

genotype-environment interaction. In: Papers 2nd Meeting, Working Group on Quantitative Genetics. IUFRO, Raleigh, N. C. 1969, p. 49–61, (1970). — STONECYPHER, R. and M. ARBEZ: Methods of selection. IUFRO Joint Meeting on Advanced Generation Breeding, Bordeaux, June 1976, (1976). — WERNER, M.: Vegetative propagation by cuttings of *Picea abies* in Sweden. In: Proc. Vegetative Propagation of Forest Trees - Physiology and Practice. Inst. For. Imp. and Dep. For. Gen., Coll. For., Swed., Univ. Agric. Sci., pp. 97–102, (1977). — WRICKE, G.: Über eine Methode zur Erfassung der ökologischen Streubreite in Feldversuchen. Z. Pflanzenzüchtung 47: 92–96, (1962).

## Isolierung und Elektrofusion von Koniferenprotoplasten

Von U. KIRSTEN<sup>1)</sup>, H.-E. JACOB<sup>2)</sup>, M. TESCHE<sup>1)</sup> und S. KLUGE<sup>3)</sup>

Technische Universität Dresden, Sektion Forstwirtschaft,  
Wissenschaftsbereich Biologie

(Eingegangen 2. September 1985)

### Zusammenfassung

Beschrieben wird die Isolierung von Protoplasten aus Fichte (*Picea abies* (L.) KARST.) und Kiefer (*Pinus sylvestris* L.). Deutliche Beziehungen bestehen zwischen Protoplastenausbeute, Lebensfähigkeit der Protoplasten und dem Verholzungsgrad der Kotyledonen in den verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung. Die Stadien 7 bis 9 erwiesen sich als die geeigneten zur Protoplastenisolierung. Ab Stadium 10 nehmen Protoplastenausbeute und Lebensfähigkeit aufgrund fortschreitender Verholzung des Gewebes signifikant ab.

Die Fusion der Protoplasten erfolgte durch elektrischen Feldimpuls nach dielektrophoretischer Sammlung der Protoplasten. Erfolgreich fusioniert wurden Protoplasten von *Picea abies* × *Picea abies*, von *Pinus sylvestris* × *Pinus sylvestris* und von *Picea abies* × *Pinus sylvestris*.

Beträchtliche Unterschiede ergeben sich hinsichtlich der Isolierungs- und Fusionsbedingungen von Koniferenprotoplasten gegenüber Protoplasten aus krautigen Pflanzen.

Schlagwörter: Koniferen, Protoplasten, Fusion.

### Summary

The isolation of protoplasts of Norway spruce (*Picea abies* (L.) KARST.) and Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) is described. Distinct differences exist between protoplast yield, viability of the protoplasts and lignification degree of the cotyledons in their different developmental stages. The stages 7 to 9 turned out to be the most suitable for protoplast isolation. Due to progressive lignification of the tissue protoplast yield and viability decrease significantly beginning with stage 10.

Fusion of the protoplasts was effected by electrical breakdown after dielectrophoretic collection of the protoplasts. Protoplasts of *Picea abies* × *Picea abies*, *Pinus sylvestris* × *Pinus sylvestris* and *Picea abies* × *Pinus sylvestris* were successfully fused. Considerable differences are observed with regard to the isolation and fusion conditions of conifer protoplasts as compared with protoplasts of herbaceous species.

Key words: conifers, protoplasts, fusion.

### Einleitung

In der Forstpflanzenzüchtung werden ebenso wie in Landwirtschaft und Gartenbau seit einigen Jahren mit der Anwendung von Gewebe- und Zellkulturen, speziell der Protoplastentechnik, neue Wege beschritten.

Aus Geweben von 22 Gehölzpflanzen wurden bisher Protoplasten isoliert, bei 11 Arten ist deren Kultur gelungen. Jedoch ist außer bei *Citrus*-Arten noch keinerlei Pflanzenregeneration bekannt geworden. Auch Protoplastenfusionen sind nur von vier Arten beschrieben (AHUJA, 1984).

Demgegenüber steht die Isolierung von Protoplasten aus krautigen Pflanzen von über 500 Pflanzenarten insgesamt, von denen fast ausnahmslos alle kultivierbar sind. Belege über eine erfolgreiche Pflanzenregeneration existieren von mehr als 60 Pflanzenarten.

