55	39	0	0	0	2,33	—
	4x	11	2550	3	42	42	13	0	0	2,66	13
Fiederblattstiellchen	$2x$	1	740	59	41	0	0	0	0	1,41	9
	4x	2	600	5	31	49	17	0	0	2,77	8
Kelchblatt	$2x$	1	400	39	61	0	0	0	0	1,61	9 <sup>++</sup>
	4x	1	180	11	27	42	21	0	0	2,72	9 <sup>++</sup>

<sup>+</sup> Anzahl der Organe, von denen nur wenige, statistisch nicht auswertbare Kerne analysiert wurden.  
<sup>++</sup> Einzelblüten.

diestufe), und zweitens tritt sie bei den kurzen Zellen sämtlicher Wurzelhauben (nicht aber bei jedem Organ und jedem Gewebe überhaupt) in einer genügend großen Anzahl von Kernen auf (79% und 36% bei den Di- bzw. Tetraploiden; Tab. 1). Die beiden Aussagen beruhen auf der Untersuchung von Pflanzen und Kernen in einer Anzahl, die für unsere Zwecke in jedem Falle ausreicht, teilweise sogar aber höher als notwendig ist. Letzteres ist darauf zurückzuführen, daß hier (und bei anderen Organen) auch Zahlenmaterial mitverwertet wurde, das anfiel aus mikrotechnischen Versuchen, aus praktischen Ploidiebestimmungen bei mehreren Saatgutposten und aus Untersuchungen über die Abhängigkeit der mittleren T-Anzahl von verschiedenen Faktoren.

In der Tab. 1 wurden jeweils sämtliche analysierten Wurzelhaubkerne zusammengefaßt, obwohl die Häufigkeit der T-Höchstzahl und die mittlere T-Anzahl der Kerne von der Art und dem Alter der Zellen abhängt. Bei der (3x)-Pflanze und bei den 4x-Pflanzen weisen 0,8% bzw. 0,53% der Kerne eine T-Anzahl auf, die um 1 höher als die Genomanzahl ist. Diese Kerne dürfen als seltene Anomalien bei der praktischen Ploidiebestimmung vernachlässigt werden. Die Überzähligkeit könnte durch Nichttrennen oder dadurch entstehen, daß ein Chromatinpartikel (S. 131) ausnahmsweise die Größe und Form eines T-Chromozentrums annimmt. Die Ausdrücke 3x und 5x sind eingeklammert, was besagen will, daß es sich dabei nicht um eine Tri- bzw. Pentaploide handelt, sondern um zwei Aneutetraploide (vgl. S. 133) mit 3 bzw. 5 Nucleolenchromosomen; wahrscheinlich gleichen sie hinsichtlich ihrer T-Anzahlen Tri- bzw. Pentaploiden.

Nachteile einer Ploidiebestimmung mittels Chromosomenauszählung in den Wurzelspitzen bestehen darin, daß in diesen keine, wenig oder lediglich nicht-auszählbare Kernteilungen vorhanden sein können und daß das Aufsuchen brauchbarer Mitosen sowie die Chromosomenauszählung beträchtliche Zeit und Mühe kostet. Das Auszählen der T-Chromozentren der Wurzelhaube dagegen ist leicht, ein Suchen entfällt hier fast ganz und jede Wurzelhaube liefert ein Ergebnis. Ein solches beansprucht bei rationeller Arbeitsweise 1 bis  $1\frac{1}{2}$  min, die Präparatherstellung mit eingerechnet.

Außer den Wurzelhaubenzellen eignen sich, wenngleich nicht ganz so gut wie diese, auch die Epidermiszellen des Keimstengels (Hypokotyls) von Keimlingen, die in Glasschalen auf Filterpapier im Dunkeln oder in Erde im Gewächshaus aufgezogen werden; neben den Epidermiszellen sind auch subepidermale Zellen verwendbar, obwohl bei diesen die Häufigkeit der T-Höchstzahl und die mittlere T-Anzahl kleiner als bei jenen ist. Unsere routinemäßigen

Ploidiebestimmungen wurden anfangs ausschließlich am Keimstengel von in Erde gewachsenen Keimpflanzen durchgeführt (vor der Färbung muß dieser Keimstengel einen Längsschnitt erhalten). Die Häufigkeiten der T-Anzahlen der Keimstengelepidermis sind in der Tab. 1 eingetragen. Wie man sieht, unterscheiden sie sich nicht wesentlich von denen der Wurzelhaubenzellen.

