

ADAMS, 1987; MORAN and ADAMS, 1989). However, there is no evidence from this study that a translocation from native locations to Germany imposes different evolutionary forces detectable at the loci used in this study. Significant differences of allele frequencies at *Idh* within the population pair #1076 may be attributable to some form of selection and/or drift at this locus. Although all gene markers employed belong to the group-I enzymes that are probably adaptive (BERGMANN, 1991) the loci under study were neutral or evolutionary forces were too weak that they could be inferred by the sample size employed.

Acknowledgements

The authors thank M. T. CONKLE and P. D. HODGSKISS for the possibility that the electrophoresis could be performed in their lab. Stimulating suggestions for this study originated from H.-R. GREGORIUS, H. H. HATTEMER, W. LIBBY and D. B. NEALE.

Literature

ADAMS, W. T., NEALE, D. B., DOERKSEN, A. H. and SMITH, D. B.: Inheritance and linkage of isozyme variants from seed and vegetative bud tissues in Coastal Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (MIRB.) FRANCO]. *Silvae Genet.* **39**, 153–167 (1990). — BERGMANN, F.: Isozyme gene markers. In: G. MÜLLER-STARCK and M. ZIEHE (Editors): Genetic Variation in European Populations of Forest Trees. J. D. Sauerländer's Verlag, Frankfurt. pp. 67–77 (1991). — BERGMANN, F., GREGORIUS, H.-R. and LARSEN, J. B.: Levels of genetic variation in European silver fir (*Abies alba*). Are they related to the species' decline? *Genetica* **2**, 1–10 (1990). — CAMPBELL, R. K.: Soils, seed zone maps, and physiography: guidelines for seed transfer of Douglas-fir in south-western Oregon. *For. Sci.* **37**, 973–986 (1991). — CONKLE, M. T., HODGSKISS, P. D., NUNNALLY, L. B. and HUNTER, S. C.: Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. USDA For. Serv., Pacific Southwest Forest and Ranges Experimental Station, Gen. Tech. Rep. PSW-64 (1982). — CONKLE, M. T., SCHILLER, G. and GRUNWALD, C.: Electrophoretic analysis of diversity and phylogeny of *Pinus brutia* and closely related taxa. *Syst.*

Bot. **13**, 411–424 (1988). — FAST, W., DANCICK, B. P. and BOWER, R. C.: Mating system and pollen contamination in a Douglas-fir clone bank. *Can. J. For. Res.* **16**, 1314–1319 (1986). — GREGORIUS, H.-R.: Genetischer Abstand zwischen Populationen. I. Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung. *Silvae Genet.* **23**, 22–27 (1974). — HATTEMER, H. H.: Measuring genetic variation. In: G. MÜLLER-STARCK and M. ZIEHE (Editors): Genetic Variation in European Populations of Forest Trees. J. D. Sauerländer's Verlag, Frankfurt. pp. 2–19 (1991). — HERNANDEZ, C. M. and CROSSA, J.: A program for estimating the optimum sample size for germplasm conservation. *J. Hered.* **84**, 85–86 (1993). — KERESTESI, B.: Black locust. *Unasylva* **32**, 23–33 (1980). — KLEINSCHMIT, J. and BASTIEN, J. CH.: IUFRO's role in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) FRANCO) tree improvement. *Silvae Genet.* **43**, 161–173 (1992). — KLEINSCHMIT, J., RACZ, J., WEISGERBER, H., DIETZE, W., DIETRICH, H. und DIMPFELMEIER, R.: Ergebnisse aus dem internationalem Douglasien-Herkunftsversuch von 1970 in der Bundesrepublik Deutschland. *Silvae Genet.* **23**, 167–176 (1974). — LEDIG, F. T.: Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos* **63**, 87–108 (1992). — LI, P. and ADAMS, W. T.: Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Can. J. For. Res.* **19**, 149–161 (1989). — MERKEL, S. A. and ADAMS, W. T.: Patterns of allozyme variation within and among Douglas-fir breeding zones in southwest Oregon. *Can. J. For. Res.* **17**, 402–407 (1987). — MILLER, J. T.: Five-year height and survival differ significantly in *Larix decidua* provenances in New Zealand. *Research Leaflet NO. 7, For. Res. Inst., N. Z. For. Serv.*, Rotorua, New Zealand (1964). — MORAN, G. F. and ADAMS, W. T.: Microgeographical patterns of allozyme differentiation in Douglas-fir from southwest Oregon. *For. Sci.* **35**, 3–15 (1989). — OHLER, J. G.: Coconut, tree of life. FAO Plant Prod. Prot. Pap. 57. Food and Agriculture Organization, United Nations, Rome (1984). — SNEATH, P. H. and SOKAL, R. R.: Numerical Taxonomy. W. H. Freeman and Company, San Francisco (1973). — SOKAL, R. R. and ROHLF, F. J.: Biometry. W.H. Freeman and Company, New York (1981). — SWOFFORD, D. L. and SELANDER, R. B.: BIOSYS-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical genetics (release 1.7). User's Manual. Center for Biodiversity, Champaign, Illinois and School of Life Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois (1981). — ZHANG, J. W., MARSHALL, J. D. and JAQUISH, B. C.: Genetic differentiation in carbon isotope discrimination and gas exchange in *Pseudotsuga menziesii*. A common garden experiment. *Oecologia* **93**, 80–87 (1993).