Diese Unterschiede deuten bereits auf die Schwierigkeiten hin, die sich aus der Arbeit mit Gehölzpflanzen ergeben. Darin liegt sicherlich auch die Hauptursache, daß sich nur ein Drittel der Ergebnisse auf Koniferen beziehen und gelungene Fusionen von Koniferenprotoplasten bisher noch nicht beschrieben worden sind.

Nachfolgend wird die Isolierung von Protoplasten aus Kotyledonen von *Picea abies* (L.) KARST. und *Pinus sylvestris* L. dargestellt und deren inner- und zwischenartliche Fusion durch die elektrische Feldimpulstechnik.

Die Versuche haben das Ziel, neue Wege und Methoden für die Forstpflanzenzüchtung, insbesondere Grundlagenerkenntnisse zur Protoplastenfusion über Artgrenzen hinweg zu gewinnen und biotechnologische Nutzungsmöglichkeiten zu erkunden.

### Material und Methoden

#### Anzucht der Keimlinge

Saatgut von Fichte und Kiefer wurde nach 24stündigem Einquellen in Wasser in Quarzsand ausgelegt und in einer Phytokammer angezogen (Photoperiode 14 h, 20°C, 60% rel. Luftfeuchte, 7000 lx; Dunkelperiode 10 h, 15°C, 95% rel. Luftfeuchte). Die Einteilung der Keimlinge nach Entwicklungsstadien erfolgte nach TESCHE und ZENTSCHE (1978).

Die Fichtenkeimlinge konnten analog klassifiziert werden.

#### Protoplastenisolierung

Die Protoplastenisolierung erfolgte in Anlehnung an die Methode von DAVID und DAVID (1979).

Die Kotyledonen der Keimlinge wurden abgetrennt und in wenigen Tropfen 0,7 M Mannitlösung mit einem Skalpell längsgeteilt. Daran schloß sich die Übertragung des Gewebes in ein Enzymgemisch bestehend aus Cellulase R-10, 1 %ig, (Kinki Yakult, Nishinomiya, Japan) Rapidase 0,5 %ig, (Firma Seclin, Frankreich) und Pectinol D 0,5 %ig, (Firma Röhm, Darmstadt, BRD)

<sup>1)</sup> Technische Universität Dresden, Sektion Forstwirtschaft, WB Biologie, Pierner Str. 7, DDR-8223 Tharandt.

<sup>2)</sup> Karl-Marx-Universität Leipzig, Sektion Biowissenschaften, Leipzig, DDR.

<sup>3)</sup> Zentralinstitut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie, Jena, DDR.

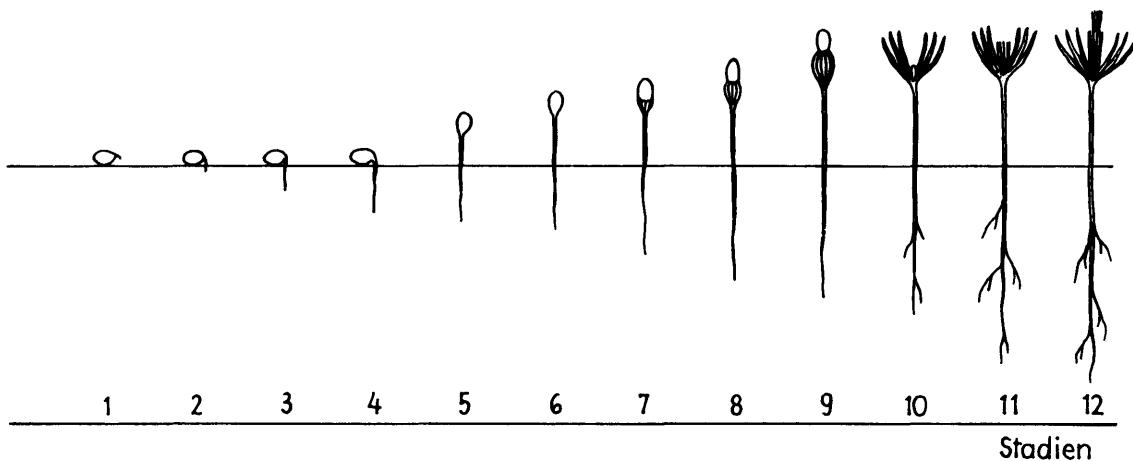


Abb. 1. — Einteilung von Kiefernkeimlingen nach Entwicklungsstadien.

in 0,7 M Mannitlösung an. Die Inkubationszeit betrug bei 15–17°C etwa 18–22 Stunden. Des weiteren wurden Inkubationstemperaturen von 35°C und 25°C getestet.

