

Endopolyploidie und Ertrag bei diploiden und tetraploiden Zuckerrüben

III. Ergebnisse zur Methodik

THEODOR BUTTERFAß

Max-Planck-Institut für Pflanzengenetik, Ladenburg, Rosenhof (BRD)

Endopolyploidy and Yield in Diploid and Tetraploid Sugar Beets

III. Methodological Results

Summary. An improved procedure is described for selection for a lower degree of endopolyploidy in leaves of sugar beets by means of scoring chloroplast numbers in spongy parenchyma cells. The higher yield of the tetraploid sugar beets with smaller cells (i.e. with a lower degree of endopolyploidy) in the populations is not a result of an increased heterozygosity of these plants.

In zwei früheren Arbeiten (Butterfaß 1966, 1968) sind einige methodische Fragen offen geblieben, nämlich: 1. Wie läßt sich der Endopolyploidiegrad bei den Pflanzen umfangreicher Populationen schnell und genügend genau bestimmen? 2. Enthalten die genetisch kleinerzelligen und deshalb leistungsfähigeren Zuckerrüben Allele, die aus sich heraus, d. h. auch homozygot, eine starke Endopolyploidisierung verhindern, oder sind sie stärker heterozygot und aus diesem Grunde kleinerzellig und leistungsfähiger? Die Selektion könnte also günstige Allele anreichern oder nur die Heterozygotie erhöhen. Bloß im ersten Fall wäre die Selektion der richtige Weg, um die Leistung zu steigern.

Die Erfassung des Endopolyploidiegrads

Obwohl eine enge Korrelation zwischen der Größe und der Ploidiestufe einer Mesophyllzelle besteht, gibt es auch Zellgrößenfaktoren, die nichts mit Endopolyploidie zu tun haben. Allein die Größe der Schwammparenchymzellen kann deshalb kein Maß für deren Ploidiestufe sein. Um die Einflüsse nicht unnötig zu vermischen, wurde in den beiden früheren Arbeiten, ausgehend von Butterfaß (1965), versucht, die allgemeinen Größenfaktoren durch Beziehen der Länge der Schwammparenchymzellen auf diejenige der (nicht endopolyploid werdenden) Schließzellen zu eliminieren. Der erhaltene Quotient wurde als Index für den Ploidiegrad der Schwammparenchymzellen angesehen und auch der Selektion zugrundegelegt. Das Verfahren setzt voraus, daß die Längen der Schließzellen dabei einigermaßen konstant bleiben.

Diese Voraussetzung hat sich als falsch erwiesen. Infolge der Selektion auf kleine Indexwerte nimmt

nicht nur der Zähler (Länge der Schwammparenchymzellen) ab, sondern auch der Nenner (Länge der Schließzellen) erheblich zu, d. h. die ohnehin sehr großen, vielleicht schon zu großen Schließzellen der Tetraploiden wachsen weiter. Die Indexquotienten eignen sich also nur zur Aufgliederung einer Population, aber nicht zur Selektion auf bestimmte Endopolyploidiegrade.

Bei der Selektion braucht man nicht alle Pflanzen genau quantitativ zu erfassen, sondern es genügt, die Pflanzen mit offensichtlich geringem Endopolyploidiegrad herauszusuchen. Als Merkmal für eine schnelle Auslese durch Bonitur kommt vor allem die Chloroplastenzahl in den Schwammparenchymzellen in Frage (Butterfaß 1963).

Ich halte es für richtig, geeignete Stämme auf der diploiden Stufe zu selektieren und erst später tetraploid zu machen. Das geht schneller. Es gibt keinen Grund anzunehmen, erzielte Unterschiede bildeten sich nicht auf der tetraploiden Stufe entsprechend ab. Die erste Leistungsprüfung folgt dann allerdings erst auf die Tetraploidisierung (die diploiden Pflanzen zu prüfen wäre sinnlos) und verschiebt sich damit auf einen recht späten Zeitpunkt.

Von 200 diploiden Pflanzen wurde je ein Stückchen eines ausgewachsenen Blatts in 4% Formaldehyd + 0,6 % KCl mindestens einen Tag lang fixiert. Abgezogene Stückchen der unteren Epidermis mit anhaftendem Schwammparenchym wurden von innen her in J-KJ-Lösung auf die Chloroplastenzahl in den Schwammparenchymzellen bonitiert. Herausgesucht wurden Pflanzen mit besonders wenigen und solche mit besonders vielen Chloroplasten in den Schwammparenchymzellen, zusammen elf Pflanzen. Von je zwei dicht benachbarten Blattstellen dieser elf Pflan-

