

## Colchicinversuche an *Larix decidua* Miller und *Picea Abies* (L.) Karst.

Von ZOE MARIA ILLIES

(Eingegangen am 14. 10. 1951)

Seit NILSSON-EHLE (1936) die erste triploide Aspe fand und über ihre züchterische Bearbeitung berichtet wurde (BERGSTRÖM 1940), sind von verschiedener Seite Versuche mit Colchicin an Forstpflanzen zur Herstellung künstlicher Polyploider unternommen worden. Die ausführlichsten Ergebnisse über den Erfolg solcher Colchicinierungen liegen bisher von JOHNSSON (1950) an *Alnus* vor. Er berichtet bei *Alnus glutinosa* über eine 9jährige C<sub>3</sub>-Generation (C<sub>3</sub>-Generation = die mit Colchicin behandelte Generation, JOHNSSON [1950]) und eine 1jährige, triploide C<sub>3</sub>-Nachkommenschaft aus der Kreuzung zwischen dieser C<sub>3</sub> und einer diploiden Form. Die triploide C<sub>3</sub> zeichnet sich besonders durch größeres Wachstum und größere Blätter aus. Andere Autoren beschreiben die Methode der Colchicinbehandlung und das Aussehen der erhaltenen Keimlinge sowie deren Zytologie (MIROW und STOCKWELL 1939; JOHNSSON und EKLUNDH 1940; JENSEN und LEVAN 1941; KIELLANDER 1946, 1949, 1950; MEYER, H. 1951). W. v. WETTSTEIN (1940) weist auf die Möglichkeiten der Polyloidiezüchtung hin und erwähnt kurz ähnliche Versuche in Müncheberg. Individuen mit spontan entstandenen, aberranten Chromosomensätzen untersuchten ANDERSSON (1947) bei *Picea Abies* (L.) KARST. und EKLUNDH (1949) bei *Ulmus glabra* Huds. SYRACH-LARSEN und WESTERGAARD (1938) beschrieben einen triploiden Lärchenbastard. Über triploide *Betula alba* L. wird von JOHNSSON (1944) und über eine 56- bis 58jährige *Larix decidua* MILL. mit tetraploidem Chromosomensatz von CHRISTIANSEN (1950) berichtet. Über mehrjährige, noch nicht blühende, experimentell hergestellte C<sub>3</sub>-Fichten und C<sub>0</sub>-Lärchen und über spontan entstandene, triploide Fichten schreibt KIELLANDER (1950). Er schließt im Gegensatz zu MIROW und STOCKWELL (1939) und JENSEN und LEVAN (1941), die die gesamten colchicinierten Sämlinge fixierten und zytologisch untersuchten, nach morphologischer Auslese und zytologischer Untersuchung der Wurzelspitzen auf die Polyploidie des Sprosses.

Eigene Colchicinversuche mit *Picea Abies* (L.) KARST., *Larix decidua* Mill. und *Larix leptolepis* (SIEB. und ZUCC.) GORD. wurden im Frühjahr 1949 am hiesigen Institut begonnen. In der vorliegenden Arbeit sollen die ersten zytologischen Untersuchungen der C<sub>0</sub>-Generation beschrieben werden. Samen von *Larix decidua*, *Larix leptolepis* und *Picea Abies* wurden 2 bis 25 Tage lang zwischen mit Colchicinlösung verschiedener Konzentration (0,1, 0,2, 0,4 und 0,5%) getränkten Fließpapier scheiben in Petrischalen gelegt. Das Fließpapier wurde täglich mit der erstmalig angewandten Colchicinlösung neu befeuchtet, um eine Austrocknung zu verhindern. Je nach der Behandlungsdauer waren die Samen nach Abschluß des Versuches nur angequollen oder in verschiedenen Keimstadien. Die Versuche wurden unabhängig von der Jahreszeit im Gewächshaus vorgenommen. Die hierbei beschriebenen Pflanzen sind alle aus verschiedenen Versuchsserien hervorgegangen. Beziehungen zwischen der Länge und Stärke der Behandlung einerseits und der Anzahl der Polyploiden andererseits konnten nicht festgestellt wer-

den. Nach Abschluß der Colchicinbehandlung wurden die Samen bzw. Keimlinge abgespült, in Handkästen ausgelegt, später im Gewächshaus verschult, bei gerade noch frostfreier Temperatur überwintert und im Frühjahr 1950 ins Freie gebracht. Viele Keimlinge hatten das für die C<sub>0</sub>-Pflanzen typisch rübenförmig verdickte Hypokotyl und angeschwollene Wurzeln. Die Kotyledonen waren z. T. stark keulenförmig verdickt (Abb. 1). Viele der an-

