

of seed size and seedling size to inherent vigor. Jour. Forestry 43, 131–137 (1945). — RIGTER, F. I.: Forest tree improvement research in California. Jour. Forestry 52, 680–682 (1954). — RIGTER, F. I.: Possibilities and limitations of hybridization in *Pinus*. pp. 54–63 in Proc. 3rd. South Conf. For. Tree Improvement, 132 pp. (1955). — RIGTER, F. I., and J. W. DUFFIELD: Interspecies hybrids in pines. Jour. Heredity 42, 75–80 (1951). — RIKER, A. J., T. F. KOUBA, W. H. BRENER and L. E. BYAM: White pine selections tested for resistance to blister rust. Jour. Forestry 41, 753–760 (1943). — RIKER, A. J., and R. F. PATTON: Breeding of *Pinus strobus* for quality and resi-

stance to blister rust. Univ. Wisc. Forestry Res. Notes 12, 2 pp. (1954). — SQUILLACE, A. E., and R. T. BINGHAM: Breeding for improved growth rate and timber quality in western white pine. Jour. Forestry 52, 656–661 (1954). — STOCKWELL, PALMER and F. I. RIGTER: Hybrid forest trees. pp. 465–472 in U. S. Dept. Agr. Yearbook 1943–1947, 944 pp. (1949). — VLOTEN, H. VAN: Jeugdgroei van nakomelingschappen uit kruisingen met *Leuce-populieren*, een generatieve toetsing van daarbij gebruikte ouders. T. N. O. Nieuws 99, 195–200 (1954). — WHALEY, W. GORDON: Heterosis. Bot. Rev. 10, 461–498 (1944).

(Aus der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Schmalenbeck)

## Veränderungen der Pollengröße bei Lärche nach Blütenbehandlung mit Colchicin

Von Z. M. ILLIES

(Eingegangen am 24. 4. 1956)

Im Gegensatz zu der Polyploidiezüchtung mit Colchicin bei krautigen Pflanzen hatte man bisher bei holzigen Gewächsen nach Colchicineinwirkung auf die diploiden, im Wachsen begriffenen Körperzellen mehrere Jahre lang abzuwarten, bis die so entstandenen mixoploiden Pflanzen ( $C_0$ -Generation) blühreif geworden waren und diploide Geschlechtszellen entwickelten. So konnten erst nach mehreren Jahren die erforderlichen Kreuzungen zur Erzeugung einheitlicher polyploider Pflanzen durchgeführt werden (ILLIES 1951/52, dort ausführliches Literaturverzeichnis). Nachfolgend wird bei *Larix leptolepis* der Versuch unternommen, die bisherige  $C_0$ -Generation dadurch entscheidend abzukürzen, daß inännliche Blüten während der Meiose colchiciniert wurden, um auf diese Weise un-reduzierten Pollen zu erhalten. Die  $C_0$ -Generation würde

dann nur auf die colchicinierten un-reduzierten Geschlechtszellen beschränkt bleiben, und die aus Kreuzungen mit diesen  $C_0$ -Pollen hervorgegangenen Nachkommen wären bereits die C<sub>1</sub>-Generation.

Die Versuche wurden an Blütenknospen von fünf Pflöpfingen von *Larix leptolepis* mit einer 0,2%igen warmen Colchicinlösung vorgenommen. Das Colchicin wurde auf 40°–60° C erwärmt, um das Diffundieren in die verharzte Knospe zu erleichtern. Als Zeitpunkt der Colchicineinwirkung auf die bis zu Beginn des Versuches normal im Freien überwinterten Pflöpfinge wurde der 15.3. gewählt, an dem durch Stichproben an Kontrollblüten festgestellt worden war, daß sich die Meiose in der Diakinese bis Interphase befand. Um das Colchicin direkt an die Blüten heranzubringen, wurde die von OLDEN (1954)

