

durch Parasitenbefall der Wuchsstoffhaushalt von Pflanzen gewaben und damit die morphologische Struktur beeinflußt wird, ist hinlänglich bekannt und wurde für eine Picea-Art erst kürzlich wieder von BALCH, CLARK und BONGA (1964) gezeigt. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich mit zunehmender Entwicklung die beobachteten Störungen ausgleichen oder ob eine dauernde Schädigung von aus solchen Stecklingen hervorgegangenen Pflanzen bestehen bleibt.

Zusammenfassung

Es wird nach der Ursache des in zahlreichen Fällen beobachteten Verrocknens der Kurztriebe von *P. radiata* gesucht, die nach einer IBS-Behandlung Wurzeln gebildet hatten und spontan zu kleinen Langtrieben ausgewachsen waren. Die anatomische Analyse ergab, daß häufig die kontinuierliche Verbindung von Leitgewebe zwischen Sproß und Wurzel fehlt. Dies könnte, wenigstens z. T. die einangs gestellte Frage beantworten. Außerdem wird eine recht häufig auftretende Anomalie beim Dickenwachstum der Wurzeln von Kurztrieben beschrieben.

Resumen

Se busca la causa que en numerosos casos produce la muerte de fasciculos de *P. radiata*, que habian formado raices despues de un tratamiento con AIB y brotado espontaneamente. El analisis anatomico indica ausencia frequente de comunicacion vascular directa entre raiz y tallo. Esto podria contestar, al menos en parte, la pregunta planteada. Ademas se describe una anomalia, que aparece a menudo, del engrosamiento secundario de las raices de los fasciculos.

Summary

Title of the paper: Anatomic observations on the rooting of short shoots of *Pinus radiata*.

An attempt is made to determine the cause of the frequently observed mortality of short shoots of *Pinus radiata*, which initially had been forming long shoots after treatment with IBA. Anatomic studies revealed that a continuous vascular tissue between shoot and root was often lacking. This, therefore, is at least a partial answer. A description of a frequent anomaly in diameter growth of the roots of short shoots is also given.

Literatur

- BALCA, R. E., CLARK, J., and BONGA, J. M.: Hormonal action in production of tumors and compression wood by an aphid. *Nature (Lond.)* 202, 721–722 (1964). — FOSKET, D. E., and ROBERTS, L. W.: Induction of wound-vessel differentiation in isolated *Coleus* stem segments in vitro. *Amer. J. Bot.* 51, 19–25 (1964). — ISIKAWA, H., and KUSAKA, M.: The vegetative propagation of cuttings of *Pinus* species. I. Vegetative propagation of Japanese black pine using leaf-bundles. *Gov't. For. Exp. Sta. Meguro, Tokyo, Bull.* 116, 59–64 (1959). — JECKALEJS, H. J.: The vegetative propagation of leaf bundle cuttings of red pine (*Pinus resinosa*). *For. Chron.* 32, 89–93 (1965). — JOHANSEN, D. A.: Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co., New York, 1940. — MERGEN, F., and SIMPSON, B. A.: Asexual propagation of *Pinus* by rooting needle fascicles. *Silvae Genetica* 13, 133–139 (1964). — REINES, M., and McALPINE, R. G.: The morphology of normal, callused, and rooted dwarf shoots of slash pine. *Bot. Gaz.* 121, 118–124 (1959). — RUDOLPH, T. D., and NIENSTAEDT, H.: Rooting, shoot development and flowering of Jack pine needle fascicles. *Silvae Genetica* 13, 118–123 (1964). — THIMANN, K. V., and DELISLE, A. L.: Notes on the rooting of some conifers from cuttings. *Journ. Arnold Arbor.* 23, 108–109 (1942). — TODA, R.: Rooting response of leaf bundle cuttings of pine. *Bull. Tokyo Univ. For.* 36, 42–48 (1948). — TODA, R.: Rooting ability of pine leaf bundle cuttings can be improved by environmental control before their collection. *Bull. Gov't. For. Exp. Sta. Meguro, Tokyo,* 57, 205–208 (1952). — ZAK, B., and McALPINE, R. G.: Rooting of shortleaf and slash pine needle bundles. *S. E. For. Exp. Stat. Res. Note* 112, 2 pp. (1957).