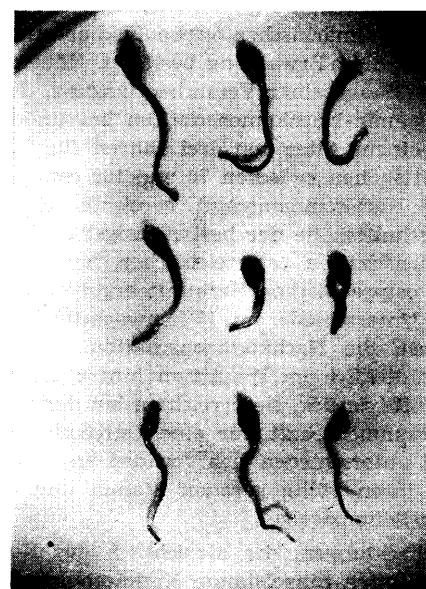


Abb. 1. C<sub>3</sub>-Keimlinge von *Larix species*, untere Reihe Kontrolle. Phot. GREHN.

fänglich deformierten Pflanzen wuchsen im Laufe der Entwicklung normal weiter, andere zeigten kürzere, dicke Nadeln von dunklerem Grün. Teilweise waren die Keimpflanzen in der Wurzel so stark geschädigt, daß sie abstarben. Das lebensfähige Material wurde laufend weiter beobachtet. Vom Durchschnitt der Kontrolle abweichende Individuen, etwa solche mit verzögertem Wachstum, wurden ausgewählt. Soweit sich normale Seitentriebe bildeten, wurden diese entfernt.

Von den 2jährigen Pflanzen wurden im Frühjahr 1951 kurz nach dem Austrieb Knospen, junge, bis zu 5 mm lange Nadeln und Wurzelspitzen sowie in einigen Fällen im Juli noch einmal Knospen des Johannistriebes in Alkohol-Eisessig (3:1) fixiert und davon Quetschpräparate in Karminessigsäure hergestellt. Die Chromosomenzahlen wurden unter Benutzung des ABBE'schen Zeichenapparates bei 950facher Vergrößerung (1/12a Ölimmersion, Okular 10 X) festgestellt.

Unter dem behandelten Material fanden sich bisher 2 *Larix decidua* (C, 97; C<sub>0</sub> 125), die in den Wurzelspitzen und Knospen tetraploid oder mixoploid mit z. T. offensichtlich unvollständigen Genomen waren (Abb. 2 bis 5). Außerdem waren 2 *Larix decidua* (C, 35; C, 126)

in den Wurzeln tetraploid, während der Sproß nach Untersuchung verschiedener Knospen erster und zweiter Ordnung diploide Zellen hatte (Abb. 5). Der Habitus einer anderen *Larix decidua* ( $C_0$  61) war dem der  $C_0$  125

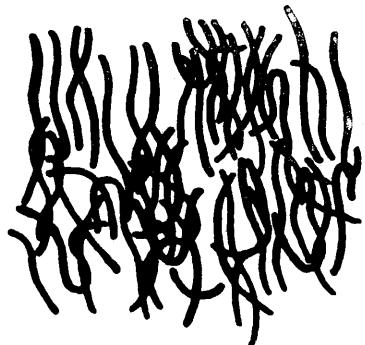


Abb. 2.  $C_0$ -125, *Larix decidua* tetraploid. Tetraploide Zelle aus der Wurzelspitze.



Abb. 3.  $C_0$ -125, *Larix decidua* tetraploid. Tetraploide Zelle der Sproß-Spitze, nahezu sämtliche Chromosomen in optischer Bildebene. Phot. GREHN.