bei Kirsche und Apfel beschriebene Methode etwas abgewandelt angewendet<sup>1</sup>). Wie Abb. 1 zeigt, wurde dazu ein mit Blüten besetzter Zweig durch den durchbohrten Gummistopfen des Deckels eines Wirtschens Topfes gesteckt und der Zwischenraum zwischen Zweig und Gummistopfen gut mit Watte und Hahn Fett abgedichtet. An diesem Zweig wurde ein Reagenzglas mit warmer Colchicinlösung befestigt und in einem Becher in den Topf gestellt, dessen angeschliffener Deckel danach eben-

falls gut abgedichtet wurde. Das Absaugen der Luft geschah durch eine dem Topf angeschlossene Wasserstrahlpumpe. Da der Wasserdruck sehr wechselnd war, mußte von einer Überprüfung des Unterdrucks mittels Manometer abgesehen werden. Als Kriterium, daß das Colchicin in die Knospen eingedrungen war, wurde das erste Auftreten von Luftblasen genommen, was je nach der Stärke des Wasserdrucks nach 10 bis 30 Minuten eintrat. Von da an wurde noch 20 Minuten lang weiter abgesaugt. Nachdem der Unterdrucktopf abgebaut war, wurden die

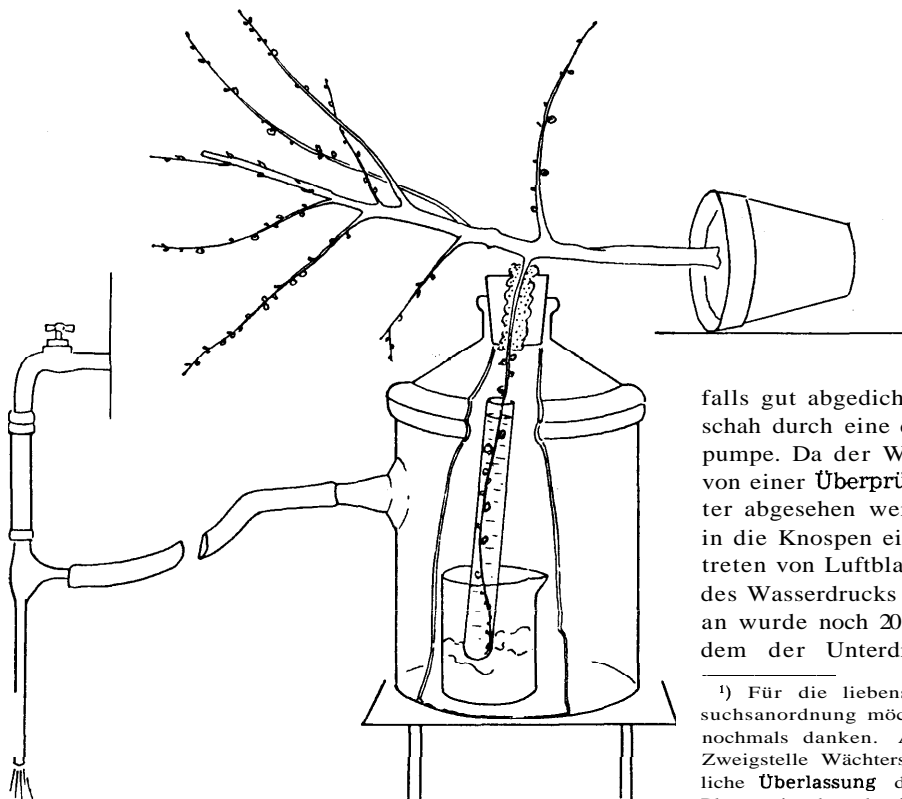


Abb. 1. — Versuchsanordnung.

<sup>1</sup>) Für die liebenswürdige ausführliche Mitteilung der Versuchsanordnung möchte ich Herrn Dr. OLDEN auf diesem Wege nochmals danken. Außerdem danke ich dem Leiter unserer Zweigstelle Wächtersbach, Herrn Dr. HEITMÜLLER, für die freundliche Überlassung des für die Versuchsanordnung benötigten Platzes in den dortigen Gewächshäusern, und Fräulein L. MAY für ihre unermüdliche Hilfe bei der Colchicinbehandlung.

