

# Bestäubungsverhältnisse und das Problem der Heterosiszüchtung bei tetraploidem Rotklee

B. BARCIKOWSKA und T. ŁĄCZYŃSKA-HULEWICZ

Institut für Pflanzen-genetik der Polnischen Akademie der Wissenschaften in Poznań und  
Institut für Genetik und Pflanzenzüchtung der Landwirtschaftlichen Hochschule in Lublin

## Fertilization and the Problem of Heterosis in Tetraploid Red Clover

**Summary.** Self-fertility in the tetraploid variety Wielkolistna was studied over a period of nine years. When the flowers were artificially selfed (heads rolled between fingers) seed-setting was on the average 13.61 per head. Weather conditions during the flowering period affected very considerably the degree of self-fertility: favourable conditions promoting better seed-setting. Positive correlation coefficients were found (in 1957, 1963, 1964 and 1965) between self-fertility and seed-setting after free pollination.

Inbred lines were established and their performance, seed yield and winterhardiness in  $I_1$ – $I_4$  were analysed. The degree of loss in green yield was 20–40%. However, several lines showed a higher yield than the controls. Very high uniformity of some features like leaf size and color, type of growth and leafiness could be observed already in the  $F_1$ .

To study the effect of heterosis the following crosses were performed: inbred lines of red clover  $\times$  inbreds, inbreds  $\times$  variety Wielkolistna, inbreds  $\times$  polyploid ecotypes. Crosses were made by hand and without emasculation. In all cases no heterosis effect was observed and the green yield of the putative hybrids was of the same level as that of the inbreds. It could therefore be concluded, that the analysed plants were not of hybrid origin but mostly results of self-pollination.

In the second series of experiments the plants were emasculated before crossing. This was done by immersing the flowers in 60% ethyl alcohol for 10 sec., then rinsing the heads in water. Seed-setting after use of this method was very poor: 1.08 seeds per head on the average, due to a damaging effect of the alcohol on female gametes. The green yield of the hybrid progeny was in this case much higher than that of the plants originating from crosses without emasculation (about 22% higher) and from free pollination (13% higher). It could, therefore, be supposed, that by artificial crossing without emasculation, and to some extent by free pollination, a lot of seeds originate from self-pollination.

In using hybrid methods it is important to know the degree of self-fertility in a free pollinating variety. To study this problem plants without leaf marking, which were recessive homozygotes, were chosen and freely pollinated by surrounding plants with distinct leaf markings. The number of plants without leaf markings in the progeny was a direct measure of spontaneous self-fertility. At the same time some heads on the mother plants were bagged and rolled between fingers to get data on artificial self-fertility. In 1964 9 progeny and in 1965 25 progeny were tested. In the first year spontaneous self-fertility was on the average 28.73% and in the second 55.20%. This difference was probably due to different weather conditions during the flowering period. They were more suitable in 1963 than in 1964, when a higher percentage of self-fertilization took place.

There was great diversity in the degree of self-fertility among the analysed mother plants. Most plants were highly self-fertile (their degree of self-fertility being 40–95%). There is probably no competition between own and foreign pollen grains when they germinate on the stigmas of those plants.

The tetraploid variety Wielkolistna can therefore be regarded as a partly autogamous population, its degree of self-fertilization being conditioned by genetical and to some extent external factors.

The calculated correlation coefficient between spontaneous and artificial self-fertility was highly significant:  $r = +0.714$  ( $P = 1\%$ ).

Plants with leaf markings were on the average better in yield than those without them: the green yield of the former was 521 g per plant, whereas that of the latter was 454 g (signif. with  $P = 1\%$ ). The inbreeding depression effect is therefore 12.9 percent.

In spite of a high degree of self-fertility there exist still some possibilities of applying hybrid methods to tetraploid red clover. These are discussed in the paper.

Noch immer unbefriedigende Samenerträge bei tetraploidem Rotklee zwingen zur Suche nach neuen Züchtungsmethoden, von denen die Heterosiszüchtung eine der erfolgreichsten zu sein scheint.

Ein reicher Samenansatz wird in einer fremdbestäubenden Population durch eine große Anzahl von Sterilitätsgenen bedingt, die einen hohen Anteil fertiler Kreuzungskombinationen garantieren. Die Anwesenheit von möglichst vielen Sterilitätsgenen ist nur bei einer starken genetischen Differenzierung innerhalb der Population möglich. In einer synthetischen Sorte, deren hohe Leistung vorwiegend auf einem Heterosis-effekt beruht, müssen die genannten Voraussetzungen erfüllt sein.

Der Heterosiseffekt hängt von vielen Faktoren ab, einige der wichtigsten sind die Blüh- und Bestäubungsverhältnisse sowie ein hoher Grad von Panmixie in der Population: je stärker die Neigung der Pflanzen zur Allogamie und je größer die Selbststerilität ist, desto höher ist die Zahl der Kreuzbestäubungen.