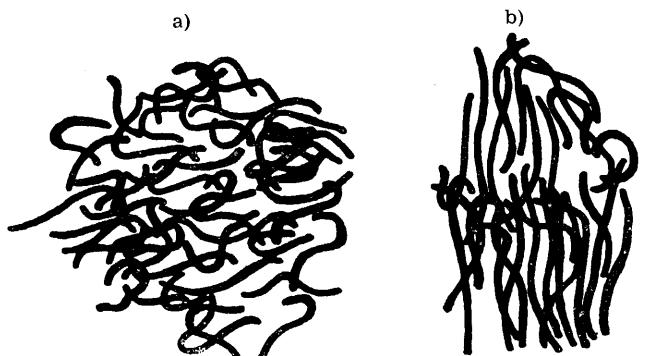


Abb. 4.  $C_0$ -97, *Larix decidua* mixoploid. a) tetraploide und b) diploide Zelle in einer Nadelbasis des Johannistriebes.

10  $\mu$



Abb. 5.  $C_0$ -35, *Larix decidua* diploid. a) Zelle des diploiden Sprosses, b) Zelle einer tetraploiden Wurzelspitze.



Abb. 6. Habitus der  $C_0$ -Lärchen und Kontrolle. Phot. GREHN. (Von links nach rechts:  $C_0$  125;  $C_0$  97;  $C_0$  61; Kontr.)

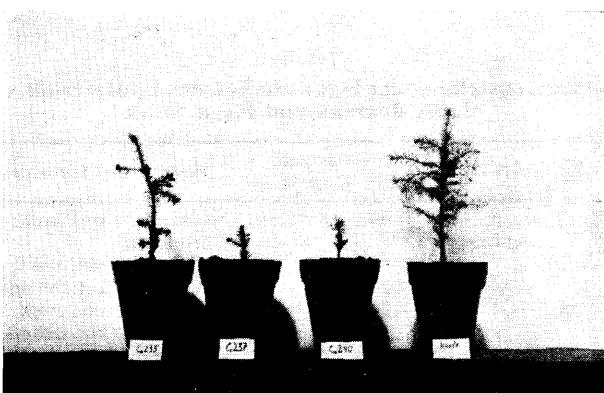


Abb. 7. Habitus der  $C_0$ -Fichten und Kontrolle. Phot. GREHN. (Von links nach rechts:  $C_0$  235;  $C_0$  237;  $C_0$  240; Kontr.)

(tetraploid) sehr ähnlich, hatte aber in allen untersuchten Geweben nur diploide Zellen (Abb. 6). Unter dem Fichtenmaterial fielen 3 Fichten durch ihre kurzen, dicken, dunkelgrünen Nadeln auf ( $C_0$  235;  $C_0$  237;  $C_0$  240) (Abb. 7). Sie erwiesen sich wie die Lärchen ebenfalls als tetraploid bzw. mixoploid (Abb. 8 und 9). Bei  $C_0$  240 ist besonders zu erwähnen, daß ein im zweiten Jahr neben dem bisher als polyploid angesehenen kurznadeligen Trieb gebildeter normaler Sproß ebenfalls mixoploid war. Eine Zusammenstellung der ausgelesenen Typen enthält Tabelle 1.

Betrachtet man diese Ergebnisse, so kommt man zu der Feststellung, daß sehr vielseitige Untersuchungen nötig sind, um ein klares Bild über die chromosomal Verhältnisse in den einzelnen Pflanzen zu erhalten. Daß man die Auslese z. B. nicht allein nach morphologischen Gesichtspunkten vornehmen kann, zeigen die beiden Pflanzen  $C_0$  240 (Fichte) und  $C_0$  61 (Lärche). Bei den Fichten unterscheiden sich zwar anscheinend die polyploiden Pflanzen deutlich morphologisch von den diploiden, worauf KIELLANDER (1950) bereits hinwies, aber der morphologisch „diploide“ Trieb der  $C_0$  240 (Fichte), der sich ebenfalls als mixoploid erwies, mahnt



Abb. 8. C<sub>0</sub>-237, *Picea Abies* mixoploid. Tetraploide (links) und diploide (rechts) Zelle in zusammenhängendem, mixoploidem Gewebe (Johannistrieb). In optischer Bildebene nahezu alle Chromosomen sichtbar. Phot. GREHN.