Reagenzgläser mit der Colchicininlösung noch 12, 24 und 60 Stunden an den Blütenzweigen belassen. An einem Pfropfling wurde außerdem die Colchicininbehandlung ohne Vakuum ausgeführt, da die Lage der Blüten das Anbringen des Apparates nicht erlaubte. Die Zweige dieses Pfropflings wurden dafür länger, nämlich 5½ Tage, in der Colchicininlösung belassen. Nachdem die Behandlung bei allen Pfropflingen nach 5–6 Tagen abgeschlossen war, hatten sie durch die Wärme im Gewächshaus ausgetrieben. Um die Entwicklung nicht weiter zu beschleunigen, wurden sie, vor Nachfrösten geschützt, in ein ungeheiztes Glashaus gestellt. Im ganzen wurden 33 ♂ Blütenknospen colchiciniert und 10 weitere als Kontrollen unbehandelt gelassen. Außerdem befanden sich an den Zweigen noch 10 ♀ Blüten, die aber offensichtlich infolge der Colchicininbehandlung ihr Wachstum einstellten und alle bis auf eine abstarben, während sich die ♂ Blüten gut weiter entwickelten.

Um wenigstens einen Anhalt über den Meioseverlauf in den so behandelten Blüten zu bekommen, wurden 6 Tage nach der Colchicineinwirkung von einigen Blüten Antheren abgenommen und zytologisch untersucht. Dabei wurden an 2 Männchen neben normal haploiden auch diploide Pollenmitosen gefunden (Abb. 2). In allen anderen Fällen war die Pollenbildung schon beendet. Eine Ausdehnung dieser Untersuchung auf weitere Blütenproben mußte leider unterbleiben, weil das behandelte Material nicht umfangreich genug war, und das Schwergewicht auf die Untersuchung des fertigen Pollens gelegt werden sollte.

Die ersten colchicinierten ♂ Blüten und die Kontrollen begannen 13 Tage nach der Behandlung zu stäuben. Sie wurden sofort einzeln in Gläschen mit durchbohrten Stopfen geerntet und in einem Exsiccator kühl aufbewahrt. Diese Blüten unterschieden sich morphologisch in keiner Weise von den unbehandelten Kontrollen. Erst neun Tage später wurden die restlichen behandelten Blüten abgenommen. Bei diesen war das Stielchen sehr lang, die Antheren standen locker und waren trocken und gelb, ohne aber zu stäuben. Unter der Lupe ließen sich die Antheren leicht öffnen und der Pollen als ein Klümpchen herausnehmen. Dieser Pollen war deutlich dunkler gefärbt als der auf den neun Tage vorher von selbst ausgestäubten Blüten.

Um etwas über die Wirkung der Colchicininbehandlung auf die Lärchenblüten aussagen zu können, wurden so-