Der tetraploide Rotklee zeigt wie andere künstlich induzierte Polyploide eine verhältnismäßig hohe Selbstfertilität im Gegensatz zu diploidem Rotklee, der selbststeril ist und dessen nur geringer Samenansatz bei künstlicher Isolierung einer Pseudofertilität zugeschrieben wird (WILLIAMS u. WILLIAMS 1947).

Die Fertilitätsverhältnisse des tetraploiden Rotklees wurden von verschiedenen Autoren untersucht.

HERTZSCH (1957) fand eine weitgehende Selbststerilität, indem er in intakten Blütenständen den Samenansatz nach spontaner Selbstbestäubung analysierte. FOCKE (1958) wies dagegen darauf hin, daß der tetraploide Rotklee in hohem Grade selbstfertil sei. In eingehenden Versuchen stellte auch WEXELSEN (1965) fest, daß die Tetraploidien nach künstlicher Selbstbestäubung reichlich Samen ansetzen. Er hatte drei Methoden der Selbstbestäubung überprüft: 1. spontane Selbstbestäubung bei künstlicher Isolierung von Blütenständen; 2. Selbstbestäubung durch künstliches Auslösen der Blüten ("tripping"), 3. künstliche Selbstbestäubung durch das Rollen der isolierten Köpfchen in den Fingern. Die beiden letzten Methoden hatten einen höheren Samenansatz als die erste zur Folge, künstliches Auslösen der Blüten lieferte die höchsten Werte. Die Samenzahl pro Köpfchen betrug bei der tetraploiden Sorte Tepa beim künstlichen Auslösen durchschnittlich 23,6 (im Jahre 1963) und 19,7 (im Jahre 1964), während die tetraploide Sorte Tripo, die eine niedrigere Selbstfertilität zeigte, entsprechend 15,7 und 12,9 Samen ansetzte.

Die Resultate eigener mehrjähriger Untersuchungen sind in Tab. 1 zusammengestellt. Wie aus den angegebenen Daten ersichtlich ist, ist der Samenansatz bei künstlicher Selbstbestäubung (durch das Rollen der Blütenstände in den Fingern) im Verhältnis zum

Tabelle 1. *Selbstfertilität des tetraploiden Rotkleeps 'Wielkolistna'. (Anzahl der Samen pro Köpfchen)*

Jahr	Zahl der untersuchten Pflanzen	Spontane Selbstbestäubung	Künstliche Selbstbestäubung	Freie Bestäubung
1957	29	1,13	11,60	47,72
1958	25	—	28,64	54,10
1959	22	1,61	9,53	28,17
1960	22	—	11,90	15,90
1961	35	0,66	12,33	16,83
1962	48	—	5,58	16,75
1963	51	—	29,79	42,55
1964	30	—	4,96	22,04
1965	63	—	8,15	21,05
Summe	325			
Durchschnittlich		1,13	13,61	29,36

In den Jahren 1958, 1960 und 1962–1965 wurde die spontane Selbstfertilität (an intakten, isolierten Blütenständen) nicht geprüft.

Ansatz bei spontaner Selbstung (isolierte und intakte Blüten) mehrfach höher, was früher erhaltene Resultate bestätigen (ŁĄCZYŃSKA-HULEWICZ 1960, 1963). Die starke Differenzierung zwischen den einzelnen Untersuchungsjahren bei der freien wie bei der künstlichen Selbstbestäubung kann auf einen wesentlichen Einfluß von Außenfaktoren zurückgeführt werden. In den Jahren 1958 und 1963, die sich für die Samenproduktion als günstig erwiesen, lagen die Werte für beide Bestäubungsarten am höchsten. Im Gegensatz dazu zeigten die Jahre 1962 und 1964 einen sehr niedrigen Samenansatz.

Wie schon in den früheren Untersuchungen festgestellt wurde, besteht häufig eine signifikante positive Korrelation im Samenansatz bei Frei- und Selbstbestäubung (Tab. 2).

Nur in den Jahren 1958 und 1959 waren die Werte der Korrelationskoeffizienten nicht signifikant und sehr niedrig. WEXELSEN (1965) fand in seinen Untersuchungen dieselbe Erscheinung, die aber nur bei der Sorte Tepa mit dem höchsten Samenansatz festgestellt wurde. Die innerhalb anderer Sorten berechneten Korrelationskoeffizienten waren dagegen nicht signifikant.

Tabelle 2. *Korrelationskoeffizienten zwischen Samenansatz bei Selbstung und freier Bestäubung*

Jahr	$r =$	Zahl der Pflanzen
1957	+0,751**	n = 20
1958	+0,111	n = 18
1959	+0,139	n = 15
1963	+0,447**	n = 155
1964	+0,568*	n = 17
1965	+0,523**	n = 71

\*\* signifikant bei  $P = 0,01$ .

