

zwischen Gewebefestigkeit und alkoholunlöslichen Bestandteilen enger ist als diejenige zwischen Gewebefestigkeit und Trockensubstanzgehalt.

5. Die Größe der Festigkeit der reifenden Samen ist eine sortentypische Eigenschaft.

#### Literatur

GUTSCHMIDT, J.: Ein Beitrag zur Bestimmung des Reifegrades grüner Erbsen mit Hilfe des Texturemeters. I. Zur Methodik der Bestimmung des Reife- und Gütegrades bei Erbsen. Die industrielle Obst- und Gemüseverwertung, **38**, 389 (1953); II. Der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Meßergebnisse. ebenda **38**, 405 (1953); III. Vergleichende Reifegradbestimmungen. ebenda, **39**, 242 (1954). — KERTESH, Z. I.: N. Y. St. Agric. Exp. Stat., Techn. Bull. No 233 (1935), (zit. nach GUTSCHMIDT).

— MEYER, K. H., G. NOELTING und P. BERNFELD: Recherches sur l'amidon XXXVI. Détermination du pois moléculaire de polysaccharides naturels par dosage colorimétrique. Helv. chim. Acta, XXXI, I, 103 (1948). — SCHNEIDER, A.: Untersuchungen über die Eignung von Erbsensorten für Zwecke der Naßkonservierung. Züchter **21**, 97 (1951). — SCHNEIDER, A.: Über das Garkochen von Trockenspeiseerbsen und dessen exakte Bestimmung mit Hilfe eines modifizierten Texturemeters. Züchter **25**, 181 (1955). — SUMNER, J. B.: J. biol. Chemistry **62**, 287 (1925). (zit. nach MEYER u. Mitarb.). — UNGER, K. und A. SCHNEIDER: Über Zusammenhänge zwischen der Reifeentwicklung von Gemüseerbsen und einigen mikrometeorologischen Faktoren. Züchter (im Druck). — WANNER, H.: Natur und Verteilung der löslichen Kohlehydrate im Erbsenkeimling. 2. Mittlg. Qualitative und quantitative Bestimmung der einfachen Zucker durch Papierchromatographie. Ber. schweiz. Bot. Ges. **62**, 205 (1952).

(Aus dem MAX-PLANCK-INSTITUT für Züchtungsforschung, ERWIN-BAUR-INSTITUT, Voldagsen)

## Der Nachweis der Blattrollinfektion bei Kartoffeln durch ein neues Färbeverfahren (Vorläufige Mitteilung)

Von MARIA-LUISE BAERECHE

Mit 4 Textabbildungen

Kartoffelsämlinge und -klone sind im Infektionsjahre mit dem bei uns verwendeten Zuchtverfahren nicht sicher auf ihre Reaktion gegen das Blattrollvirus auszulesen (RUDORF 1954, BAERECHE 1955). Die große Masse der anfälligen Pflanzen läßt sich zwar im ersten Jahr ausschalten, aber die symptomfreien und auch nach der Nekroseuntersuchung mit Fuchsin nach BODE (1947) gesund erscheinenden Pflanzen bringen zu einem großen Teil einen kranken Nachbau.

Selbst Sämlinge, die im Frühjahr im Pikierkasten durch Aufsetzen von drei blattrolltragenden Läusen je Pflanze künstlich infiziert werden, lassen sich im Herbst nicht sicher beurteilen. Das zeigen Test- und Nachbauergebnisse der Sämlingsjahrgänge 1951 und 1952 in Voldagsen: in beiden Jahren waren von 3—4000 infizierten Sämlingen aus den verschiedensten Kombinationen im September noch etwa 10% symptomfreie Pflanzen auf dem Feld, die serienmäßig an fuchsingefärbten Querschnitten im Bereich der unteren drei Internodien (also in den Sproßteilen, die am frühesten der Virusinfektion ausgesetzt waren,) auf Nekrosen untersucht wurden. Etwa die Hälfte der untersuchten Pflanzen besaß Nekrosen und wurde ausgeschieden. Der Rest der symptom- und nekrosefreien Sämlinge aber brachte im Nachbau (3—5 Knollen) noch einen erheblichen Ausfall krank auflauender Klone:

1952: Aus 190 nekrosefreien Sämlingen wuchsen 88 blattrollinfizierte und 102 gesunde Klone.

1953: Aus 159 nekrosefreien Sämlingen wuchsen 117 blattrollinfizierte und 42 gesunde Klone.