Somatische Embryogenese und Sproßentwicklung in Abhängigkeit von 2,4-D- und BAP-Konzentrationen an zygotischen Embryonen der spätaustreibenden Stieleiche (*Quercus robur* L.)

Von E. HÜBNER, K. MÜLLER, J. HEYDER und H. P. SCHMITT

Landesanstalt für Ökologie, Bodenordnung und Forsten, Landesamt für Agrarordnung NRW,
Dez. 41, Forstgenbank, Obereimer 2a, D-59821 Arnsberg, Germany

(Eingegangen 10. Juli 1995)

Zusammenfassung

Ein standardisiertes Verfahren zur in vitro-Vermehrung der spätaustreibenden Stieleiche konnte entwickelt werden. Durch gezielten Einsatz von Wachstumsregulatoren konnte sowohl somatische Embryogenese an den zygotischen Embryonen, als auch Sproßbildung bei zygotischen Embryonen stimuliert werden.

Sproßbildung bei zygotischen Embryonen konnte auf modifiziertem WPM mit 1 µM BAP + 1 µM 2,4-D, sowie auf modifiziertem WPM mit 10 µM BAP induziert werden. Auf modifiziertem WPM mit 10 µM BAP lag die Induktionsrate bei

87,9%. In Kombination mit 5 µM 2,4-D fand bereits eine Hemmung der Sproßentwicklung statt.

Somatische Embryonen bildeten sich an den Keimblättern zygotischer Embryonen auf modifiziertem WPM (Woody plant medium) bei allen getesteten Kombinationen von 2,4-D und BAP, jedoch mit stark unterschiedlichen Induktionsraten. Die höchste Induktionsrate lag bei 34,8% bei Verwendung von modifiziertem WPM mit 1 µM BAP + 1 µM 2,4-D.

Insgesamt wurden 36 Genotypen durch Sproßentwicklung aus zygotischen Embryonen und 17 Genotypen auf dem Wege der somatischen Embryogenese in vitro etabliert. Regeneration

von somatischen Embryonen zu Pflanzen konnte bereits bei 7 von 17 Genotypen erreicht werden.

Schlagwörter: Spätaustreibende Stieleiche (*Quercus robur* L.), Gewebekultur, somatische Embryogenese, Sproßbildung, Pflanzenregeneration.
FDC: 165.442; 176.1 *Quercus robur*.

Summary

A standard method for in vitro propagation of late flushing *Quercus robur* L. was developed. Shoot induction on zygotic embryos as well as somatic embryogenesis was induced by a selective use of growth regulators.

Shoot formation on zygotic embryos was induced by using modified WPM supplemented with 1 µM BAP + 1 µM 2,4-D and by using modified WPM supplemented with 10 µM BAP. The use of modified WPM supplemented with 10 µM BAP led to an induction rate of 87,9%. In combination with 5 µM 2,4-D shoot formation was already suppressed. The tested hormone combinations of 2,4-D and BAP induced somatic embryos on cotyledons of zygotic embryos, however the induction rates differed strongly. The highest induction rate of 34,8% was achieved on modified WPM supplemented with 1 µM BAP + 1 µM 2,4-D.

A total of 36 genotypes were established by shoot formation on zygotic embryos and 17 genotypes were established by somatic embryogenesis.

Plant regeneration from somatic embryos was achieved with 7 of 17 genotypes.

Einleitung

In Nordrhein-Westfalen gibt es einige Stieleichenbestände, die im Durchschnitt 2 bis 3 Wochen später austreiben als die „normale Stieleiche“. Diese spätaustreibende Stieleiche ist bei uns nicht heimisch. Es lässt sich heute noch nachvollziehen, daß das Saatgut, aus dem diese Bestände angezogen worden sind, mit einiger Wahrscheinlichkeit aus Slawonien im ehemaligen Österreich-Ungarn stammte. Aufgrund der klimatischen Besonderheit dieser Region in Form von häufig auftretenden Spätfrösten ist von einer genetischen Anpassung der Eichen auszugehen.