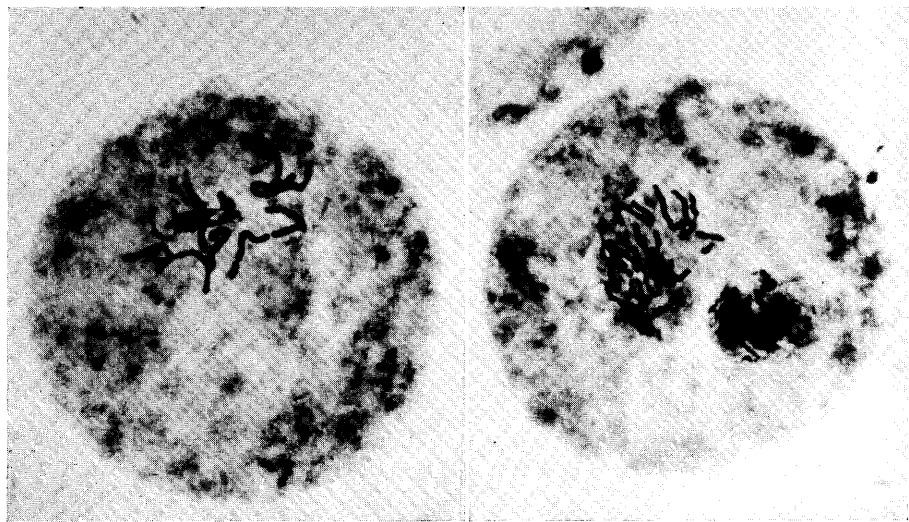


Abb. 2. — Links: haploide, — rechts: diploide Pollenmitose aus einer colchicinierten Blüte. Gleiche Vergrößerung.

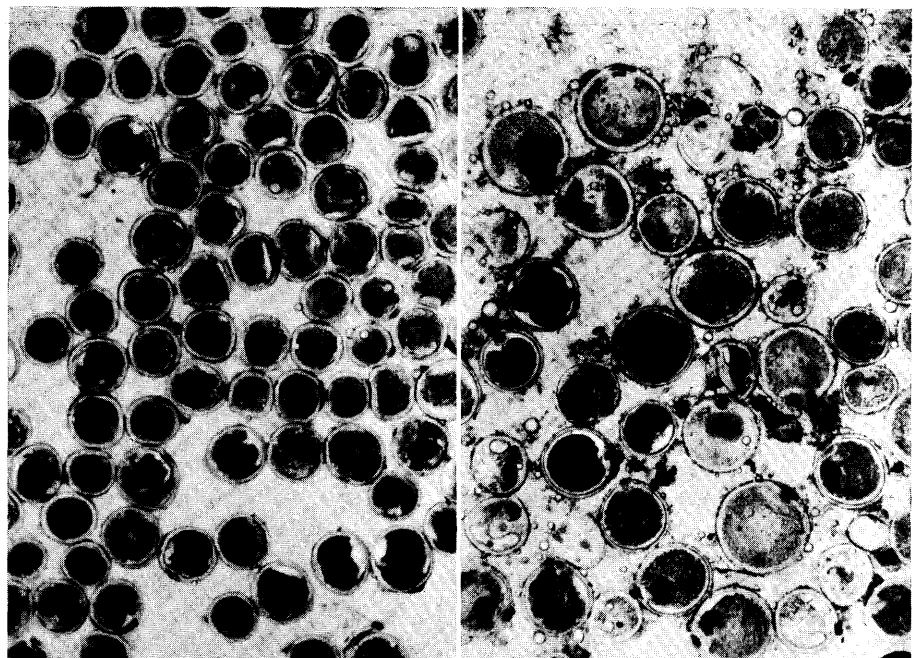


Abb. 3. — Links: Pollen unbehandelter, — rechts: Pollen colchicinierten Blüten. Gleiche Vergrößerung.

wohl der fertige Pollen der colchicinierten als auch der unbehandelten Blüten näher untersucht. Da das Stadium der Meiose zum Zeitpunkt der Colchicininbehandlung nur durch Stichproben festgestellt werden konnte und erfahrungsgemäß in den einzelnen Blüten variiert, wurden diese Untersuchungen für jede Blüte einzeln durchgeführt. Der geerntete Pollen wurde dabei zunächst auf den Objektträger gebracht und unter dem Deckglas mit Karminessigsäure gefärbt. Nach einer Stunde ließ sich der gesunde, gutgefärbte Pollen leicht von deutlich schlecht gefärbten Pollen unterscheiden (Serrz 1952/53). Der Pollen behandelter Blüten erwies sich dabei in Größe und Färbung ungleichmäßiger als jener der Kontrollen (Abb. 3). An diesen Pollenproben wurden sodann Messungen durchgeführt, wobei der Durchmesser von 150–200 gut gefärbten, voll turgeszenten Pollen je Blüte mit dem Okularmikrometer bei 270facher Vergrößerung bestimmt wurde. Um Fehlerquellen durch individuelle Beurteilung

