

# Dielektrische Einzelzellspektroskopie an Pollen verschiedener Waldbaumarten – Charakterisierung der Pollenvitalität

Von T. MÜLLER<sup>1)</sup>, L. KÜCHLER<sup>2)</sup>, G. FUHR<sup>1)</sup>, TH. SCHNELLE<sup>1)</sup>  
und A. SOKIRKO<sup>3)</sup>

(Eingegangen am 21. Dezember 1992)

## Zusammenfassung

Als nichtinvasive Methode wurde die dielektrische Einzelzellspektroskopie zur Ermittlung der passiven elektrischen Eigenschaften und zur Interpretation von Meßdaten individueller Nadelbaumpollen eingesetzt. Die dielektrische Dispersion wurde in einem Frequenzbereich von 100 Hz bis 32 MHz in einem Medium niedriger Leitfähigkeit untersucht. Die Zellbewegung, induziert über rotierende elektrische Felder, gestattet Aussagen zur Vitalität und Keimfähigkeit einzelner Pollen *in vitro* und die Bestimmung von passiven elektrischen Parametern einzelner Kompartimente (Exine, Intine, Membran, Innenraum). Im Sinne einer angepaßten Beschreibung der Daten wurden die Berechnungen auf schalenförmig aufgebaute Rotationsellipsoide ausgedehnt. Die Unterschiede im Rotationsverhalten von vitalen und nichtvitalen Pollen werden im wesentlichen durch die Veränderung der Leitfähigkeit des Innenraumes 0,15 S/m auf 0,03 S/m und der Intine (3,5 mS/m auf 5,5 mS/m) sowie der Veränderung der Exine verursacht. Durch die passiven elektrischen Eigenschaften der Exine (geringe Leitfähigkeit und Dk) hat das Plasmalemma nur einen geringen Einfluß auf das Rotationspektrum. Die an Einzelpollen gewonnenen Resultate wurden mit anderen Ergebnissen aus *in vitro* Tests — der Elektrolytfreisetzung, UV-Absorption, FDA-Färbung — und aus *in vivo* Kreuzungsexperimenten verglichen und unterstützen diese Interpretation.

**Schlagwörter:** Elektrorotation, elektrische Permeabilität, Pollenvitalität, Waldbaumarten, Artunterschiede, Rotationsellipsoide.

## Summary

The dielectric spectroscopy of single cells has been proved to be a powerful noninvasive method to determine the electric properties and to characterise individual pollen grains of coniferes. Measurements were carried out in a surrounding medium of low conductivity with electric field frequencies ranging from 100 Hz to 32 MHz. The behavior of cells in rotating electric fields allows to determine the electric parameters of compartments (exine, intine, membrane, etc) and to distinguish between vital and nonvital pollen cells. For fundamental interpretation of the data the frequency response of multishell ellipsoidal cell models was calculated analytically. Compared with nonvital pollen the vital one has been found to have a higher conductivity in the interior (0.15 S/m to 0.03 S/m) and of the intine (3.5 mS/m to 5.5 mS/m). Due to low conductivity and permittivity of the exine the plasma lemma has nearly no impact on the frequency spectrum. The results obtained with the dielectric spectroscopy on single cells are supported by those of *in vitro* tests, electrolyte release, UV-absorption, FDA staining (Fluorescein Diacetate) as well as *in vivo* crossing experiments done in parallel.

<sup>1)</sup> Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie, Invalidenstraße 42, D-10115 Berlin

<sup>2)</sup> Umweltlabor im Sächsischen Landesamt für Umwelt und Geologie, Wasastraße 50, D-01445 Radebeul

<sup>3)</sup> A.N. Frumkin Institut für Elektrochemie, Akademie der Wissenschaften, 117071 Moskau, Rußland

