

- to 56. Prague (1965). — 12a. HIRONO, Y., and G. P. REDEI: Somatic sectoring after X-irradiation and ethyl methanesulfonate treatment. *Arabidopsis Inform. Serv.* **2**, 15 (1965). — 13. JACOBS, M.: Mutagenicity of some monofunctional alkylating agents. In: G. RÖBBELEN (Ed.), *Arabidopsis Research*, pp. 184—190. Göttingen 1965. — 14. KRIEG, D. R.: Ethyl methanesulfonate-induced reversion of bacteriophage T4<sub>rII</sub> mutants. *Genetics* **48**, 561—580 (1963). — 15. MCKELVIE, A. D.: Studies in the induction of mutations in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Radiation Bot.* **3**, 105—123 (1963). — 16. MOES, A.: Comparison of the effects of X-rays and of ethyl methanesulfonate in barley. In: *Barley Genetics I*, pp. 82 bis 91. Wageningen 1964. — 17. MÜLLER, A. J.: Mutationen mit embryonaler Manifestation bei *Arabidopsis thaliana*. *Naturwissenschaften* **48**, 579 (1961). — 17a. MÜLLER, A. J.: Embryonentest zum Nachweis rezessiver Letalfaktoren bei *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Zbl.* **82**, 133—163 (1963). — 18. MÜLLER, A. J.: Mutationsauslösung durch Nitroso-methylharnstoff bei *Arabidopsis*. *Der Züchter* **34**, 102 bis 120 (1964a). — 19. MÜLLER, A. J.: Keimwurzeltest zur Bewertung des somatischen Strahlenschadens bei *Arabidopsis*. *Kulturpflanze* **12**, 237—255 (1964b). — 20. MÜLLER, A. J.: The chimerical structure of  $M_1$ -plants and its bearing on the determination of mutation frequencies in *Arabidopsis*. In: J. VELEMINSKY and T. GICHNER (Ed.), *Induction of mutations and the mutation process*, pp. 46—52. Prague 1965a. — 21. MÜLLER, A. J.: Comparative studies on the induction of recessive lethals by various mutagens. In: G. RÖBBELEN (Ed.), *Arabidopsis Research*, pp. 192—199. Göttingen 1965b. — 22. MÜLLER, A. J.: Beeinflussung der radiomimetischen Wirksamkeit von Nitrosamiden durch Stoffwechselinhibitoren. *Naturwissenschaften* **52**, 213 (1965c). — 23. MÜLLER, A. J.: Über den Zeitpunkt der Mutationsauslösung nach Einwirkung von N-Nitroso-N-methylharnstoff auf quellende Samen von *Arabidopsis*. *Mutation Res.* **2**, 426—437 (1965d). — 24. MÜLLER, A. J.: Reparation chemisch induzierter prämutativer Läsionen durch Rücktrocknung der behandelten Samen? *Biol. Zbl.* **84**, 759 bis 762 (1965e). — 25. MÜLLER, A. J.: Durch Röntgenbestrahlung des Pollens von *Arabidopsis* induzierte diplophatische und haplophatische Letalmutationen. *Kulturpflanze* **13**, 163—171 (1965f). — 26. MÜLLER, A. J.: Die Bestimmung von Mutationsfrequenzen nach mutagener Behandlung von autogamen Pflanzen (1967, in Vorbereitung). — 27. MÜLLER, A. J.: Mutagenic activity of tri-2-chloroethylamine. *Arabidopsis Inform. Serv.* **3**, 24 (1966a). — 28. MÜLLER, A. J.: Induction of recessive lethals by X-rays. *Arabidopsis Inform. Serv.* **3**, 22 (1966b). — 29. NAGARAJA RAO, R., and A. T. NATARAJAN: Mutagenicity of some alkyl alkanesulfonates in barley. *Mutation Res.* **2**, 132—148 (1965). — 30. NATARAJAN, A. T., and G. SHIVASANKAR: Studies on modification of mutation response of barley seeds to ethyl methanesulfonate. *Z. Vererbungsl.* **96**, 13—21 (1965). — 31. NILAN, R. A., C. F. KONZAK, R. E. HEINER and E. E. FROESE-GERTZEN: Chemical mutagenesis in barley. In: *Barley Genetics I*, pp. 35—54. Wageningen 1964. — 32. RIEGER, R., und A. MICHAELIS: Chromatidenaberrationen nach Einwirkung von Äthylmethansulfonat (Methansulfonsäureäthylester) auf Primärwurzeln von *Vicia faba* L. *Kulturpflanze* **8**, 230—243 (1960). — 33. RÖBBELEN, G.: Wirkungsvergleich zwischen Äthylmethansulfonat und Röntgenstrahlen im Mutationsversuch mit *Arabidopsis thaliana*. *Naturwissenschaften* **49**, 65 (1962). — 34. RÖBBELEN, G.: The effects of two endogenous factors on artificial mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. In: J. VELEMINSKY and T. GICHNER (Ed.), *Induction of Mutations and the Mutation Process*, pp. 42—45. Prague 1965a. — 35. RÖBBELEN, G.: Plastom mutations. In: G. RÖBBELEN (Ed.), *Arabidopsis Research*, pp. 100—103. Göttingen 1965b. — 36. SHAMA RAO, H. K., and E. R. SEARS: Chemical mutagenesis in *Triticum aestivum*. *Mutation Res.* **1**, 387—399 (1964). — 37. SPECKMANN, G. J.: The mutagenic effect of treatment with EMS at different temperatures in *Pisum sativum*. *Euphytica* **13**, 337—344 (1964). — 38. TESSMAN, I., R. K. PODDAR and S. KUMAR: Identification of the altered bases in mutated single-stranded DNA I. In vitro mutagenesis by hydroxylamin, ethyl methansulfonate and nitrous acid. *J. Mol. Biol.* **9**, 352—363 (1964). — 39. WALLES, S., and G. AHNSTRÖM: Correlation between the mutation frequency and the alkylation of deoxyribonucleic acid upon treatment of seeds of *Arabidopsis thaliana* with ethyl methanesulfonate. In: G. RÖBBELEN (Ed.), *Arabidopsis Research*, pp. 165—169. Göttingen 1965. — 40. VEEN, J. H. VAN DER, and M. GERLACH: Chimeric structure after EMS treatment of seeds. *Arabidopsis Inform. Serv.* **2**, 14 (1965).

