

# Applicability of the Distribution of Stomates to Verify Pine Hybrids

By FRANÇOIS MERGEN,

Asst. Prof. of Forest Genetics, Yale University School of Forestry, New Haven, Connecticut

(Received for publication November 30, 1958)

In a recent article (MERGEN, 1958)<sup>1)</sup> it was shown that the number of stomates per unit length of row can be used as a diagnostic test to evaluate putative hybrids. This method was used for several pine species that grow in the southeastern part of the United States. The number of stomates per unit length was relatively independent of environmental effects and was under fairly rigid genetic control. The frequency of the stomates is not controlled by a single gene, but by a large number, resulting in a intermediacy of the hybrid. To test the applicability of this diagnostic test to other species of pines, the stomates were evaluated on five artificial pine hybrids which were growing in test plantations. The results of this study are presented in this report.

## Experimentation and Results

The pine seedlings used were obtained through the cooperation of the Northeastern Forest Experiment Station, the Lake States Forest Experiment Station, the U. S. Department of Agriculture, and from a local seed source. When the seedlings were evaluated they varied in age between four and six years. The details as to the species used, and as to the number of individuals per species are given in Table 1. For each species, or hybrid, 20 secondary needles were collected and placed in water until used. The number of needles collected per plant depended on the number of trees available in each category. When 20 seedlings were available, one needle was collected per plant, while ten needles were collected for the cross where only two plants were available. A segment, 0.8 to 1.0 cm. in length, was cut one centimeter from the base, and the stomates were counted on one side under a binocular microscope (X 100) using reflected light for illumination. For the hard pines (Diploxylon), the stomates on the outer surface were counted as a matter of convenience, but on the white

pinus (Haploxylon) they were counted on the inner surface because their outer surfaces did not have stomates. The number of stomates per row were kept separate, and corrected for the differences in length between the various needle segments. Incomplete rows were discarded, and the number was expressed as stomates per mm. of row for the analysis.

The results are graphically represented as frequency distributions of the number of stomates for the individual rows in Figure 1 (A—E). In Table 1, along with the details of the samples, are given the values for the mean and standard error of the mean. In the crosses *P. thunbergii* X *P. densiflora*, *P. densiflora* X *P. nigra*, and *P. monticola* X *P. strobus* the means between the two parent species differed enough to verify the intermediacy of the hybrids. According to the information received from the cooperators the authenticity of these hybrids was fairly certain. The trees of the cross *P. nigra* X *P. thunbergii* were obtained from open-pollinated seed collected from a *P. nigra* tree where there was a good chance of natural cross pollination with *P. thunbergii*. While in the nursery beds some of these seedlings had been tentatively identified as *P. nigra* X *P. thunbergii* hybrids. The analysis of the stomates also indicates that some of the seedlings in this cross were not pure *P. nigra*. The seedlings in the cross *P. griffithii* X *P. strobus* were obtained by applying a mixture of *P. strobus* pollen to the strobili of *P. griffithii* which had not been previously isolated by pollination bags. The analysis of the stomates would indicate that the resulting seedlings from this cross might not be hybrids, but pure *P. griffithii*. Probably a few of the seedlings are hybrids as evidenced by the positive skewness of the curve with a long tail into the distribution of *P. strobus*. Further observation of these plants, however, are necessary to say definitely whether or not the entire seed lot are hybrids. The values for the mean and the frequency distributions for *P. strobus* and *P. ayacahuite* were very similar. Therefore, the hybrids between these two species could not be evaluated.

<sup>1)</sup> MERGEN, FRANÇOIS, 1958: Genetic variation in needle characteristics of slash pine and in some of its hybrids. *Silvae Genetica* 7, 1—9.

Table 1. — Details of the trees used, with values for the mean, and standard error of the mean for the number of stomates per mm. of row.