Unter unseren Wuchsbedingungen ist die spätaustreibende Eiche (im Handel als „Sonderherkunft Münsterländer Spät-eiche“ bekannt) waldbaulich außerordentlich interessant. Ihre Vorteile liegen auf der Hand: Das verzögerte Austreiben schützt sie nicht nur vor Spätfrösten, sondern – vor allem – vor dem Fraß des Eichenwicklers, der im nordwestdeutschen Flachland immer wieder sehr bedeutende Schäden verursacht. Das Auftreten der L1-Generation des Schadinseks erfolgt in etwa zeitgleich mit dem Knospenaustrieb der „normalen“ Eiche. Erfolgt ein späterer Austrieb der Knospen, kommt es zu einer hohen Mortalitätsrate wegen fehlender Nahrungsgrundlage.

Diesen Vorteilen steht vor allem ein Nachteil gegenüber: Hier in Nordwestdeutschland haben Späteichenbestände nur einen geringen und zudem unregelmäßigen Fruchtansatz. Dementsprechend ist Späteichensaftgut nur selten am Markt und dann verhältnismäßig teuer. Dies behindert den waldbaulich gewünschten verstärkten Anbau der Münsterländer Spät-eiche.

Die Weiterentwicklung und Vereinfachung von Verfahren zur in vitro-Vermehrung gerade der Späteiche ist von besonderem Interesse. Ziel ist:

1. Zum Zwecke der Generhaltung somatische Embryonen durch Kryokonservierung langfristig zu erhalten und dazu

sicherzustellen, daß die Regeneration zu Pflanzen mit geeigneten Methoden auch bei hohen Klonzahlen bewältigt werden kann.

2. Methoden für eine stabile Kulturbegründung mit relativ hohen Klon- und Pflanzenzahlen zu erarbeiten, deren Vermehrung über Sproßkulturen aus zygotischen Embryonen mit standardisierten Kulturbedingungen erreicht werden soll.

Material und Methoden

Mitte August 1993 wurden unreife Eicheln von 4 Bäumen eines zur Saatgutbeirntung zugelassenen Bestandes (FA Letmathe, FBB Unna, Waldbesitzer: Freiherr von BOESELAGER, UAbt. 161A1) geerntet. Der Ernteumfang betrug 100 Eicheln pro Baum. Vor der Sterilisation wurden Eicheln mit Fraß- bzw. Faulstellen verworfen. Die Eicheln wurden mit der Cupula wie folgt sterilisiert: 3 Min. 70% EtOH, 3 Min. 2% NaOCl + einige Tropfen Tween 20, 3 mal 3 Min. in steriles Aqua dest. gewaschen.

Cupula, Perikarp und Samenschale wurden unter aseptischen Bedingungen entfernt. Die isolierten unreifen zygotischen Embryonen wiesen eine Größe von 10 mm bis 18 mm auf. Die Kultivierung der isolierten zygotischen Embryonen erfolgte bei einer Photoperiode von 16 h, bei einer für den Photosynthesevorgang nutzbaren Strahlung (PhuR, nach DIN 5031) von 5,5 Wh • m⁻² (Leuchtentyp: Osram, cool white, L58W25) und einer Temperatur von 25 °C ± 1 °C.

Kultur von zygotischen Embryonen

Als Kulturmedium diente ein modifiziertes Woody plant medium (WPM): Makroelemente und Vitamine WPM nach LLOYD, McCOWN (1980), Mikroelemente und EDTA-Eisen(III)-Natriumsalz nach MURASHIGE und SKOOG (1962), mit folgenden Zusätzen: 6,8 mM Glutamin, 0,5 mM Serin, 0,7 mM Glycin, 7 g/l Agar (Agar Oxoid Bacteriological No. 1), 87,6 mM Saccharose (separat autoklaviert). Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH bzw. 0,1 N HCl auf 5,8 eingestellt und das Medium 20 Min. bei 1,1 bar und 121 °C autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden die sterilfiltrierten Phytohormone zugegeben. Fünf Kombinationen von BAP (6-Benzyl-aminopurin) und 2,4-D [(2,4-Dichlorphenoxy)-essigsäure]: 1 µM BAP + 1 µM 2,4-D, 1 µM BAP + 5 µM 2,4-D, 2,5 µM BAP + 10 µM 2,4-D, 5 µM BAP + 5 µM 2,4-D und 10 µM BAP wurden zur Induktion von somatischen Embryonen und Sproßentwicklung getestet. 40 ml des Mediums wurden in Glaspetrischalen (Durchmesser 100 mm, Höhe 20 mm) ausgegossen, pro Petrischale wurden 2 zygotische Embryonen aufgelegt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen. Der Testumfang betrug 208 Eicheln.