## Feinstruktur der Pollenschläuche im Griffel von *Petunia*

J. VAN DER PLUIJM und H. F. LINSKENS

Botanisches Laboratorium der Universität Nijmegen

### Fine structure of pollen tubes in the style of *Petunia*

**Summary.** From electron microscopic observation of transverse sections through the style of *Petunia* it was possible to show that the pollen tubes grow within the compact matrix of the middle lamellae of the transmitting tissue. This it does enzymatically by dissolving a pipelike path in front of the tube tip. From the fine structure of the cytoplasm and the organelle content, the cells of the tubes and of the transmitting tissue can be distinguished. Differences in the fine structure of the cytoplasm and the wall between inhibited (incompatible) and normal growing (compatible) pollen tubes can be demonstrated *in situ*. This is discussed in terms of localisation of the incompatibility reaction on the surface of the inhibited pollen tubes. The interpretation is in agreement with genetical and biochemical observations elsewhere.

Die submikroskopische Struktur der Pollenschlauchwand wurde schon wiederholt untersucht (O'KELLEY u. CARR 1954, MÜHLETHALER u. LINSKENS 1956). Auch liegt eine Reihe von Beobachtungen

über die Feinstruktur des Pollenschlauchplasmas nach Keimung *in vitro* vor (LARSON u. LEWIS 1962, ROSEN 1964, ROSEN et al. 1964, SASSEN 1964a, 1964b). Hingegen fehlen bislang elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pollenschläuchen *in situ*, d. h. während ihres Wachstums durch das Leitgewebe des Griffels. Im Hinblick auf eventuelle Änderungen in der Feinstruktur im Zusammenhang mit der Wachstumshemmung des Pollenschlauches, welche als Folge inkompatibler Bestäubung innerhalb selbst-inkompatibler Rassen auftritt (LINSKENS 1955, 1961, 1965), wurde eine Einsicht in die submikroskopische anatomische Situation bei dem biochemisch gut untersuchten Objekt versucht.