Species	Identification		Number of Trees	Number of Stomates		No. of rows counted
	Previous	Current		Mean	Standard error of the mean	
<i>Diploxylon</i> (Hard Pines)						
<i>Pinus thunbergii</i> PARL.	NEFES, Pi — 636	M 67	9	9.23	0.018	211
<i>Pinus densiflora</i> SIEB. and Zucc.	Pi — 432	M 86	9	12.47	0.023	148
<i>Pinus nigra</i> ARNOLD	NEG — 1211	M 82	4	11.13	0.089	215
<i>Pinus thunbergii</i> X <i>P. densiflora</i>	Pi — 629	M 68	2	10.62	0.022	187
<i>Pinus nigra</i> X <i>P. thunbergii</i>	Pi — 569	M 76	10	9.69	0.080	161
<i>P. densiflora</i> X <i>P. nigra</i>	Pi — 617	M 85	7	11.45	0.023	169
<i>Haploxylon</i> (White Pines)						
<i>Pinus griffithii</i> McCLELLAND	USDA, Pi 231755	M 300	10	13.80	0.023	151
<i>Pinus strobus</i> L.			20	15.37	0.098	132
<i>Pinus ayacahuite</i> EHRENB.	NEFES, Pi 578	M 103	20	15.50	0.088	113
<i>Pinus monticola</i> DOUGL.	LSFES, 2520	M 109	12	13.36	0.113	119
<i>P. griffithii</i> X <i>P. strobus</i>	NEFES, Pi 582	M 104	15	13.78	0.092	158
<i>P. monticola</i> X <i>P. strobus</i>	LSFES, 2518	M 108	10	14.36	0.098	117

