

plast Symposium, Basel, POTRYKUS, I. *et al.* (eds.), *Experientia Suppl.* 45: 8–9 (1983). — DUHOUX, E.: Protoplast isolation of gymnosperm pollen. *Z. Pflanzenphysiol.* 99: 207–214 (1980). — GAMBORG, O. L., SHYLUK, J. P. and SHAHIN, E. A.: Isolation, fusion and culture of plant protoplasts. In: *Plant Tissue Culture Methods and Application in Agriculture*. THORPE, T. A. (ed.). Academic Press, New York, pp. 115–153 (1981). — HAKMAN, I. C. and VON ARNOLD, S.: Isolation and growth of protoplasts from cell suspensions of *Pinus contorta* Dougl. ex. Loud. *Plant Cell Reports* 2: 92–94 (1983). — HARMS, C. T.: Somatic hybridization by plant protoplast fusion. In: *Proc. 6th International Protoplast Symposium*. POTRYKUS, I. *et al.* (eds.). Birkhäuser Verlag, Basel (in press) (1983). — HONKANEN, J. and SIMOLA, L. K.: Ornithine- und putrescine-supported divisions and cell colony formation in leaf protoplasts of alders (*Alnus glutinosa* and *A. indica*). *Plant Sci. Lett.* 28: 3–9 (1982). — HUHTINEN, O. and WINTON, L.: Cell and tissue culture for production of haploid, polyploid and clonal propagation. In: *IUFRO Workshop for Methods in Biochemical Genetics of Forest Trees*, Göttingen, pp. 1–12 (1973). — KAO, K. N.: Plant protoplast fusion and isolation of heterokaryocytes. In: *Plant Tissue Culture Methods*. WETTER, L. R. and CONTABEL, F. (eds.). National Research Council of Canada, Saskatoon, pp. 49–55 (1982). — KAO, K. and MICHAYLUK, M. R.: A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115: 355–367 (1974). — KIRBY, E. G.: The use of *in vitro* techniques for genetic modifications of forest tree species. In: *Tissue Culture in Forestry*. BONGA, J. M. and DURZAN, D. J. (eds.). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague, pp. 369–386 (1982). — KIRBY, E. G. and CHENG, T. Y.: Colony formation from protoplasts derived from Douglas fir cotyledons. *Plant Sci. Lett.* 14: 145–154 (1979). — LAKSHMI SITA, G. and SHOBHA RANI, B. Preliminary studies on isolation and culture of protoplasts from sandalwood (*Santalum album*). In: *6th International Protoplast Symposium*. POTRYKUS, I. *et al.* (eds.). *Experientia Suppl.* 45: 4–5 (1983). — LARKIN, P. J.: Purification and viability determinations of plant protoplasts. *Planta* 128: 213–216 (1976). — OHYAMA, K. and OKA, S.: Isolation of protoplasts in Moraceae. *J. Jap. Crop. Soc.* 44: 121–122 (1975). — RADENBAUGH, M. K., WESTFALL, R. D. and KARNOSKY, D. F.: Protoplast isolation from *Ulmus americana* pollen mother cell tetrads and microspores. *Canad. J. For. Res.* 10: 284–289 (1980). — RONA, J. P. and GRIGNON, C.: Obtention