### Material und Methode

Griffel von *Petunia hybrida* Klon T2U (Selbststerilitätsallele  $S_3S_3$ ) wurden mit eigenem Pollen bzw. mit Pollen des Klones W166k (Selbststerilitätsallele  $S_1S_2$ ) bestäubt und in der abgeschnittenen Blüte bei

25 °C im Dunkeln gehalten. Unter diesen Bedingungen setzt die Hemmung der Selbstungsschläuche nach ca. 3 Stunden ein, die nach ca. 12–16 Stunden zu einer Sistierung des Pollenschlauchwachstums führt. In der gleichen Zeit wachsen die Fremdungsschläuche mit nahezu gleichbleibender Geschwindigkeit durch den Griffel (LINSKENS 1955). Nach 17–18 Stunden wurden die Griffel entnommen, 2 Stunden lang in 2%igem KMnO<sub>4</sub> fixiert und in Epon 8/2 eingebettet. Die mit einem Porter-Blum-Mikrotom hergestellten Dünnschnitte wurden mit einem Philips EM 100 C untersucht. Die Aufnahmen erfolgten auf Kodak Fine Grain Positive Film und sind nicht retuschiert.

### Beobachtungen

1. Auf den Abbildungen 1 und 2 sind Übersichtsaufnahmen von Querschnitten durch das Leitgewebe mit den darin befindlichen Pollenschläuchen wiedergegeben. Die Pollenschläuche (P) fallen sofort ins Auge durch die hellen Höfe, von denen sie umgeben sind. Im Gegensatz dazu sind die Zellen des Leitgewebes (L) eingebettet in eine elektronenoptisch dichte Matrix. Da man sowohl bei den Pollenschläuchen als auch bei den Leitgewebszellen deutlich die Zellwand unterscheiden kann, muß die Matrix vorläufig als extrem verdickte Mittel-Lamelle bezeichnet werden, welche wahrscheinlich aus Pektin besteht.

Die Pollenschläuche wachsen in der genannten Matrix. Auf den Querschnitten sind sie von einem elektronenoptisch leeren Hof umgeben.

Die Unterscheidung der Pollenschläuche von den Leitgewebszellen kann auf den Querschnitten anhand folgender Kriterien erfolgen: 1. Sofern sich in dem Pollenschlauch ein freier Zellkern befindet, ist dies der stark gelappte vegetative Kern (Abb. 3), während der Kern in den Griffel-Zellen meist mehr oder weniger abgerundet ist.

2. Im Cytoplasma der Pollenschläuche liegen keine großen Vakuolen vor. Wird ein Pollenschlauch jedoch hinter einem Kallose-Pfropfen quer geschnitten, so ist dieser zwar nicht mehr mit Plasma gefüllt, sondern leer, was bei gleichzeitigem Durchwachsen zahlreicher Schläuche zum Eindrücken der runden Form führt.

3. Das Cytoplasma der Pollenschläuche ist dicht, stets reich an Mitochondrien, Golgi-Material und gefüllt mit endoplasmatischem Retikulum (Abb. 4). Trifft der Schnitt den Schlauch in der Spitzen-Region, so werden Anhäufungen von Golgi-Vesikeln gefunden (Abb. 5), wie sie bereits SASSEN (1964) und ROSEN (1964) bei *in vitro* kultivierten Pollenschläuchen regelmäßig beobachtet hatten.