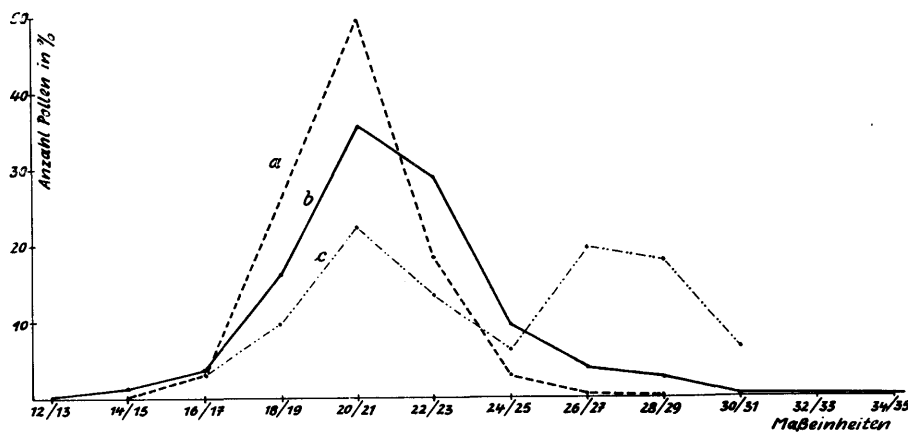


Abb. 4. Prozentuale Verteilung des Pollendurchmessers. — a: Kontrollen, — b: colchicinierte Pollen, — c: Pollendurchmesser in einer einzelnen colchicinierten Blüte.

sowie geringe Vergrößerungsunterschiede in der Optik zu vermeiden, wurden alle Messungen von einer Person sowie mit ein und demselben Mikroskop durchgeführt. Bei der Auswertung der so gewonnenen Ergebnisse wurden alle Werte der colchicinierten Blüten denen der unbehandelten Kontrollblüten gegenübergestellt. Eine Trennung der  $C_0$ -Blüten nach den verschiedenen Erntedaten erwies sich als unnötig, da der Pollen aus den am 26./27. 3. und am 5. 4. geernteten Blüten hinsichtlich seiner Größenvariation übereinstimmte. Ebenso konnte von der Voraussetzung ausgegangen werden, daß andere Außeneinflüsse, wie die verschiedene Stellung und Beleuchtung der einzelnen Blüten, die Stellung der einzelnen Antheren innerhalb der Blüten u. a. (ANDERSSON 1954) bei behandelten wie unbehandelten Blüten dieses Klones in gleicher Weise wirksam waren, so daß sie nicht weiter beachtet zu werden brauchten.

Wie bereits aus dem mikroskopischen Bilde ersichtlich (Abb. 3), variiert der Durchmesser des in den colchicinierten Blüten entstandenen Pollens sehr viel stärker als der der Kontrollen. Er beträgt bei ersteren zwischen 12 und 34 Maßeinheiten, bei letzteren nur zwischen 15 und 28. Die Verteilungskurven lassen diese Unterschiede ebenfalls deutlich erkennen (Abb. 4). In Abb. 4a+b ist die durchschnittliche Häufigkeit von je 150–200 Pollendurchmessern pro Blüte aus unbehandelten (4a) sowie behandelten (4b) Blüten abgebildet, während Abb. 4c die Unregelmäßigkeit der Pollengröße an einer besonders charakteristischen Verteilungskurve einer einzelnen colchicinierten Blüte noch deutlicher wiedergibt, als dies bei der Gesamtverteilungskurve zum Ausdruck kommt. Außer dem bei allen drei Kurven bei 20/21 Maßeinheiten liegenden Gipfel ist hier noch ein zweiter bei 27/28 Maßeinheiten festzustellen, der erst am rechten Rande der normalen Verteilungskurve der Kontrollen liegt.