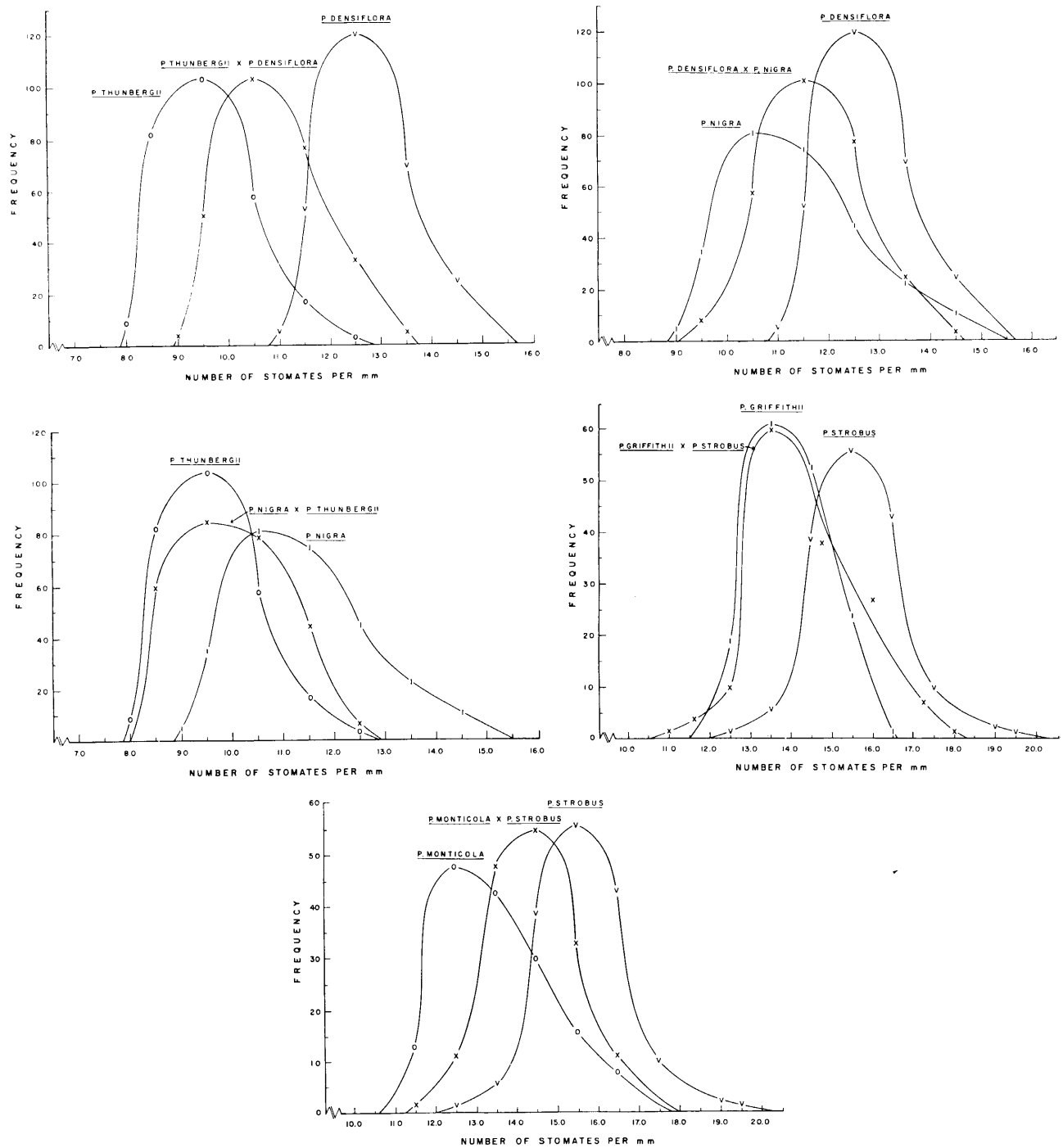


Figure 1 (A—E). — Frequency distributions of the average number of stomates per mm. of row for the five hybrids. — (A) *P. thunbergii* × *P. densiflora*; — (B) *P. nigra* × *P. thunbergii*; — (C) *P. densiflora* × *P. nigra*; — (D) *P. griffithii* × *P. strobilus*; — (E) *P. monticola* × *P. strobilus*.

#### Discussion and Summary

From the evidence obtained, it appears that an analysis of the stomates can be used as a valid test to identify putative hybrids, and verify the hybrids from controlled crosses. The method was successful to verify the hybrids of the cross *P. thunbergii* × *P. densiflora*, *P. densiflora* × *P. nigra*, and *P. monticola* × *P. strobilus*. For seedlings resulting from open-pollinated seed collected from *P. nigra* the analysis pointed towards some pollination with another species, and possibly with pollen from *P. thunbergii*. In the cross *P. griffithii* × *P. strobilus*, where the femal strobili

were not bagged, it appears that the progeny were not pure *P. griffithii* seedlings. The limitations of the analysis of the stomates was brought forth by an attempt to compare seedlings of the cross *P. ayacahuite* × *P. strobilus*. The means and frequency distributions of the two species were not dissimilar enough to allow for a comparison.

#### Acknowledgments

The author is indebted to the Northeastern Forest Experiment Station, and to the Lake State Forest Experiment Station for supplying most of the plant material used in this study. The manuscript was reviewed by Drs. P. F. BOURDEAU, G. M. FURNIVAL,

### Zusammenfassung

Titel der Arbeit: *Die Verwendung der Stomata-Verteilung zum Nachweis von Kiefern-Artbastarden.*

Auf Grund der gewonnenen Erkenntnisse scheint die Analyse der Spaltöffnungen als zuverlässiger Test für die Identifizierung vermeintlicher Hybriden und zur Prüfung von Bastarden aus kontrollierten Kreuzungen herangezogen werden zu können. Die Methode ermöglichte es, die Echtheit von Bastarden der Kreuzungen *P. thunbergii* × *P. densiflora*, *P. densiflora* × *P. nigra* und *P. monticola* × *P. strobus* nachzuweisen. Bei Sämlingen einer freiabgeblühten *P. nigra* deutet die Analyse auf Bestäubung durch artfremden Pollen, möglicherweise von *P. thunbergii*, hin. In einer Kreuzung *P. griffithii* × *P. strobus* scheinen die Nachkommen der nicht eingetüteten weiblichen Blüten nicht allein aus reinen *P. griffithii* zu bestehen. Die Grenzen der Verwendbarkeit von Stomata-Analysen wurden bei einem Versuch erkannt, Sämlinge der Kombination *P. ayacahuite* × *P. strobus* zu vergleichen. Die Mittel und die Häufig-

keitsverteilungen der beiden Arten waren nicht unterschiedlich genug, um diesen Vergleich zu ermöglichen.

### Résumé

Titre de l'article: *Application de l'analyse des stomates comme test d'identification des hybrides de pins.*

L'analyse des stomates peut servir comme test pour identifier les arbres supposés hybrides, et vérifier le résultat des croisements contrôlés. Cette méthode fut appliquée avec succès à la vérification du caractère hybride des croisements *P. thunbergii* × *P. densiflora*, *P. densiflora* × *P. nigra* et *P. monticola* × *P. strobus*. L'étude de semis issus de graines récoltées sur *P. nigra* après pollinisation libre a montré qu'une autre espèce, peut être *P. thunbergii*, avait concouru à la pollinisation. Dans le croisement *P. griffithii* × *P. strobus*, effectué sur des fleurs femelles non ensachées, on a pu voir que les descendants n'étaient pas des *P. griffithii* purs. Cependant, les limites de cette technique apparaissent dans une tentative de comparer les semis issus du croisement *P. ayacahuite* × *P. strobus*. Les moyennes et les courbes de distribution des parents ne sont pas assez différentes pour permettre un diagnostic certain.