Tabelle 1  
Zusammenstellung der Eigenschaften des C<sub>0</sub>-Materials von *Larix decidua* und *Picea Abies*

Lfd. Nr.	Art	Chromosomenzahl d. Wurzel	Chromosomenzahl d. Sprosses	Habitus des Sprosses
C <sub>0</sub> 97	<i>Larix decidua</i>	2 n = 48	2 n = 24 2 n = 48	Nadeln kurz und breit, dunkelgrün
C <sub>0</sub> 125		2 n = 48	2 n = 48	Nadeln kurz und breit, graugrün, locker stehend
C <sub>0</sub> 61		2 n = 24	2 n = 24	Nadeln kurz und breit, graugrün, locker stehend
C <sub>0</sub> 35		2 n = 48	2 n = 24	keine besonderen Merkmale im 2. Jahr
C <sub>0</sub> 126		2 n = 48	2 n = 24	keine besonderen Merkmale im 2. Jahr
C <sub>0</sub> 235	<i>Picea Abies</i>	— *)	2 n = 48	dunkelgrüne, kurze und spitze Nadeln
C <sub>0</sub> 237		— *)	2 n = 48 2 n = 24	dunkelgrüne, kurze und spitze Nadeln
C <sub>0</sub> 240		2 n = 48	2 n = 48 2 n = 24	1 Trieb mit kurzen und spitzen, dunkelgrünen Nadeln, 1 Trieb mit normalen Nadeln. Beide mixoploid.

\*) Zur Fixierung waren zu wenig Wurzeln vorhanden.

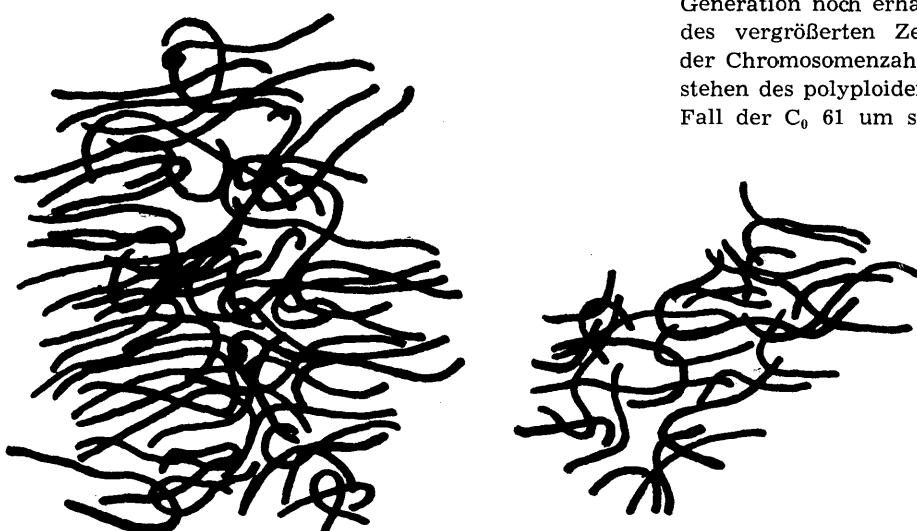


Abb. 9. C<sub>0</sub>-237, vollständige tetraploide Chromosomenzahl (links) und vollständige diploide Chromosomenzahl (rechts) der Zellen aus Abb. 8. (Maßstab für Chromosomengröße [10 μ] siehe Abbildung 4.)

zur Vorsicht. Die Notwendigkeit zytologischer Untersuchungen zeigt ebenfalls der „polyploide“ Habitus der C<sub>0</sub> 61, deren Sproß diploid befunden wurde. Diese Diskrepanz zwischen dem morphologischen und zytologischen Bild bietet verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits besteht die Möglichkeit, daß bei dem mixoploiden Charakter der Pflanzen der Habitus von dem jeweils überwiegenden Anteil des diploiden Gewebes bestimmt wird. In den morphologisch „diploiden“ Trieben wäre demnach der Anteil des diploiden Gewebes stärker, in den morphologisch „polyploiden“ Trieben dagegen der Anteil des tetraploiden. Der „polyploide“ Habitus der diploiden C<sub>0</sub> 61 (Lärche) und die Beobachtung von Zellen mit offensichtlich unvollständigen Genomen in den mixoploiden Geweben legt aber auch den Gedanken nahe, daß sich die bei der zytologischen Untersuchung schon 2jährige Pflanze im Laufe dieser Zeit wieder „herabreguliert“, aber damit noch nicht wieder den normalen Habitus angenommen habe. Ähnliche Beobachtungen machte HERTZSCH (1951) an der herabregulierten C<sub>1</sub> einer *Vicia villosa* (Zottelwicke) bei somatischem und generativem Gewebe. Er weist auf das bedeutend größere Zellvolumen hin, welches auch nach der Herabregulierung der Chromosomenzahl in der nächsten Generation noch erhalten blieb. Eine solche Beibehaltung des vergrößerten Zellvolumens nach Herabregulierung der Chromosomenzahl und das dadurch bewirkte Fortbestehen des polyploiden Habitus wäre in dem vorliegenden Fall der C<sub>0</sub> 61 um so erklärlicher, als es sich dabei im