de protoplastes a partir de suspensions de cellules d' *Acer pseudo-platanus*. *C. R. Acad. Sci. D.* 274: 2976–2979 (1972). — SAITO, A.: Isolation of protoplasts from mesophyll cells of *Paulownia taiwaniana* and *Populus × euramericana*. *Bull. For. Prod. Res. Inst.* 309: 1–6 (1980a). — SAITO, A.: Fusion of protoplasts isolated from somatic cells of tree species. *Bull. For. Prod. Res. Inst.* 309: 7–12 (1980b). SCHIEDER, O. and VASIL, I. K.: Protoplast fusion and somatic hybridization. *International Rev. Cytology Suppl.* 11B: 21–46 (1980). — SMITH, M. L. and McCOWN, B. H.: A comparison of source tissues for protoplast isolation from three woody plant species. *Plant Sci. Lett.* (in press) (1983). — STEINHAUER, A., GLOCK, H. and SRIVASTAVA, P. S.: *In vitro* culture methods and its implications in genetics and forest tree breeding. *Eur. J. Biol.* 22: 603 (1980). — STRMEN, J. and CIERNA, M.: Cell wall regeneration of the spruce (*Picea excelsa*) tissue culture protoplasts. In: *Colloque International sur la Culture "In Vitro" des Essences Forestieres*, AFOCCEL, Nangis, France, pp. 355–359 (1981). — VASIL, I. K. and VASIL, V.: Isolation an culture of protoplasts. *International Rev. Cytology Suppl.* 11B: 1–19 (1980). — VASIL, I. K., AHUJA, M. R. and VASIL, V.: Plant tissue cultures in genetics and plant breeding. *Adv. Genetics* 20: 127–215 (1979). — VARDI, A., SPIEGEL-ROY, P., BEN-HAYYIM, G. and GALUN, E.: Protoplast derived plants and fusion experiments in different *Citrus* species. In: *Plant Tissue Culture 1982*. FUJIWARA, A. (ed.). Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, pp. 619–620 (1982). — VARDI, A., SPIEGEL-ROY, P. and GALUN, E.: Protoplast isolation, plant regeneration and somatic hybridization in different *Citrus* species and *Microcitrus*. In: *6th International Protoplast Symposium*. POTRYKUS, I. *et al.* (eds.). *Experientia Suppl.* 45: 284–285 (1983). — VENKETESWARAN, S. and GANDHI, V.: Protoplast isolation and culture of tree genera for biomass production. *Eur. J. Cell. Biol.* 22: 501 (1980). — VERMA, D. C. and WANN, S. R.: Isolation of high yields of viable protoplasts from quaking aspen seedlings and cultured loblolly pine cell suspensions. In: *6th International Protoplast Symposium*. POTRYKUS, I. *et al.* (eds.). *Experientia Suppl.* 45: 10–11 (1983). — WIDHOLM, J. M.: The use of fluorescein diacetate and phenosafranin for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.* 47: 189–194 (1972). — WINTON, L. L., PRAHAM, R. A. and KAUSTINEN, H. M.: Isolation of conifer protoplasts. *Genetics and Physiology Notes, Inst. of Paper Chemistry, Appleton, No.* 20: 1–7 (1975).

Short Note: Isolation and Culture of Mesophyll Protoplasts from Mature Beech Trees

By M. R. AHUJA

Federal Research Center for Forestry and Forest Products,
Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding,
Sieker Landstrasse 2, D-2070 Grosshansdorf,
Federal Republic of Germany

(Received 3rd June 1983)

Abstract

Protoplasts were isolated from young spring leaves of mature (70 years old) beech (*Fagus sylvatica* 'Atropunicea' and 'Zlatia') trees. In addition to normal protoplasts, exceptionally large (Mega) protoplasts were also observed. The mega protoplasts were upto 64 times greater in volume compared to average normal protoplasts. Following culture, the beech protoplasts regenerated cell wall and exhibited budding and cell division. These studies have shown that mesophyll protoplasts from mature beech trees are developmentally viable, when they are isolated at an appropriate stage of leaf development.

Key words: Beech (*Fagus sylvatica*), mature trees, mesophyll protoplasts, mega protoplasts, isolation, culture, cell division.

Zusammenfassung

Aus jungen, im Frühjahr ausgetriebenen Blättern von ungefähr 70jährigen Buchen (*Fagus sylvatica* 'Atropunicea'

und 'Zlatia') wurden Protoplasten isoliert. Dabei sind außerordentlich große (Mega-) Protoplasten beobachtet worden. Die Megaprotoplasten hatten ein Volumen bis zu 64 mal größer als das der durchschnittlich großen normalen Protoplasten des Mesophylls. In der Kultur haben die Buchenprotoplasten Zellwände gebildet und Zellsprossungen und Zellteilungen sind erfolgt. Die Untersuchung zeigt, daß Protoplasten des Mesophylls alter Buchen in ihrer Entwicklung lebensfähig sind, wenn sie in einem bestimmten Entwicklungsstadium der Blätter isoliert werden.