Dieses Ergebnis läßt sich nur so erklären, daß im Zuchtmaterial unseres Instituts neben hochresistenten Pflanzen auch hochtolerante Formen enthalten sind, und daß von diesen letzteren ein beträchtlicher Prozentsatz im Infektionsjahr keine oder nur so selten bzw. schwach Nekrosen ausbildet, daß sie im Serientest nicht als infiziert erkannt werden können. Besonders Kombi-

nationen mit der Wildart *Solanum acule* neigen dazu, viele Sämlinge ohne oder mit sehr schwer definierbaren äußeren und auch inneren Symptomen zu enthalten. Auch im Nachbau aus Abbauversuchen finden sich immer wieder Klone, die fast symptomfrei erscheinen, keine Nekrosen haben und doch bei Pfropfungen und im *Physalis*-Test zeigen, daß sie das Blattrollvirus enthalten. Die Nekroseuntersuchung, ausreichend bei Handelsorten und Sortenkreuzungen, genügt also offenbar bei unserem Material nicht mehr als Testmethode. Es wurde darum versucht, sie zu verbessern oder zu ersetzen durch Färbeverfahren, die nicht erst das Endstadium der Zerstörung, das nekrotische, ± zusammengedrückte Phloem, nachweisen. Denn dem Absterben muß ja eine Phase der Schädigung durch das Virus vorangehen, ein Prämortalsstadium, das früher erreicht und mit geeigneten Methoden auch früher nachzuweisen sein muß als die Nekrosen. Mit Hilfe eines solchen Verfahrens müßte es möglich sein, die Auslese innerhalb des Infektionsjahres durchzuführen.

Bis vor kurzem waren in der Literatur für Blattrollnachweise neben dem Fuchsin-test nur der auf der gleichen Grundlage — Anfärbung von Lignin-Reaktion zeigenden Einlagerungen in dem nekrotisch gewordenen Gewebe — beruhende Phloroglucin-Test (letzte umfangreiche Prüfung: HUTTON 1949) bekannt geworden und außerdem ein von BALD (1949) ausgearbeitetes Färbeverfahren, das eine andere Reaktion faßte. Nach BALD sollen im phloemnahen Parenchym von Blattstielen blattrollinfizierter Pflanzen Zellen enthalten sein, die mit Giemsa-Lösung (Azur—Eosin—Methylblau-Lösung) anfärbbare Einschlusskörperchen enthalten. Daneben sollen sich auch einzelne Phloemzellen mit einem als „purple“ bezeichneten Farbton anfärben. Wir könnten diese Befunde bei sekundär kranken Siegelinde-Gewächshauspflanzen nicht bestätigen; da aber

das Färbeverfahren nur sehr summarisch angegeben ist, mag dieses Fehlergebnis darauf beruhen, daß wir nicht die gleichen Konzentrationen und  $pH$ -Werte bei den Farblösungen getroffen haben. Bei diesen Experimenten fand sich nicht immer, aber doch sehr häufig an Längsschnitten von Blattstielen und Sprossen im Phloem ein charakteristischer Unterschied zwischen blattrollinfizierten Pflanzen und gesunden Kontrollen: gesunde Pflanzen hatten ungefärbte oder leicht rot gefärbte Phloemzellen; kranke besaßen außer solchen auch mehrgliedrige Phloemstränge, die dunkelviolet bis schwarz gefärbt waren. Die gleichen Stränge fanden sich bei Färbungen mit Trypanblau, das BALD wie auch MACWORTHER (1941) als typischen Virusfarbstoff empfehlen.

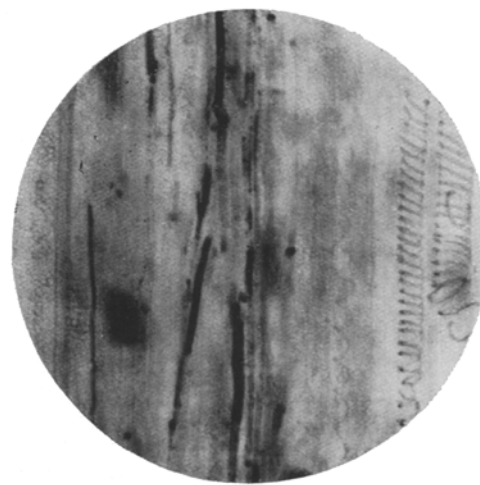
sterben der Phloemzellen, bei der Bildung der in diesen jungen Pflanzen noch nicht auffindbaren Nekrosen eingelagert. Kallosefarbstoffe aber (Anilinblau, Resoblau, Korallin) brachten die gleiche Färbung wie Trypanblau und Giemsa. Sie besaßen außerdem den großen Vorteil, daß sie auch im neutralen  $pH$ -Bereich unfixiertes Gewebe anfärbten und die zeitraubende Fixierung und Nachbehandlung der Schnitte, wie BALD sie entwickelt hat, fortfallen können.