Unterschied zu dem Fall *Vicia villosa* um ein und dasselbe Individuum handelt, denn die Erhaltung des polyploiden Charakters wäre nicht wie dort durch einen generativen Vorgang unterbrochen. Andererseits weisen aber zur Zeit laufende Untersuchungen darauf hin, daß nicht nur Genommutationen den kurznadeligen, dunkelgrünen Typ verursachen können. Daß auch zytologische Untersuchungen an Sprossen notwendig sind, wenn sich die Wurzeln als polyploid erwiesen haben, zeigen die beiden Lärchen C<sub>0</sub> 35

und  $C_0$  49, an welchen tetraploide Wurzeln festgestellt wurden. Diese beiden Pflanzen wurden im ersten Jahr nach morphologischen Gesichtspunkten als wahrscheinlich polyploid ausgelesen. Die Knospen im Frühjahr des zweiten Jahres waren hingegen diploid, wie auch der Habitus des im zweiten Sommer gebildeten Sprosses keinerlei morphologische Anhaltspunkte für Polyploidie mehr gab. Die Beobachtung KIELLANDERS (1950) bedürfte daher wohl noch ergänzender Untersuchungen, besonders da auch verschiedene andere Autoren (GEITLER 1939) auf die Möglichkeiten hingewiesen haben, daß zu einem gewissen Prozentsatz an diploiden krautigen Pflanzen tetraploide Wurzeln vorkommen. Wie weit dies auch für Nadelbäume zutrifft, wäre noch festzustellen. Überhaupt muß die Verteilung der polyploiden und diploiden Gewebe innerhalb jeder Pflanze verschieden sein. Es werden je nach dem, auf welche Zellen des Embryo oder Keimlings das Colchicin gewirkt hat, Periklinal- oder Sektorialchimären entstehen.

Diese Einschränkungen zeigen, daß man die Untersuchungen so vielseitig wie möglich vornehmen muß. Um das Material einzuengen, eignet sich die Vorauslese nach morphologischen Gesichtspunkten. Es muß aber darauf geachtet werden, daß dabei eine gewisse Vielfalt der Formen erhalten bleibt, auf die Gefahr hin, damit auch Genmutationen erfaßt zu haben. Die zytologischen Untersuchungen wurden im hier vorliegenden Fall erst nach Abschluß des zweiten Jahres durchgeführt, um die einjährigen Pflänzchen noch zu schonen. Es ist aber angezeigt, diese Untersuchungen evtl. schon früher vorzunehmen und die ausgelesenen polyploiden oder mixoploiden Pflanzen jeder  $C_0$ -Generation auch in den folgenden Jahren weiterhin zytologisch zu überwachen. Erschwerend ist allerdings die allgemeine Empfindlichkeit der einjährigen Pflänzchen durch die toxischen Nachwirkungen des Colchicins. Da sie außerdem häufig mixoploid sind, besteht die Gefahr, durch solche frühzeitigen Eingriffe, wie es die Gewebeentnahme zur Fixierung ist, gerade die polyploiden Pflanzenteile zu entfernen.

Mixoploidie und toxische Wirkung des Colchicins machen es auch erklärlich, daß ein Vergleich der  $C_0$ -Generation mit der diploiden Standardsorte keineswegs eine gültige Aussage über die Wirkung der Polyploidisierung zuläßt. Sie bedeutet nach den bisherigen Erfahrungen auch nicht bereits in ein und derselben Generation einen positiven Zuchterfolg, wie das von einigen Autoren erwartet wird (W. v. WETTSTEIN, 1940; MARQUARDT, 1950). Vielmehr kann die  $C_0$ -Generation nur die Aufgabe erfüllen, durch Selbstungen, Kreuzungen mit anderen  $C_0$ -Generationen oder mit diploiden und polyploiden Sorten entweder im günstigsten Falle eine Nutz- $F_1$  oder eine Basis für die weitere Züchtung zu schaffen.