Die Häufigkeit der T-Höchstzahl und die mittlere T-Anzahl im Keimstengel ist bei den Glasschalen-Pflanzen größer als bei den Erdkulturen-Pflanzen gleicher Ploidiestufe, ferner nimmt die mittlere T-Anzahl von der Spitze des Keimstengels zur Basis desselben in einer Anzahl von Pflanzen ab (sonst bleibt sie gleich). Weil aber diese Unterschiede nicht bedeutend sind, wurden in der Tab. 1 jeweils sämtliche analysierten Epidermiszelle des Keimstengels zusammengefaßt. Die (3x)-Pflanze und die (5x)-Pflanze ist mit der des obersten Teiles der Tabelle identisch. Die Prozentzahlen 0,29, ferner 0,11 und 0,7 sind, nach den entsprechenden Ausführungen bei den Wurzelhauben, wieder als Anomalien zu vernachlässigen.

## B. Ploidiebestimmung bei zur Weiterzucht bestimmten Pflanzen

### 1. Keimlinge

Auch wenn die Keimlinge weiterkultiviert werden sollen, kann das oben beschriebene Verfahren der Bestimmung der T-Höchstzahl in der Wurzelhaube angewandt werden; doch ist es mit leicht einzuschätzenden Nachteilen verbunden. Viel vorteilhafter ist es, die T-Höchstzahl in der Epidermis der Ober- oder Unterseite des Keimblattstiels festzustellen. Sie stimmt auch hier mit der Ploidie der betreffenden Pflanze überein und kommt bei jedem Keimblattstiell genügend häufig vor (Tab. 1). Die subepidermalen Zellen sind ebenfalls geeignet, wenngleich ihre mittlere T-Anzahl geringer ist. Brauchbar ist der Keimblattstiell vom Aufgang der Pflanze an bis ungefähr zu dem Zeitpunkt, wo ein ausgewachsenes zweites Folgeblatt entstanden ist. Später nimmt die mittlere T-Anzahl im Keimblattstiell zu stark ab, und es sind dann in den Epidermiszellen Absterbeerscheinungen wahrzunehmen. Es wurde nicht bemerkt, daß das

Abschneiden eines Keimblattes der Pflanze irgendwie schadet. Fixiert werden die Keimblattstiele mit AE (3 : 1) und gefärbt mit heißer KE (Kochen auf Objektträger oder Färbung bei 80 °C). Einer Färbung mit Salzsäure-Orcein (S. 130) ist zu widerraten, weil nach einer solchen die Chloroplasten zu sehr stören. Wenn man den Keimblattstiel vor der Färbung mit KE in seiner Längsrichtung (etwa mit einem Starmesser) anschneidet, färben sich die T-Chromozentren besser an als ohne Verletzung (das gilt im folgenden auch für alle anderen Stiele).

Die Epidermiszellen des Stiels des Primärblattes sowie des ersten und zweiten Folgeblattes sind zur Ploidiebestimmung nicht zu empfehlen, weil hier die Chromatinpartikeln zu oft und zu stark stören.

## 2. Ausgewachsene Pflanzen

Auch bei ausgewachsenen Pflanzen kann die Ploidie mittels der T-Chromozentrenmethode festgestellt werden. Geeignet dafür sind u. a. die Stielchen der Fiederblätter (Kleinblätter) des dreiteiligen Kleeblattes. Auch die Kelchblätter sind brauchbar, so daß sich also unmittelbar vor der Bestäubung die Ploidie der zur Kreuzung zu verwendenden Blütenköpfchen prüfen läßt, was besonders bei frisch tetraploidisierten Pflanzen wünschenswert sein kann.