Introduction

Protoplasts have been isolated from several forest tree species, but cultured in a few (see AHUJA, 1981, 1982). Cell wall regeneration and cell division have been observed in the protoplast cultures of *Pinus pinaster* and *Biota orientalis* (DAVID *et al.* 1981), *Picea excelsa* (STRMEN and CIERNA, 1981), *Populus tremula* (AHUJA, 1983), and colony/callus

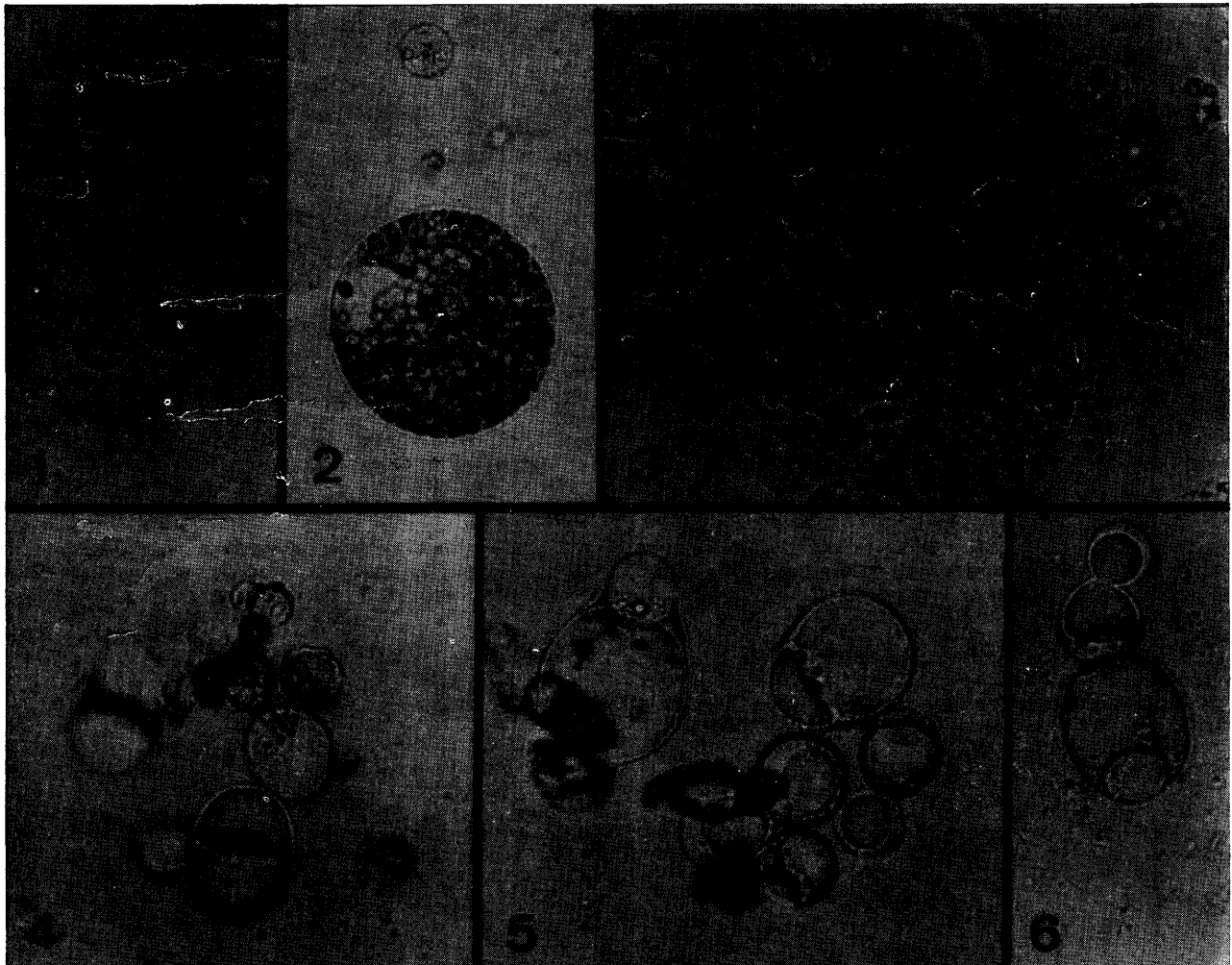


Figure 1. — Freshly isolated normal protoplasts from young leaves of *Fagus sylvatica* 'Atropunicea'. x560

Figure 2. — A normal and a mega protoplast from *F. sylvatica* 'Atropunicea'. x560

Figure 3. — Mesophyll protoplasts from slightly older leaves of *F. sylvatica* 'Zlatia' showing mostly normal range protoplasts. x560

Figure 4. — Protoplast culture of *F. sylvatica* 'Zlatia' showing cell division in normal protoplasts. x560

Figure 5. — Protoplast culture showing cell divisions in normal and mega protoplasts. x560

Figure 6. — A 3-4 cell derivative from beech protoplast. x560

formation in *Pseudotsuga menziesii* (KIRBY, 1981). So far it has not been possible to regenerate whole plants from forest tree protoplasts. Here we report on the isolation and culture of mesophyll protoplasts from young spring leaves of mature beech, *Fagus sylvatica*, trees.

Materials and Methods

Branches from approximately 70 years old beech trees, *Fagus sylvatica* 'Atropunicea' and 'Zlatia', were brought in early spring before bud break and maintained in controlled chambers (temperature 23–25°C; light 3400 lux; relative humidity 70%) for a regular supply of leaves. Young leaves were surface sterilized in 5% sodium hypochlorite solution, containing a few drops of Tween 80, for 5 minutes. Following three washings in autoclaved distilled water, the gently scraped leaves were cut into small pieces, sliced transversely into 1 mm strips and incubated into an enzyme solution consisting of 1% cellulase R-10 (Serva), 0.5% macerozyme R-10 (Serva), 0.1% pectinase (Serva), 0.1% bovine albumin (Sigma), and 0.7 M mannitol in a