Vorbehandlung der Koniferensamen für Chromosomenuntersuchungen¹⁾

Von MILAN SIMAK und CHRISTA HAPPEL

Institut für Forstgenetik, Forstliche Hochschule, Stockholm 50

(Eingegangen am 8. 6. 1965)

Einleitung

Die Chromosomenzahl der Nadelholzarten liegt relativ hoch (in den meisten Fällen $2n = 24$) und die Chromosomen selbst sind verhältnismäßig lang. Um gute zytologische Quetschpräparate zu erhalten, ist es darum notwendig, die Chromosomen auf geeignete Länge zu kontrahieren und sie auch gut in den Zellen verteilen zu können. Eine von uns ausgearbeitete Methode, welche sich in dieser Hinsicht gut bewährte, wird hier zuerst in einigen Punkten kurz beschrieben und nachher näher kommentiert.

Als Material dienten Wurzelspitzen der keimenden Samen von *Picea abies*, *Pinus silvestris* und *Larix decidua*.

Anleitung

1. Material und Vorkeimung

Frische Samen werden nach einstündigem Einweichen in Wasser (ca. 20°C) zur Keimung auf nasses Filterpapier in einer Petrischale ausgelegt.

¹⁾ Diese Arbeit ist ein Teil eines Versuchsprogramms, das von der „Carl Trygger-Stiftung für wissenschaftliche Forschung“ (Stockholm) unterstützt wird.

2. Keimlingsauswahl

Wenn die Wurzelspitzen halbe bis einfache Samenlänge erreicht haben, sind zahlreiche Zellteilungen darin enthalten, und die Samen eignen sich am besten für die zytologischen Untersuchungen.

3. Kältebehandlung

Um Kontraktion der Chromosomen zu erreichen, werden die ausgewählten Keimlinge in der Petrischale 4–6 Tage lang einer konstanten Temperatur von 0°C ausgesetzt.

4. Wärmebehandlung

Anschließendes Aufbewahren der Petrischale mit den Keimlingen bei Zimmertemperatur (ca. 20°C) für 60–120 Minuten fördert die gute Verteilung der Chromosomen beim Quetschen der Präparate.

5. Fixierung

Die Keimlinge werden 1–2 Stunden in einer Mischung aus absolutem Alkohol und Eisessig (3 : 1) fixiert.

6. Hydrolyse

Die Keimlinge werden in einer Mischung aus einem Teil absolutem Alkohol und einem Teil konzentrierter Salzsäure ca. 2 Minuten lang hydrolysiert.

7. Herauspräparieren des Wurzelmeristems

Nur sehr kleine Stückchen des Wurzelmeristems sollen für das Präparat verwendet werden. Die feine Zerkleinerung auf dem Objektträger geschieht mit Vorteil in 45%-iger Essigsäure.

8. Färben und Quetschen

Nach dem vorsichtigen Absaugen der Essigsäure wird das Material in 4%igem Orcein gequetscht.

Material und Vorkeimung

Gegenüber der Verwendung von Knospen oder Wurzelspitzen größerer Pflanzen für die zytologischen Untersuchungen hat das Arbeiten mit Keimlingswurzeln den Vorteil, daß sich die zu diesem Zweck notwendigen Samen leicht aufbewahren lassen, und somit zu jeder Jahreszeit Versuchsmaterial zur Verfügung steht. Zulange oder ungeeignete Lagerung bringt allerdings die Gefahr mit sich, daß viele Chromosomenaberrationen in den Samen entstehen können (NAWASCHIN und GERASSIMOWA 1936). Für Karyotypanalysen z. B. eignet sich solches Material aufgrund der stark veränderten Chromosomenmorphologie nicht. Außerdem erschweren schlechte Verteilung der Chromosomen beim Quetschen, verschiedene Unregelmäßigkeiten in der Chromosomenkontraktion und anderes mehr das Herstellen guter zytologischer Präparate aus alten Samen.

