

— EKLUND, B.: Om granens årsringssvariationer inom mellersta Norrland och deras samband med klimatet. Medd. Statens Skogs-forskningsinst. 47, 1-63 (1957). — HOLMSGAARD, E. and OLSEN, H. C.: The influence of weather on the production of beech mast. Forstl. Forsøgsveas. Dan. 26, 345-370 (1960). — HOLMSGAARD, E. and OLSEN, H. C.: Experimental induction of flowering in beech. Ibid. 30, 1-17 (1966). — JACKSON, D. J. and SWEET, G. B.: Flower initiation in temperate woody plants. Hortic. Abstr. 42, 9-24 (1972). — LARSON, P. R.:

Influence of date of flushing on flowering of *Pinus banksiana*. Nature (Lond.) 192, 82-83 (1961). — TIREN, L.: Om granens kottsättning, dess periodicitet och samband med temperatur och nederbörd. Medd. Statens Skogförsöksanst. 28, 413-524 (1935). — YANAGIHARA, T., TOCHIAKI, K. and ARAI, K.: On the relation between the harvest of Japanese Larch seed and meteorological conditions. (In Japanese). J. Jap. For. Soc. 42, 347-351 (1960).

Zum Problem der Umstimmung von vegetativem zu generativem Wachstum bei *Picea abies* (L.) Karst.

Von W. E. SCHINDLBECK

Aus dem Institut für Forstpflanzenzüchtung, Samenkunde und Immissionsforschung

(Eingegangen Februar I März 1977)

1. Einleitung

Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten, die sich mit dem Phänomen der Blühstimulation bei verschiedenen Pflanzenarten befassen, wobei bei biochemischen Untersuchungen besonders der Funktion von pflanzlichen Wirkstoffen, z. B. Hormonen, Aufmerksamkeit geschenkt wurde.

Blütenbildung scheint das Ergebnis eines aufeinander folgenden Zusammenwirkens verschiedener Phytohormone zu sein (BLEYMÜLLER 1973, 1976). Sinngemäß dürften auch bei der Hemmung des vegetativen Wachstums, wie sie bei der Unterdrückung der Apikaldominanz zu Fruktifikationssteigerungen verwandt wird, bestimmte Wirkstoffe wie Hormone beteiligt sein. Zusammenhängend mit dem Anliegen der forstlichen Praxis, die Fruktifikationsvorgänge in Waldbauarten wirksam beeinflussen zu können, wird die Gewinnung eines physiologisch aktiven Extraktes aus männlichen Fichtenblüten beschrieben und anhand der Ergebnisse von Biostests mit diesem Extrakt ein Arbeitskonzept zur Umstimmung von vegetativem zu generativem Wachstum (Blüteninitiierung) diskutiert.

2. Methoden

2.1 Herstellung eines sauren Extraktes aus männlichen Blüten

Blütenmaterial: Herkunft aus Siegsdorf (Adlgaß) bei Traunstein (1300 m). Die Ernte der noch nicht abgeblühten Blüten erfolgte am 14. 5. 76 an frisch gefällten Mutterbäumen. Die Zweige mit Blüten wurden nach ca. 5 h Transport (10—20°) in einer Tiefkühltruhe einige Tage eingefroren. Die Blüten wurden dann von den Zweigen abgenommen und bis zur späteren Aufarbeitung am 11. 10. 76 bei —20° aufbewahrt.

2.11 Ätherphase

531 g gefrorene Blüten wurden mit insgesamt 1,5 Liter ungekühltem dest. Wasser versetzt und in 2 Portionen bei Raumtemperatur 15 Min. auf Stufe III (Star-Mix) aufgeschlossen. Das Aufschlußgut wurde anschließend 15 Min.

bei 0° und ca. 20.000 g in Stahlbechern zentrifugiert. Zur Erleichterung der Aufarbeitung wurde der Extrakt vor der Zentrifugation mit einem Seitentuch von groben Gewebetrümmern durch Abpressen befreit. 1,6 Liter klarer, gelber Überstand (pH ca. 4,5) wurden weiter verarbeitet. Es wurden 130 g NaCl im Überstand gelöst. Je 500 ml Überstand wurden 2X mit je 100 ml p. a. Äther ausgeschüttelt. Die fast farblose Ätherphase enthält lipoide neutrale und z. T. auch saure Extraktkomponenten. Die vereinten Ätherphasen wurden über wasserfreiem Na₂SO₄ 24 h getrocknet und bei 40° vom Äther befreit (Rotationsverdampfer). Nach 24 h Trocknen i. Vak. über KOH-Plätzchen unter Lichtausschluß und bei Raumtemperatur wurden 82,9 mg eines harzigen heterogenen Rückstandes (pH ca. 2-3) erhalten.