4. Die Stärkekörper (S) in Pollenschläuchen sind selten, meist sehr klein und von einfacher Struktur. In den stärkeren Plastiden der Zellen des Leitgewebes finden sich stets mehrere Doppelmembranen.

5. Die Wand der Pollenschläuche ist deutlich dicker als die Wand der Zellen des Leitgewebes.

In den gehemmten Schläuchen gleichen Alters ist das Plasma blasig degeneriert. Die Wand ist stark verdickt (Abb. 7 und 8). Auffallend ist eine schaumig-körnige Struktur an der Wandoberfläche, die als

eine Aureole den gehemmten Pollenschlauch in dem freien Raum der Matrix umgibt.

Häufig werden auch Pollenschläuche beobachtet, die während ihres Wachstums im Leitgewebe aufplatzen und degenerieren (Abb. 6). Dabei wird der plasmatische Inhalt in die Matrix entlassen, so daß man in bestimmten Schnittebenen scheinbar freie, in der Mittellamelle befindliche, noch mehr oder weniger intakte Mitochondrien beobachten kann. Diese stammen jedoch von den häufig auf dem Wege zurückbleibenden Schläuchen, die nach Aufreißen der Wand noch teilweise funktionelle Plasmaorganelle in das Leitgewebe entlassen.

### Diskussion

Die Pollenschläuche im Griffel wachsen in den Mittel-Lamellen zwischen den Leitgewebs-Zellen. Sie schaffen sich darin röhrenförmige Kanäle, die im Querschnittsbild als helle Ränder um die Wände hin hervortreten. Man kann annehmen, daß dieser Raum, den sich die Schläuche als Wachstumsbahn bereiten, enzymatisch geschaffen ist. Er ist vor der Pollenschlauch-Spitze bereits anwesend und nimmt im Durchmesser nach hinten um etwa das Doppelte zu. Das hierbei freigesetzte Material dürfte gleichzeitig durch den wachsenden Pollenschlauch resorbiert und als Substrat verwendet werden. Damit würden auch elektronenoptisch mikroskopische Befunde (HUBER u. SCHOCH-BODMER 1945, 1947) und ein biochemischer Befund (LINSKENS u. ESSER 1960) über die fermentative Auflösung der Mittellamelle durch die Pollenschläuche bestätigt sein.

Die Feinstruktur des Cytoplasmas der normal wachsenden Pollenschläuche *in situ* und deren Organell-Population weicht nicht von den Beobachtungen an *in vitro* gekeimten Pollenschläuchen, wie sie SASSEN (1964) und ROSEN (1964) mitgeteilt haben, ab. Dies ist ein Hinweis dafür, daß zumindest in der Beginnphase der Keimung und des Wachstums von Pollenschläuchen *in vitro* und *in situ* gleichartige Verhältnisse vorliegen. Weitere Untersuchungen über Strukturabweichungen bei spezifischer und unspezifischer Hemmung der Pollenschläuche sind im Gange.

Die hier mitgeteilten Fotos von Querschnitten aus einem umfangreichen Beobachtungsmaterial zeigen, daß die biochemische Barriere der Inkompatibilität nicht nur auf mikroskopischer Ebene zu Störungen (SCHLÖSSER 1961), sondern auch zu einer frühzeitigen Degeneration des Cytoplasmas und seiner Organelle führt. Diese Auflösungserscheinungen gehen zeitlich parallel mit den Änderungen physiologischer Prozesse (LINSKENS 1955, 1964). Von besonderem Interesse sind die abweichende Wandstruktur, die in Übereinstimmung ist mit früheren Befunden (MÜHLETHALER u. LINSKENS 1956), wonach bei gleichbleibender Streuungstextur die Zahl der Zellulose-Mizellen in der Wand des inkompatibel gehemmten Schlauches vergrößert und die Zahl der Kallose-Pfropfen pro Wegeinheit vermehrt (LINSKENS u. ESSER 1957) ist. Die nur beim gehemmten Schlauch in der Spitzenregion auftretende schaumig-körnige Aureole dürfte ein erster sichtbarer Hinweis für die Lokalisierung der Inkompatibilitäts-Reaktion oder deren Folge-