\* signifikant bei  $P = 0,05$ .

Der hohe Grad von Selbstfertilität beim tetraploiden Rotklee ermöglichte die Herstellung und weitere Erzeugung von Inzuchtlinien. Sie zeichneten sich durch eine weitgehende morphologische Ausgeglichenheit aus, besonders hinsichtlich solcher Eigenschaften wie Wuchstypus, Entwicklungsrhythmus und Blattanteil (ŁĄCZYŃSKA-HULEWICZ 1963). Auch die Form, Größe und Farbe der Blätter zeigte innerhalb der Linien nur kleine Schwankungen. Die Inzuchtdepression im Grünertrag, die bis  $S_4$  untersucht wurde, betrug 20–40% des Ertrages der Nachkommenschaft aus frei abgeblühten Pflanzen. Eine Anzahl Linien, besonders diejenigen, die hoch selbstfertil waren, zeigte keine Inzuchtdepression oder übertraf sogar die Kontrolle im Ertrag. Die berechneten Korrelationskoeffizienten wiesen eine Beziehung zwischen den Grünerträgen und dem Grad der Selbstfertilität auf ( $r = +0,514$ ).

Die Vitalität der Inzuchtpflanzen war bedeutend niedriger als die der Nachkommenschaft aus freier Bestäubung, die Folge waren höhere Auswinterungsschäden und stärkerer Virusbefall. Trotz geringer Vitalität und durchschnittlich niedrigerem Samenansatz konnten die Inzuchtlinien auf Grund der Selbstfertilität ohne Schwierigkeiten weiter vermehrt werden. Es fand eine unbeabsichtigte Selektion auf Selbstfertilität statt, weil nur diejenigen Pflanzen und Linien vermehrt wurden, die bei Selbstbestäubung genügenden Samenansatz lieferten.

Um den Grad des Heterosiseffektes feststellen zu können, wurde ein Teil der Pflanzen in den  $S_2$ -Linien mit der Hand gekreuzt. Die Kreuzungen wurden ohne Kastration der Blüten durchgeführt, da früher nachgewiesen worden war, daß die Pollenschläuche der fremden Pollenkörner in dem Griffel schneller wachsen als die des eigenen Pollens. (ŁĄCZYŃSKA-HULEWICZ und MACKIEWICZ 1963). Zur Bestäubung dienten Streichhölzchen, deren zugespitzte Enden mit einem Stück Samtstoff umwickelt wurden.

Es wurde eine Reihe von Kreuzungskombinationen hergestellt, indem man untereinander verschiedene Inzuchtlinien und Inzuchtlinien mit der tetraploiden Sorte Wielkolistna und andere künstlich hergestellte Polyploide kombinierte.

Der Samenansatz bei Handkreuzung zeigte eine signifikante Korrelation mit dem Samenansatz bei Selbst- und Freibestäubung. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Da die Resultate aller Ertragsversuche negativ waren, sind sie hier nicht angegeben. Die Grünerträge der Nachkommenschaften aus künstlicher Handbestäubung wiesen keine Heterosiswirkung auf und lagen auf dem Niveau der Inzuchlinien. Die Pflanzen aus freier Bestäubung wiesen im Gegensatz dazu 20% höheren Grünmassenertrag auf.

Tabelle 3. Korrelationskoeffizienten zwischen Samenansatz bei verschiedenartiger Bestäubung

	Wiel-kolistna	Inzucht-linien	Polyploide Ökotypen
Selbstfertilität			
× Samenersatz			
bei Handkreuzung	+ 0,581*	+ 0,601**	+ 0,874**
Samenansatz bei freier Bestäubung			
× Samenansatz bei Handkreuzung	+ 0,587*	+ 0,520**	+ 0,109

\*\* signifikant bei  $P = 0,01$  — \* signifikant bei  $P = 0,5$ .

Der niedrige Ertrag der Nachkommenschaften, die aus Handbestäubung stammten, ließ vermuten, daß vorwiegend nicht Kreuz-, sondern Selbstbestäubung wirksam war. Bei freier Bestäubung trat dagegen wahrscheinlich eine größere Anzahl von Kreuzbestäubungen auf, was sich in einem starken Heterosiseffekt auswirkte.

Dieses Problem sollte näher studiert werden, indem einerseits kastrierte Blüten zur Kreuzung verwendet wurden, andererseits der Anteil der spontanen Selbstungen bei freier Bestäubung untersucht wurde.