2.12 Essigesterphase

Die gelbe Wasserphase der Ätherextraktion wurde nun mehr mit konz. HCl unter Röhren ad pH ca. 3 gebracht, wobei eine orangefarbene Lösung eintrat. Je 500 ml der angesäuerten Phase wurden mit 2X je 100 ml p. a. Essigester ausgeschüttelt. Die gelbe Esterphase enthält saure Bestandteile der generativen Zellen. Die vereinten Esterphasen wurden 24 h über Na₂SO₄ getrocknet und bei 40° vom Solvens befreit. Nach 24 h Trocknen i. Vak. wie unter Kap. 2.11 wurden 113 mg ölig-harziger, heterogener Rückstand vom pH 2-3 erhalten.

Die Aufarbeitung des Aufschlußgutes wurde bis zur Na₂SO₄-Trocknung der organischen Phasen an einem Tag durchgeführt. Die verbliebene orangefarbene, saure Wasserphase der Essigesterextraktion enthält basische Zellkomponenten und wurde nicht weiter untersucht. Die erhaltenen Rückstände wurden zu weiteren Untersuchungen unter Lichtausschluß bei —20° verschlossen aufbewahrt.

Bei Bedarf wurde der Essigesterrückstand mit Essigester vollständig gelöst (Vibrationsmischer) und Aliquote für die Biostests bzw. Diazomethanbehandlung entnommen. Von den Aliquoten kann das Solvens leicht abgedampft werden. Nach Substanzentnahme wurde stets wieder vom Solvens befreit und wie beschrieben aufbewahrt.

2.2 Methylierung des sauren Extraktes mit Diazomethan

Das saure Extraktgemisch (2.12) wurde nach den Reaktionen a) und b) mit Diazomethan verestert bzw. veräthert.
a) RCOOH + CH₂N₂ = RCOOCH₃ + N₂
b) Phenole + CH₂N₂ = Methyläther + N₂

Anschrift des Verfassers:

Dr. W. E. Schindlbeck, Institut für Forstpflanzenzüchtung, Samenkunde und Immissionsforschung der Forstlichen Forschungsanstalt 8000 München 40, Amalienstraße 52

Diazomethanherstellung: 1/10 des Ansatzes von GATTERMANN und WIELAND Methylierung: Es wurden 41,19 mg trockener saurer Essigesterextrakt in 1/1 Äther/Methanol (Vol./p. a.) gelöst und mit einem Diazomethanüberschuss 15 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Eine währenddessen einsetzende milchige Trübung wurde jeweils sofort durch tropfenweise Methanolzugabe wieder beseitigt. Anschließend wurden überschüssiges Diazomethan und Solvens entfernt (30% Rotationsverdampfer). Der Rückstand wurde wie unter Kap. 2.11 getrocknet. Das getrocknete Methylierungsgemisch (18,3 mg) wurde wie das Ausgangsgemisch für weitere Versuche aufbewahrt.

2.3 Salatbiotest

Die Methodik entsprach im Prinzip dem Lactuca-Hypokotyltest von FRANKLAND und WARING.

Testorganismus: *Lactuca sativa* (Kagraner Sommer).

Die Samen wurden 48 h bei diffusem Tageslicht bei 20–23° in abgedeckter (Glasplatte), mit Quarzsand und Leitungswasser gefüllter Glasschale auf Filterpapier angekeimt. Zum Test gelangten nur Keimlinge mit 4–6 mm langen Primärwurzeln. Je Ansatz wurden in einem runden Glasgefäß (ϕ 3 cm) Essigesterquote des Extraktes durch Föhnen vom Solvens befreit und 0,5 ml Testmedium eingesetzt; im Falle der sauren Extrakte 0,25 ml Leitungswasser + 0,25 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,5; bei neutralem, methyliertem Extrakt nur 0,5 ml Leitungswasser. Bei Verwendung von Puffer wurde auch die Kontrolle mit Puffer angesetzt, ansonsten nur mit Leitungswasser.