Bei den Fiederblattstielchen werden die epidermalen (und subepidermalen) Zellen der Ober- oder Unterseite analysiert. Das Stielchen war bei unserem Material etwa 1,5 mm und die Spreite 10—15 mm lang; in älteren Blättern kommen zu wenig Kerne mit 3 und 4 T vor. — Bei den Kelchblättern wird die subepidermale Zellschicht desjenigen Abschnittes der Innenseite des Kelchblattes analysiert, der unmittelbar unter der Basis der Kelchblattzipfel liegt. In einer wechselnden Entfernung von dieser Basis enthalten die subepidermalen Zellen je einen Kristall, der gegen den Blütengrund an Größe zunimmt und die T-Auszählung immer stärker behindert. Die Kerne der subepidermalen Zellen besitzen ziemlich viel Chromatinpartikeln, die eine T-Auszählung zwar erschweren, aber nicht zu einer falschen Ploidiebestimmung führen. Die subepidermalen Zellen stehen nicht selten in Teilung. Am brauchbarsten für eine T-Auszählung sind wohl die Kelchblätter von Blüten, die noch nicht ganz geöffnet sind.

Am Grunde der Einzelblüten kommen Zellen vor, deren Kerne besonders große T-Chromozentren sowie nur wenige und kleine Chromatinpartikeln aufweisen. Sie sind deshalb für eine T-Auszählung günstiger als die oben beschriebenen Kelchblattzellen. Allerdings sind sie weniger leicht präparierbar und auffindbar als diese. Man kann sie des öfteren am Unterende von Kelchblättern sehen, die man von der Blüte abgerissen hat; sie kommen auch zum Vorschein, wenn man den ganzen unteren (in heißer KE gefärbten) Teil einer Einzelblüte stark klopft und quetscht. Von ihren Kernen besitzen bei den Diploiden 35% 1 T und 65% 2 T ( $n = 300$ ), bei den Tetraploiden 1% 1 T, 15% 2 T, 46% 3 T und 40% 4 T ( $n = 200$ ).

## C. Triploide und Aneutetraploide

Unter den Pflanzen aus tetraploidem Saatgut fanden sich 4 (d. i. ungefähr 0,5%) Triploide; bei jeder von diesen wurden bis 3 T-Chromozentren und ungefähr 21 Chromosomen gezählt. Nach G. JULÉN (1959; dort Literatur) läßt sich tetraploider Rotklee nicht mit diploidem kreuzen.

Daneben gingen aus unseren tetraploiden Samen 2% ( $n = 1053$ ) Pflanzen hervor, deren T-Höchstzahl ebenfalls 3 war, deren Chromosomenanzahl aber ungefähr 28 betrug; es handelte sich also um Aneutetraploide, denen eines der 4 Nucleolenchromosomen der Eutetraploiden fehlte. Auch Aneutetraploide, die bis 5 T-Chromozentren (und bis 5 Nucleolen!) aufwiesen, gingen aus dem tetraploiden Saatgut hervor, und zwar insgesamt 3%; bei 3 von ihnen betrug die Chromosomenanzahl mindestens und wohl auch höchstens 29, bei den übrigen ungefähr 28. Pentaploide wurden noch nicht beobachtet. Eine Neigung bestimmter Gewebe oder Organe, aneutetraploid zu werden, während die übrigen eutetraploid bleiben, besteht beim Rotklee nicht: 11 Aneutetraploide, bei denen gleichzeitig je 2, 3 oder 4 verschiedene Gewebe oder Organe (Wurzelhaube, Wurzelhaare, Wurzelrinde, Epidermis des Keimstengels und der Keimblattspreite, Leitbündel) geprüft wurden, zeigten überall die gleiche T-Höchstzahl. — Unter unseren insgesamt 243 untersuchten Diploiden befand sich bloß eine Aneuploide; sie wies 3 T und einwandfrei 15 Chromosomen auf, war also trisom hinsichtlich des Nucleolenchromosoms.