Eine mechanische Kastration der Blüten mit einer Pinzette oder Saugpumpe kam wegen des großen Arbeitsaufwandes nicht in Betracht. Es wurde deswegen eine chemische Methode ausprobiert, indem man die Köpfe in verschiedene Äthylalkoholkonzentrationen eintauchte. Der Pollen aus den behandelten Blüten wurde auf Vitalität und Keimfähigkeit geprüft. Nach einmaligem Eintauchen der Köpfchen in eine 50%ige Lösung waren noch lebensfähige Pollenkörner zu finden, während eine 70%ige Lösung sich als zu stark erwies, und die Blüten wurden geschädigt. Es wurde deswegen eine 60%ige Konzentration gewählt, die eine vollkommene Hemmung der Pollenkeimung veranlaßte. Isolierte Blütenköpfchen wurden für 10 Sekunden in die Alkohollösung eingebracht und dann sorgfältig mit Wasser

abgespült. Während der Alkoholbehandlung wurde die Luft von den Blüten durch mehrmaliges Drücken der Köpfchen mit den Fingern entfernt. Blüten, die noch nicht geöffnet waren, wurden vor der Kastration abgebrochen. Die Kreuzbestäubung fand am nächsten Tage statt, damit die Blüten völlig trocken waren.

Tabelle 4. Samenansatz bei verschiedenen Bestäubungsmethoden (pro Köpfchen)

Künstliche Selbst-bestäubung	Kreuzung mit Kastrierung	Kreuzung ohne Kastrierung	Freie Be-stäubung
11,25	1,08	11,08	19,41

Gleichzeitig wurde auf denselben Pflanzen ein Teil der Köpfchen ohne vorherige Kastration gekreuzt und 3 Blütenstände künstlich selbstbestäubt. Tab. 4 zeigt den Samenansatz bei den verschiedenen Varianten. Die Kastration mit Äthylalkohol hatte den üblichen Einfluß auf den Samenansatz zur Folge, weil nicht nur die Staubbeutel, sondern auch die Fruchtknoten und Eizellen geschädigt wurden. Die Kastration mit 60%igem Alkohol kann deswegen bei der Züchtung von Rotklee nicht empfohlen werden, da der Samenansatz bei der Anwendung dieser Methode zu gering ist.

Durch Auspflanzen in einem Abstand von  $60 \times 60$  cm ins Feld wurden die Nachkommenschaften auf Grünertrag und Winterfestigkeit geprüft (Tab. 5). Trotz großer Variation zeigte die Kombination mit Kastrierung der Blüten (Komb. 3) im Vergleich zu der Kombination mit Selbstung (Komb. 1) und der Kreuzung ohne Kastrierung (Komb. 2) einen bedeutend höheren Ertrag, was als starke Heterosiswirkung angesehen werden kann. Die durchschnittliche Differenz im Vergleich zur Kontrolle (Nachkommenschaft von Freibestäubung, Komb. 4) war auch positiv, aber nicht signifikant.

Auf Grund dieser Resultate kann man zweifellos feststellen, daß bei künstlichen Kreuzbestäubungen ohne vorherige Kastration vorwiegend Selbstbefruchtung vorliegt, was in der Nachkommenschaft zu bedeutenden Inzuchtdépressionen führt. Nur eine sorgfältige Kastration kann das Gelingen der Kreuzbefruchtung garantieren.

Die durchgeföhrten Versuche führen weiter zu der Feststellung, daß der tetraploide Rotklee bei künstlicher Selbstbestäubung in hohem Grade selbstfertil ist und daß daher auch bei Anwesenheit fremden Pollens der eigene oft die Befruchtung ausführt.

Tabelle 5. Einfluß verschiedener Kreuzungsmethoden auf die Nachkommenschaft (Grünertrag pro Pflanze in g)

Mutterpflanze Nr.	1 Künstliche Selbstbestäubung	2 Kreuzung ohne Kastrierung	3 Kreuzung mit Kastrierung	4 Freie Bestäubung	5 Selbstfertilität der Mutterpflanze
211 II	128	169	225	329	4,0
223 I	192	337	458	214	15,6
292 II	235	159	250	395	27,0
292 III	87	145	425	262	12,5
292 IV	173	257	425	343	29,7
$\bar{x}$	163,0	213,4	356,6	308,6	
Diff. =	105,2		F. exp. =	5,60 signif. bei $P = 0,05$	

Da das Problem der spontanen Selbstbestäubung und der Anteil von Selbststungen in freiblühenden Populationen von ausschlaggebender Bedeutung für eine erfolgreiche Heterosiszüchtung ist, sollte diese Frage näher analysiert werden.