zen wurde je ein Blattstückchen in Formaldehyd (wie oben) zum genauen Zählen der Chloroplasten und in Alkohol-Eisessig 3:1 zur DNA-Messung fixiert. Stückchen der unteren Epidermis aus der Formaldehyd-Serie wurden wie von Butterfaß (1964, S. 49) angegeben behandelt und solche aus der Alkohol-Eisessig-Reihe nach Feulgen gefärbt (Hydrolyse bei 20 °C über Nacht in Anlehnung an Fox [1969], aber mit 1N HClO₄ statt mit HCl) und in J-KJ-Lösung mit 5% Glycerin bzw. in Euparal eingebettet. Chloroplasten wurden je Pflanze in 20 Schließzellen (10 Paaren) und in 10 Schwammparenchymzellen, alle möglichst zufallsgemäß herausgegriffen, gezählt. Die DNA-Messungen erfolgten mit dem Leitz-Mikroskop-photometer MPE, und zwar in 10 Schließzellen (ergibt Bezugswert für diploide Zellen in der G₁-Phase) und in 10 möglichst zufallsgemäß herausgegriffenen Schwammparenchymzellen. Die Volumenverhältnisse der (einigermaßen isodiametrischen) Zellen ergaben sich aus dem Vergleich der dritten Potenzen ihrer größeren Durchmesser, die Oberflächenverhältnisse aus dem der zweiten.

Tab. 1. Chloroplastenzahlen, relative DNA-Mengen und relative Zellgrößen in Blättern ausgesuchter diploider Zuckerrüben

Pfl.-zahl	Chloroplastenzahl		Extinktion ¹	Schwammparenchymzellen	
	Schwammparenchymzellen	Schließzellen		Volumen relativ	Oberfläche relativ
6	wenig: 33	7,5	186	1	1
5	viel: 71	7,3	238	2,82	2,02

¹ Extinktion der Schwammparenchymzellen in % derjenigen in Schließzellen.

Tab. 1 zeigt das Ergebnis. Die Schließzellen enthielten in beiden Gruppen etwa gleich viele Chloroplasten; die übrigen Unterschiede zwischen den Gruppen waren signifikant ($P = 1\%$). Weil Zahl und Beschaffenheit der im Präparat verfügbaren Mesophyllzellen schwankten und für die Feulgenmessung wahrscheinlich eine andersartige Teilpopulation der Schwammparenchymzellen geeignet war und herangezogen wurde als für die Chloroplastenzählungen und daher die Stichprobe nur bei den Schließzellenpaaren annähernd dem Zufall entsprach, kann man die Werte der verschiedenen Spalten nur mit Vorbehalt und überschlagsmäßig vergleichen. Im Rahmen dieser Unsicherheiten besteht im Schwammparenchym eine befriedigende Parallele zwischen den Plastidenzahlen, den relativen DNA-Gehalten und den Zellgrößen. Da bei der Volumenverdoppelung einer kugeligen Zelle der Durchmesser nur um 26%, die Chloroplastenzahl aber um 60–80% zunimmt, ist die Chloroplastenzahl bei schneller Bonitur ein besserer Anzeiger des Ploidiegrads als der Zelldurchmesser.

Präparation für die Auslese: Ich fixiere in Formaldehyd wie oben angegeben, färbe nicht besonders und bette abgezogene Epidermisstückchen samt dem anhaftenden Schwammparenchym mit der Mesophyllseite nach oben in einen Tropfen verdünnte J-KJ-Lösung mit 5% Glycerin ein. Dann decke ich mit Hart-PVC-Folie ab. Die Präparate halten sich mehrere Tage.

Selektion: Ich suche die 10–30% Pflanzen mit den wenigsten Chloroplasten je Schwammparenchymzelle heraus (Bonitur, keine Zählungen!). Von diesen Pflanzen fixiere ich je ein Stück eines zweiten Blatts und bonitiere wieder, bis etwa 5% der Pflanzen übrig bleiben. Wegen der scharfen Selektion gehe ich mindestens von einigen tausend Pflanzen aus, damit der genetische Hintergrund nicht verarmt.

Endopolyploidie und Heterosis

Zwei diploide Zuckerrüben-Inzuchtstämme mittlerer Zuchtichtung, von denen schon bekannt war, daß sie miteinander Heterosis zeigen, wurden gekreuzt. Die mittleren Gewichte von jungen Pflanzen der beiden Elternstämme und der F₁ sind in Tab. 2 zusammengestellt. Die Heterosis ist deutlich. Die Zellgrößenindizes unterscheiden sich dagegen nur wenig, und die Unterschiede sind nicht signifikant.