Um diese Beobachtungen noch weiter zu erhärten, wurde ein rechnerischer Vergleich angestellt, zu dem die Maßeinheiten in je zwölf Gruppen zusammengefaßt wurden. Im  $\chi^2$ -Test (MATHER 1955) erhält man dann ein  $\chi^2$  von 518,7424 bei 11 Freiheitsgraden. Der Erwartungswert bei vorgegebener Überschreitungswahrscheinlichkeit 0,001 beträgt dagegen nur 31,264. Dieses Ergebnis kann also bei zufälliger Probenahme nur mit einer Wahrscheinlichkeit auftreten, die um ein Vielfaches kleiner ist als 0,1%, so daß daraus zu ersehen ist, daß die Abweichung der Werte

dieser verschiedenen Pollensorten voneinander hochsignifikant ist und in ursächlichem Zusammenhang mit der Colchicinbehandlung steht. Ähnliche Erscheinungen nach Colchicinbehandlung u. a. künstlichen und natürlich vorkommenden Einwirkungen auf die Reduktionsteilung wurden bereits von anderer Seite an forstlichen Objekten beobachtet (CHIBA und WATANABE 1952; JOHNSON und EKLUNDH 1940; ANDERSSON 1947; EKLUNDH-EHRENBURG 1949; IWAKAWA und CHIBA 1952; MÜNTZING 1936; SEITZ 1952/53, 1954; WETTSTEIN und NIKLAS 1955).

Da in vorliegendem Versuch bei den zytologischen Untersuchungen des Pollens behandelte Blüten diploide und haploide Pollenmitosen (s. Abb. 2) gefunden wurden, ist die Annahme berechtigt, daß es sich bei den großen Pollenkörnern ganz allgemein um diploide handelt. Da ferner die in den Kurven dargestellten Pollendurchmesser nur an gut gefärbten Pollen festgestellt wurden, ist anzunehmen, daß diese lebens- und keimfähig sind. Eine Auszählung der guten gefärbten sowie der deformierten, ungefärbten Pollen ergab bei den Kontrollblüten 4,2% schlechten : 95,8% gesunden, bei den colchicinierten Blüten dagegen 44,5% schlechten : 55,5% gesunden Pollen. Man kann daraus in etwa auf die Keimfähigkeit des colchicinierten Pollens schließen.

Zur Überprüfung der Keimfähigkeit wurden mit den restlichen Pollenproben, die im Exsiccator im Eisschrank aufbewahrt waren, im Juni noch Pollenkeimversuche durchgeführt. Obgleich diese Untersuchungen im Brutschrank vorgenommen wurden, keimte sowohl der Pollen der Kontrollen wie der colchicinierten Blüten um diese Jahreszeit nicht mehr, oder doch so langsam, daß die Proben verpilzten, ehe Pollenschläuche beobachtet werden konnten.

Über die Valenzstufe der offensichtlich zurückgebliebenen sowie der ungefärbten, nicht turgeszenten, wahrscheinlich abortierten Pollenkörner kann nichts ausgesagt werden. Da aber bei früheren Versuchen, die somatische Entwicklung von Keimlingen mit Colchicin zu beeinflussen (ILLIES 1953), ziemlich regelmäßig auch aneuploide Zellen festgestellt wurden, die jedoch durch Jahre hindurch und auch an den Pflöpfingen der  $C_0$ -Pflanzen mit annähernd der gleichen Chromosomenzahl auftraten, besteht die Möglichkeit, daß es sich um aneuploiden, degenerierten Pollen handelt. Hinweise für die Degeneration aneuploiden Pollens und dadurch herabgesetzte Fertilität von Pollen unterschiedlicher Valenzstufen fand auch EKLUNDH-EHRENBURG (1949) bei Kreuzungen zwischen asynaptischen und normalen Ulmen. In diesem Zusammenhang kann auch die Beobachtung „unvollständigen“ Pollens neben Gigasporen nach Hitzebehandlung während der Meiose durch CHIBA und WATANABE (1952) genannt werden. Die Feststellung, ob auch ein Teil des gesunden Pollens aneuploid und in der Lage ist, sich an der Befruchtung mit oder ohne Erfolg zu beteiligen, muß einem vorgesehenen Kreuzungsversuch mit colchiciniertem Pollen und der Untersuchung der daraus entstandenen Nachkommenchaften vorbehalten bleiben.