Zu diesem Zweck wurde bei der tetraploiden Sorte Wielkolistna und bei aus ihr selektionierten Inzuchtlinien eine Anzahl von Pflanzen ohne Blattzeichnung ausgelesen. Wie eine Reihe von Autoren festgestellt hat, ist die Ausbildung dieses Merkmals durch ein Gen bedingt (KAJANUS 1912, RINKE 1941, SMITH 1952). Das Fehlen der Zeichnung wird rezessiv vererbt. Die tetraploiden Pflanzen, die glatt grüne Blätter besitzen, sind also rezessive Homozygoten der Konstitution  $m\ m\ m\ m$ . Diese Pflanzen standen einzeln in einem Zuchtgarten und waren mit Pflanzen, die eine stark ausgeprägte Blattzeichnung besaßen, umgeben. Ein Teil der rezessiven Homozygoten wurde zusammen mit blattmarkierten Pflanzen in Isolationskäfigen untergebracht, wo die Bestäubung mit Bienen durchgeführt wurde. Obwohl man kleine Bienenvölker in die Isolationskäfige brachte, war die Bestäubung ungenügend, weil die Bienen, die einen zu geringen Raum zur Verfügung hatten, meistens zugrunde gingen.

Es wurde angenommen, daß Pflanzen mit stark ausgeprägter Blattzeichnung folgende genetische Konstitution hatten:  $M\ M\ M\ M$  oder  $M\ M\ M\ m$ . Während die Dominanzhomozzygoten nur eine Art der Gameten produzierten ( $M\ M$ ), lieferten die  $M\ M\ M\ m$ -Pflanzen zwei Arten von Gameten ( $M\ M$  und  $M\ m$ ). Bei einer Befruchtung von  $m\ m\ m\ m$ -Genotypen mit  $M\ M$ -Gameten war die Zeichnung stärker ausgeprägt ( $M\ M\ m\ m$ -Zygoten) als bei der Befruchtung mit  $M\ m$ -Gameten, wodurch  $M\ m\ m\ m$ -Zygoten entstanden. Zwar fehlte eine eingehende genetische Analyse der Vaterpflanzen, doch können die Versuchsdaten als ausreichend angesehen werden. Der Versuchsfehler, der auf unkontrollierter Fremdbestäubung mit  $m\ m$ -Gameten beruhte, war wahrscheinlich nur geringfügig.

Alle glatt grünen Versuchspflanzen wurden auf Selbstfertilität geprüft: 5 Köpfchen wurden auf jeder Mutterpflanze mit engmaschigen Gazebeuteln isoliert und während des Aufblühens 3 mal (während 3 Tagen) zwischen den Fingern gerieben.

Die Nachkommenschaften aller Testpflanzen (aus Selbst- und Freibestäubung) wurden in Kisten im Glashaus reihenweise ausgepflanzt und einer genauen Auswertung auf Vorhandensein von Blattzeichnungen unterworfen. Alle Sämlinge, die eine Blattzeichnung hatten, wurden gezählt und ausgemerzt. Die Pflanzen mit glatt grünen Blättern, die übriggeblieben sind, wurden im Feld ausgepflanzt und weiter auf das Vorkommen der Blattzeichnung analysiert. Ein Teil von ihnen zeigte in den weiteren Entwicklungsstadien noch eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Blattzeichnung, die oft auf den höher inserierten Blättern hervortrat. Diese Pflanzen, die wahrscheinlich die Konstitution von  $M\ m\ m\ m$  besaßen, wurden nach Zählung ebenfalls entfernt. Der Prozentsatz an Pflanzen mit Blattzeichnung, bezogen auf die Gesamtzahl der Nachkommen, diente als Maßstab für den Grad der Selbstbestäubung bei freier Bestäubung der Mutterpflanzen.

Außer Nachkommenschaften aus freier Bestäubung wurden auch solche aus künstlicher Selbstbestäubung untersucht. Wie erwartet, hatten diese Pflanzen, mit wenigen Ausnahmen, die einer ungewollten Fremdbestäubung zugeschrieben werden können, glatt grüne Blätter und waren rezessive Homozygoten.

Tabelle 6. Nachkommenschaft der Pflanzen ohne Blattzeichnung im Jahre 1964. Erstes Versuchsjahr

Nr. der Mutterpflanze	Zahl der analysierten Pflanzen	Prozent der Pflanzen ohne Blattzeichnung
94/16	69	60,9
43/1	100	6,0
38/18	89	49,4
60/1	113	0,9
37/5	131	9,9
21/45	21	14,3
21/47	71	43,7
21/137	15	26,7
21/142	93	47,3
Durchschnittlich	702	28,73

Die Resultate der zweijährigen Analyse nach freier Bestäubung sind in Tab. 6 und 7 zusammengefaßt. Die Prozentzahlen, die den Anteil der Pflanzen mit glatt grünen Blättern wiedergeben, sind, wie aus den zusammengestellten Daten ersichtlich, sehr ungleichmäßig (Tab. 6). Es gibt sowohl Nachkommenschaften, die fast nur Pflanzen mit Blattzeichnung umfassen, was das Ergebnis einer hohen Fremdbestäubung der Mutterpflanze sein kann (Pflanzenummer 43/1, 60/1, 37/5 und 21/45), als auch solche,