Keimlingsauswahl

Mit physikalischen und chemischen Mitteln wurden Versuche durchgeführt, um das Untersuchungsmaterial zu reicher Zellteilung anzuregen (z. B. KISSEK 1926, MERGEN und NOVOTNY 1957). Es gibt bis jetzt aber kein universelles Mittel in dieser Hinsicht. Soweit man keinen effektiven Stimulator hat, soll man bei den keimenden Samen die Zeit – oder das Entwicklungsstadium suchen, wo jeweils die Zellteilungstätigkeit kulminiert. Diesbezüglich hat BEVILACQUA (1965) festgestellt, daß die höchste Frequenz der Prometaphasen bei *Pinus nigra* zwischen 20° und 24° vorkommt.

In unserem Versuch fanden wir die meisten Zellteilungen in den Keimlingen, bei welchen die Wurzelspitzen halbe bis einfache Samenlänge erreicht hatten. Dieses Stadium mit den meisten Zellteilungen ist für jede Art und bei gleichen Keimungsbedingungen ziemlich spezifisch und konstant, so daß man auch bei sich wiederholenden Versuchen gute Aussichten hat, Material mit reichen Zellteilungen zu bekommen.

Kältebehandlung

Die chemischen Mittel, die man zur Vorbehandlung der Chromosomen anwendet, um Kontraktion, Streckung, Unterscheidung der Einschnürungen zu erreichen (vergl. SHARMA 1956), wirken nicht bei allen Pflanzenarten gleich (CHRISTIANSEN 1960). Sogar in den verschiedenen Zellen innerhalb eines Präparates kann sich diese ungleichmäßige Wirkung bemerkbar machen. Auch sind die oft teuren Chemikalien in vielen Fällen giftig, und es ist deshalb nicht angenehm damit zu arbeiten.

Die kontraktive Wirkung der tiefen Temperaturen wurde schon früh in der zytologischen Technik ausgenutzt (WARM-

KE 1942). Bei mäßiger Kontraktion durch die Kälte sind auch die primären und sekundären Einschnürungen gut sichtbar. Außerdem können durch diese Methode in gewissen Fällen die heterochromatischen Chromosomenteile hervortreten (DARLINGTON und LA COUR 1940), was bei den Karyotypanalysen von Interesse sein kann. Bei den Koniferen wurde diese Methode mit unterschiedlichem Erfolg erprobt z. B. MEHRA und KHOSHOO (1956), MERGEN und NOVOTNY (1957), SIMAK (1960), allerdings fehlen Beschreibungen für die Verfahren bei der Kältebehandlung völlig oder sind nur unvollständig.

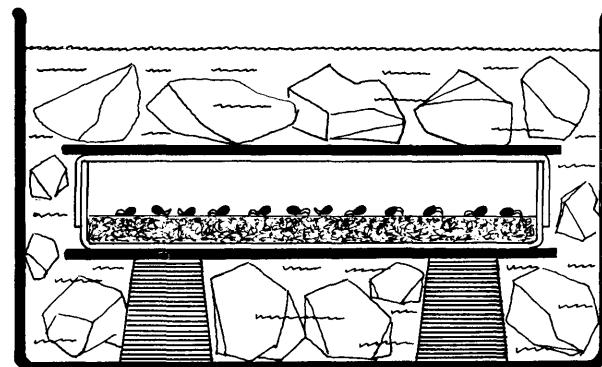


Abb. 1. — Kältebehandlung: Die vorgekeimten Samen liegen auf Filterpapier in einer Petrischale, die von oben und unten durch zwei schwere Scheiben (z. B. Blei) geschützt und beschwert ist. Diese Anordnung liegt auf Stützfüßen in einem Gefäß mit Wasser und Eisstückchen (s. auch Text).