## Zusammenfassung

Blüten von *Larix leptolepis* wurden während der Meiose colchiciniert, um auf diese Weise die Reduktionsteilung zu unterbinden und zu diploiden Geschlechtszellen zu kommen. Gegenüber dem bisherigen Verfahren, durch Colchiciniierung wachsender Körperzellen mixoploide Pflanzen zur Erzeugung diploider Geschlechtszellen zu erhalten, besteht Aussicht Zeit zu sparen, denn das bisher erforderliche Warten auf den Eintritt der Blühwilligkeit, das bei den Holzgewächsen mehrere Jahre beträgt, entfällt. Aus den Kreuzungen mit den erhaltenen unreduzierten Geschlechtszellen wären noch im gleichen Jahre polyploide Nachkommen zu erwarten. Zu diesem Zweck wurden die Blüten eines Zuchtbaumklones während der Diakinese bis Interphase mit warmer 0,2%iger Colchicininlösung im Unterdruck behandelt. Untersuchungen der Pollenmitose ergaben haploide und diploide Chromosomenzahlen. Außerdem wurden vergleichende Durchmessermessungen an Pollen unbehandelter und colchiciniert-er Blüten durchgeführt. Für die Pollen der unbehandelten Blüten ergaben sich danach eingipflige Verteilungskurven der Durchmesser von 15 bis 28 Maßeinheiten, während die Pollendurchmesser der colchicinierten Blüten zum Teil zweigipflige Verteilungskurven bildeten und eine Variationsbreite von 12 bis 34 Maßeinheiten hatten. Die statistische Sicherung dieser Variation der Pollendurchmesser wurde mit dem  $\chi^2$  Test nachgewiesen, der ein  $\chi^2$  von 518,7424 ergab.

## Summary

Title of the paper: *Variation in the size of pollen of Larix leptolepis after colchicine treatment of the flowers.* —

Flowers of *Larix leptolepis* were treated with colchicine during meiosis to obtain unreduced diploid germ cells. After this treatment only the germ cells will represent the mixoploid  $C_0$ -generation which might result in a saving of time in contrast to the former colchicine treatment of vegetative cells of seedlings and the wait necessary until these  $C_0$ -plants flower. In woody plants this can amount to several years. Following this colchicine treatment of the flowers polyploid progenies could be expected from crossings with these unreduced gamete cells. For this purpose flowers from grafts of a plus tree were treated during meiosis with a warm solution of 0,2% colchicine in a partial vacuum during the diakinesis — interphase. Investigations of the pollen grain at mitosis showed haploid and diploid chromosome numbers. Later comparative measurements of pollen diameter were made from treated and untreated flowers. The variation of the pollen diameter of the untreated flowers followed a single peaked binomial curve between 15 and 28 units of diameter, while the pollen diameter of the colchicine treated flowers showed a double peaked curve and a variation in diameter of between 12 and 34 units. This difference were statistically significant ( $\chi^2 = 518,7424$ ).