Tabelle 7. Nachkommenschaft der Pflanzen ohne Blattzeichnung im Jahre 1965. Zweites Versuchsjahr

Nr. der Mutterpflanze	Zahl der analysierten Pflanzen	1	2
		Prozent der Pflanzen ohne Blattzeichnung	Selbstfertilität der Mutterpflanze in Prozent des Samenansatzes bei freier Bestäubung
323/1	85	65,9	80,0
323/4	113	62,8	61,3
323/9	61	80,3	100,0
323/10	70	60,0	65,5
323/14	100	68,0	89,5
324/12	114	71,1	100,0
324/17	85	36,5	48,3
324/18	63	69,8	72,4
331/5	59	59,6	31,7
331/8	68	42,3	62,8
337/2	50	42,0	53,1
337/11	65	50,8	39,2
337/16	68	60,3	95,6
337/20	69	50,7	47,5
391/16	67	38,8	40,0
391/21	55	34,5	—
410/20	152	44,7	—
432/10	78	67,9	13,0
457/5	55	34,5	7,0
475/8	27	76,3	23,0
485/5	41	58,5	—
493/13	56	42,9	—
498/1	61	37,7	—
503/3	49	53,1	11,0
505/1	92	78,3	63,0

$$\bar{x} = 1803 \quad 55,49 \quad 55,20$$

$$r_{(1,2)} = +0,711 \text{ (signif. bei } P = 0,01)$$

die eine große Anzahl glatt grüne Pflanzen aufweisen (Nr. 94/16, 38/18, 21/47 und 21/142). Die Werte in Tab. 7 sind höher und die Zahl der Pflanzen ohne Blattzeichnung liegt hier zwischen 34,5–80,3%.

Die genetische Differenzierung des Selbstfertilitätsgrades scheint also in der tetraploiden Sorte Wielkolistna sehr groß zu sein, da sowohl fast vollkommen selbstfertile, als auch selbststerile Pflanzen zu finden sind. Die Mehrzahl der analysierten Individuen zeigt einen Selbstbestäubungsgrad zwischen 40–60%, woraus zu schließen ist, daß bei der Sorte Wielkolistna ungefähr die Hälfte der Pflanzen durch Selbstbestäubung entsteht.

Es war interessant zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen Selbstfertilität bei freier Bestäubung und bei künstlicher Isolierung der Mutterpflanze besteht. Die analysierten Werte zeigen zwar bei einzelnen Pflanzen große Unterschiede, der berechnete Korrelationskoeffizient ist aber hoch signifikant (bei  $P = 1\%$ ) und beträgt  $r = +0,711$ . Dies bedeutet, daß die Pflanzen, die eine hohe Selbstfertilität bei künstlicher Isolierung aufweisen, auch bei freier Bestäubung eine große Anzahl von Selbststungen liefern.

Der Grad der Selbstfertilität ist sowohl von der genetischen Konstitution der Pflanze wie auch von Außenfaktoren abhängig, was die Durchschnittswerte der beiden Versuchsjahre klar belegen. Der durchschnittliche Prozentsatz an glatt grünen Pflanzen beträgt im Jahre 1964 28,73, während er 1965 fast doppelt so hoch ist (55,20%). Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, daß die Außenfaktoren während des Blühens der Mutterpflanze im Jahre 1963 viel günstiger waren als im Jahre 1964. Die entsprechenden Werte für den Samenansatz bei freier Bestäubung sind im Jahre 1963 42,55 und im Jahre 1964 22,04 Samen pro Köpfchen. Die günstigen Vegetationsfaktoren, die im Jahre 1963 vorlagen, verursachten also einen höheren Grad an Fremdbestäubungen, während der kühle und nasse Sommer 1964 eine große Zahl von Selbstbefruchtungen zur Folge hatte. Um die Abhängigkeit des Selbstfertilitätsgrades des tetraploiden Rotklee von Außenfaktoren genauer erklären zu können, soll dieses Problem noch eingehend untersucht werden.

Eine bedeutende Rolle bei der Selbstbefruchtung kann auch der Grad der Pollenfertilität spielen. Um diesen Zusammenhang zu studieren, wurden im Jahre 1961 und 1964 Pflanzen der Sorte Wielkolistna auf ihre Selbstfertilität und gleichzeitig auf Vitalität des Pollens untersucht. Die Pollenkeimung wurde auf künstlichem Agarmedium mit 35%iger

Zuckerlösung in Zimmertemperatur durchgeführt und die Fertilität auf Grund der Färbung in Acetokarmiin geschätzt. Die Resultate wurden mit dem Grad der Selbstfertilität der untersuchten Pflanzen verglichen und die entsprechenden Korrelationskoeffizienten berechnet. Es wurde aber sowohl bei spontaner wie künstlicher Selbstbestäubung keine signifikante Abhängigkeit zwischen den untersuchten Eigenschaften gefunden (Tab. 8). Das Fehlen einer signifikanten Korrelation ist zweifellos mit der genügend hohen Pollenvitalität der untersuchten Pflanzen zu erklären. Im allgemeinen kann man also feststellen, daß der Grad der Selbstfertilität der Pflanzen nicht von der Pollenfertilität abhängt, zumindest nicht dann, wenn die Zahl der fertilen Pollenkörper hoch genug ist.