### Zusammenfassung

Durch Samenbehandlung mit Colchicin an *Larix decidua*, *L. leptolepis* und *Picea Abies* entstanden Pflanzen mit tetraploidem Gewebe sowie aus tetraploiden und diploiden Geweben zusammengesetzte Chimären (Mixoploidie). Es wurden sowohl Sproß- wie Wurzelspitzen untersucht und tetraploide, mixoploide und normale diploide Lärchen festgestellt, die alle durch ihren von der Kontrolle abweichenden Habitus mit weniger, kürzeren und breiteren Nadeln aufgefallen waren. Auch Pflanzen mit tetraploiden Wurzeln an diploidem Sproß wurden gefunden. Sie bestätigen die Notwendigkeit, zytologische Untersuchungen nicht nur an Wurzelspitzen, sondern ebenfalls an Sproßteilen durchzuführen. Tetraploide und mixoploide  $C_0$ -Fichten fielen durch kürzere, dunklere Nadeln auf. Normal erscheinende Triebe an diesen  $C_0$ -Fichten erwiesen sich ebenfalls als mixoploid. Diese normalen Fichtentreibe sowie der bei Lärche gefundene „polyploide“ Habitus diploider Sprosse oder Sproßteile legen den Gedanken nahe, daß die bei der zytologischen Untersuchung schon 2jährigen Pflanzen ihre Chromosomenzahl im Laufe der Zeit wieder herabregulieren, aber noch nicht wieder ihren ursprünglichen Habitus angenommen haben. Es ist daher und wegen der Möglichkeit der Überwucherung polyploider durch diploide Gewebe eine dauernde zytologische Überwachung erforderlich. Abschließend wird auf die Möglichkeiten, die sich für die Forstpflanzenzüchtung aus der Anzucht einer  $C_0$ -Generation ergeben, hingewiesen.

### Literatur

- ANDERSSON, E.: A case of asyndesis in *Picea Abies*. *Hereditas* 33, 304—347 (1947). — BERGSTRÖM, I.: On the progeny of diploid  $\times$  triploid *Populus tremula* with special reference to the occurrence of tetraploidy. *Hereditas* 26, 191—201 (1940). — CHRISTIANSEN, H.: A tetraploid *Larix decidua* MILLER. *Det Kgl. Danske Vidensk. Selskab. Biol. Medd.* 18, Nr. 9 (1950). — EKLUNDH-EHRENBURG, C.: Studies on asynapsis in the elm *Ulmus glabra* Huds. *Hereditas* 35, 1—25 (1949). — GEITLER, L.: Das Wachstum des Zellkerns in tierischen und pflanzlichen Geweben. *Erg. Biol.* 18, 1—54 (1941). — HERTZSCH, W.: Beobachtungen an polyploiden *Vicia villosa*. *Z. Pflanzenzüchtg.* 30, 210—217 (1951). — JENSEN, H., and LEVAN, A.: Colchicine-induced tetraploidy in *Sequoia gigantea*. *Hereditas* 27, 222—224 (1941). — JOHNSSON, H.: Triploidy in *Betula alba* (L.). *Bot. Notiser* 1944, 85—86. — JOHNSSON, H.: On the  $C_0$  and  $C_1$  generation in *Alnus glutinosa*. *Hereditas* 36, 205—219 (1950). — JOHNSSON, H., och EKLUNDH, C.: Colchicinebehandling som metod vid växtförädling av lövträd. (Medd. fr. Fören. f. växtf. av skogsträd.) *Svensk Papperstidn.* 43, 373—377 (1940). — KIELLANDER, C. L.: Om barrträd förädling och barrträdssympning (mit engl. Zus.). (Medd. fr. Fören f. växtf. av skogsträd.) *Svensk Papperstidn.* 49 (1946). — KIELLANDER, C. L.: Demonstration of the Conifer Department. 8th Intern. Congr. Genetics. *Hereditas Suppl.* Vol. 1949. — KIELLANDER, C. L.: Polyploidy in *Picea Abies*. *Hereditas* 36, 513—516 (1950). — MARQUARDT, H.: Möglichkeiten der Forstpflanzenzüchtung. *Allg. Forst- und Jagdzeitg.* 121, 129—139 (1950). — MIROV, N. T., and STOCKWELL, P.: Colchicine treatment of pine seeds. *J. Heredity* 30, 389 (1939). — WETTSTEIN, W. v.: Wuchssteigerung durch Kombinationszüchtung und Chromosomenvermehrung. *Forstarch.* 17, 80 (1941).