Dann wurden 3 runde Filterpapierscheibchen eingelegt. Auf dem Filterpapier wurden 10 Keimlinge radial mit den Wurzeln nach außen hin angeordnet. Die Glaszyliner wurden mit durchsichtiger Haushaltsfolie und Gummiringen verschlossen (Verdunstungsschutz) und eine definierte Zeit (siehe Legenden der Abbildungen) bei Dauerlicht (Groluxleuchte) und Raumtemperatur (20–23°) gehalten.

Nach Beendigung des Versuches wurden die Keimlinge kurzzeitig mit 0,001% Bismarckbraun in 70% Äthanol behandelt, wobei die Radices bräunlich angefärbt wurden. Als Maß für das vegetative Wachstum diente nach Entfernung der Radices und der Keimblätter (Rasierklinge) die Hypokotyllänge (Meßgenauigkeit $\pm 0,5$ mm). Der größte und kleinste Wert jedes Ansatzes wurden verworfen, so daß für die Dosis-Wirkungs-Beziehungen jedem arithmetisch gemittelten Wert 8 Einzelwerte entsprechen.

2.4 Fichtenbiotest

Methodik analog Kap. 2.3. Testorganismus: *Picea abies*. Die Samen wurden nach 24 h Vorquellung in Leitungswasser bei Dunkelheit wie unter Kap. 2.3 beschrieben 7 Tage angekeimt. Zum Test gelangten Keimlinge mit 1–5 mm langen Radices, wobei die Anzahlen unterschiedlicher Phänotypen (verschiedene Wurzellängen) in Wirkstoff- und Kontrollansatz einander entsprachen. In ein rundes Glasgefäß (ϕ 5 cm), das den Wirkstoff enthielt (vgl. Kap. 2.3), wurden 2,5 ml Leitungswasser eingesetzt (Kontrolle analog ohne Wirkstoff). Je Ansatz wurden ein rundes Filterpapier eingelegt und 11 Keimlinge wie bei Kap. 2.3 beschrieben angeordnet.

Die Inkubation der folienverschlossenen Ansätze begann vormittags (10.00) und dauerte 168 h bei diffusem Tageslicht und normalem Hell-Dunkel-Rhythmus bei 20–23°.

Anschließend wurden die Radices 2 Min. wie unter Kap. 2.3 beschrieben angefärbt und zur Nachfärbung 10 Min. an der Luft liegen gelassen. Der Übergangsbereich zwischen

Wurzel (hellbraun) und Hypokotyl (grün) ist hellbraun oder weißlich-braun gefärbt. Bei der Auswertung (vgl. Kap. 2.3) wurde nur der grüne Teil als Hypokotylanteil gewertet.

3. Ergebnisse und Diskussion

Aus männlichen Fichtenblüten wurden durch Äther- und Essigesterextraktion saure Substanzgemische erhalten, die das vegetative Wachstum von Salat- und Fichtenkeimlingen hemmen. Abb. 1 zeigt die signifikant hemmende Wirkung des Rückstandes von 4 ml bei Raumtemperatur eingegangener Ätherphase (Kap. 2.11) auf das Wachstum von Salat im Biotest. Die Abb. zeigt außerdem die signifikant hemmende Wirkung des Rückstandes von 4 ml bei Raumtemperatur eingegangener Essigesterphase (Kap. 2.12) im Salatbiotest.

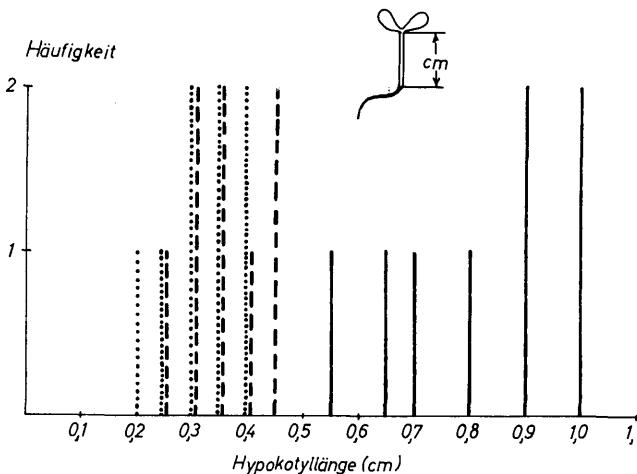


Abb. 1. — Hemmung des vegetativen Wachstums von Salatkeimlingen mit Äther- und Essigesterextrakt gegenüber Kontrolle ohne Extrakt.