Es ist anzunehmen, daß, ebenso wie das Nucleolenchromosom, auch jedes der übrigen 6 Chromosomen des haploiden Chromosomensatzes bei den Tetraploiden gelegentlich 3- oder 5mal vorhanden sein kann, und zwar in einer bestimmten, ziemlich wahrscheinlich sogar in ähnlicher Häufigkeit wie das Nucleolenchromosom. Demnach wäre bei einem Saatgutposten mit insgesamt 7mal so viel Aneutetraploiden zu rechnen, wie durch das Vorhandensein von 3 oder 5 Nucleolenchromosomen nachgewiesen werden kann. Aus unserem tetraploiden Saatgut wären also nicht weniger als  $7 \cdot (2\% + 3\%) = 35\%$  Aneutetraploide hervorgegangen. Die Aneutetraploiden entstehen sehr wahrscheinlich aus aneudiploiden Gameten. Diese wiederum sind auf Störungen in der Meiose zurückzuführen, die bekanntlich besonders häufig und stark in neu hergestellten Autotetraploiden auftreten.

So leicht man mittels der T-Methode die Anwesenheit von Aneutetraploiden feststellen kann — Tri- und Pentaploide sowie Hyperdiploide mit 3 Nucleolenchromosomen seien hier wegen ihrer Seltenheit vernachlässigt —, so schwierig ist dies durch Chromosomenauszählung. Denn hierzu wäre ja die genaue Feststellung der Chromosomenanzahlen unerlässlich, was besonders mühsam, zeitraubend und bei Routineuntersuchungen kaum durchführbar ist.

## III. *Trifolium hybridum*

Die Chromosomenzahl des diploiden Schwedenklee ist  $2n = 2x = 16$  (DARLINGTON u. WYLIE 1955). Die von uns untersuchten Pflanzen stammten aus 2 diploiden und 3 tetraploiden Sorten. Hand in Hand mit den T-Auszählungen wurde bei 43 Diploiden und 97 Tetraploiden die Chromosomenanzahl bestimmt. Das Kulturverfahren und die mikroskopische Technik sind hier die gleichen wie beim Rotklee.

Auch beim Schwedenklee läßt sich die Ploidie einer Pflanze mittels der T-Chromozentrenmethode bestimmen. Seine Ruhekerne unterscheiden sich jedoch insofern ziemlich stark von denen des Rotklee, als sie neben den T-Chromozentren im all-

gemeinen zahlreichere und größere Chromatinpartikeln besitzen als die Ruhekerne des Rotklee. Das erschwert die T-Auszählung und bewirkt, daß diese etwas mehr Zeit als beim Rotklee beansprucht; bei einiger Übung ist sie aber ohne größere Schwierigkeiten ausführbar.

#### A. Ploidiebestimmung beim Saatgut

Hierfür eignen sich, ähnlich wie beim Rotklee, die Wurzelhaubenkerne von Keimlingen, die auf Filtrerpapier in Glasschalen angezogen werden. Aus der Tab. 2 ist zu entnehmen, daß auch hier bei

somen treten so selten auf, daß sie hier vernachlässigt werden dürfen.

#### B. Ploidiebestimmung bei zur Weiterzucht bestimmten Pflanzen

Wie beim Rotklee, so läßt sich auch beim Schwedenklee die Ploidie mittels Auszählung der T-Chromozentren in den Epidermisruhekernen des Keimblattstieles feststellen. Bei den Tetraploiden kommen hier freilich nur recht wenig, nämlich 4% Kerne mit 4 T vor; dieser Nachteil wird dadurch ausgeglichen, daß ziemlich viel (29%) Kerne mit 3 T auftreten, was ja nach den obigen Darlegungen praktisch ein Zeichen von Tetraploidie ist.

Auch bei ausgewachsenen Pflanzen ist die T-Methode anwendbar. In Betracht kommen hierfür die Stielchen des Fiederblattes und der Einzelblüte sowie das Kelchblatt (Tab. 2). Bei dem ungefähr 1 mm langen Fiederblattstielchen sieht man sich, wie beim Rotklee, die Epidermiskerne an. Das Fiederblättchen soll noch jung, seine Spreite etwa 10 mm lang sein.