#### Nachweis der Verholzung der Kotyledonen von Fichten- und Kiefernkeimlingen

Für die Protoplastenisolierung spielt der Verholzungsgrad der Kotyledonen eine wesentliche Rolle.

Er wurde anhand der Färbung dünner Blattquerschnitte mit Phloroglycin-Salzsäure ermittelt, indem die verholzten, d. h. rot gefärbten Tracheiden ausgezählt wurden. Außerdem wurde registriert, ob sich im Parenchym oder in der Epidermis bereits verholzte Zellen befanden oder nicht.

#### Fusion der Protoplasten mittels elektrischem Feldimpuls

Der zur Fusion verwendete Feldimpulsgenerator ist ein Eigenbau der Werkstätten des Zentralinstitutes für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie Jena der Akademie der Wissenschaften der DDR. In der dazugehörigen Fusionskammer ( $\phi$  4 mm) befinden sich zwei in Polyacryl streng parallel gehaltene Platinelektroden ( $\phi$  0,5 mm) in einem Abstand von 150  $\mu\text{m}$ . Die Zellen wurden in dieser Kammer mittels eines elektrischen Feldimpulses nach vorangegangener dielektrophoretischer Sammlung fusioniert (BERG et al., 1984). Die Füllung der Mikrofusionskammer mit Protoplastensuspension (Zelldichte ca. 105/ml) erfolgte bei angelegter Dielektrophoresespannung.

Die dielektrophoretische Sammlung der Protoplasten und der Fusionsvorgang konnten mikroskopisch beobachtet werden.

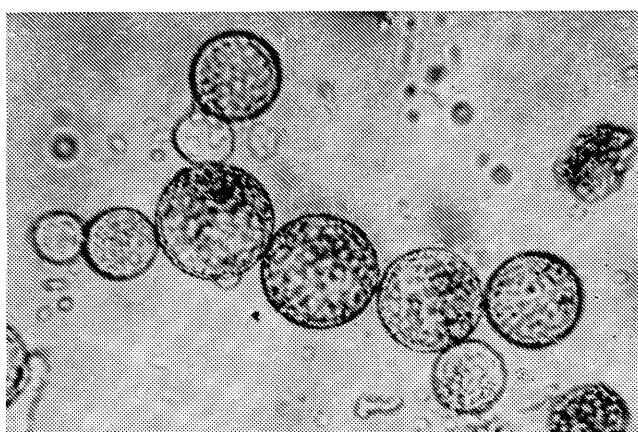


Abb. 2. — Frisch isolierte Kiefernprotoplasten, Stadium 8.

#### Vitalfärbung von Fichtenprotoplasten

Zur visuellen Unterscheidbarkeit wurden die Fichtenprotoplasten 20 min mit Neutralrot gefärbt (1 : 10 000 in 0,7 M Mannitlösung).

Die Mischung von Kiefern- und Fichtenprotoplasten erfolgte unmittelbar vor der Kammerfüllung im Verhältnis 1 : 1.

#### Ergebnisse

Es wurden aus den Kotyledonen von Keimlingen sechs verschiedener Entwicklungsstadien Protoplasten isoliert, die Ausbeute pro Gramm Blattfrischmasse und die Lebensfähigkeit bestimmt. Abbildung 2 zeigt frisch isolierte, lebensfähige Protoplasten.

Wie wir feststellen konnten, spielt der Verholzungsgrad der Kotyledonen für die Protoplastenausbeute und die Lebensfähigkeit der Protoplasten eine wesentliche Rolle. Dies wird deutlich aus Abbildung 4 und 5, in denen diese Zusammenhänge für Fichte und Kiefer dargestellt sind.