Wir haben hauptsächlich bei 0° C gearbeitet, da diese Temperatur mit einfachen Mitteln ziemlich leicht konstant zu halten ist. Wie aus Abb. 1 zu ersehen ist, wird die Schale mit dem keimenden Samen in ein Gefäß mit Eis und Wasser eingesetzt und anschließend im Kühlschrank oder an einer anderen kalten Stelle aufbewahrt. Weder darf das Eis im Gefäß völlig schmelzen, noch das Wasser gefrieren, da sich die Temperatur dadurch verändert und die Behandlung unterbricht. In unseren Versuchen mit Fichte und Kiefer erzielten wir die besten Erfolge, wenn die Kälte die Zellteilungstätigkeit aufhielt und nur die in den Teilungsstadien vorhandenen Chromosomen der Kältewirkung ausgesetzt wurden. Die Temperatur, bei welcher die Mitoseprozesse zum Stillstand kommen, ist aber bei den verschiedenen Arten sehr unterschiedlich. Bei *Trillium* und *Fritillaria* z. B. setzt die Mitose noch bei -5° resp. -10° ihre Tätigkeit fort (DARLINGTON und LA COUR 1940). Ebenso zeigten unsere Versuche mit der Lärche, daß die Zellteilungen auch bei 0° C noch immer im Gang waren. Daraus ist zu entnehmen, daß die verschiedenen Arten unterschiedliche Behandlungstemperaturen verlangen.

Ähnlich wie die Tiefe der Temperatur muß auch die Behandlungsdauer für jede Art speziell bestimmt werden. Die erforderliche Zeit der Kälteinwirkung ist selbstverständlich auch vom Zweck der Untersuchung abhängig. Da die Chromosomenverkürzung kontinuierlich mit der Behandlungsdauer fortschreitet, reicht für morphologische Analysen eine kürzere Zeit in Eiswasser (Fichte 4–5 Tage) als z. B. zur Ermittlung der Chromosomenzahl (Fichte 6–8 Tage), wobei sehr kurze Chromosomen das Auszählen beträchtlich erleichtern (Abb. 2, 3 und 4).

Durch die Kältebehandlung können verschiedene Chromosomenaberrationen entstehen, die sich bei spezieller Art der Untersuchungen als hinderlich erweisen, z. B. beim Stu-