Multiplikation von Sproßkulturen

Verwendet wurde ein modifiziertes Gresshoff und Doy Medium (GD): Makroelemente nach GRESSHOFF und DOY (1972), Mikroelemente und EDTA-Eisen(III)-Natriumsalz nach MURASHIGE und SKOOG (1962), Vitamine nach VIEITEZ et al. (1985), 7g/L Agar (Oxoid Bacteriological No. 1) und 87,6 mM Saccharose. Der pH-Wert wurde mit 1 N HCl + bzw. 0,1 N HCl auf 5,7 eingestellt. Die sterile Zugabe von 1 µM BAP + 0,5 µM IBA (3-Indolbuttersäure) erfolgte nach dem Autoklavieren. 100 ml des Mediums wurden pro Kulturgefäß (Weckglas 250 ml) ausgegossen, das Kulturgefäß wurde mit einem Filzring abgedichtet und mit Tesafilm gegen ein Öffnen verschlossen.

Sprosse, die aus zygotischen Embryonen entstanden sind, wurden vom Embryo abgetrennt und auf das oben genannte Multiplikationsmedium transferiert. Nach 4 bis 6 Wochen Subkultur wurden die Axillarsprosse bzw. Adventivsprosse vom

Kallus abgetrennt, in 8 mm lange Segmente geteilt und wiederum auf das Multiplikationsmedium transferiert. Die Explantate wurden zur Vermehrung in einem Zeitraum von 4 bis 6 Wochen subkultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei einer Photoperiode von 16 h, bei einer für den Photosynthesevorgang nutzbaren Strahlung von $6,8 \text{ Wh} \cdot \text{m}^{-2}$ und einer Temperatur von $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Die Bestimmung der Vermehrungsrate erfolgt nach der Methode von SAN-JOSE et al. (1988).

Bewurzelung von Sproßkulturen

Es wurde ein MS-Medium nach MURASHIGE und SKOOG (1962) verwendet. Die Makroelemente dieses Mediums wurden in ihrer Konzentration auf ein Drittel reduziert. 7g/L Agar (Oxoid Bacteriological No. 1) und 87,6 mM Saccharose wurden dem Medium zugesetzt. Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH bzw. 0,1 N HCl auf 5,8 eingestellt. Die Auxinkonzentration im Bewurzelungsmedium betrug 5 μM IBA, das Auxin wurde nach dem Autoklavieren steril zugegeben. Sprosse mit einer Mindestlänge von 15 mm wurden nach Trennung vom Kallus auf das Bewurzelungsmedium transferiert und 4 Wochen bei einer Photoperiode von 16 h, bei einer für den Photosynthesevorgang nutzbaren Strahlung von $6,8 \text{ Wh} \cdot \text{m}^{-2}$ und einer Temperatur von $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ kultiviert.

Pikieren und Adaption der bewurzelten Pflanzen erfolgte nach den von CHALUPA (1988) beschriebenen Methoden. Es wurde Einheitserde (Typ P) zum Pikieren verwendet.

Multiplikation von somatischen Embryonen

Verwendet wurde modifiziertes Woody plant medium (WPM) mit Zugabe von 1 μM BAP + 1 μM 2,4-D. 40 ml des Mediums wurden in Petrischalen ausgegossen. Die Kultivierung erfolgte bei einer Photoperiode von 16 h, bei einer für den Photosynthesevorgang nutzbaren Strahlung von $5,5 \text{ Wh} \cdot \text{m}^{-2}$ und einer Temperatur von $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$; dabei wurden die Petrischalen mit Parafilm gegen mögliche Kontaminationen abgedichtet. Das Subkultivierungsintervall betrug 6 Wochen.

Ausdifferenzierung von somatischen Embryonen

Die somatischen Embryonen wurden vom Multiplikationsmedium für somatische Embryonen auf das oben erwähnte Multiplikationsmedium für Sproßkulturen transferiert. Die Kultivierung erfolgte bei einer Photoperiode von 16 h, bei einer für den Photosynthesevorgang nutzbaren Strahlung von $5,5 \text{ Wh} \cdot \text{m}^{-2}$ und einer Temperatur von $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Das Subkultivierungsintervall betrug 6 Wochen. Nach der Ausdifferenzierung von somatischen Embryonen wurden die Sprosse vom restlichen Gewebe abgetrennt und auf das Multiplikationsmedium für Sproßkulturen transferiert. Der Zeitpunkt der Sproßentnahme wurde so festgelegt, daß die gebildeten Sproßachsen eine Mindestlänge von 1 cm aufwiesen. Die Vermehrung, Bewurzelung und Adaption dieser aus somatischer Embryogenese stammenden Sprosse erfolgt nach den gleichen Methoden der Vermehrung, Bewurzelung und Adaption von Sproßkulturen aus zygotischen Embryonen.