Ab Stadium 10 geht bei beiden Baumarten die Protoplastenausbeute und die Lebensfähigkeit der Protoplasten signifikant zurück. Dieses Ergebnis korreliert deutlich mit dem Verholzungsgrad der Kotyledonen. Bis zum Stadium 9 verholzen zunächst nur die Tracheiden. Dabei nimmt diese Anzahl zwischen Stadium 8 und 9 um etwa das Doppelte zu und steigt in den folgenden Stadien kontinuierlich an. Ab Stadium 10 setzt Verholzung der Epidermiszellen ein und ab Stadium 12 sind verholzte Zellen im Parenchym nachweisbar. Mit zunehmender Verholzung vor allem der Epidermis- und Parenchymzellen wird die Protoplastenfreisetzung deutlich verhindert.

Die für die Fusionsexperimente empirisch ermittelten Optimalwerte für Dielektrophorese und Feldimpuls sind in Abbildung 5 zusammengestellt.

Die Protoplasten bildeten nach dem Einfüllen in die Fusionskammer zumeist Ketten zwischen den Elektroden, mitunter kamen auch nur zwei bis drei Zellen miteinander an einer Elektrode in Kontakt. Nach dem Feldimpuls fusionierten die Protoplasten in einer Zeit von 5 bis 6 min miteinander, in Ausnahmefällen verlief die vollständige Fusion mehrerer Zellen in wenigen Sekunden (Abb. 6).

Analoge Bilder ergaben sich bei der Fusion von Kieferninit Kiefernprotoplasten bzw. von Fichten- mit Kiefernprotoplasten. Bei der Interspeziesfusion war während der Zellverschmelzung die Vermischung gefärbter Partikel der Fichtenprotoplasten mit dem ungefärbten Zytoplasma der Kiefernprotoplasten deutlich sichtbar.

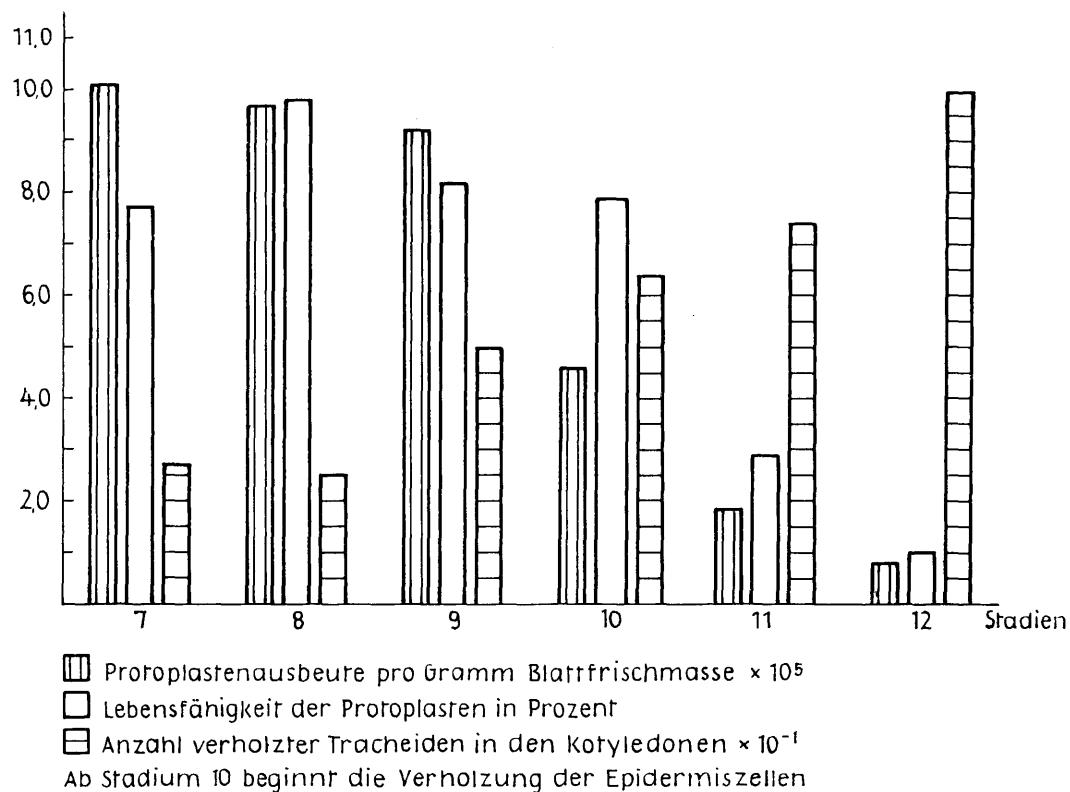


Abb. 3. — Protoplastenausbeute, Lebensfähigkeit der Protoplasten und Verholzungsgrad der Kotyledonen bei Fichtenkeimlingen.