Unsere mehrjährigen Versuche führen zu dem Ergebnis, daß der Grad der Selbstfertilität der tetraploiden Sorte Wielkolistna sowohl bei künstlicher als auch bei freier Bestäubung sehr hoch ist. Zweifellos wurde diese Tendenz noch durch die mehrjährige Selektion von Pflanzen, die unter schlechten Witterungsbedingungen einen guten Samenansatz erbrachten, erhöht.

Ein Teil der untersuchten Pflanzen kann nicht nur als vollkommen selbstfertil, sondern sogar als selbstbestäubend angesehen werden. Der Anteil dieser Pflanzen, die in der Nachkommenschaft über 60% glatt grüne Individuen lieferten, betrug im Jahre 1965 44%. Dieser überaus hohe Grad von Selbstfertilität bei freier Bestäubung ist um so überraschender, als diese Selbstbefruchtungen bei gleichzeitiger Anwesenheit fremden Pollens auf der Narbe vorkommen.

Die starke Neigung zur Selbstbefruchtung kann sich in den morphologischen Eigenschaften der Einzelpflanzennachkommenschaften auswirken, die in mehreren Merkmalen oft sehr ausgeglichen erscheinen. Im allgemeinen führt die Selbstbefruchtung zur Schwächung der Vitalität und zu Inzuchtdepressionen beim Grün- und Samenertrag. Pflanzen, die sich durch sehr hohe Selbstfertilität auszeichnen, können aber im vorliegenden Falle höhere Erträge als die selbststerilen erbringen.

Das Versuchsmaterial, das die Nachkommenschaften der frei abgeblühten glatt grünen Pflanzen umfaßte, diente im Jahre 1965 auch zur Schätzung der Grünmassenerträge, indem man Pflanzen mit Blattzeichnung mit glatt grünen Individuen verglich. Es zeigte sich, daß die ersten einen durchschnittlichen Einzelpflanzenertrag von 521 g zeigten, die zweiten 454 g pro Pflanze lieferten. (Die Differenz

Tabelle 8. Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) zwischen Pollenvitalität und verschiedenen Bestäubungsmethoden (25 Pflanzen)

Jahr	Prozent der fertilen Pollenkörper $\times$			Prozent der gekeimten Pollenkörper $\times$		
	Spontane Selbstbefruchtung (Intakte Blütenstände)	Künstliche Selbstbefruchtung	Samenansatz bei freier Bestäubung	Spontane Selbstbefruchtung	Künstliche Selbstbefruchtung	Samenansatz bei freier Bestäubung
1961	-0,238	-0,037	-0,148	-0,116	-0,064	+0,723**
1964	+0,112	+0,089	-0,070	-0,385	-0,027	+0,042

\*\* Signifikant bei  $P = 0,01$

war bei  $P = 1\%$  signifikant.) Diese Daten zeigen deutlich, daß mit zunehmender Selbstbestäubung ein Rückgang der Vitalität und der Grünerträge auftreten kann, da die rezessiven Homozygoten schwächer als die Kreuzungsnachkommenschaft sind.

Trotz hohen Grades an Selbstfertilität scheint jedoch eine zweckmäßige Heterosiszüchtung bei unserem tetraploiden Rotklee Aussicht auf Erfolg zu haben, weil ein großer Teil der Pflanzen aus Fremdbestäubung stammt. Es können wahrscheinlich Stämme selektiert werden, die vollkommen selbststeril sind und die für die Heterosiszüchtung von besonderem Interesse sein würden. Bei der Heterosiszüchtung muß auch beachtet werden, daß der Grad der Fremdbestäubung stark von Außenfaktoren abhängt und eine ausreichende Panmixie nur bei gutem Wetter während der Blüte erzielt werden kann. Die Kreuzung von Familien oder Inzuchlinien soll deswegen in solchen Gebieten durchgeführt werden, wo sich der Sommer durch gute Witterungsverhältnisse auszeichnet.