CPW solution, pH 5.6. The CPW consisted of 100 mg/l calcium sulphate, 250 mg/l magnesium sulphate, and 30 mg/l calcium nitrate. Incubation was carried out in the dark, at 25°C, with shaking at 30 rpm, for 20–22 hours. After filtration through 80 µm stainless steel sieve, protoplasts and debris were pelleted in 0.7 M mannitol + CPW at 100 g for 6 minutes. The pellet was resuspended in 20% sucrose + CPW and centrifuged at 100 g for 15 minutes. Floating protoplasts were washed twice in 10% mannitol + CPW and plated in 2 ml of protoplast culture medium essentially as previously described (AHUJA, 1983).

Results and Discussion

Mesophyll protoplasts in *Fagus sylvatica* 'Atropunicea' and 'Zlatia' ranged from 14 µm to 60 µm in diameter; the normal protoplast range being 14 µm to 18 µm. The diameters of exceptionally large (Mega) protoplasts were 2 to 4 times greater than the average normal mesophyll protoplasts (Figures 1–3). The mega protoplasts were upto

64 times greater in volume as compared to average normal protoplasts. The mega protoplasts could be isolated only from young spring leaves. In the mature beech leaves there were hardly any mega protoplasts, and even the yield and growth potential of normal protoplasts were much lower as compared to those from young leaves. Following culture, cell wall regeneration occurred in the beech protoplasts after 48 to 72 hours. After 5 to 7 days, the protoplast derived cells showed initiation of budding. Subsequently cell divisions were observed in these protoplast cultures (Figures 4—6). Growth and differentiation studies on the protoplast derived beech cells are in progress.