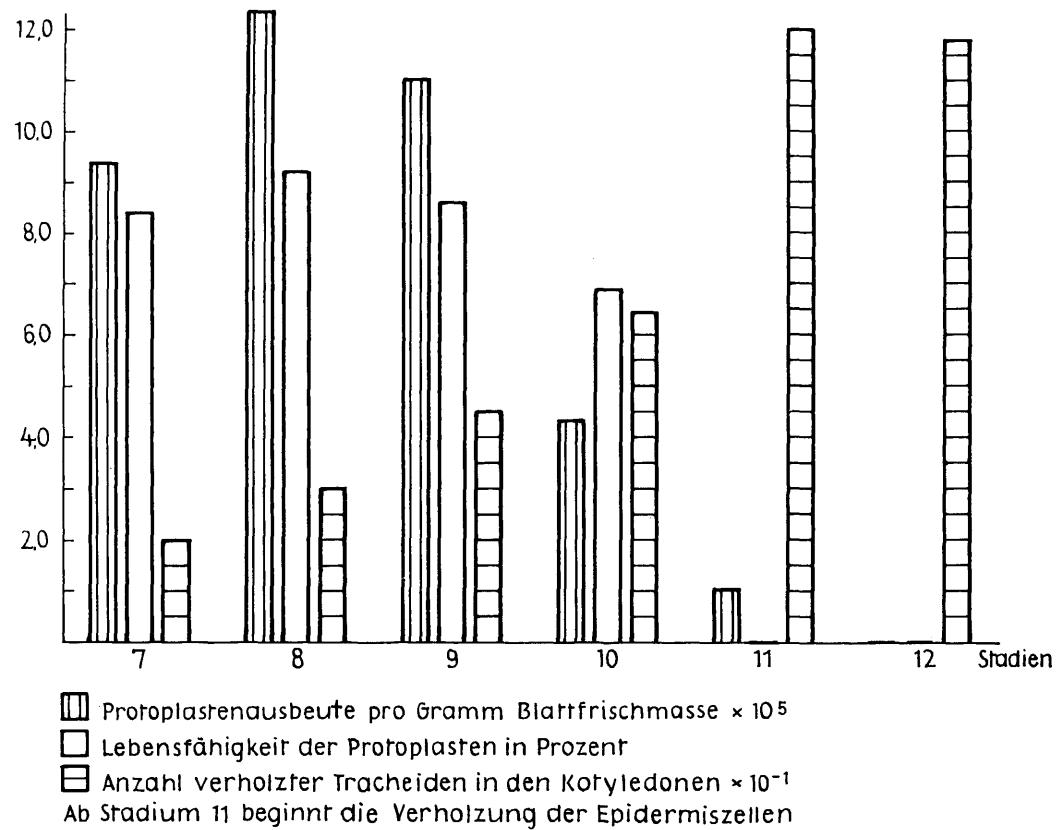


Abb. 4. — Protoplastenausbeute, Lebensfähigkeit der Protoplasten und Verholzungsgrad der Kotyledonen bei Kiefernkeimlingen.

Protoplastenfusion der Art	Dielektrrophorese - spannung/Frequenz	Pulsspannung / Pulsdauer
<i>Picea abies</i> x		
<i>Picea abies</i>	2,5 V / 350 kHz	50 V / 50 µs
<i>Pinus sylvestris</i> x		
<i>Pinus sylvestris</i>	3,5 V / 350 kHz	60 V / 100 µs
<i>Picea abies</i> x		
<i>Pinus sylvestris</i>	2,5 V / 350 kHz	30 V / 50 µs

Abb. 5. — Dielektrophoresespannung/Frequenz der Wechselspannung und Pulsspannung/Pulsdauer bei der Fusion von Koniferenprotoplasten durch elektrischen Feldimpuls.

Die Fusionsraten lagen bei den Untersuchungen innerhalb einer Art zwischen 30 und 50%. Bei der Interspeziesfusion betrug sie etwa 20%, da nur etwa die Hälfte aller stattfindenden Fusionen Verschmelzungen zwischen Fichte und Kiefer waren.

### Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß sich Koniferenprotoplasten hinsichtlich der Isolierungsbedingungen und der Fusionierung z. T. beträchtlich von anderen pflanzlichen Protoplasten unterscheiden. So benötigt man zur Freisetzung vitaler Protoplasten beim Tabak, bei der Gerste und bei der Nelke zwischen 2 und 5 Stunden bei Temperaturen von 25° C bis 30° C (MOTOMORI *et al.*, 1973; OKUNO *et al.*, 1978; KLUGE *et al.*, 1983). Auch bei Gehölzpflanzen, beispielsweise bei Ulmen, wird nur wenig länger (6 Std.; 25° C) inkubiert (REDENBRUCH, 1981). KIRBY *et al.* (1979) benötigten auch für die Freisetzung von Douglasienprotoplasten nur 2 Stunden bei 25° C. DAVID and DAVID (1979) gaben für *Pinus pinaster* dagegen mehrere Stunden ("overnight") an.

Die letzteren Ergebnisse können wir voll unterstützen. Die Protoplastenfreisetzung dauert bei Fichte und Kiefer 18—22 Stunden, bei Inkubationstemperaturen von 15° C bis 17° C. Hinsichtlich der Inkubationstemperatur stellten wir Unterschiede zur Literatur fest. Bei 35° C sank die Protoplastenausbeute im Optimalstadium 8 auf Werte ab, die Stadium 11 und 12 entsprachen. Bei 25° C starben die Protoplasten noch während ihrer Freisetzung ab, so daß zwar die Protoplastenausbeute kaum beeinträchtigt war, aber die Lebensfähigkeit auf nahe Null Prozent zurückging.

Eine Erhöhung der Temperatur zur Beschleunigung der Freisetzung der Protoplasten geht immer auf Kosten der Vitalität der Protoplasten.

Ein Vitalitätsmerkmal von Protoplasten ist deren Teilungsfähigkeit. Erste Zellteilungen konnten sowohl bei Kiefern- als auch bei Fichtenprotoplasten nach 3 bis 7 Tagen beobachtet werden (KIRSTEN, unveröff.).

DAVID and DAVID (1979) beschreiben zwei Entwicklungsstadien von Keimlingen, von denen gleichermaßen gut Protoplasten isoliert worden sind (nach unserem Entwicklungs-schema entsprechen diese den Stadien 9 und 10). Wir prüften ausgehend von dem erwähnten Schema die Stadien 7 bis 12 von Fichten- und Kiefernkeimlingen auf Ausbeute und Lebensfähigkeit der Protoplasten. Dabei stellten wir fest, daß es zwischen Stadium 9 und 10 in Abhängigkeit vom Verholzungsgrad der Kotyledonen zu einer signifikanten Er-niedrigung der Protoplastenausbeute kommt. Die Ursachen für den Rückgang der Protoplastenausbeute liegen u. a.

darin, daß Lignin, eine typische Inkrustierung, die Elementarfibrillärräume in der sekundären Zellwand ausfüllt und Seitenketten in die Zellulosestruktur bildet. Das wiederum