Tab. 2. Heterosis der Gewichte und Zellgrößenindex (großer Durchmesser der Schwammparenchymzellen durch Länge der Schließzellen) bei jungen Zuckerrüben, die in Einzeltöpfen gemeinsam in zufälliger Anordnung aufgezogen wurden

Stamm	Pflanzenzahl	Wurzel g	Blatt g	Zellgrößenindex
A	98	27,9	59,6	1,92
B	100	11,2	44,6	2,00
A × B	100	36,9	84,8	1,94

Es gibt daher keinen Grund anzunehmen, die Heterosis beeinflusse den Endopolyploidiegrad und damit die Zellgröße. Wenn also eine Selektion auf kleinere Zellen die Leistung von Tetraploiden verbessert, geschieht das wahrscheinlich auch nicht auf dem Wege einer höheren Heterosis, sondern mit Hilfe von Allelen, die homozygot (oder, falls dominant, auch heterozygot) keinen höheren Endopolyploidiegrad erlauben.

Bisher wissen wir allerdings nur, daß die kleinerzelligen, weniger hoch endopolyploiden tetraploiden Zuckerrüben mehr leisten, wenn sie in einer Population zusammen mit höher endopolyploiden Pflanzen vorkommen. Es muß sich erst zeigen, wie stark die Selektion auf weniger hoch endopolyploide Pflanzen auch die Leistung ganzer tetraploider Stämme erhöht. Zwischen den Pflanzen verschiedener Endopolyploidiegrade wird Konkurrenz herrschen, ähnlich wie es zwischen den Pflanzen verschiedener meristematischer Ploidiestufen (Knapp und Laube 1969,

dort weitere Literatur) und zwischen Euploiden und Aneuploiden (Butterfaß 1967, Lichter 1967, 1968) der Fall ist. Dadurch erscheinen uns die Leistungsunterschiede in den Populationen höher als sie beim Vergleich von sortierten Beständen zu beobachten wären.

Frau Gisela Weinmann danke ich herzlich für gewissenhafte technische Hilfe.

Zusammenfassung

Ein verbessertes Verfahren zur Selektion auf niedrigen Endopolyploidiegrad in Zuckerrübenblättern durch Bonitur der Chloroplastenzahlen in Schwammparenchymzellen wird angegeben. Die bessere Leistungsfähigkeit der kleinzelligen (d. h. weniger hoch endopolyploiden) tetraploiden Zuckerrüben in den Populationen beruht nicht auf stärkerer Heterozygotie dieser Pflanzen.

Literatur

1. Butterfaß, Th.: Die Abhängigkeit der Plastidenvermehrung von der Reproduktion der Erbsubstanz im Kern.

Ber. dt. bot. Ges. **76**, 123–134 (1963). — 2. Butterfaß, Th.: Die Chloroplastenzahlen in verschiedenartigen Zellen trisomer Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L.). Z. Bot. **52**, 46–77 (1964). — 3. Butterfaß, Th.: Der Endopolyploidiegrad als neuer Aspekt der Polyploidiezüchtung. Züchter **35**, 293–296 (1965). — 4. Butterfaß, Th.: Endopolyploidie und Ertrag bei diploiden und tetraploiden Zuckerrüben. Züchter **36**, 297–302 (1966). — 5. Butterfaß, Th.: Wettbewerb zwischen eu- und aneuploiden Zuckerrüben im gemeinsamen Bestand. Naturwissenschaften **54**, 290 (1967). — 6. Butterfaß, Th.: Endopolyploidie und Ertrag bei diploiden und tetraploiden Zuckerrüben. II. Theor. appl. Genet. **38**, 294–297 (1968). — 7. Fox, D. P.: Some characteristics of the cold hydrolysis technique for staining plant tissues by the Feulgen reaction. J. Histochem. Cytochem. **17**, 266–272 (1969). — 8. Knapp, E., Laube, H.-A.: Über die Konkurrenzbeziehungen zwischen Diploiden, Triploiden und Tetraploiden und deren Einfluß auf die Leistungen einer anisoploiden Zuckerrübenpopulation. Z. Pflanzenzüchtg. **62**, 105–128 (1969). — 9. Lichter, R.: Konkurrenzbeziehungen zwischen eu- und aneuploiden Pflanzen in tetraploiden Zuckerrübenpopulationen. Zucker **20**, 351–355 (1967). — Lichter, R.: Über das Ausmaß der Konkurrenz in diploiden und tetraploiden Zuckerrübenpopulationen. Arb.gem. Biometrie i. d. Pflanzenzüchtg., Rundschr. **1**, 17–22 (1968).

Eingegangen am 24. Juni 1971

Angenommen durch H. Stubbe

Professor Dr. Th. Butterfaß

Max-Planck-Institut

für Pflanzengenetik

D-6802 Ladenburg, Rosenhof (Germany/BRD)