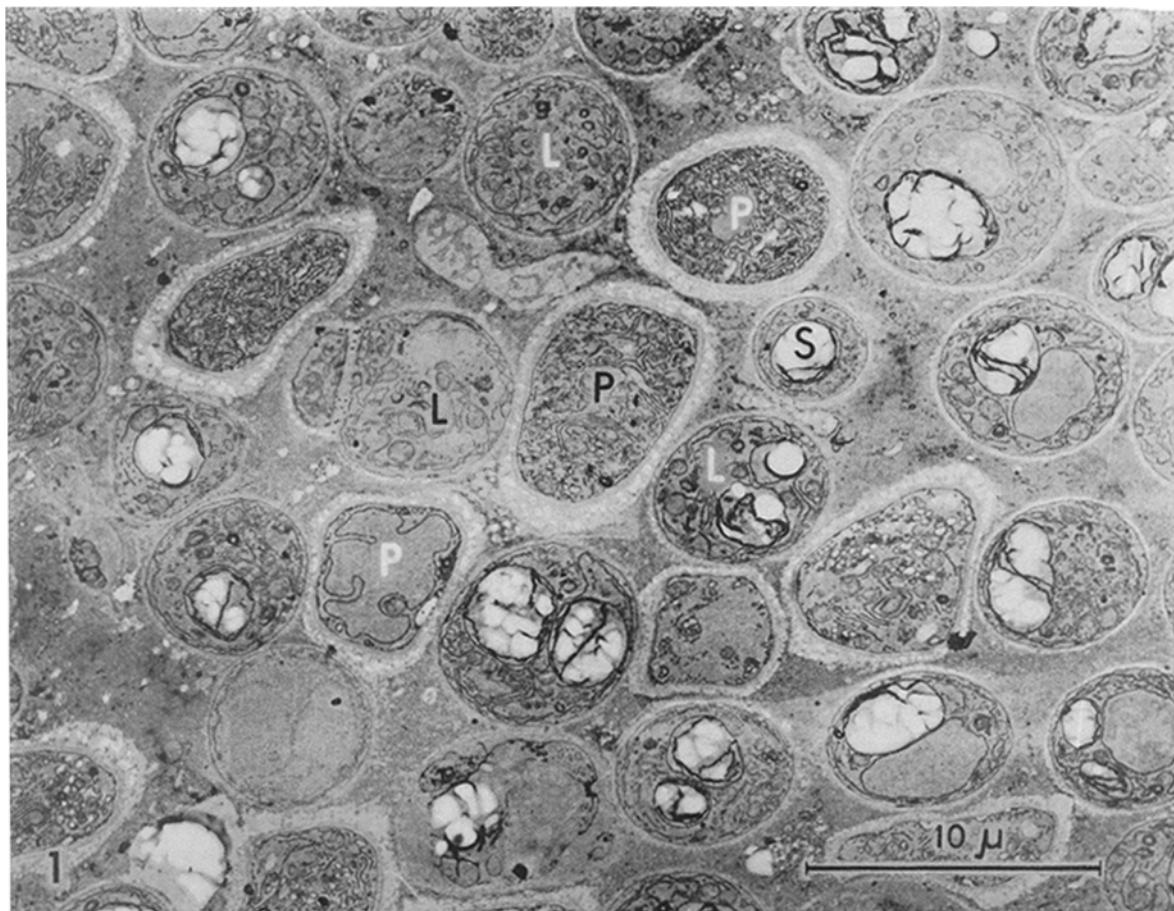


Abb. 1. Übersichtsbild eines Querschnittes durch das Leitgewebe eines fremdbestäubten Griffels. — Abb. 2. Übersichtsfoto eines Querschnittes durch das Leitgewebe eines selbstbestäubten Griffels. — Abb. 3 (Ausschnitt aus Abb. 1). Der vegetative Kern in dem kompatibel wachsenden Pollenschlauch ist stark gelappt und nimmt den größten Raum ein. Unten eine angeschnittene Leitgewebszelle mit großem Stärkekorn. — Abb. 4. Der wachsende Pollenschlauch mit seinem gesunden Plasma. — Abb. 5. In der Spitzenregion ist das Plasma reich an Golgi-Vesikeln, die ihren Inhalt in die im Aufbau befindliche Wand entleeren. —