Von diesen drei Farbstoffen ist für die Zwecke eines Massen-Test-Verfahrens das Korallin nicht brauchbar: es verblaßt in kurzer Zeit, so daß die Schnitte sofort durchgesehen werden müssen. Anilinblau hat den Nachteil, daß es außer Kallose bekanntlich auch den Inhalt von Siebröhren anfärbt, wobei das Dunkelblau ge-



Epidermis    Parenchym    Außen-phloem    Xylem

Abb. 1. Übersicht: Längsschnitt durch gesunden Kartoffelsproß (Handschnitt Vergr. 90 $\times$ ).



Parenchym    Außen-phloem    Xylem

Abb. 2. Längsschnitt durch Blattroll-kranken Kartoffelsproß mit gefärbtem Phloem (Handschnitt, Vergr. 120 $\times$ ).

Sollte nun die Phloemfärbung so zu deuten sein, daß das Blattrollvirus bzw. Einschlußkörper mit vorwiegend Blattrollvirus im Phloem direkt angefärbt werden, wie BALD es in seiner Arbeit tut? Dem widerspricht, daß es sich bei diesen Versuchen um sekundär kranke, also aus einer kranken Knolle gewachsene, 10–20 cm hohe Pflanzen handelte, deren gesamtes Phloem das Virus von der Knolle her erhalten haben mußte. Es ist nicht verständlich, warum nur einzelne Phloemstränge gefärbt sind, unmittelbar danebenliegende, die mit den gefärbten in direkter Kommunikation stehen, aber nicht. Von beiden Farbstoffen ist außerdem bekannt, daß sie unspezifisch sind und auch andere Pflanzenbestandteile färben, in unseren Präparaten in Abhängigkeit von Färbedauer und  $pH$ -Wert der Lösung, vor allem Holz und Trypanblau, außerdem auch Kallose in den Siebröhren gesunder und kranker Pflanzen. Es war also durchaus möglich, daß die Anfärbung nicht das Virus selbst, sondern die Einlagerung eines anderen Stoffes als Sekundärreaktion der Phloemzellen anzeigte.

Deshalb untersuchten wir zunächst, ob die bekannten Holz- und Kallose-Farbstoffe auch einen Unterschied im Phloem zwischen Präparaten gesunder und kranker Pflanzen erkennen ließen. Holzfarbstoffe (Fuchsin, Phloroglucin, Chrysoidin) versagten; anscheinend werden also die ligninartigen Stoffe erst nach dem Ab-

schädigter Siebröhren von dem helleren Blau gesunder nicht immer mit Sicherheit zu unterscheiden ist. Am geeignetsten ist das Resoblau, das in einem Zeitraum von 15 Minuten in den Schnitten nichts außer Kalloseplatten und bei den kranken Pflanzen auch ganze Siebröhren anfärbt; erst bei längeren Anwendungszeiten wird auch das Xylem blau. Eine entscheidende Verbesserung brachte der Rat meines Kollegen Dr. SCHWARZE, Voldagsen, die Farblösung mit den neuen im Seifenhandel erhältlichen Netzmitteln Pril oder Spüleri zu versetzen. Diese „grenzflächenaktiven“ Verbindungen (KLING 1953) bewirken, daß der Farbstoff schneller und elektiver von dem Gewebe aufgenommen wird.

Seither arbeiten wir nach folgendem Verfahren: Die Resoblau-Lösung (hergestellt nach dem Rezept im TUNMANN-ROSENTHALER aus 1 g Resorcin, 100 ccm Wasser und 1 ccm konzentriertem Ammoniak) bleibt etwa 14 Tage offen an der Luft stehen. Die gealterte Lösung wird kurz auf 100 $^{\circ}$ C erhitzt und dann mit 5% Spüleri oder Pril versetzt. Nach dem Erkalten ist die Lösung gebrauchsfertig. Längsschnitte des zu prüfenden Materials kommen aus Leitungswasser in die Lösung, werden 5 Minuten gefärbt, in Leitungswasser gespült und bei einer 100–150 fachen Vergrößerung mikroskopisch beurteilt. Die Schnitte sind in Wasser mindestens 3–4 Stunden haltbar. Es gelang

uns bisher nicht, befriedigende Dauerpräparate herzustellen, auch nicht mit der für Resoblau-Färbungen empfohlenen HOYERSchen Flüssigkeit. Nur in dem von SCHAEDE (1949) angegebenen dicken Lävulose-Sirup hielt sich die Färbung etwa drei Tage.