Resultate

Kontaminationen

31% der aufgelegten Eicheln mußten wegen Kontaminationen verworfen werden.

Sproßentwicklung

Sprosse bildeten sich auf modifiziertem WPM mit 1 μM BAP + 1 μM 2,4-D sowie auf modifiziertem WPM mit 10 μM BAP. Bei den weiter getesteten Kombinationen von BAP und 2,4-D zeigte sich kein Sproßwachstum. Die Kombination von 1 μM

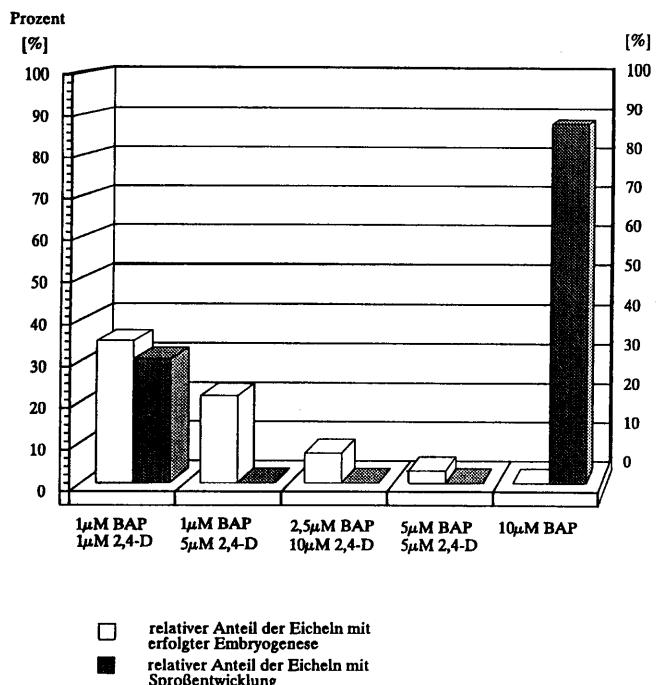


Abb. 1. – Somatische Embryogenese und Sproßentwicklung an unreifen Embryonen von *Quercus robur* L. auf modifizierten WPM mit unterschiedlichen Kombinationen von 2,4-D und BAP.

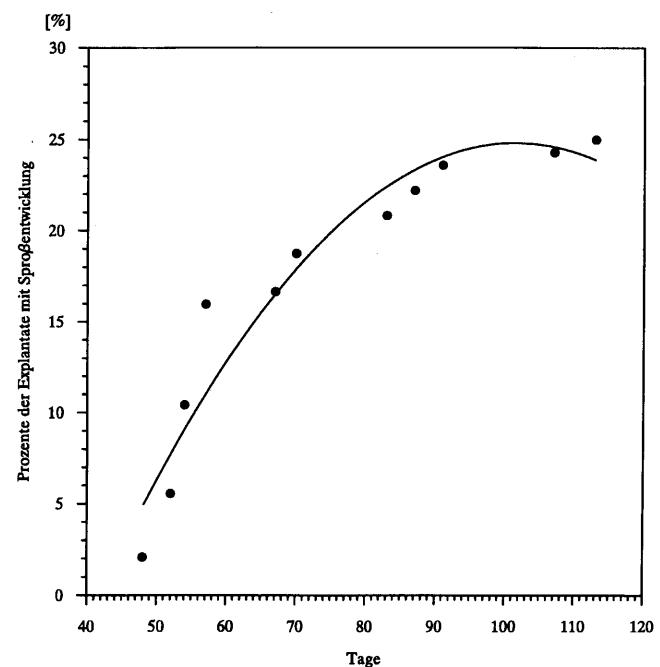


Abb. 2. – Sproßentwicklung (ztl. Auftrag); relative Induktion nach Tagen ausgehend von 144 Eicheln (Varianz = 4,496; Standardabweichung = 2,1204; Korrelationskoeffizient = 0,9621; Irrtumswahrscheinlichkeit = 0,006).