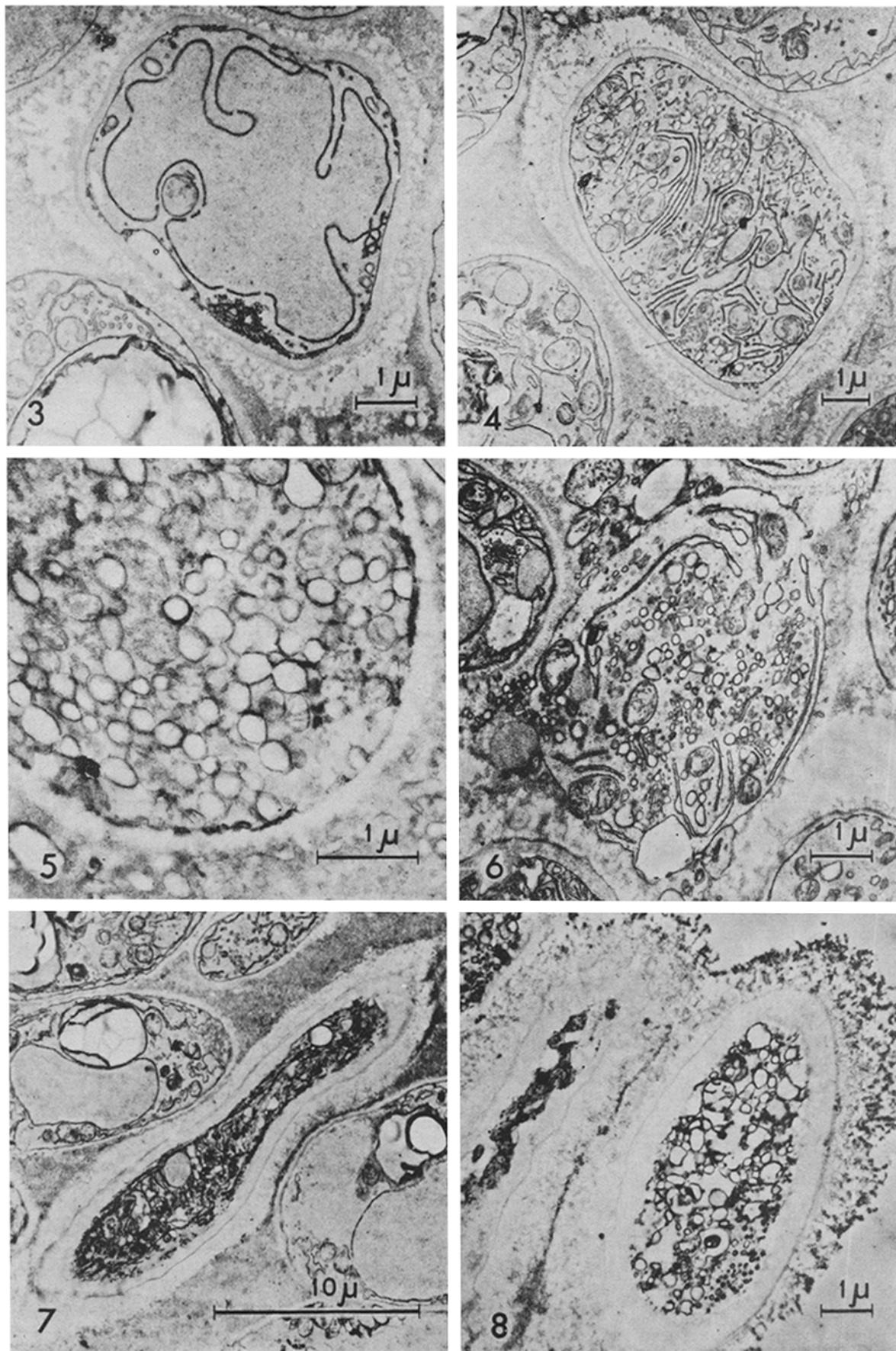


Abb. 6. Degenerierender Pollenschlauch. Durch die sich auflösende Wand wird der teilweise noch funktionsfähige Inhalt mit seinen Organellen in die Matrix des Leitgewebes entleert. — Abb. 7. Der kollabierte, dickwandige, inkompatibel gehemmte Pollenschlauch wird durch die turgeszenten Leitgewebszellen eingedrückt. Die Wand des Pollenschlauches ist stark verdickt. — Abb. 8. Die beiden gehemmten Pollenschläuche haben ein blasig degeneriertes Cytoplasma, ineinander fließende Vakuolen und eine stark verdickte Wand. In der Spitzenregion befindet sich an der Außenseite ein Kranz schaumiger Körnchen.

Reaktionen sein. Schon MÄKINEN und LEWIS (1962) hatten auf Grund genetischer und immunologischer Untersuchungen vermuten können, daß der Ort der Hemmreaktion die Wand des Pollenschlauches ist.

#### Literatur

1. LARSON, D. A., and C. W. LEWIS: Cytoplasm in mature, non-germinated and germinated pollen. In: S. S. BREESE (Ed.), Electron Microscopy 2, W-11 (1962).
- 2. LINSKENS, H. F.: Physiologische Untersuchungen der Pollenschlauchhemmung selbststeriler Petunien. Z. Bot. 43, 1–44 (1955).
- 3. LINSKENS, H. F.: Biochemical aspects of incompatibility. Rec. Adv. Bot. (Toronto) 2, 1500–1503 (1961).
- 4. LINSKENS, H. F.: Biochemistry of incompatibility. Genetics today 3, 629–635 (1965).
- 5. LINSKENS, H. F., u. K. ESSER: Über die spezifische Anfärbung der Pollenschläuche im Griffel und die Zahl der Kallose-Pfropfen nach Selbstung und Fremdung. Naturwissenschaften 44, 16 (1957).
- 6. LINSKENS, H. F., u. K. ESSER: Stoffaufnahme des Pollenschlauches aus dem Leitgewebe des Griffels. Proc. Kon. Nederl. Akad. Wet. (Amsterdam) C 62, 150–153 (1959).