Abb. 1 und 2 zeigen Übersichtsbilder aus der oberen Sproßregion gesunder und kranker Pflanzen. Dem ungefärbten Außenphloem von Abb. 1 entspricht in Abb. 2 eine Region mit dunkel (im Präparat ± blau) gefärbten Phloemsträngen. Diese Stränge ziehen sich bei kranken Pflanzen meist durch die ganze Länge des Präparates, finden sich aber in manchen Fällen auch nur vereinzelt im Innen- und Außenphloem.

An den Schnittträgern können zuweilen auch bei gesunden Pflanzen gefärbte Phloemzellen anscheinend infolge der Veränderungen durch den Wundreiz auftreten. Aus diesem Grunde zeigen nur solche Phloemfärbungen Blattrollinfektion an, die etwa drei Phloemglieder entfernt vom Schnitttrand beginnen und sich über mindestens zwei Röhrenglieder erstrecken. Dem Anfänger können die manchmal stark verdickten Kalloseplatten auch bei gesunden Präparaten Anlaß zu Zweifeln geben. Wenn man aber die Phloemzelle über ihre ganze Länge verfolgt, so erkennt man sofort, daß nur eine eng begrenzte Partie um die Siebplatte herum angefärbt ist, nicht aber der Zellinhalt auch in der Mitte der Röhrenglieder, was allein Blattrollinfektion anzeigen würde.

Nachdem wir uns von diesen Unterschieden in der Anfärbbarkeit gesunder und kranker Siebteile in Pflanzen oder Pflanzenteilen, die keinerlei Phloemnekrosen auf Querschnitten zeigen, überzeugt hatten, war festzustellen, welche Regionen der Pflanze mit größter Sicherheit diese Differenzen zeigen. Je drei bis vier etwa 30 und etwa 80 cm hohe Gewächshauspflanzen von gesunder und kranker Sieglinde, Oberarnbacher Frühe und Corona wurden systematisch durchgeprüft und aus jedem Internodium mehrere Längsschnitte gefärbt. Dabei zeigte es sich, daß gesunde Pflanzen bis zur Mitte ihres Sprosses und noch höher angefärbte Phloempartien besitzen können, die sich nicht von denen kranker Pflanzen unterscheiden lassen. Nimmt man aber die jüngsten Internodien, am besten die beiden obersten schon gestreckten unterhalb der Spitzenregion, so findet sich hier bei gesunden Pflanzen niemals eine Phloemfärbung. Schnitte durch die Nodien bringen häufig wegen der abgehenden Blattspurstränge keine klare Übersicht über den Phloemverlauf und sind deshalb weniger geeignet als Schnitte durch die Internodien. Bei Serienuntersuchungen ist es deshalb am besten, je drei Längsschnitte aus den beiden oberen Internodien mit Resoblau anzufärben und aus dem Auftreten von Strängen hier auf gesundes oder krankes Material zu schließen. Brauchbar erwies sich der Test bei allen Pflanzen, die 1—2 voll ausgereifte Blätter besitzen, also auch bei Augenstecklingen, dagegen nicht bei eben aus dem Boden tretenden Sprossen. Die äußere Symptomausprägung hat keinen Einfluß auf die Entwicklung der Phloemsymptome; auch vergeilte Pflanzen brachten klare Ergebnisse.

Es ist uns bisher nicht gelungen, mikrochemisch nachzuweisen, daß die mit Resoblau gefärbten Substanzen aus Kallose bestehen. Es gelang uns weder bei ge-

sunden noch kranken Pflanzen die z. B. im Lehrbuch von SCHNEIDER-ZIMMERMANN beschriebene Auflösung von Kallose durch 1—5%ige Alkalilauge oder konzentriertes Chlorkalzium. Auch nach 3—stägigem Einlegen frischer und alkoholfixierter Schnitte in diese Lösungen waren die Kallosepolster auf den Siebplatten wie auch die Phloemstränge immer noch mit Resoblau anfärbbar. Ehe der exakte Nachweis nicht gelungen ist, wird die Bezeichnung „Kallose“, wie sie in dieser Arbeit auf Grund der Farbreaktionen verwendet wird, nur mit dem Vorbehalt späterer Revision gegeben.