These studies have demonstrated that viable protoplasts can be isolated from young spring leaves of mature beech trees, even when the trees are 70 or more years old. The initiation of budding and cell division show that mesophyll protoplasts from mature trees are developmentally viable, when isolated at an appropriate stage of leaf development.

The mega mesophyll protoplasts have been previously isolated from aspen, *Populus tremula* (AHUJA, 1983). Beech, *Fagus sylvatica*, is the second forest tree species investigated that also shows mega mesophyll protoplasts. The mega protoplasts in beech are also developmentally viable as was the case in aspen (AHUJA, 1983). The origin and func-

tion of mega protoplasts are not known. Since the mega protoplasts appear to be transient, it seems plausible to speculate that mega mesophyll cells, from which mega protoplasts are presumably derived, may be involved in a rapid post-winter photosynthetic activity in the first spring leaves of the forest tree species.

Acknowledgements

This research was supported by a project C080 from the Federal Ministry of Research and Technology. I thank Dr. HANS MUHS for discussions, and Miss ELISABETH WENK for technical assistance.

Reference

- AHUJA, M. R.: Isolation, culture and fusion of plant protoplasts. In Colloque International sur la Culture "In Vitro" des Essences Forestieres, AFOCEL, Nangis, France, pp. 315—337 (1981). — AHUJA, M. R.: Isolation, culture, and fusion of protoplasts: problems and prospects. *Silvae Genetica* 31: 66—77 (1982). — AHUJA, M. R.: Isolation and culture of mega and normal protoplasts in aspen. *Silvae Genetica* (in press) (1983). — DAVID, H., DAVID, A. and MATTEILE, T.: Isolement et culture des protoplastes de deux gymnospermes: *Pinus pinaster* — *Biota orientalis*. In Colloque International sur la Culture "In Vitro" des Essences Forestieres, AFOCEL, Nangis, France, pp. 338—347 (1981). — STRMEN, J. and CIERNA, M.: Cell wall regeneration of the spruce tissue culture protoplasts (*Picea excelsa* LINK). *Ibid*, pp. 355—359 (1981). — KIRBY, E. G., The isolation and culture of conifer protoplasts. *Ibid*, pp. 348—354 (1981).

Buchbesprechungen

Untersuchungen über die Resistenz von Pappeln gegenüber dem Erreger des Pappelkrebses, *Xanthomonas populi* subsp. *populi* (Ridé) Ridé und Ridé. VON HORST-GERRIT KECHEL. Dissertation der Forstwissenschaftlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München. 1982. 154 Seiten.

Eine der wichtigsten Pappelkrankheiten ist der Pappelkrebs, verursacht durch die Bakterienart *Xanthomonas populi* ssp. *populi*. Kenntnisse über die Anfälligkeit bzw. Resistenz von Pappeln gegenüber dieser Erkrankung sollten daher Bestandteil der Züchtungsarbeit sein. Hierfür ist die Entwicklung und Erprobung geeigneter Infektionstests sowie eine Überprüfung der Ergebnisse mit den unter Feldversuchsbedingungen erhaltenen erforderlich. In der vorliegenden Dissertation wurden in umfangreichen Versuchen 141 *Tacamahaca*-Klone und 39 *Aigeiros*-Klone auf ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber *X. populi* geprüft. Von den verschiedenen Inokulationsverfahren hat sich die Keilschnittmethode, im Juni durchgeführt, am besten bewährt. Die Infektionsergebnisse lassen deutliche Resistenzunterschiede auf der Individualebene erkennen. Resistenz ist offenbar polygen bedingt. Zwischen den Arten und Sektionen zeigten sich keine Resistenzunterschiede. In der Reaktion der Klone bestand eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der künstlichen Infektionen und Feldbeobachtungen. Das Verfahren ist demnach als Frühtest zur Prüfung auf Krebsresistenz geeignet. Zum gewerbsmäßigen Verkehr sollten daher nur noch Klone zugelassen werden, die im Infektionstest resistent gegenüber *X. populi* waren. Für die praktische Durchführung von Infektionsversuchen und die Bewertung von Klonen nach bestimmten Selektionskriterien macht der Autor Vorschläge.