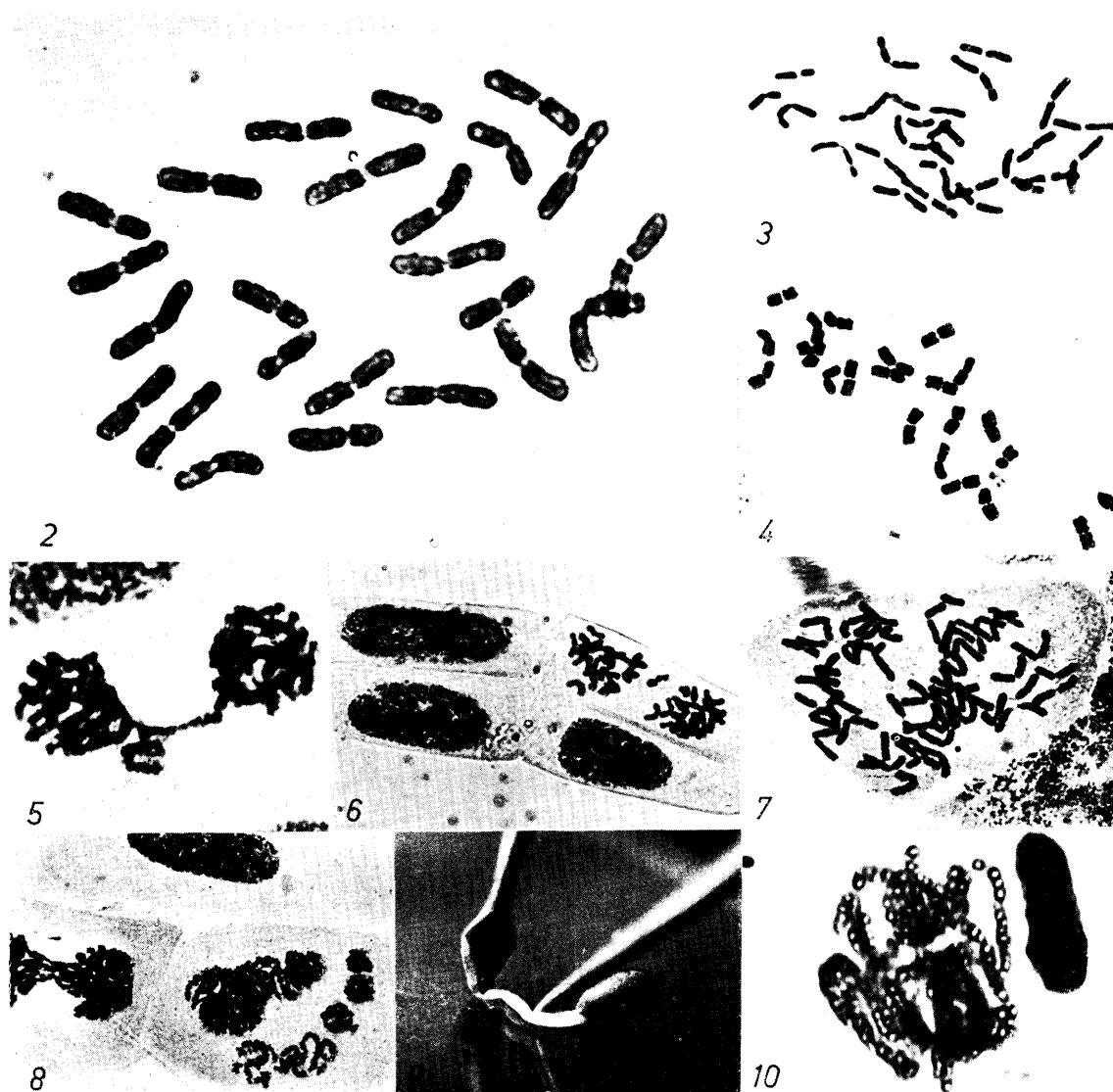


Abb. 2—10. — Abb. 2: Die 24 somatischen Chromosomen von *Picea abies*. — Abb. 3: Mäßig kontrahierte Chromosomen, geeignet für morphologische Untersuchungen. — Abb. 4: Stark kontrahierte Chromosomen, geeignet für die Bestimmung der Chromosomenzahl. — Abb. 5: Eine Chromosomenbrücke, durch die Kältebehandlung entstanden. — Abb. 6 und 7: Anaphasenchromosomen, die durch die unregelmäßige Verteilung in der Zelle den Eindruck von Polyploidie erwecken. — Abb. 8: Zwei verschiedene Chromosomenaberrationen, die durch die Kältebehandlung entstanden sind. — Abb. 9: Entfernung des Wurzelhäutchens (s. Text). — Abb. 10: Vakuolisierung der Chromosomen, die als Artefakt zu bezeichnen ist. — Abb. 3 und 6: *Pinus silvestris*; die übrigen Bilder: *Picea abies*.

dium des spontanen Vorkommens von Chromosomenaberrationen (Abb. 5) oder bei der Chromosomenzahlermittlung. Eine „Scheinpolyploide“ kann entstehen, wenn Anaphasenchromosomen durch verschiedene Ursachen unregelmäßig in der Zelle verteilt wurden und damit den Eindruck einer doppelten Chromosomenzahl erwecken (Abb. 6 und 7). Solche Unregelmäßigkeiten in der Chromosomenteilung können durch die Multipolarität des Spindelapparates, durch dessen Zerstörung sowie durch andere weniger bekannte Faktoren zustande kommen (Abb. 8). Dies ist aber auch bei der Verwendung anderer Kontraktionsmittel nicht zu vermeiden (TJIO und LEVAN 1950, ÖSTERGREN 1950, SHARMA und SARKAR 1957, SWAMINATHAN und NATARAJAN 1959).

Wärmebehandlung

Günstige Voraussetzungen für gute Verteilung der Chromosomen in den Quetschpräparaten werden durch die Inaktivierung des Spindelapparates und die Veränderung der Plasmaviskosität geschaffen. Letzteres versuchte man

hauptsächlich durch verschiedene chemische Mittel herbeizuführen.

SWAMINATHAN und NATARAJAN (1956) bekamen gute Verteilung und Kontraktion bei *Triticum* spp. und anderen Arten, wenn die Samen vor der Keimung in vegetabilischen Ölen (von *Ricinus communis*, *Cocos nucifera*, *Arachis hypogea*, *Sesamum orientale* oder *Brassica campestris* var. *toria*) eingelegt waren. Bei zu langer Behandlung mit diesen Ölen besteht jedoch die Gefahr, daß in dem Samenmaterial Chromosomenaberrationen induziert werden können (SWAMINATHAN und NATARAJAN 1959). Ähnlich wirkt auch 8-Oxychinolin (TJIO und LEVAN 1950), das außerdem die Einschnürungen sehr klar hervortreten läßt. EIFLER (1959) hatte nach der Methode von SHARMA und SARKAR (1955) das Alkaloid Aeskulin angewandt, um bessere Chromosomenverteilung in Wurzelpräparaten von *Betula*-Hybriden zu erreichen.