Die blütenbiologischen Verhältnisse bei der Sorte 'Wielkolistna' bieten die Möglichkeit, die Methode wiederkehrender Selektion, die von JOHNSON (1957) bei Steinklee ausprobiert wurde, mit Erfolg anzuwenden: eine hohe Selbstfertilität kann die Erhaltung der Inzuchtnachkommenschaft ermöglichen, während das Samenmaterial aus den frei abgeblühten Köpfchen für die Ertragsprüfung dienen kann. Auf diesem Wege wäre die Möglichkeit gegeben, eine synthetische Sorte herzustellen, in der ein ständiges Gleichgewicht von Selbst- und Fremdbestäubungen bestünde, was zu einer Stabilität der Samenerträge auch in ungünstigen Vegetationsperioden führen könnte.

### Zusammenfassung

Es wird über 9jährige Untersuchungen der Selbstfertilität bei tetraploidem Rotklee berichtet. Der Samenansatz je Köpfchen betrug bei künstlicher Selbstbestäubung durchschnittlich 13,61%. Die genetische Variation wurde dabei durch Außenfaktoren modifiziert.

Die untersuchten Inzuchlinien wiesen im Grünertrag eine Depression von 20—40% gegenüber dem Ertrag der Nachkommenschaft aus freier Bestäubung auf; einige Linien brachten aber auch höhere Erträge.

Die Nachkommenschaften einer Reihe von Handkreuzungen, die an den Inzuchlinien (ohne Kastrier-

ung der Blüten) durchgeführt wurden, zeigten keinen Heterosiseffekt, die Pflanzen dürften meistens aus Selbstungen hervorgegangen sein. Nach Kastrierung der Blüten mit Äthylalkohol war dagegen ein Heterosiseffekt nachzuweisen. Der Grünertrag war durchschnittlich um 22% höher.

Die spontane Selbstfertilität, die bei der Heterosiszüchtung eine entscheidende Rolle spielt, wurde an homozygot rezessiven Pflanzen mit glatt grünen Blättern untersucht. Sie war sehr hoch und betrug durchschnittlich im ersten Versuchsjahr 28,73%, im zweiten 55,20%. Die Variation war dabei sehr groß; einige Pflanzen waren fast vollkommen selbststeril, während andere eine 100%ige Selbstfertilität zeigten. Es wurde eine positive Korrelation zwischen spontaner und künstlicher Selbstfertilität gefunden ( $r = +0,714$  bei  $P = 1\%$ ).

Die Möglichkeiten der Anwendung der Heterosiszüchtung bei einer hoch selbstfertilen polyploiden Rotklessorte wurden besprochen.

### Literatur

- FOCKE, R.: Einiges zur Fertilität des selbstfertilen tetraploiden Klees. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. Zeszyt 20 (1958). — 2. HERTZSCH, W.: Fertilität bei polyploidem Rotklee. Tagungsberichte Deutsche Akad. d. Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin Nr. 18, 12—17 (1957). — 3. JOHNSON, I. J., and A. S. EL BANNA: Effectiveness of successive cycles of phenotypic recurrent selection in sweetclover. *Agron. J.* **49**, 120—125 (1957). — 4. KAJANUS, B.: Über die Blattzeichnung des Rotkleeps. *Bot. Nat.* **39**—43 (1912). — 5. ŁĄCZYŃSKA-HULEWICZ, T.: Selbstfertilität und Inzuchtdepression bei tetraploidem Rotklee. *Der Züchter* **30**, 220—222 (1960). — 6. ŁĄCZYŃSKA-HULEWICZ, T.: Self-fertility and inbreeding in tetraploid red clover. *Genetica Polonica* **4**, 97—119 (1963). — 7. ŁĄCZYŃSKA-HULEWICZ, T., u. T. MACKIEWICZ: Pollenfertilität u. Pollenschlauchwachstum bei di- und tetraploidem Rotklee. *Der Züchter* **33**, 11—17 (1963). — 8. RINKE, E. H. and I. J. JOHNSON: Self-fertility in red clover in Minnesota. *J. Amer. Soc. Agr.* **33**, 512—521 (1941). — 9. SMITH, P. E.: The inheritance of leaf marking in red clover (*Trifolium pratense*). *Abstr. Doct. Diss. Ref. Plant Breed. Abstr.* **22**, 1218 (1952). — 10. WEXELSEN, H.: Segregation in red clover (*Trifolium pratense*). *Hereditas* **16**, 219—240 (1932). — 11. WEXELSEN, H.: Studies in tetraploid red clover fertility and seed yield. Inbreeding and heterosis effects. *Sci. Rep. from the Agric. Coll. of Norway* **44**, Nr. 17 (1965). — 12. WILLIAMS, R. D.: Genetics of red clover and its bearing on practical breeding. 4th Int. Grassl. Congr. Aberystwyth Rep. 238—250 (1937). — 13. WILLIAMS, R. D. and W. WILLIAMS: Genetics of red clover (*Trifolium pratense* L.) compatibility. *J. Genet.* **48**, 51—68 (1947).