Je Ansatz wurden 8 Hypokotyllängen ausgewertet (vgl. Abb. 3). Inkubationszeit: 72 h. Kontrolle: — Ätherextrakt: Essigesterextrakt: - - - -

(Inhibition of the vegetative growth of lettuce seedlings by ether- and acetic acid ester-extracts; control without extracts.

Per test 8 seedlings were evaluated (comp. fig. 3). Incubation: 72 h. Control: — ether-extract: acetic acid ester-extract: - - - -)

Wenngleich auch der Ätherextrakt Hemmwirkung zeigte, wurden weitere Untersuchungen wegen der höheren Ausbeute und der gleichfalls vorhandenen Hemmwirkung nur auf den Essigesterextrakt beschränkt.

Abb. 2 zeigt anhand einer Dosis-Wirkungs-Beziehung die hemmende Wirkung des nach Kap. 2.12 isolierten sauren Gemisches auf das Hypokotylwachstum von Salatkeimlingen. Die Häufigkeitsverteilung (Abb. 3) der beim Biotest mit 1130 µg Gemisch/0,5 ml Testmedium beobachteten Hypokotyllängen lieferte den entsprechenden Mittelwert für die zugehörige Dosis in Abb. 2.

Das vegetative Wachstum der Biotest-Organismen (Salat, Fichte) hängt sowohl vom pH, als auch von der Pufferkapazität des Testmediums ab. Im Hinblick auf weitere Biotests erschien deshalb eine Diazomethanbehandlung des sauren Gemisches von Vorteil, da durch das neutrale Methylierungsgemisch (Kap. 2.2), anders als beim unbehandelten sauren Gemisch, Pufferkapazität und pH des Biotestmediums kaum mehr beeinflußt werden.

Die Diazomethanbehandlung kann außerdem für eine bislang noch ausstehende gaschromatografische Auftren-

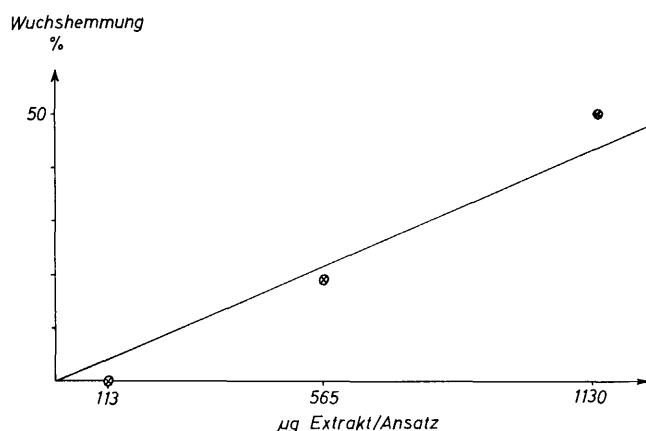


Abb. 2. — Hemmung des vegetativen Wachstums von Salatkeimlingen mit Essigesterextrakt aus männlichen Fichtenblüten.

% Wuchshemmung = 100% — Restwachstum in %; Kontrolle = 100%. Jeder Meßpunkt = Mittelwert aus 8 Keimlingen pro Ansatz (2 Extreme von 10 Keimlingen pro Ansatz verworfen). Inkubationszeit der Keimlinge: 48 h.

(Inhibition of the vegetative growth of lettuce seedlings by an acetic acid ester-extract isolated from male flowers of Norway spruce.

% Inhibition = 100% — Remaining growth in %. Control = 100%. Each value = mean value received from 8 seedlings per test (2 extreme values from 10 seedlings per test were eliminated). Incubation of the seedlings: 48 h).