## Résumé

Titre de l'article: *Variations des dimensions du pollen de Larix leptolepis après traitement des fleurs à la colchicine.* —

On a traité les fleurs de *Larix leptolepis* pendant la méiose pour obtenir des cellules génitales diploides n'ayant pas subi la réduction chromatique. Par ce type de traitement, seules les cellules génitales représentent la  $C_0$ -génération mixoploïde, alors que les autres types de traitement à la colchicine, portent sur les cellules végétatives de jeunes semis; on espère donc gagner du temps en évitant d'attendre, comme on doit le faire jusqu'ici, que les plants traités fleurissent. Par des croisements faits avec ces cellules génitales non réduites on pourrait avoir dans la même année des descendants polyploïdes purs. Dans ce but, on a traité les fleurs de greffes d'un arbre plus pendant la méiose, de la diakinese jusqu'à l'interphase, avec une solution chaude de colchicine à 0,2%, sous pression. L'examen des mitoses des grains de pollen montre des nombres de chromosomes haploïdes et diploïdes. De plus, on exécuta des mesures comparatives des diamètres des grains de pollen des fleurs traitées avec la colchicine et des témoins. Pour les diamètres des grains de pollen des fleurs non traitées on a obtenu avec une gamme de 15 à 28 unités, des courbes binomiales à un seul sommet, tandis que les diamètres des grains de pollen des fleurs traitées avec la colchicine donnèrent des courbes à plusieurs sommets et une variation de 12 à 34 unités. Les différences étaient statistiquement significatives: le test de  $\chi^2$  donne un  $\chi^2$  de 518,7424.

## Literatur

- ANDERSSON, E.: A case of asyndesis in *Picea Abies*. Hereditas 33, 301—347 (1947). — ANDERSSON, E.: Pollen and seed setting studies of an asyndetic spruce and some normal spruces, and a progeny test of spruces. Sv. Papp. Tidn. 50, Nr. 4—7 (1947). — ANDERSSON, E.: Some data concerning the pollen variation and pollen fertility of spruce and pine. Sv. Papp. Tidn. 57, Nr. 7 och 8 (1954). — CHIBA, S., and WATANABE, M.: Abnormal pollen grains of *Cryptomeria japonica* D. Don produced by heat treatment. Rep. Govern. For. Exp. Sta. No. 64, Tokyo, Japan, 13—20 (1952). — EKLUNDH-EHRENBORG, C.: Studies on asynapsis in the elm, *Ulmus Glabra* HUDS. Hereditas 35, 1—26 (1949). — EKLUNDH-EHRENBORG, C.: Studies on elm pollen. Bot. Notiser 1953, 308—316. — ILLIES, Z. M.: Colchicinversuche an *Larix decidua* MILLER und *Picea abies* (L.) KARST. Z. Forstgenetik 1, 36—39 (1952). — ILLIES, Z. M.: Weitere Erfahrungen mit colchicinierten Lärchen. Z. Forstgenetik 3, 136—137 (1954). — IWAKAWA, M., and CHIBA, S.: Abnormal pollen grains of *Cryptomeria* and *Pinus* occurred in natural conditions. Rep. Govern. For. Exp. Sta. No. 64, Tokyo, Japan, 1—9 (1952). — JOHNSON, H., och EKLUNDH, C.: Colchicinbehandlung som metod vid växtförädling av lövträd. Sv. Papp. Tidn. 43, 355—360, 373—377 (1940). — MATHER, K.: Statistische Analyse in der Biologie. (Dtsch. Übersetzung K. ZELLER). Springer, Wien 1955. — MÜNTZING, A.: The chromosome of a giant *Populus tremula*. Hereditas 21, 383—393 (1936). — OLDÉN, E. J.: Giant pollen grains in fruit trees from Colchicine treatment in vacuum. Hereditas 40, 526—528 (1954). — SEITZ, F. W.: Über anomale Zwitterblüten eines Klones der Gattung *Populus*, Sektion *Leuce*. Z. Forstgenetik 2, 77—90 (1952/53). — SEITZ, F. W.: Über das Auftreten von Triploiden nach der Selbstung anomaler Zwitterblüten einer Graupappelform. Z. Forstgenetik 3, 1—6 (1954). — WETTSTEIN, W., und NIKLAS, L.: Vergleichende Pollenuntersuchungen an verschiedenen Lärchenrassen. Österr. Bot. Z. 102, 520—523 (1955). —