Um die Sicherheit der Beurteilung durch diesen Test zu erproben, wurden mehrere Serien mit Blindproben durchgeprüft. Dabei wurden folgende Erfahrungen gemacht: bei 50 Proben von gesundem und krankem Material der Sorten Sieglinde, Corona, Oberarnbacher Frühe, Ackersegen und Aquila waren zwei Präparate nicht richtig beurteilt worden; bei Augenstecklingen von Zuchtmaterial aus verschiedenen Kreuzungen, ebenfalls unter verschlüsselten Nummern geprüft, waren in einem Versuch von 60 zu prüfenden Präparaten keine Fehler enthalten; in einem anderen Versuch waren von 120 Stecklingen 11% falsch beurteilt worden. Allerdings ist es dabei möglich, daß ein Teil dieser Fehler auf eine falsche Beurteilung der Augenstecklinge zurückgeht, wie endgültig erst der Nachbau zeigen wird. Es geht aber aus diesen Ergebnissen hervor, daß der Test keine 100%ige Sicherheit besitzt, und man einen Unsicherheitsfaktor von vielleicht 5% in Kauf nehmen muß, wie bei so vielen biologischen Prüfverfahren. Der Vorzug gegenüber dem Fuchsin-Test ist die Anwendbarkeit bei jungen Pflanzen und Geweben, die noch keine Nekrosen zeigen können. Außerdem sind die Präparate leichter für ungeübte Kräfte zu beurteilen, da außer Kallose nichts in den Schnitten gefärbt ist, während bei Fuchsin-Färbungen Xylem und Bast ebenfalls rot erscheinen und sich die Nekrosen nur bei einigen anatomischen Kenntnissen einwandfrei erkennen lassen.

Wir hatten leider bisher wenig Gelegenheit zu prüfen, ob auch andere Kartoffelviren die gleichen Veränderungen hervorrufen können. Sieglinde mit deutlichen Y- und Mosaiksymptomen, aber nachweisbar ohne Blattroll, zeigte keine Färbungen im Phloem. Bei Ackersegen mit Mischinfektionen von Blattroll und Y fand sich keine Störung der Blattrollphloemfärbung. Es weist somit bisher nichts darauf hin, daß Mischinfektionen diesen Test stören könnten, doch müssen noch weitere Sorten geprüft werden.

Das Phloem kranker Knollen färbt sich ebenfalls an, besonders stark und deutlich bei alten Mutterknollen, die sich gerade bei blattrollkranken Pflanzen häufig bei der Ernte noch finden. Doch bei 20—30% der gesunden Kontrollknollen fanden sich die gleichen Symptome, obgleich diese gesunden Knollen von verschiedenen Zuchtstätten als Hochzuchtsaatgut bezogen wurden und höchstwahrscheinlich virusfrei waren. Das Ergebnis spricht dafür, daß der Resoblautest nur unter bestimmten Vorbedingungen bei Knollen durchzuführen ist. Der physiologische Zustand der Knolle (ruhend oder keimend) und die Ebene der Schnittführung (das Nabelende der Knolle enthält von der abgestorbenen Stolonenverbindung her degeneriertes, teilweise verbräuntes Xylem und Phloem, das auch bei gesunden Knollen Anfärbungen ergeben kann; Schnitte am Kronenende bringen häufig auch bei

kranken Knollen nur schwache Anfärbungen) — das alles sind Faktoren, die es zuerst näher zu untersuchen gilt, ehe man ein Urteil über die Brauchbarkeit der Methode für Knollenfärbungen geben kann. Da zur gleichen Zeit und unabhängig von den Arbeiten in unserem Institut die Knollenuntersuchungen auch von den Vereinigten Saatzuchten in Ebstorf (mündl. Mitteilung) und von U. HEILMANN (1955) aufgegriffen wurden, läßt sich hoffen, daß durch den Vergleich der Erfahrungen die für den Kartoffelbau besonders wichtige Frage der Knollendiagnose bald gelöst werden kann.

Vorzugsweise junge blattrollkranke Pflanzen, aber auch solche, bei denen schon anfärbare Phloemzellen vorhanden sind, enthalten einzelne Phloemzellen, die offenbar den Beginn der Degenerationserscheinun-

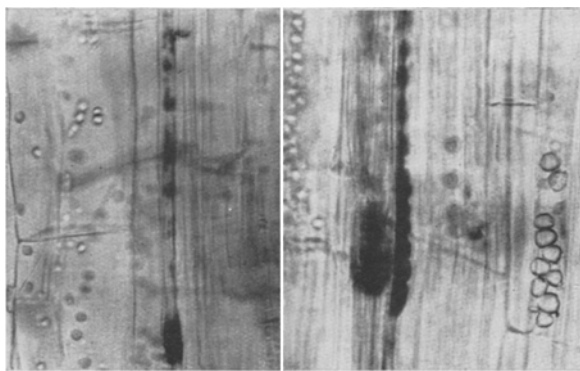


Abb. 3. Teil einer Phloemzelle mit Siebfeldern. (Siebplatte mit starkem Kallosebelag unten am Bildrand) (Handschnitt, Vergr. 300×).