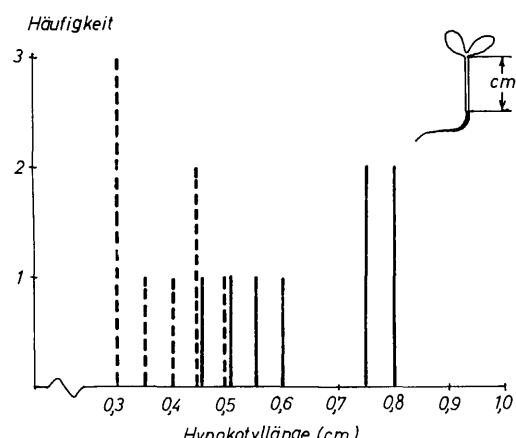


Abb. 3. — Histogramm zur Hemmwirkung von 1130 μg Extrakt pro 0,5 ml Testmedium (vgl. Abb. 2).

Die Abb. gibt die Häufigkeitsverteilung von je Ansatz beobachteten 8 Hypokotyllängen wieder. Kontrolle: — Extrakt: — — — (Histogram referring to fig. 2 (1130 μg extract per 0,5 ml growth medium).

Fig. shows the distribution of 8 evaluated seedlings per test. Control: — extract: — — —).

nung des Gemisches insofern nützlich sein, als durch sie saure Gruppen von Einzelkomponenten maskiert werden.

Bei den Versuchen zu den Abbildungen 2 und 3 wurden zwar durch Phosphatpufferung des Testmediums pH-Differenzen zwischen Kontrolle und Wirkstoffansatz vermieden, eine unkontrollierbare, geringfügige Änderung der Pufferkapazität und deren Auswirkung müssen jedoch bei diesen Versuchen im Wirkstoffansatz gegenüber der Kontrolle angenommen werden.

Beim methylierten Extraktgemisch fallen derartige Interpretationsschwierigkeiten von Wuchseffekten weg.

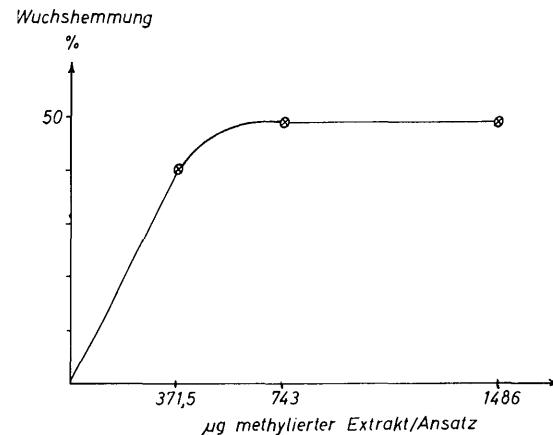


Abb. 4. — Hemmung des vegetativen Wachstums von Salatkeimlingen mit methyliertem Extrakt männlicher Fichtenblüten. Vgl. Legende Abb. 2. Inkubationszeit: 72 h.

(Inhibition of the vegetative growth of lettuce seedlings by a methylated extract isolated from male flowers of Norway spruce. Comp. fig. 2. Incubation: 72 h).

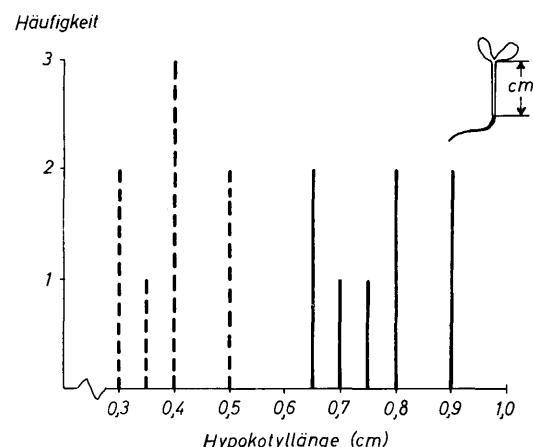


Abb. 5. — Histogramm zur Hemmwirkung von 1486 μg methyliertem Extrakt pro 0,5 ml Testmedium (vgl. Abb. 4). Vgl. Legende Abb. 3.

(Histogram referring to fig. 4 (1486 μg methylated extract per 0,5 ml growth medium). Comp. fig. 3).

Es zeigte sich, daß sowohl im Salat- als auch im Fichtenbiotest das vegetative Wachstum der Keimlinge durch den methylierten Extrakt nach Dosis-Wirkungs-Beziehungen und bei ausreichenden Dosen signifikant gehemmt wird, wobei die Wuchseffekte nicht von Unterschieden in pH und Pufferkapazität zwischen Kontrolle und Testansatz, sondern tatsächlich von einer Wirkstoff-Funktion einer (mehrerer) Komponente(n) herrührt/herrühren (Abbildungen 4 bis 7).