Die Verteilung der Chromosomen in den Zellen kann auch durch physikalische Faktoren wie Licht, Temperatur

u. a. günstig beeinflußt werden. In unseren Versuchen mit der Fichte verteilten sich die Chromosomen in Quetschpräparaten gut, wenn die Keimlinge nach der Kältebehandlung eine gewisse Zeit höheren Temperaturen ausgesetzt und danach nur fixiert wurden. WARMKE (1942) empfiehlt dagegen eine sofortige „Kälte“fixation nach der Kältebehandlung. Den Beweis, daß die vorteilhafte Wirkung dieser Wärmebehandlung keinen Zufälligkeiten unterliegt, lieferen uns mehrfach wiederholte Fixierungsserien, die nach Abschluß der Kältebehandlung in 5-Minuten-Intervallen über mehrere Stunden ausgedehnt wurden. Eine mögliche Erklärung für diesen Wärmeeffekt wäre, daß die gestoppten Mitosen in den Keimlingen nach der Kältebehandlung durch die erhöhten Temperaturen wieder in Gang kommen können, womit günstige Bedingungen für die gute Verteilung der Chromosomen geschaffen sind. Ein wichtiger Faktor ist dabei wahrscheinlich auch die der Wärmebehandlung folgende Fixierungsmethode. Die neue normale Mitosetätigkeit beginnt bei den kältebehandelten Fichtenkeimlingen nach ca. 100 Minuten Wärmeeinwirkung, bei Lärche dagegen schon einige Minuten nach der Entnahme aus der Eispackung. Es ist deshalb notwendig, die untere und obere Zeitgrenze dieser Wärmebehandlung für jede Art experimentell zu ermitteln. Bei zu kurzer Wärmebehandlung bleiben sonst die Chromosomen verklumpt, und bei zu langem Einfluß verschwinden die kontrahierten Chromosomen und werden durch neue normale Zellteilungen ersetzt.

Fixierung und Hydrolyse

Bei Orientierungsversuchen, beispielsweise über den Kontraktionsgrad der kältebehandelten Chromosomen, kann das Material ohne Fixierung direkt hydrolysiert und gequetscht werden. Legt man jedoch auf einwandfreie Präparate Wert, erweist sich das Fixieren als unumgänglich, da sich unter anderem hierbei die sonst gekrümmten liegenden Chromosomen strecken.

Fixier- und Hydrolysierlösung soll man in reichlichen Mengen verwenden, da das in den gequollenen Samen enthaltene Wasser die Konzentration stark herabsetzen und so die Wirksamkeit der Lösungen leiden kann. Zur Fixation und Hydrolyse wurden ganze Keimlinge verwendet, um die Handhabung zu erleichtern.

Herauspräparieren der Wurzelmeristeme, Färben und Quetschen

Nachdem das Häutchen, das die Wurzel umgibt, entfernt wurde (Fig. 9), präpariert man das Gewebe aus der verdickten Stelle in der Nähe der Wurzelspitze heraus. Die Zerkleinerung und Verteilung der Gewebeklumpchen geschieht mit Vorteil in einem Tropfen 45%iger Essigsäure auf dem Objektträger unter dem Präparationsmikroskop. Auf diese Weise kann der Arbeitsgang besser kontrolliert werden als bei Präparation direkt in Orcein. Danach wird die Essigsäure mit einem Stückchen nicht faserndem Filterpapier vorsichtig abgesaugt und durch einen Tropfen 4%iges Orcein ersetzt.

Im weiteren verfährt man nach der üblichen Quetschtechnik. Es ist noch darauf aufmerksam zu machen, daß die Erwärmung des Präparates vor der Quetschung über einer Flamme nicht zu stark sein darf, da sonst Artefakte wie z. B. vakuolierte Chromosomen entstehen können (Fig. 10).