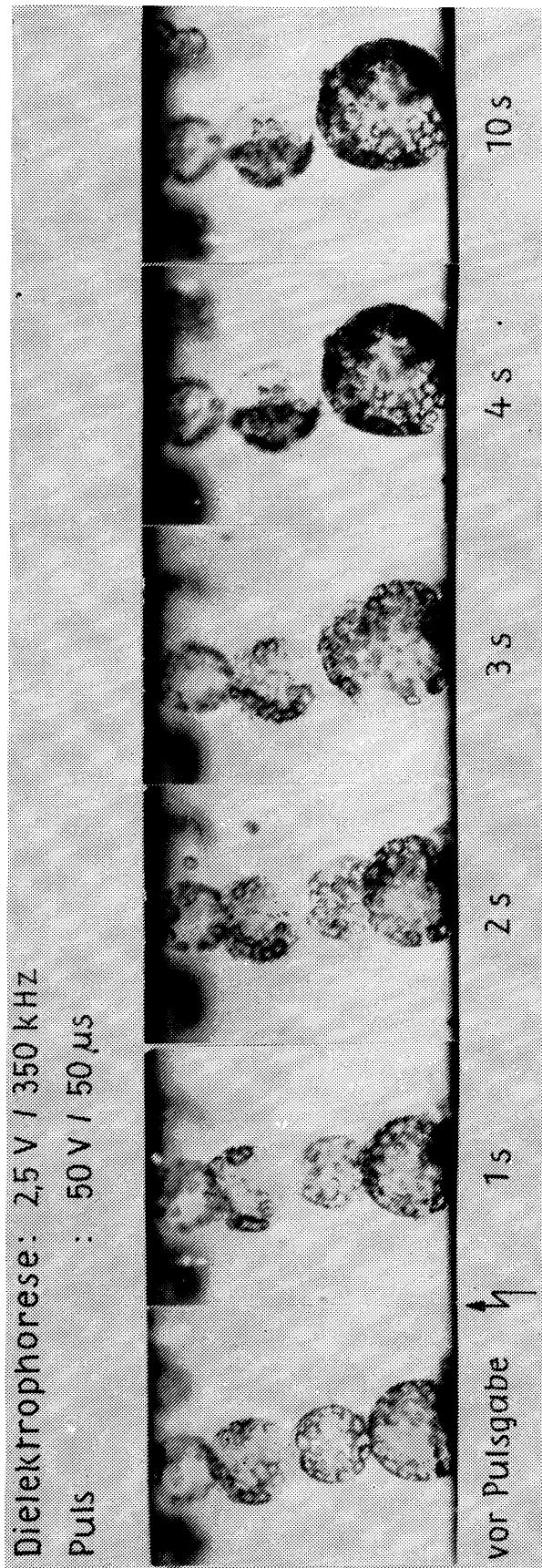


Abb. 6. — Elektrofusion von Fichtenprotoplasten.

führt zu einer sterischen Hinderung der Zellulase (SCHMIEDEL, pers. Mitt.). Neben dem Verholzungsgrad der Kotyledonen spielt sicherlich auch der beginnende Sekundärstoffwechsel des Keimlings eine bedeutende Rolle. In Kiefernkemmlingen werden nach dem Abwurf der Testa (Stadium 10) erste Harzkanäle nachgewiesen (FALZ, 1981). Die bei der Protoplastenisolierung dadurch möglicherweise freiwerdenden toxischen Stoffe (z. B. Phenole) könnten Einfluß auf die Lebensfähigkeit der Protoplasten haben. Bei den Fusionsversuchen zeigen sich ebenfalls deutliche Unterschiede gegenüber den bisher mit elektrischem Feldimpuls fusionierten pflanzlichen Protoplasten. So wurden im Vergleich zu Protoplasten aus Gerste, Tomate, Tabak und Saubohnen (JACOB *et al.*, 1984; ZIMMERMANN und SCHEURICH, 1981) sehr viel höhere Pulsspannungen und Pulslängen benötigt, um Fusionen zu erreichen.

Die angeführten Ergebnisse unterstreichen somit einmal mehr die Besonderheiten von Koniferen, die diese nicht nur hinsichtlich der Protoplastenisolierung aufweisen.

#### Danksagung

Für gute technische Mitarbeit danken wir Fräulein KATRIN HARZ und Frau KARIN WERSIG.

#### Literatur

- AHUIA, M. R.: Protoplast Research in Woody Plants. *Silvae Genetica* **33**: 32–37 (1984). — BERG, H., AUGSTEN, K., BAUER, E., FÖRSTER, W., JACOB, H.-E., MÜHLIG, P., WEBER, H. and KURISCHKO, A.: Possibilities of Cell Fusion and Transformation by Electrostimulation. *Biochemistry and Bioenergetics* **12**: 119–133 (1984). — DAVID, A. and DAVID, H.: Isolation and Callus Formation from Cotyledon Protoplasts of Pine (*Pinus pinaster*). *Z. Pflanzenphysiol.* **94**: 173–177 (1979). — FALZ, D.: Kurze Übersicht zum gegenwärtigen Stand der Erkenntnisse über die Harzbildung bei Kiefern. *Wiss. Zschr. d. TU Dresden* **30** (4): 223–226 (1981). — JACOB, H.-E., SIEGMUND, F. und BAUER, E.: Fusion von pflanzlichen Protoplasten durch elektrischen Feldimpuls nach Dielektrophorese. *Biol. Zbl.* **103**: 77–82 (1984). — KIRBY, E.: The Isolation and Culture of Conifer Protoplasts. *Coll. Internat. sur la Cult. 'in vitro' des ess. forest. Tagungsbericht, Nangis, France*. — KLUKE, S., KIRSTEN, U. and OERTEL, C.: Infection of *Dianthus* Protoplasts with Carnation Mottle Virus. *J. gen. Virol.* **64**: 2485–2487 (1983). — MOTOYOSHI, F., BANCROFT, J., WAITS, J. and BURGESS, J.: The Infection of Tobacco Protoplasts with Cowpea Chlorotic Mottle Virus and its RNA. *J. gen. Virol.* **20**: 177–193 (1973). — OKUNDO, T. and FURUSAWA, I.: Modes of Infection of Barley Protoplasts with Brome Mosaic Virus. *J. gen. Virol.* **38**: 409–418 (1978). — REDENBRUGH, K., KARNOWSKY, D. and WESTFALL, R.: Protoplasts isolation and fusion in three *Ulmus* species. *Can. J. Bot.* **59**: 1436–1443 (1981). — TESCHE, M. und ZENTSCHE, W.: Zur Entwicklung der Keimlinge von *Pinus sylvestris* L.. *Wiss. Tagung d. Sektion Forstwirtschaft vom 16. 10. bis 18. 10. 1978 aus Anlaß der 150-Jahr-Feier der TU Dresden, DDR. Vorträge* S. 31–40 (1978). — ZIMMERMANN, U. and SCHEURICH, P.: High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta* **151**: 26–32 (1981).