Ein Vergleich zwischen den Abbildungen 4 und 6 zeigt, daß bei Applikation gleicher Gemischkonzentrationen die Fichte offenbar wesentlich empfindlicher als Salat reagiert. Der Einfluß der etwas unterschiedlichen Testbedingungen zwischen Salat- und Fichtenbiotest (Kap. 2.3 und 2.4) könnte hierfür verantwortlich sein. Andererseits wäre eine derartige Wirkstoffspezifität durchaus erklärlich, da in diesem Fall Herkunft der/des Wirkstoffe(s) und Biotestorganismus in der Art übereinstimmen.

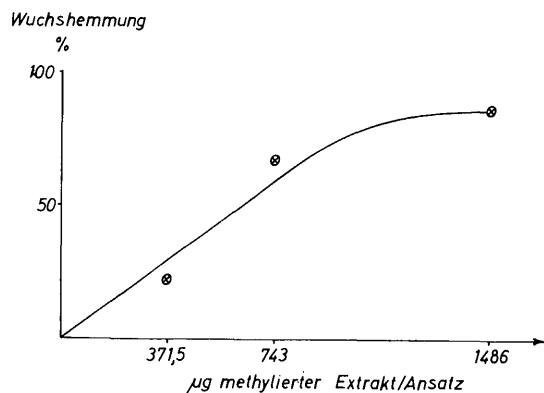


Abb. 6. — Hemmung des vegetativen Wachstums von Fichtenkeimlingen mit methyliertem Extrakt aus männlichen Fichtenblüten. Vgl. Legende Abb. 2. Jeder Meßpunkt = Mittelwert aus 9 Keimlingen pro Ansatz (2 Extremwerte von 11 Keimlingen pro Ansatz verworfen). Inkubationszeit: 168 h.

(Inhibition of the vegetative growth of Norway spruce seedlings by a methylated extract isolated from male flowers of Norway spruce.

From 11 seedlings per test only 9 were evaluated (comp. fig. 2). Incubation: 168 h.)

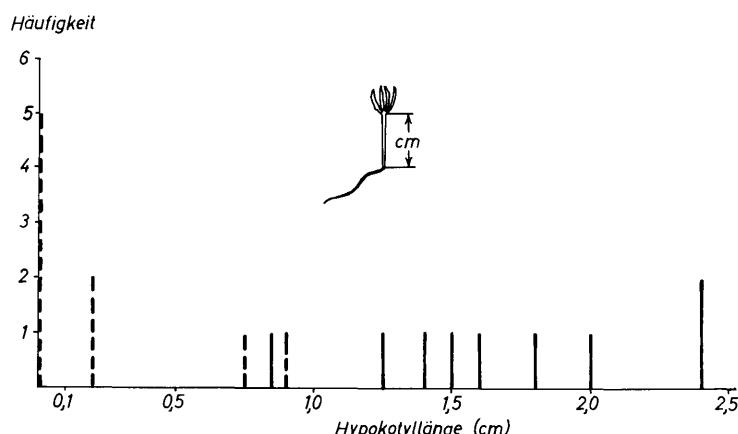


Abb. 7. — Histogramm zur Hemmwirkung von 1486 μg methyliertem Extrakt pro 2,5 ml Testmedium (vgl. Abb. 6).

Vgl. Legende Abb. 3. Je Ansatz wurden 9 Hypokotyllängen beobachtet.

(Histogram referring to fig. 6 (1486 μg methylated extract per 2.5 ml growth medium).

Comp. fig. 3. 9 seedlings per test were evaluated.)

Entwicklungsphase	Zellwachstum		
	vW	Zelluläre(r) Wirkstoff(e) X	gW
Jugendphase (Embryo, juvénile Pflanze)	+	-	-
Reifephase (Blütenansatz)	-	+	+

Abb. 8. — Umstimmung von vegetativem Wachstum (vW) zu generativem Wachstum (gW) bei Fichte.

X = Hemmstoff(e) des vW; in generativem Gewebe (Blüten) gebildet oder/und akkumuliert.