Beim Kelchblatt kommen die epidermalen und subepidermalen Zellen seiner Innenseite in Frage. Die subepidermalen Zellen unterscheiden sich hier von den entsprechenden Zellen beim Rotklee durch das Fehlen von Kristallen sowie durch die Struktur ihrer Ruhekerne. Sie weisen bei den Tetraploiden die T-Höchstzahl nur selten auf (9%; Tab. 2).

Wegen dieser geringen Häufigkeit ist es zweckmäßiger, das (beim Rotklee fehlende) bis einige Millimeter lange Blütenstielchen zu verwenden, und zwar dessen Epidermiskerne, bei denen die tetraploide Höchstzahl häufiger als dort vorkommt (31%; Tab. 2). — Wenn man die gefärbten Blütenstielchen stark klopft, so werden die zahlreichen langen, schmalen, die Gefäße begleitenden Zellen auseinandergezogen und sehr augenfällig. Auffallend sind auch ihre vielen Nucleolen. Diese können zur Ploidiebestimmung dienen; denn auch ihre Höchstzahl stimmt mit der Ploidiestufe der Blüte überein und kommt genügend häufig vor, bei den Diploiden in 38%, bei den Tetraploiden in 17% der langen Zellen (1, 2 und 3 Nucleolen in 1% bzw. 36% und 46% der tetraploiden Zellen).

den Di- und Tetraploiden die T-Höchstzahl gleich der Genomzahl ist und daß sie, wenngleich weniger oft als beim Rotklee, so doch in genügender Häufigkeit vorkommt, nämlich in 66% bzw. 19% der Kerne. Die geringen Prozentsätze (1,0 und 0,2) von Kernen mit einer T-Anzahl, die die Genomzahl um 1 übersteigt, dürfen für unsere Zwecke außer acht gelassen werden (vgl. S. 132). In der Tabelle sind wieder alle drei Formen der Wurzelhaubenzellen zusammengefaßt (vgl. S. 131). Leider gibt es beim Schwedenklee in den Wurzelhauben zahlreiche Kerne, in denen zwischen den T-Chromozentren und den kleinsten Chromatinpartikeln fließende Größenübergänge vorhanden sind, die eine T-Auszählung nicht erlauben (vgl. S. 131).

Besser eignen sich in dieser Beziehung die Epidermiszellen des Keimstengels (also umgekehrt wie beim Rotklee) von jungen Keimlingen. Dabei sind die Keimstengel von Pflanzen aus Glasschalen etwas besser als die von Erdkulturen-Pflanzen; sie sollen bei ersten ungefähr 8 mm lang sein. Damit sich der Keimstengel von Erdkulturen-Pflanzen anfärbt, muß man ihn vor oder nach der Fixierung verletzen, z. B. mit einem Längsschnitt versehen; bei Keimlingen aus Glasschalen ist das nicht nötig. Wie aus Tab. 2 zu entnehmen ist, erscheint die T-Höchstzahl bei den diploiden Keimstengeln im Durchschnitt häufig (81%), bei den tetraploiden dagegen wesentlich seltener (14%). Wenn man die Ploidie beim Saatgut zu bestimmen hat, so kann man sich aber eine Suche nach Kernen mit 4 T überhaupt ersparen. Eine Pflanze ist nämlich schon dann als tetraploid zu bewerten, wenn Kerne mit 3 T in größerer Anzahl zu beobachten sind (etwa 40%; Tab. 2); denn Triplide und Aneutetraploide mit 3 Nucleolenchromo-

Tabelle 2. T-Chromozentrenanzahlen bei *Trifolium hybridum*.

Organ	2n =	Anzahl der Organe		Kerne in % mit					Mittlere T-Anzahl	Stichproben <sup>+</sup>
		Kerne	1 T	2 T	3 T	4 T	5 T			
Wurzelhaube	2n	5	700	33	66	1,0	0	0	1,68	38
	4n	7	490	7	36	37	19	0,2	2,68	107
Keimstengel	2n	35	2040	19	81	0,3	0	0	1,81	79
	4n	38	1697	8	39	39	14	0,5	2,61	282
Keimblattstiel	2n	5	500	41	59	0,2	0	0	1,59	5
	4n	7	600	14	54	29	4	0	2,23	3
Fiederblattstielchen	2n	2	200	38	62	0	0	0	1,62	10
	4n	2	200	4	21	53	22	0	2,93	10
Kelchblatt	2n	3	300	38	62	0,3	0	0	1,62	7 <sup>++</sup>
	4n	5	250	2	37	51	9	0	2,67	5 <sup>++</sup>
Blütenstielchen	2n	2	200	25	75	0	0	0	1,75	8
	4n	2	200	2	20	48	31	0	3,09	8

<sup>+</sup> Anzahl der Organe, von denen nur wenige, statistisch nicht auswertbare Kerne analysiert wurden.