B. R. STEPHAN

Illustrierte Flora von Mitteleuropa. VON GUSTAV HEGI. Band I, Teil 3, *Gramineae*, Lieferung 2. Bearbeitet von HANS JOACHIM CONERT. 3., völlig neubearbeitete Auflage. 80 Seiten mit 27 Abbildungen und 3 Farbtafeln. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg. 1983. Broschiert DM 35,—.

In Fortführung der völligen Neubearbeitung des Standardwerkes über die Flora von Mitteleuropa enthält die vorliegende Lieferung des Bandes I/3 einen weiteren Teil der *Gramineae*. Behandelt werden 13 Gattungen der *Poaceae* aus den Unterfamilien *Eragrostoideae*, *Arundinoideae* und *Poioideae*. Hierher gehören u. a. die weit verbreiteten Gattungen *Spartina*, *Phragmites*, *Molinia* oder *Phalaris*. Gegenüber der vorigen Auflage sind schon in der

äußeren Aufmachung zahlreiche Veränderungen festzustellen. Durch den zweiseitigen Drucksatz und die deutlichere Hervorhebung von Untertiteln ist der Text jetzt übersichtlicher gestaltet und leichter lesbar. Die einzelnen Arten sind eingehend beschrieben und abgebildet. Auch Verbreitung, Vorkommen im Gebiet, Ökologie, Cytotaxonomie, Inhaltsstoffe, Nutzen und Verwendung sowie Schädlinge und Krankheiten werden ausführlich dargestellt. Außerdem wird auf wichtige Literatur hingewiesen. Stärkere Aufmerksamkeit gilt in der Neuauflage der Beschreibung von Adventivarten. — Insgesamt unterstreicht auch die vorliegende Lieferung erneut die Einmaligkeit des „Hegi“ als Standardwerk für die mitteleuropäische Flora.

B. R. STEPHAN

Krankheiten der Wald- und Parkbäume. Leitfaden zum Bestimmen von Baumkrankheiten. VON HEINZ BUTIN. Verlag Georg Thieme, Stuttgart, New York. 1983. 172 Seiten mit 100 Abbildungen in 388 Einzeldarstellungen. DM 49,—. (ISBN 3-13-639001-6).

Das vorliegende Buch gehört zu den besten in den letzten Jahren in verschiedenen Ländern erschienenen Werken über Baumkrankheiten. Durch klare und eindeutige Zeichnungen der Symptome und Schadorganismen mit Fruchtkörpern und Sporenformen, sowie durch präzise, auf das Wesentliche beschränkte Beschreibungen können über 100 Krankheiten der Wald- und Parkbäume bestimmt werden. Auch dem weniger Geübten dürfte die richtige Diagnose anhand dieses Buches nicht schwer fallen. Außer diagnostischen Merkmalen werden Hinweise auf die Biologie und die wirtschaftliche Bedeutung der einzelnen Krankheitserreger gegeben und Maßnahmen zur Verhütung oder Bekämpfung aufgezeigt. Gegliedert ist der Stoff nach dem Ort der Schädigung am Baum: Schäden an Blüten, Samen und Früchten; Schäden an Nadeln und Blättern; Schäden an Knospen und jungen Trieben; Rindenschäden; Gefäß- und Welkekrankheiten; Holzschäden im stehenden Stamm; Lagerholzschiäden; Epiphyten, Symbionten und parasitische Blütenpflanzen; Bildungsabweichungen und Wachsanomalien. — Die Hauptabschnitte sind untergliedert in Einzelbeschreibungen der durch Viren, Bakterien, Pilze oder parasitische Blütenpflanzen verursachten Erkrankungen. Der klassischen Forstpathologie folgend werden tierische Schädlinge nicht behandelt. Die Ausführungen über die wichtigeren Krankheiten werden ergänzt durch Hinweise auf ähnliche Krankheitsbilder oder Schadorganismen, die wirtschaftlich von geringerer Bedeutung sind oder weniger häufig vorkommen. Die Taxonomie der Schad-