(Transition from vegetative growth (vW) to generative growth (gW) in Norway spruce.

X = Inhibitor(s) of vegetative growth; synthesized and/or accumulated in generative tissue (blossoms.)

Abb. 8 veranschaulicht ein Arbeitskonzept zur Umstimmung von vegetativem Wachstum (vW) zu generativem Wachstum (gW), das die physiologische Funktion der gefundenen Wuchshemmungen erklären könnte.

Es würde auch den eingangs (Kap. 1) erwähnten Zusammenhang zwischen Unterdrückung der Apikaldominanz und Fruktifikationssteigerung verständlich machen.

In den beschriebenen aktiven Substanzgemischen aus Fichtenblüten liegt/liegen möglicherweise der/die Wirkstoff(e) X des Konzepts vor. Die zelluläre Synthese von X wäre durch das Zusammenwirken äußerer (Licht, Temperatur, Ernährung) und innerer Faktoren (physiologischer Zustand, Alter) zu erklären. X könnte in generativen Organen gebildet oder/und akkumuliert werden.

Dieses Arbeitsmodell schließt die Mitwirkung weiterer Regelmechanismen, z. B. Initiierung der Umstimmungsphase durch genspezifische Hormone, nicht aus.

Der Vorstellung Abb. 8 entsprechend, könnte X entweder das vegetative Wachstum konzentrationsabhängig hemmen und gleichzeitig das generative fördern (hohe zelluläre Konzentrationen an X), oder umgekehrt (geringe Konzentrationen an X). Nach dieser Vorstellung sollte X erst in der Umstimmungsphase in nennenswertem Umfang gebildet werden.

Die Wirkung von X wäre auf wenigstens drei Ebenen denkbar:

a) Beeinflussung von Enzymaktivitäten (Proteinebene) und/oder

b) direkte Hormonwirkung auf Gene (Nukleinsäureebene) und/oder

c) Veränderung morphologischer Strukturen, ähnlich der Gerbung von Membranproteinen durch phenolische Substanzen (Ebene der Zellorganellen).

X könnte gleichermaßen in männlichen wie weiblichen Blüten vorkommen. Die Frage nach den Ursachen der geschlechtlichen Determination (3) ist mit den vorhandenen Informationen nicht beantwortbar (METZNER 1973).

Aus forstlicher Sicht wäre es wünschenswert, durch Applikation fichtenspezifischer Wuchsstoffe (z. B. von X) unter definierten Bedingungen die Umstimmung zu generati-

vem Wachstum (erhöhte Blühwilligkeit) möglicherweise intensivieren oder prinzipiell einleiten zu können.

Untersuchungen über chemische Natur und Wirkungsweise der (vielleicht synergistisch) wirksamen Komponente(n) der beschriebenen aktiven Substanzgemische wären die nächsten Schritte um zu klären, ob die erhaltenen Ergebnisse für die Praxis mittelbar nützlich sein können.

4. Zusammenfassung

Es wird die Darstellung eines Gemisches unbekannter saurer Verbindungen aus männlichen Fichtenblüten beschrieben. Der Extrakt enthält mindestens eine wachstumsregulierende Komponente, da er sowohl in saurer als auch in methylierter Form im Biotest das vegetative Wachstum von Salat- und Fichtenkeimlingen hemmt.

Anhand dieser Ergebnisse wird folgendes Arbeitskonzept zur Beeinflussung der Blütenbildung bei Fichte vorgeschlagen:

Der/die gefundene(n) Hemmstoff(e) wird/werden nur bei generativem Wachstum (z. B. in Blüten) angehäuft, während des vegetativen Wachstums (Jugendphase) hingegen nur in geringerem Umfang oder gar nicht. Der/die Hemmstoff(e) werden nur unter definierten äußeren und inneren Bedingungen (Licht, Temperatur, Ernährung, Alter der Pflanze) gebildet.

Möglicherweise kann das generative Wachstum der Fichte durch den/die beschriebenen Hemmstoff(e) des vegetativen Wachstums stimuliert werden.

Schlagworte: Vegetatives Wachstum, Umstimmung, generatives Wachstum, *Picea abies* (L.) KARST.