<sup>++</sup> Einzelblüten.

Triplide haben wir beim Schwedenklee bis jetzt noch nicht angetroffen. Aneutetraploide mit 3 oder 5 Nucleolenchromosomen, wie sie beim Rotklee besprochen wurden (S. 133), lassen sich beim Schwedenklee schwieriger als bei jenem auffinden, weil beim Schwedenklee 4 T-Chromozentren in der Wurzelhaube, im Keimstengel und im Keimblattstiel seltener vorkommen (19% bzw. 14% und 4%) als beim Rotklee (36% bzw. 32% und 13%). Am häufigsten erscheint die T-Höchstzahl beim Schwedenklee in der Epidermis des Fiederblattstielchens und Blütenstielchens (22% bzw. 31%) oder in dessen langen Zellen; bei diesen Organen kann man also noch am ehesten jene Aneutetraploiden auffinden. Wir haben Anhaltspunkte dafür, daß aus unserem tetraploiden

Schwedenklee-Saatgut einige solche Aneutetraploide hervorgegangen sind.

#### IV. Schlußbemerkungen

Die Chromosomenzählung ist ein direktes Verfahren zur Ploidiebestimmung. Auch die T-Chromozentrenmethode ist ein solches, weil ja dabei Teile von Chromosomen ausgezählt werden. Statt der T-Chromozentren können zur Ploidiebestimmung bei manchen Organen und Geweben des Rotklees und Schwedenklees die Nucleolen dienen, die mit dem gleichen Chromosom wie die T-Chromozentren in Beziehung stehen. Alle übrigen bisher bekannt gewordenen Verfahren der Ploidiebestimmung beim Klee sind indirekt. Beim Rotklee werden hierbei morphologische Unterschiede zwischen den Di- und Tetraploiden benutzt; es handelt sich dabei um die Samen, Stengel, Blätter, Nebenblätter, Blütenköpfchen und Einzelblüten, schließlich um die Größe der Spaltöffnungen und der Pollenkörner. „Aber es ist nicht immer möglich, nur mit Hilfe morphologischer Merkmale eine einzelne Pflanze als diploid oder tetraploid zu bezeichnen. Die Variationsbreite der genannten Eigenschaften ist nämlich außerordentlich groß, und wenn sich auch typische tetraploide Pflanzen von typischen diploiden unterscheiden lassen, gibt es viele Grenzfälle, in denen eine solche Beurteilung unmöglich ist“ (G. JULÉN 1959, S. 294). Beim Rotklee und Schwedenklee ist nach BUTTERFASS (1959) die Ploidie bestimmbar durch Auszählung der Chloroplasten in den Schließzellen ausgewachsener Primär- und Folgeblätter. Aneutetraploide lassen sich beim Klee mit den angeführten indirekten Verfahren bis jetzt noch nicht feststellen.

#### Zusammenfassung

Bei *Trifolium pratense* ( $2n = 2x = 14$ ) und *hybridum* ( $2n = 2x = 16$ ) ist in jedem haploiden Chromosomensatz ein bestimmtes Chromosom vorhanden, von dem ein bestimmter Abschnitt im ruhenden Zellkern als „T-Chromozentrum“ gut sichtbar sein kann. Die Anzahl dieser T-Chromozentren schwankt innerhalb eines Organs und Ge-