Abb. 4. Teil einer Phloemzelle mit warzenartigen Kalloseauflagerungen auf den Siebfeldern. Links neben der langen Phloemzelle unscharf eingestellte Kallosebeläge der Nachbarzellen (Handschnitt, Vergr. 300×).

gen zeigen. In solchen Zellen findet man außer den blaugefärbten, nicht auffallend verdickten Kallosepolstern auch an den Längswänden kleine, runde, blaue Anfärbungen. Es sind meist 20—30 solcher Farbzentren vorhanden, die in späteren Stadien unregelmäßige Gestalt annehmen und schließlich gewissermaßen zusammenlaufen zu größeren oder kleineren Flecken (Abb. 3). Bei manchen Präparaten ist die warzenartige Vorwölbung dieser gefärbten Substanzen in die Phloemzelle hinein deutlich erkennbar (Abb. 4). Von hier ist es dann nur noch ein Schritt zur total gefärbt erscheinenden Zelle, wobei es offen bleiben muß, ob das gesamte Lumen von dieser mit Resoblau anfärbaren Substanz erfüllt wird oder nur die inneren Wandflächen davon überzogen sind und eine Kompaktfärbung vorgetäuscht wird.

Diese Vorgänge spielen sich an Zellen ab, deren Durchmesser dem der ganz ungefärbten Nachbarzellen gleicht; sie müssen also noch einen normalen Turgor besitzen. Auch die angefärbten Stränge sind noch turgeszent, und zwar eine geraume Zeit, wie aus ihrem gehäuften Auftreten geschlossen werden kann. Nur selten findet man auch auf  $\frac{1}{4}$  bis  $\frac{1}{8}$  des ursprünglichen Umfangs zusammengedrückte gefärbte Stränge, die noch deutlich im Bereich der ehemaligen Siebplatten und auch hier und da an den Längswänden Vorwölbungen zeigen, die die Orte besonders starker Kallose-Ablagerung markieren. Dann verliert der Strang in dem nur mit Resoblau behandelten Präparat seine Anfärbbarkeit; färbt man nun aber mit Fuchsin nach, so erscheinen

auch in den Längsschnitten leicht verdickte rote Wandpartien, die zeigen, wo Phloemzellen durch die turgeszenten Nachbarzellen zusammengedrückt wurden. In diesem Stadium also erscheinen in den absterbenden Zellpartien die Lignin-artigen Stoffe, die durch den Fuchsin-test nachgewiesen werden. Von der Kallose bleibt kein nachweisbarer Rest zurück.

Dieser Ablauf hat eine gewisse Parallele in den Vorgängen, die sich während des natürlichen Alterns und Sterbens von Phloemzellen abspielen. Das Phloem ist nach allem, was wir wissen, ein kurzlebiges Gewebe, dessen voll arbeitsfähige, die Stoffleitung bewältigende Zellen nur etwa 4—6 Wochen in Funktion bleiben (ESAU 1939). Es findet also in jeder Kartoffelpflanze laufend ein Sterben und Einschmelzen funktionsuntüchtig gewordener Phloemzellen und ein Ersatz durch Neubildung aus dem Phloemparenchym bzw. Kambium statt. In Präparaten aus älteren Teilen gesunder Pflanzen läßt sich beobachten, daß hier einzelne Phloemzellen ebenfalls kleine, blau gefärbte Flecken an den Längswänden besitzen. Hier erkennt man deutlich, daß es sich um die durch schwache Kallosebeläge sichtbar gewordenen Siebfelder handelt, wie sie schon HARTIG und NÄGELI vor 100 Jahren beschrieben haben. Wie die Siebplatten an den Querwänden der Phloemzellen sind die Siebfelder an den Längswänden, die viel kleineren, scharf umgrenzten, von Poren durchbrochenen dünnen Wandbezirke, durch die der Stoffaustausch zwischen nebeneinanderliegenden Siebzellen, aber auch zwischen Sieb- und Geleit- bzw. Parenchymzelle vor sich geht. Ihre Kallosebeläge sind offenbar nur in der alternden Zelle so dick, daß sie sich bei kurzen Färbezeiten mit Resoblau anfärben. Kalloseanhäufungen analog Abb. 4 haben wir nicht beobachtet, sondern nur das Endstadium der totalen Anfärbbarkeit, das, wie schon vorher geschildert, bei großen Pflanzen bis über die Mitte der Pflanzenhöhe hinauf zu finden ist. In der Spitzenregion gibt es normalerweise noch kein absterbereifes Phloem; jede Regeneration hier deutet auf einen anomalen Vorgang hin, eben die Schädigung durch das Blattrollvirus.