## Mating System Dynamics of Lodgepole Pine in Alberta, Canada<sup>1)</sup>

By D. J. PERRY<sup>2)</sup> and B. P. DANCICK

Department of Forest Science, University of Alberta,  
Edmonton, Alberta T6G 2H1, Canada

(Received 7th November 1985)

#### Summary

The mating systems of three widely separated lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia* DOUGL.) populations in the Rocky Mountain foothills of Alberta, Canada, were examined. Estimates of population multilocus outcrossing rates ranged from 0.926 to 0.983. No significant differences in outcrossing rates were found among stands, among pollination years within stands, or among crown positions within trees. However, a tentative temporal trend is suggested in which selection against inbred seed is occurring over time in the seed pool retained on the tree. Significant heterogeneity was found among single-tree multilocus outcrossing rate estimates in one stand.

**Key words:** Mating System, Outcrossing Rate, *Pinus contorta* var. *latifolia*.

#### Zusammenfassung

Es wurde das Paarungssystem von 3 weit voneinander getrennten Populationen von *Pinus contorta* var. *latifolia* DOUGL. in den Vorbergen der Rocky Mountains in Alberta, Kanada, untersucht. Schätzungen der Fremdbefruchtungsrate anhand von Multilocusanalysen in den Populationen ergaben Werte von 0,926 bis 0,983. Keine signifikanten Differenzen in der Fremdbefruchtungsrate wurden zwischen Beständen, Befruchtungsjahren des gleichen Bestan-

des oder Positionen innerhalb der Krone eines Baumes gefunden. Es wird jedoch auf einen zögernden, zeitlichen Trend hingewiesen, bei dem eine Selektion gegen ingezüchteten Samen mit der Zeit im auf dem Baum verbleibenden Samenbestand vorkommt. Signifikante Heterogenität wurde zwischen Einzelbäumen in einem Bestand gefunden, die als Fremdbefruchtungsrate mit Hilfe der Multilocusanalyse untersucht wurden.

#### Introduction

The mating system is an important determinant of plant population genetic structure (CLEGG, 1980). It is the genetic link between generations and determines the initial zygotic frequency distribution of each generation. Individuals of a highly outcrossed species generally have higher levels of heterozygosity than those of self-fertile species (BROWN, 1979). Inbreeding can also induce gametic-phase disequilibrium even among loci on different chromosomes (ALLARD, 1975; MITTON *et al.*, 1981).

Knowledge of the mating system is also of practical significance for forest tree breeders and those involved in reforestation. Selfed progeny of most coniferous forest species display significant inbreeding depression in the form of decreased survival and growth (FRANKLIN, 1970; SORENSEN and MILES, 1982). In addition, the presence of inbreeding violates some of the assumptions made in analysis of wind-pollinated progeny tests, leading to overestimation of ad-

<sup>1)</sup> Based in part upon the thesis of the senior author presented in partial fulfilment of the M. Sc. degree, University of Alberta.

<sup>2)</sup> Current address: School of Forestry, Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canada.