BAP und 1 μM 2,4-D in modifiziertem WPM zeigte eine Sproßbildung an 30,4 % der Explantate. Hingegen wies die alleinige Zugabe von 10 μM BAP zum modifizierten Medium eine Sproßentwicklung an 87,9 % der zygotischen Embryonen auf (Abb. 1). Die Ergebnisse zeigen, daß bereits bei einer Konzentration von 5 μM 2,4-D eine Hemmung der Sproßbildung hervorgerufen wird. Sproßentwicklung an den zygotischen Embryonen beobachteten wir bei den oben genannten Medien

ab dem 48. Tag nach Versuchsbeginn (Abb. 2). Die auf diesem Wege gewonnenen Sprosse von 36 Genotypen wurden auf modifiziertem GD-Medium nach GRESSHOFF und DOY (1972) mit Zugabe von 1 µM BAP + 0,5 µM IBA weiter kultiviert. Die Zugabe von Wachstumsregulatoren in der Konzentration von 1 µM BAP und 0,5 µM IBA zum modifizierten GD-Medium hat sich nach Austestung in unserem Labor als ein geeignetes Multiplikationsmedium für alle Späteichenklone herausgestellt.

Daher diente dieses Medium für alle 36 Sproßklone als Standardmultiplikationsmedium. Die Vermehrungsraten waren stark klonabhängig, sie variierten von 1,5 bis 4,1. Die durchschnittliche Vermehrungsrate dieser Genotypen betrug 2,3. Nach der Multiplikation wurden die Mikrostecklinge auf MS-Medium nach MURASHIGE und SKOOG (1962) mit der Zugabe von 5 µM IBA zur Bewurzelung kultiviert. Es wurden die Sprosse der Klone bewurzelt, die eine Vermehrungsrate > 2,0 aufwiesen. 23 von insgesamt 36 Genotypen zeigten diese Vermehrungsrate. Die Sprosse dieser Klone ließen sich erfolgreich bewurzeln.

Die Bewurzelungsrate der verschiedenen Genotypen auf MS-Medium mit 5 µM IBA lag zwischen 13,3 % und 75,9 % bei einem Mittelwert von 48 % (Tab. 1).

Tabelle 1. – Bewurzelungs- und Adoptionsresultate bei Sprossen aus zygotischen Embryonen bei *Quercus robur* L.

Klon-bezeichnung	Mikrostecklinge zur Bewurzelung	Bewurzelungsrate [%]	Überlebensrate im Gewächshaus [%]	Anzahl adaptierte Pflanzen
93.8a.5	121	55,4	71	48
93.8a.6	102	49,0	50	25
93.8a.7	29	58,6	83	14
93.8a.8	45	55,6	32	8
93.8a.9	293	55,0	57	92
93.8a.12	37	46,0	70	12
93.8a.15	27	25,9	28	2
93.8b.1	41	34,1	64	9
93.8b.2	170	15,3	54	48
93.8b.3	15	13,3	50	1
93.8b.4	35	20,0	71	5
93.8b.5	58	75,9	68	30
93.8b.6	65	64,6	62	26
93.8b.7	70	41,4	79	23
93.8b.8	61	72,1	66	29
93.8b.10	344	51,7	66	118
93.8b.11	55	45,5	12	3
93.8b.25	238	36,1	75	6
93.8b.26	120	55,0	86	57
93.8b.30	70	51,4	86	31
93.6.3	152	67,1	53	54
93.6.5	221	66,1	49	72
93.6.11	24	50,0	25	3
gesamt	2393	48,0	59	716

Die Anzahl der produzierten Pflanzen nach erfolgreicher Adaption im Gewächshaus nach CHALUPA (1988) betrug 716 Stück (Tab. 1). Die Bewurzelung und Adaption bei den 36 Genotypen werden fortgeführt.

Somatische Embryogenese

Somatische Embryonen bildeten sich an den zygotischen Embryonen entweder direkt in Form von Embryonenclustern an den Keimblättern oder nach Bildung von embryogenem Kallus an den Keimblättern (Abb. 3).

Kallusbildung bzw. somatische Embryogenese konnte nach einer Inkubationszeit von 50 Tagen auf allen Medien mit 2,4-D an den zygotischen Embryonen beobachtet werden. Insgesamt erwiesen sich 11,8 % der Explantate als embryogen.

Ohne Zusatz von 2,4-D zum Medium fand keine Embryogenese statt. Bei einer 5fach höheren Konzentration von BAP und gleichbleibender 2,4-D Konzentration reduzierte sich die Embryogeneserate von 21,4 % auf 3,0 % (Abb. 1).



Abb. 3. – Somatische Embryonen an den Kotyledonen eines unreifen zygotischen Embryos von *Quercus robur* L.

Die Kombination von 1 µM BAP und 1 µM 2,4-D in modifiziertem WPM zeigte eine Embryogeneserate von 34,8 % (Abb. 1). Dieses Medium eignet sich auch zur Weiterkultivierung und Multiplikation der somatischen Embryonen.