Sieht man die beiden Entwicklungen, die zur Bildung von prä mortal anfärbbarem Phloemgewebe und schließlich zu Nekrosen führen, in dieser Weise als Parallelen, so läßt sich das Absterben infolge des Blattrollbefalls als ein verfrühtes Altern deuten. Ein dem Phloemgewebe eigentümlicher Entwicklungsverlauf, das Absterben physiologisch alter Gewebeteile, tritt bereits vorzeitig in jüngeren Pflanzen und Pflanzenteilen auf, aber vermutlich auch hier nur bei solchen Zellen, die ein bestimmtes mit dem Kernverlust in Zusammenhang stehendes Reifungsstadium erreicht haben. Grundsätzlich finden sich keine Unterschiede. Die zahlreichen Untersuchungen aus den Jahren um 1930 über „Obliterationen“ (Altersnekrosen), „Nekrobiosen“ (reversible Umweltschädigung) und „echte Nekrose“ (auf Grund von Virusbefall) haben bis auf Unterschiede in der Stärke der Wandverquellungen auch nur Anzeichen für die Auffassung gebracht, daß es sich hier um die gleichen Reaktionen der Pflanze auf verschiedene Anlässe handelte (BREHMER und ROCHLIN 1931). Deshalb ist auch die Unterscheidung dieser verschiedenen Nekrose-Typen in Querschnittsbildern so schwierig.

In der Literatur sind mir bisher nur zwei Angaben bekannt geworden, die über eine Anhäufung von

Kallose in Phloemzellen als Reaktion auf Außeneinflüsse berichten. Die eine Beobachtung ist 1930 von SCHUMACHER veröffentlicht: er fand bei Vitalfärbungen mit Eosin, daß 2—4 Tage nach dem Eindringen und Weiterleiten dieses Farbstoffes das Phloem mit der Bildung dicker Kallosepolster auf den Siebplatten reagiert hatte. Die zweite Arbeit, die hier heranzuziehen ist, betrifft die Reaktion junger Zuckerrübensämlinge auf die Infektion mit curly-top-virus, das wie das Blattrollvirus für phloemspezifisch gehalten wird. Das Phloem in den Wurzeln der Sämlinge zeigte anfärbbare Strukturen, die sehr ähnlich den auf Abb. 4 wiedergegebenen warzenartigen Vorwölbungen sind. Die Autoren, ARTSCHWAGER und STARRET 1936, bezeichnen die Ablagerung als „Pseudocallus“, da auch sie die Identität mit Kallose nicht nachweisen konnten. Das Erscheinen von „Pseudocallus“ in den Wurzeln soll vor allem eine Reaktion resistenter Zuckerrüben auf die Infektion hin sein.

Über die Fortführung dieser Untersuchungen vor allem in Zusammenhang mit Fragen der Resistenzzüchtung soll zusammen mit Dr. SCHWARZE berichtet werden. Doch schien es aus gegebener Veranlassung angezeigt, die Technik des Färbeverfahrens vorher zu veröffentlichen.

#### Zusammenfassung

1. In einer mit Netzmitteln versetzten Resoblau-lösung läßt sich prämortales Phloem in Kartoffelsprossen und -knollen anfärben.

2. Längsschnitte in den obersten beiden Internodien enthalten nur dann absterbendes Phloem, wenn es sich um Blattroll-infizierte Pflanzen handelt.

3. Phloemzellen, die in gesunden Pflanzen altern, und solche, die infolge einer Blattrollinfektion absterben, zeigen die gleichen Degenerationserscheinungen.

4. Mit Hilfe des Resoblauverfahrens gelingt es, junge Pflanzen, die weder Symptome noch Nekrosen

gebildet haben, mit etwa 95%iger Sicherheit als gesund oder infiziert zu erkennen. Orientierende Untersuchungen an Knollen erbrachten Hinweise, daß auch hier eine Unterscheidung kranker und gesunder Knollen mit Hilfe von Resoblau möglich ist.