- 7. MÄKINEN, Y. L. A., and D. LEWIS: Immunological analysis of incompatibility (S) proteins and of cross reacting material of a self-compatible mutant of

- Oenothera organensis. Genet. Res. 3, 352–363 (1962).
8. MÜHLETHALER, K., u. H. F. LINSKENS: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pollenschläuchen. Experientia (Basel) 12, 253–254 (1956).
- 9. O'KELLEY, J. C., and P. H. CARR: An electron micrographic study of cell walls of elongating cotton fibers, root hairs and pollen tubes. Amer. J. Bot. 41, 261–264 (1954).
- 10. ROSEN, W. G.: Chemotropism and fine structure of pollen tubes. In: H. F. LINSKENS (Ed.), Pollen Physiology and Fertilization, p. 159–166. Amsterdam 1964.
- 11. ROSEN, W. G., S. R. GAWLIK, W. V. DASHEK and K. A. SIEGESMUND: Fine structure and cytochemistry of *Lilium* pollen tubes. Amer. J. Bot. 51, 61–71 (1964).
- 12. SASSEN, M. M. A.: Fine structure of germinated *Petunia* pollen. In: H. F. LINSKENS (Ed.), Pollen Physiology and Fertilization, p. 167–169. Amsterdam 1964a.
- 13. SASSEN, M. M. A.: Fine structure of *Petunia* pollen grain and pollen tube. Acta Bot. Neerl. 13, 175–181 (1964b).
- 14. SCHÖCH-BODMER, H., u. P. HUBER: Auflösung und Aufnahme von Leitgewebesubstanz durch die Pollenschläuche. Verh. Schweiz. Naturforsch. Ges. 1945, 161–162.
- 15. SCHÖCH-BODMER, H., u. P. HUBER: Die Ernährung der Pollenschläuche durch das Leitgewebe. Vj. Schr. Naturforsch. Ges. Zürich 92, 43–48 (1947).
- 16. SCHLÖSSER, K.: Cytologische und cytochemische Untersuchungen über das Pollenschlauchwachstum selbststeriler Petunien. Z. Bot. 49, 266–288 (1961).