(Aus dem Institut für Forstsamenkunde und Forstpflanzenzüchtung der Forstlichen Forschungsanstalt München)

## Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung in der Bibliographie des Oxfordsystems

VON MARION ROHMEDEK

(Eingegangen am 1. 12. 1958)

In vielen Forschungsstätten bietet die karteimäßige Verarbeitung und Sammlung des einschlägigen Schrifttums einen wichtigen und zeitsparenden Arbeitsbehelf. Voraussetzung dafür ist eine zweckmäßige und ausreichende Gliederung des jeweiligen Stoffgebietes.

In der Forstwissenschaft setzt sich für die Bibliographie des wissenschaftlichen Schrifttums das sog. Oxfordsystem der Dezimalklassifikation für Forstwesen immer mehr durch. Im Jahr 1957 erschien die deutsche Ausgabe dieses Ordnungsschlüssels.

Wie sind in diesem Oxfordsystem die Sachgebiete Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung untergebracht und gegliedert? Wir finden sie in dem Hauptabschnitt Botanik 16 unter der Ziffer 165 mit dem Titel „Vererbung, Genetik und Züchtung“. Außerdem sind jedoch wichtige einschlägige Teilgebiete in anderen Abschnitten enthalten, so im Abschnitt 18 Pflanzenökologie unter Ziffer 181.5 „Reproduktives Verhalten, Fortpflanzungsweisen“, und im Abschnitt 2 Waldbau unter Ziffer 232.12 „Rassen- und Provenienzversuche“, unter Ziffer 232.13 „Versuche mit Hybriden und anderen Züchtungsergebnissen“, unter Ziffer 232.311.2 „Elitebäume und -bestände“, unter Ziffer 232.311.3 „Samenplantagen, Pfropfplantagen usf.“, unter Ziffer 232.328 „Vegetative Vermehrung“.

Übersicht 1 gibt einen Überblick, unter welchen Teilgebieten und Ziffern Genetik und Züchtung der Waldbäume im Oxfordsystem eingeordnet sind.

Diese Einteilung entspricht leider aus mehreren Gründen nicht den Anforderungen, die man nicht nur vom sachlichen Standpunkt aus, sondern auch rein aus Zweckmäßigkeitsgründen stellen muß. So sind z. B. unter Ziffer 165.4 „Hauptmethoden der Züchtung“ Sachgebiete untergebracht,

die nicht zu den Methoden, sondern zu den Grundlagen der Züchtung gehören, wie Zytogenetik, Chromosomen und Gene. Andererseits sind die Züchtungsmethoden unter dieser Ziffer keineswegs vollständig erfaßt; denn außer Selbstung, Kreuzung und Mutationszüchtung gehört hierher vor allem auch die Auslese oder Selektion, die jetzt unter der gleichrangigen Ziffer 165.6 aufgeführt wird. Man möchte daher wünschen, daß zum mindesten alle Züchtungsmethoden einerseits, alle genetischen und physiologischen Grundlagen der Züchtung andererseits unter zwei gleichrangigen Ziffern eingeordnet werden. Die Züchtung durch vegetative Fortpflanzung, die unter Ziffer 165.44 ebenfalls den Hauptmethoden der Züchtung zugeordnet wird, ist in Wirklichkeit keine Züchtungsmethode, sondern ein Hilfsmittel, das nach jeder durchgeführten Züchtung zur Vermehrung der Züchtergebnisse angewendet werden kann. Künstlich hergestellte Hybriden werden nach dem Oxfordsystem unter Ziffer 165.72 registriert; man könnte sie aber ebenso gut unter Ziffer 165.41 Kreuzung einreihen.

Bei eingehender Beschäftigung mit dem Oxfordsystem gewinnt man den Eindruck, daß viele ältere Disziplinen, wie Waldbau, Bodenkunde u. a., für die es seit langer Zeit Lehrbücher und Einteilungsprinzipien gibt, klarer und straffer gegliedert und logisch richtiger aufgebaut sind als die noch jungen Fächer Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung. So wäre z. B. auch zu erwägen, ob die Rassen- und Provenienzversuche, die das Fundament für die erbliche Variation der Waldbäume darstellen, zweckmäßigerweise unter Vererbung und Genetik eingereiht werden. Ebenso bedarf es einer Überprüfung, ob man „Versuche mit Hybriden und anderen Züchtungsergebnissen“ unter Ziffer 232.13, ferner „Elitebäume und -Bestände“ sowie