#### Literatur

1. ARTSCHWAGER, E. and R. C. STARRETT: Histological and cytological changes in sugar-beet seedlings affected with curly top. *J. Agric. Res.* **53**, 637—657 (1936).
2. BAERECHE, M.-L.: Untersuchungen zur Blattrollresistenz. *Proc. 2nd Conf. Potato Virus Diseases*, Lisse-Wageningen, June 25th—29th, 1954 (im Druck).
3. BALD, J. G.: Additional methods for fixing and staining viruses in infected plant tissues. *Am. J. Bot.* **36**, 335—342 (1949).
4. BODE, O.: Beitrag zum frühzeitigen Nachweis der Blattrollkrankheit der Kartoffel durch Anfärbung des Phloems. *Festschr. Otto Appel, Biol. Zentralanst. für Land- u. Forstwirtschaft Berlin-Dahlem*, 34—36 (1947).
5. BREHMER, W. V. und E. ROCHLIN: Histologische und mikrochemische Untersuchungen über pathologische Gewebsveränderungen viruskranker Kartoffelstauden. *Phytopathol. Ztschr.* **3**, 471—498 (1931).
6. ESAU, K.: Development and structure of the phloem tissue. *Bot. Rev.* **5**, 373—432 (1939).
7. HEILMANN, U.: Über den Nachweis von Blattrollvirus in Kartoffelknollen mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes. *Nachr. bl. dtsh. Pflschutzdienst* **7**, 44—45 (1955).
8. HUTTON, E. M.: The significance of the necrotic phloem reaction in the potato to the leafroll-virus. *Austr. J. of Scient. Res. Ser. B.* **2**, 249—270 (1949).
9. KLING, W.: Wasserlösliche grenzflächenaktive Stoffe. (Wasch-, Netz- und Emulgiermittel). *Angew. Chemie* **65**, 201—212 (1953).
10. MACWORTHER, F. P.: Plant virus differentiation by trypan-blue reactions within infected tissue. *Stain. Techn.* **16**, 143—149 (1941).
11. RUDORF, W.: Der augenblickliche Stand und die Aussichten der Züchtung resistenter Sorten der Kartoffel. *Züchter* **24**, 48—55 (1954).
12. SCHAEDE, R.: Hilfsbuch für die botan. Mikroskopie. Georg Thieme Verlag-Stuttgart, 1949.
13. SCHNEIDER-ZIMMERMANN: Die bot. Mikrotechnik. Verlag G. Fischer, Jena 1922.
14. SCHUMACHER, W.: Untersuchungen über die Lokalisation der Stoffwanderung in den Leitbündeln höherer Pflanzen. *Jahrb. wiss. Bot.* **77**, 770—823 (1930).
15. TUNMANN-ROSENTHALER: Pflanzenmikrochemie. Verlag Gebrüder Bornträger, Berlin 1931.

Eingang des Manuskriptes: 7. 4. 1955.

(Aus dem Institut für Obstbau der Technischen Universität Berlin)

## Künstliche Zwillingsbildung bei Äpfeln durch Samenteilung

Von ILSE THIELE

Mit 5 Textabbildungen

Für die Durchführung mancher obstbaulicher Versuche — vor allem auf dem Gebiet der Grundlagenforschung — ist es notwendig, erbgleiches, unveredeltes Gehölzmaterial zur Verfügung zu haben. Da autovegetativ vermehrte Edelsorten zu diesem Zweck meist nicht bereitstehen, arbeitet man nach wie vor mit Sämlingsklonen. Sie werden üblicherweise durch Wurzelstecklinge oder Abrisse gewonnen. Dabei ist es meistens belanglos, daß man mit diesen Vermehrungsmethoden erst verhältnismäßig spät zu selbständigen Klonpflanzen kommt, nämlich frühestens nach 1½ Jahren, von der Aussaat der Sämlinge an gerechnet. Versuche, die am hiesigen Institut zur Klärung von Entwicklungsfragen bei Apfelsämlingen laufen, ließen es aber wünschenswert erscheinen, bereits in der ersten Vegetationsperiode nach der Aussaat unterschiedliche Behandlungen an Sämlingsklonen durchzuführen. Außerdem sollten die Klonpflanzen alle Primär-Organen eines echten Sämlings besitzen (Keimwurzel und Keim-

sproß), die nicht wie bei Wurzlungen oder Abrissen durch Adventiv-Organen ersetzt sind. Da die üblichen Vermehrungsmethoden also weder der einen noch der anderen Forderung gerecht werden konnten, haben

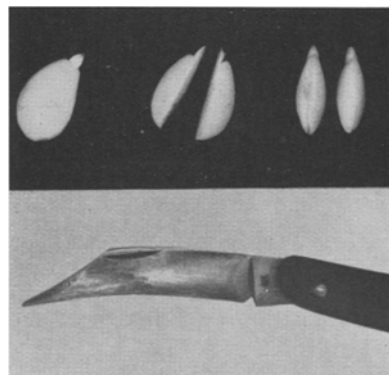


Abb. 1, oben: Apfel-Embryo vor und nach der Teilung; unten: Spezialmesser.