webes einer Pflanze. Bei einer jeweils bestimmten Prozentzahl der Ruhekerne, die aus gewissen, nachfolgend aufgeführten Geweben und Organen stammen, ist die T-Chromozentrenanzahl gleich der Genomanzahl oder Ploidiestufe der betreffenden Einzelpflanze. Höher als die Genomanzahl wird sie bei jenen Organen und Geweben aber nicht. Man kann also durch Feststellung der Höchstzahl der T-Chromozentren die Ploidie einer Pflanze bestimmen. Dieses Verfahren, das im einzelnen eingehend beschrieben wird, ist leichter und schneller als das der Chromosomenauszählung. Geeignet sind folgende leicht zu präparierende Organe und Gewebe: Die Zellen der Kalyptra und die Epidermiszellen des Hypokotyls (beide für die Ploidiebestimmung beim Saatgut), ferner die Epidermiszellen des Stiels des Kotyledo und des Stielchens des Fiederblattes, weiter die subepidermalen Zellen der Innenseite des Kelchblattes, und schließlich — nur bei *Tr. hybridum* — die Epidermiszellen des Stielchens der Einzelblüte.

Bei *Tr. pratense* kann man mittels der T-Chromozentrenmethode leicht Aneutetraploide auffinden, deren T-Chromozentrenhöchstzahl 3 oder 5 beträgt; ihr Vorkommen deutet darauf hin, daß die betreffende tetraploide Sorte noch nicht frei von Meiosestörungen ist.

#### Literatur

1. BUTTERFASS, TH.: Ploidie und Chloroplastenzahlen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **72**, 440—451 (1959). — 2. BUTTERFASS, TH.: Das Verhalten der Chloroplastenzahlen in den Schließzellenpaaren von Zuckerrüben verschiedener Ploidiestufen vom Keimling bis zur blühenden Pflanze. Der Züchter **31**, 62—71 (1961). — 3. DARLINGTON, C. D., and A. P. WYLIE: Chromosome atlas of flowering plants. London 1955. — 4. JULÉN, G.: Rotklee, *Trifolium pratense* L. Handbuch der Pflanzenzüchtung, Bd. IV, S. 242 bis 305. Berlin: Parey-Verlag 1959. — 5. REITBERGER, A.: Über polyploide Ruhekerne bei Cruciferen. Naturwissenschaften **36**, 380 (1949). — 6. REITBERGER, A.: Ruhekernuntersuchungen bei gesunden und viruskranken Diploiden und Polyploiden von *Beta vulgaris*. Der Züchter **26**, 106—117 (1956). — 7. SHARMA, A. K., and A. SHARMA: Analysis of chromosome morphology and possible means of speciation in *Jasminum*. Cytologia (Tokyo) **23**, 172—185 (1958).

Aus dem VEG Saatzucht Petkus, Petkus, Kreis Luckenwalde

## Erfahrungen über die Erhaltung der Keimfähigkeit und Triebkraft von Winterroggenzuchtmaterial durch Lagerung im Vakuum

Von CHARLOTTE PETERS, ERICH SCHNEIDER und ERICH TOEPEL

Mit 2 Abbildungen

Von allen Getreidearten verliert der Winterroggen unter normalen Lagerungsbedingungen am schnellsten seine Keimfähigkeit. Nach SCHULZE (1952) behält er nur 1—2 Jahre seine Lebensfähigkeit. Hafer kann 2—3 Jahre, Sommerweizen, Sommergerste und Mais 3 Jahre, Winterweizen und Wintergerste können sogar 3—4 Jahre überlagert werden. Sollen Roggensortimente erhalten werden, so muß mindestens in jedem zweiten Jahr ein Anbau erfolgen. Um Fremdbefruchtungen und damit unerwünschte

Kreuzungen zu vermeiden, erfordert der Anbau beste Isolierungsmöglichkeiten.

Uns als Roggenzuchstation interessiert neben der Erhaltung von besonderen Formen der Vergleich des jetzigen Zuchtmaterials mit dem aus älteren Zuchzyklen, die nach dem Petkuser Roggenzuchtschema nach jeweils 5 Jahren abgeschlossen sind. Es könnte überprüft werden, ob eine Veränderung des Sortencharakters eingetreten ist. Ebenso interessiert es uns, in welcher Weise eine bestimmte Zuchtmethode oder