Summary

A method is described to prepare a mixture of unknown acidic compounds from male flowers of Norway spruce, containing at least one growth-regulating component. According to the results of various bio-assays showing inhibition of the vegetative growth of lettuce and Norway spruce by the acidic or methylated mixture, a conception for influencing flower formation of Norway spruce is proposed.

The detected inhibitor(s) is/are thought to accumulate only when generative growth takes place, e.g. in flowers. During vegetative growth (juvenile phase) inhibitor(s) should be produced only at a low concentration or not at all. Synthesis of inhibitor(s) is thought to be possible only when well defined external and internal conditions (such as light, temperature, nutrition, age of plant) are provided.

Possibly the generative growth of Norway spruce could be stimulated by applying the described inhibitor(s) of the vegetative growth to the plant.

Key words: Vegetative growth, shift, generative growth, *Picea abies* (L.) KARST.

Literatur

- BLEYMÜLLER, H.: Blühstimulation. *Silvae Genetica* 22, 45–50 (1973). — BLEYMÜLLER, H.: Investigations on the Dependence of Flowering in Norway Spruce (*Picea abies* (L.) KARST.) upon Age. *Acta Horticulturae* 56, 169–172 (1976). — METZNER, H.: Ontogenetische Veränderungen des Stoffwechsels in Biochemie der Pflanzen, Seite 318. Verlag Enke, Stuttgart (1973). — GATTERMANN, L. und WIELAND, TH.: Praxis des organischen Chemikers, Seite 235, 236. Verlag Walter de Gruyter u. Co., Berlin (1962). — FRANKLAND, B. and WAREING, P. F.: Effect of Gibberellic Acid on Hypocotyl Growth of Lettuce Seedlings. *Nature* 185, 255, 256 (1960).

The Application of DNA Reassociation Kinetics to evaluate Picea Crossability Patterns

By J. P. MIKSCHÉ and Y. HOTTA¹⁾

(Received October 1976 / March 1977)

Introduction

Interspecific hybridization is an important method of tree improvement. Hybrid plant development is often unsuccessful because of interfering factors such as pollen incompatibility, syngamic inhibition, and embryo inviability or subsequent abnormal ontogeny yielding embryo abortion (MIKKOLA, 1969; KRIEBEL, 1973).

Picea glauca (MOENCH) Voss hybridizes successfully with *Picea sitchensis* (BONG.) CARR but not with *Picea abies* (L.) KARST. (NIENSTAEDT and TEICH, 1972; ROCHE and FOWLER, 1975). However, a putative hybrid between *Picea glauca* and *Picea abies* cv acrocona (FRIES) KRIE has been reported (JEFFERS, 1971). MIKKOLA (1969) performed reciprocal crosses between *Picea abies* and *Picea glauca* and abnormal zygotes were formed that displayed inhibited development at various stages of pro-embryo ontogeny.

The *Picea glauca* × *Picea sitchensis* and *Picea glauca* × *Picea abies* hybridizations are yes and no crossing situations, respectively. This combination of interspecific ge-

netic compatibilities offers a system that is amenable to the evaluation of the crosses at the molecular DNA level. The DNA-DNA homologies of the three species were, therefore, tested by means of liquid reassociation kinetics (BRITTEN and KOHNE, 1968) of repetitive, intermediate, and near unique copy DNA fractions to ascertain if reassociation kinetics are in agreement with the expected reannealing kinetic hypothesis in view of the demonstrated crossability patterns.

Materials and Methods

Extraction and purification of DNA from dormant seeds of *Picea abies*, *Picea glauca*, and *Picea sitchensis* are similar to the method of STERN (1968) and subsequently modified for conifers by MIKSCHÉ and HOTTA (1973) and HALL, MIKSCHÉ, and HANSEN (1976).

The seeds were washed in 10 volumes of 10% sodium hypochlorite ($\text{NaClO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in a beaker covered with cheesecloth. The seed and hypochlorite mixture was stirred vigorously for 20 minutes and the hypochlorite solution was decanted and the seeds were rinsed in running, cold, tap water for 45 minutes. The seeds were then placed on a flat surface and dried. The washed and dried seeds were ground to a fine powder with sand (acid washed and ignited) in a

¹⁾ The authors are: Principal Cytologist, North Central Forest Experiment Station, USDA Forest Service, Institute of Forest Genetics, Rhinelander, Wisconsin; and Research Biologist, University of California-San Diego, La Jolla, California, respectively.