## Versuche zur Frage der Erhaltungszüchtung beim Kulturchampignon

### II. Vermehrung durch Gewebekulturen

GERDA FRITSCHE

Max-Planck-Institut für Kulturpflanzenzüchtung, Hamburg-Volksdorf

#### Experiments on maintenance of strains of the cultivated mushroom

##### II. Propagation by tissue culture

**Summary.** 1. In this report the suitability of the so-called "tissue culture method" for multiplication and preservation of mushroom strains is investigated. The multiplication of the plectenchyme is called tissue culture by the mushroom breeder. Under sterile conditions pieces from the interior of the fruiting bodies are cut and inoculated on agar. Soon new mycelium begins to form there.

2. No influence of the size of the pieces on the growth of the mycelium could be noticed.

3. On the other hand was shown, that mushroom strains can react very differently to the nutrients available.

During the modification from generative to vegetative phase they are especially sensitive to their lack. Tissue cultures growing slowly because of poor nutrition, developed as quickly on nutritive agar as those tissue cultures which had been grown on this agar from the beginning.

4. Growth tests were carried out on pieces of tissue from fruiting bodies of different weight and picked at different dates from two multisporous and three single-sporous cultures. One out of 20 tissue cultures did not grow like the original strain. It came from a single spore culture and grew slower than normal.

No infection of the tissue culture could be shown.

5. Yield tests were carried out with tissue cultures of large and small fruiting bodies from a multisporous culture and with some picked in the beginning and end of the

harvest. The yield of half the tissue cultures in all three tests was lower than that of mycelium propagated by division; no tissue culture yields were higher.

6. No influence of the weight of the fruiting body used for tissue culture on the average weight of those growing in tissue culture could be noticed.

7. There was influence of the harvesting time of the fruiting bodies used for tissue culture on the course of harvest from the tissue-culture. The fruiting bodies picked early were more productive sooner than those which had been gathered late.

From the mixture of genotypes of multisporous culture B hyphae with genes for early yield probably produced the first fruiting bodies.

8. Yield tests on tissue cultures of early and late fruiting bodies gained from two single spore cultures showed again nearly half the tissue-cultures in both tests to be below the standard, and only one tissue culture was above it in either test.

In one of the single spore cultures there was an influence of the harvesting time of the fruiting bodies used for tissue culture on the course of harvest from the tissue culture.

9. Through multiplication of a fruiting body of a new shape, arising spontaneously in an earlier tissue culture a commercially useful strain could be bred. The yield, rather low in the beginning, was increased considerably by further tissue cultures.

10. According to the results of these tests with normal cultures preservation of strains through multiplication in tissue culture cannot be recommended.

Unter Gewebekultur versteht der Brütersteller\* eine Vermehrung des Plectenchyms\*\*. Unter steri-

\* Brut – das zum Bepflanzen der Kulturbeete bestimmte und unter sterilen Bedingungen herangezogene Mycel.

\*\* Die Bezeichnung „Gewebekultur“ ist also botanisch falsch, wird jedoch im Folgenden gebraucht, da sie in der Champignonzüchtung üblich ist.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit einer zweiten Methode der Erhaltungszüchtung, nämlich mit der Vermehrung der Stämme über Gewebekulturen.