Ausdifferenzierung von somatischen Embryonen zu Sprossen konnte bei 7 von 17 Genotypen erzielt werden. Die somatischen Embryonen wurden mit dem Ziel der Ausdifferenzierung auf dem Multiplikationsmedium für Sproßkulturen kultiviert. Bei der Ausdifferenzierung der somatischen Embryonen fand Sproß- und Wurzelentwicklung statt. Der Zeitraum der Ausdifferenzierung der somatischen Embryonen zu Sprossen war stark klonabhängig. Er variierte von 49 bis zu 294 Tagen.

Tabelle 2. – Resultate der Ausdifferenzierung von somatischen Embryonen aus zygotischen Embryonen zu Sprossen bei *Quercus robur* L..

Klon-bezeichnung	Ausdifferenzierung der som. Embryonen zu Sprossen [Tage]	Vermehrungsrate der Sprosse	Bewurzelungsrate der Sprosse [%]	Anzahl adaptierte Pflanzen
93.8a.1	221	1,5	-*	-
93.8a.3	147	2,1	20,8	9
93.8a.4	49	1,9	-*	-
93.8a.17	70	1,7	-*	-
93.8a.18	56	3,2	48,9	24
93.8a.33	294	-	-*	-
93.8b.10	49	2,6	-*	-

*) Bewurzelungsversuche bei diesem Klon nicht durchgeführt

Die abgetrennten Sprosse zeigen auf dem Multiplikationsmedium für Sproßkulturen Vermehrungsraten von 1,5 bis 3,2. Multiplikation und Bewurzelung der aus somatischen Embryonen gewonnenen Sproßkulturen erfolgte nach den bereits genannten Verfahren der Sproßkultivierung.

Diskussion

Die Weiterentwicklung und die Vereinfachung des Verfahrens zur in vitro-Vermehrung von *Quercus robur* L. „Sonderherkunft Münsterländer Späteiche“ hat zu den folgenden Ergebnissen und daraus resultierenden Schlußfolgerungen geführt.

Bei den zygotischen Embryonen konnte eine Sproßbildung an 87 % der Explantate erreicht werden; dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen von MEIER-DINKEL et al. (1993). Auf diesem Wege konnten 36 Genotypen der Münsterländer Späteiche etabliert werden.

Das aufgezeigte Verfahren zur Gewinnung von somatischen Embryonen führte zu einer Embryogeneserate von 34,8% (17 Genotypen). Die verschiedenen Entwicklungen von somatischen Embryonen werden von BHOJWANI und RAZDAN (1983) und AHUJA (1991) ausführlich beschrieben. Es zeigte sich, daß in Abwesenheit von 2,4-D keine Embryogenese stattfand. Die wichtige Rolle von 2,4-D für die Embryogenese wurde hiermit bestätigt (MANZANERA et al., 1992), wohingegen BAP hier eher hemmend wirkte. Aufgrund der hohen etablierten Klonzahl von 53 Genotypen der Münsterländer Späteiche werden diese Verfahren in der Forstgenbank NRW als Standardmethoden eingeführt werden.

Die Kultivierung der an den zygotischen Embryonen gebildeten Sprosse von 36 verschiedenen Genotypen auf dem gleichen Multiplikationsmedium (modifiziertes GD-Medium mit 1 µM BAP und 0,5 µM IBA) und eine gleichzeitige Ausdifferenzierung von somatischen Embryonen zu Sprossen mit einer Rate von 41,2% (7 von 17 Genotypen) auf diesem Medium zeigt, daß dieses Verfahren zum Aufbau einer Sammlung mit hoher Klonzahl und zur Vermehrung von Mikrostecklingen der Münsterländer Späteiche praxisreif anwendbar ist. Die Ausdifferenzierung der somatischen Embryonen fand, wie von AHUJA (1993) beschrieben, unter gleichzeitiger Entwicklung von Sproß und Wurzel statt. Diese dabei entstandenen Pflanzen könnten bereits pikiert werden. Dies würde jedoch nicht zur Gewinnung hoher Pflanzenzahlen führen, da die Ausdifferenzierung von somatischen Embryonen zwar methodisch gesichert ist, sich dabei jedoch, wie auch von AHUJA (1993) und JÖRGENSEN (1993) beschrieben, nur vereinzelte somatische Embryonen ausdifferenzieren. Nach erfolgreicher Ausdifferenzierung von somatischen Embryonen erfolgte bei uns daher die Abtrennung des Sprosses von Kallus und Wurzel. Danach durchläuft dieser Sproß eine Multiplikationsphase mit anschließender Bewurzelung nach den erwähnten Standardmethoden. Diese Vorgehensweise führt zu einer effektiveren Pflanzenausbeute. Aus somatischen Embryonen wurden bis Januar 1994 von 2 Genotypen insgesamt 33 Pflanzen produziert. Daneben wurden auf dem Wege der Vermehrung von Sprossen aus zygotischen Embryonen bisher 716 Pflanzen produziert.