Zusammenfassung

In der Arbeit wurde eine zytologische Quetschmethode beschrieben, die für die Chromosomenanalysen der Nadelhölzer geeignet ist. Durch Kälte- und nachfolgende Wärmebehandlung der vorgekeimten Samen wurden gute Kontraktion, resp. Verteilung der Chromosomen erreicht. Die Länge der Behandlung und die angewendeten Temperaturstufen sind für die verschiedenen Arten zu erproben.

Résumé

Titre de l'article: *Prétraitement de graines de conifères pour l'étude des chromosomes*.

L'article décrit des méthodes de frottis utilisables pour l'étude des chromosomes chez les conifères. Les graines sont mises en prégermination et subissent un traitement au froid suivi par un traitement à la chaleur. Cela permet une bonne contraction et une bonne répartition des chromosomes. La durée du traitement et les gammes de température à appliquer aux différentes espèces doivent faire l'objet de recherches ultérieures.

Summary

Title of the paper: *Pretreatment of conifer seeds for chromosome investigations*.

The paper describes a squash method suitable for chromosome analyses in conifers. The seeds are pregerminated and receive a cold treatment which is followed by warm treatment. This achieves good contraction and distribution of the chromosomes, respectively. The duration of treatment and the temperature grades to be applied for different species still need to be tested.

Literatur

- BEVILACQUA, B.: Changing of daily rhythm of mitosis caused in *Pinus nigra* ARN. by gamma rays. *Silvae Genet.* 14: 81—87 (1965). — CHRISTIANSEN, H.: Vejledning i squash-metoden ved undersøgelse af mitoser i rodspidser og vækstpunkter og reduktionsdeling i pollenmoderceller. 1960, 48 S. — DARLINGTON, C. D., and LA COUR, L.: Nucleic acid starvation of chromosomes in *Trillium*. *J. Genet.* 40: 185—213 (1940). — EIFLER, I.: Beschreibung einer Fixiermethode, die das Auszählen von Birkenchromosomen erleichtert. *Züchter* 29: 57—59 (1959). — KISSE, J.: Leitfaden der botanischen Mikrotechnik. Gustav Fischer, Jena, 1926, 145 S. — MEHRA, P. N., and KHOSHOO, T. N.: Cytology of conifers. I. *J. Genet.* 54: 165—180 (1956). — MERGEN, F., and NOVOTNY, H. M.: Squash technique for chromosome studies in pine needles and root tips of slash pine. *Forest Sci.* 3: 50—60 (1957). — NAWASCHIN, M., und GERASSIMOWA, H.: Natur und Ursachen der Mutation. I. Das Verhalten und die Zytologie der Pflanzen, die aus infolge Alterns mutierten Keimen stammen. *Cytologia (Tokyo)* 7: 324—362 (1936). — ÖSTERGREN, G.: Cytological standards for the quantitative estimation of spindle disturbances. *Hereditas* 36: 371—382 (1950). — SHARMA, A. K.: Fixation of plant chromosomes principles, limitations, recent developments. *Botan. Rev.* 22: 665—695 (1956). — SHARMA, A. K., and SARKAR, S. K.: A new technique for the study of chromosomes of palms. *Nature* 176: 261—262 (1955). — SHARMA, A. K., and SARKAR, S. K.: A study on the comparative effect of chemicals on chromosomes of roots, pollen mother cells and pollen grains. *Proc. Indian Acad. Sci.* 45: 288—293 (1957). — SIMAK, M.: Karyotype analysis of *Larix decidua* MILL from different provenances. *Medd. Statens Skogsundersökningsinst.* 51, 22 S. (1962). — SWAMINATHAN, M. S., and NATARAJAN, A. T.: Chromosome spreading induced by vegetable oils. *Stain Technol.* 32: 43—45 (1957). — SWAMINATHAN, M. S., and NATARAJAN, A. T.: Cytological and genetic changes induced by vegetable oils in *Triticum*. *J. Heredity* 50: 177—187 (1959). — TJO, J. H., and LEVAN, A.: The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *Anales Estac. Exptl. Aula Dei* 2: 21—64 (1950). — WARMKE, H. E.: Precooling combined with chrom-osmo-acetic fixation in studies of somatic chromosomes in plants. *Stain Technol.* 21: 87—89 (1946).