Da die Lagerung von Späteichensaatgut nur sehr begrenzt möglich ist (ROHMEDER, 1972), stellt die somatische Embryogenese eine alternative Möglichkeit der Generhaltung dar. Die 17 Genotypen der Münsterländer Späteiche aus somatischer Embryogenese sollen daher zur Generhaltung kryokonserviert (JÖRGENSEN, 1990) und anschließend nach den etablierten Methoden regeneriert werden.

Danksagung

Wir bedanken uns bei Herrn Dr. A. MEIER-DINKEL für kritische Anmerkungen und die sorgfältige Korrektur des Manuskriptes.

Literatur

- AHUJA, M. R.: *Woody Plant Biotechnology*. Plenum Press, New York. 1–4 (1991). — AHUJA, M. R. and LIBBY, W. J.: *Clonal Forestry*. I. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 136–138 (1993). — BHOJWANI, S. S. and RAZDAN, M. K.: *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier Science Publishers B. V. 91–112; 199–235 (1983). — CHALUPA, V.: Large Scale Micropropagation of *Quercus robur* L. using Ademini – Type Cytokinins and Thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Biol. Plant.* **30** (6): 414–421 (1988). — GRESSHOFF, P. M. and DOY, C. H.: Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). *Planta* **107**: 161–170 (1972). — JÖRGENSEN, J.: Conservation of valuable Gene resources by Cryopreservation in some Forest Tree Species. *J. Plant Physiol.* **136**, 373–376 (1990). — JÖRGENSEN, J.: Embryogenesis in *Quercus petraea*. *Ann. Sci. For.* **50** (Suppl. 1), 344–350 (1993). — LLOYD, G. and MCCOWN, B.: Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proc. Int. Plant. Propag. Soc.* **30**: 421–427 (1980). — MANZANERA, J. A., ASTORGA, R. and BUENO, M. A.: Somatic Embryo Induction and Germinalation in *Quercus suber* L.. *Silva Genetica* **42**, 90–93 (1993). — MEIER-DINKEL, A., BECKER, B. and DUCKSTEIN, D.: Micropropagation and ex vitro rooting of several clones of late flushing *Quercus robur* L.. *Ann. Sci. For.* **50** (Suppl. 1), 319–322 (1993). — MURASHIGE, T. and SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473–497 (1962). — ROHMEDER, E.: Das Saatgut in der Forstwirtschaft. Paul Parey, Hamburg und Berlin. 101–104 (1972). — SAN-JOSE, M. C., BALLESTER, A. and VIEITEZ, A. M.: Factors affecting in vitro propagation of *Quercus robur* L.. *Tree Physiology* **4**, 281–290 (1988). — VIEITEZ, A. M., SAN-JOSE, M. C. and VIEITEZ, E.: In vitro plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L.. *J. Hortic. Sci.* **60**: 99–106 (1985).

Systematische Mischung von Klonen in Samenplantagen

Von K.-H. SCHMITZ

Landesanstalt für Ökologie, Bodenordnung und Forsten/Landesamt für Agrarordnung Nordrhein-Westfalen,
Dezernat 41 Waldbau, Waldökologie, Postfach 101052, D-45610 Recklinghausen

(Eingegangen 13. Juli 1995)

Zusammenfassung

Mit dem Ziel, die Bestäubungsverhältnisse in einer Samenplantage zu optimieren, wurden verschiedene Verfahren zur Mischung von Klonen entwickelt. Es handelt sich dabei um streng systematische Mischungsverfahren. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der gängigen PC-Mischungsprogramme können die hier vorgestellten Verfahren gedanklich leicht nachvollzogen werden. Die Anwendung und Kontrolle ist deshalb auch ohne PC-Unterstützung möglich. Nachbarschaften zu bestimmten Klonen bzw. Klongruppen lassen sich gezielt ansteuern bzw. vermeiden. Die Anpassungsfähigkeit des

Pflanzplanes an die Form des verfügbaren Areals bleibt weitgehend gewahrt. Die Verfahren vermeiden doppelte direkte Nachbarschaften zu anderen Klonen. Ein Verfahren realisiert das Bestreben, jeden Klon mit den Ramets eines jeden anderen Klones einmal in direkte Nachbarschaft (Distanz = 1,0 Pflanzabstand) zu bringen. Ein weiteres Verfahren berücksichtigt die hohe Infektionsgefahr kompakter Ulmenplantagen durch den Ascomyceten *Ceratocystis ulmi* (Ulmensterben) in Mitteleuropa und zeigt für diese bedrohten Arten eine Möglichkeit der dezentralen Mischung in kleinen, räumlich verteilten Gruppen auf.