## 1. Einleitung

Gleichermaßen wichtig für die Kreuzungszüchtung und die Generhaltung ist die Kenntnis der Vitalität von Pollen. Eine Vitalitätsbestimmung *in vitro* mit herkömmlichen Keimmethoden ist verhältnismäßig zeitaufwendig, dauert 1 bis 3 Tage und setzt ein bestimmtes Maß an Erfahrungen voraus (WORSLEY, 1959; CHRISTIANSEN, 1972; DIETZE, 1973). In den 70er Jahren wurden deshalb Färbemethoden zum Nachweis von Enzymaktivitäten als Vitalitätskriterium eingeführt, mit z. T. schwer reproduzierbaren Ergebnissen (STANLEY und LINSKENS, 1974; RYNNÄNEN, 1978). Der Esterasenachweis mit FDA (Fluoresceindiacetat) hat sich als brauchbarer Vitalitätsnachweis auch für Waldbaumpollen herauskristallisiert (RYNNÄNEN, 1978). In den Pionierarbeiten von CHING und CHING (1964, 1976) wurde durch die Untersuchung des Effluxes von niedermolekularen Verbindungen ein ebenfalls geeigneter Vitalitätstest *in vitro* gefunden. Die Gemeinsamkeit aller *in vitro* Tests besteht letztlich darin, Parameter für die Integrität der Plasmamembran bzw. der aufgelagerten Schichten (Sporoderm) und des Polleninnenraumes zu finden und die gewonnenen Daten mit dem Zustand einer großen Anzahl von Zellen zu korrelieren und auf möglichst unkomplizierte Weise die Keimfähigkeit des Blütenstaubes festzustellen.

Eine sehr empfindliche, nichtinvasive Methode, um die passiven elektrischen Eigenschaften individueller Zellen zu charakterisieren, ist die Elektrorotation, wie in zahlreichen theoretischen und experimentellen Arbeiten belegt werden konnte (ARNOLD und ZIMMERMANN, 1988; FUHR et al., 1990; FUHR und KUZMIN, 1986; SAUER und SCHLÖGL, 1985). Die Drehung von Zellen und mikroskopisch kleinen Partikeln induziert durch ein rotierendes elektrisches Hochfrequenzfeld bildet die Basis dieser Meßmethode. Der Effekt beruht auf der Wechselwirkung des elektrischen Feldes mit induzierten Ladungen an den Grenzflächen des Objektes. Dabei reflektiert das Rotationsverhalten der Zelle die dielektrischen Eigenschaften (Dielektrizitätskonstanten -Dk, Leitfähigkeiten -g) einzelner Zellkompartimente, besonders der Membran und des Innenraumes, in Abhängigkeit vom Aufbau und der Struktur des Objektes. In der vorliegenden Arbeit wird die von ARNOLD und ZIMMERMANN (1982) entwickelte Rotations-technik erstmalig auf die Charakterisierung von Waldbaumpollen angewandt. Um der differenzierten Geometrie der Pollen Rechnung zu tragen, wurde die Theorie auf vielschalige Rotationsellipsoide erweitert. Aufbauend auf den Untersuchungen von CHING und CHING werden parallel dazu allgemein anerkannte *in vitro* Kriterien der Vitalitätstestung wie Elektrolytfreisetzung, UV-Absorption und FDA-Färbung, als Marker der Membranintegrität, herangezogen und mit den im Kreuzungsexperiment, als *in vivo* Test, erzielten Ergebnissen verglichen.

## 2. Material and Methoden

### 2.1. Pollenmaterial

In die Untersuchungen wurden Pollen von Douglasie

(*Pseudotsuga menziesii* (MIRBEL) FRANCO, 6 Klone), Lärche (*Larix decidua* MILL., 6 Klone; *Larix kaempferi* (LAMB.) CARRIÈRE, 2 Klone), verschiedene Kiefern-Arten (*Pinus strobus* L., 3 Klone; *Pinus peuce* GRISB., 3 Klone; *Pinus sylvestris* L.; *Pinus nigra* ARNOLD; *Pinus wallichiana* JACKS.; *Pinus uncinata* MILL. ex MIRB.), Fichte (*Picea abies* L.) und Aspe (*Populus tremula* L., 3 Klone) einbezogen. Für die Berechnung und Modellierung des Rotationsverhaltens der Pollen ist die Geometrie der Körper ein wichtiger Parameter. Deshalb werden an dieser Stelle Form und Abmessungen der Pollen näher ausgeführt.

#### 2.1.1. Pollen mit Luftsäcken: Kiefer und Fichte

Das Pollenkorn von *Pinus* und *Picea* besteht aus dem Pollenkörper und den Luftsäcken. Im lufttrockenen Zustand ist der Pollenkörper vorwiegend flach, schalenförmig. Im wäßrigen Medium dehnt sich die Ventralseite des Pollenkörpers aus. Dadurch wird eine nahezu kugelige (*Pinus*) oder elliptische (*Picea*) Form des eigentlichen Pollenkörpers erreicht (siehe auch EISENHUT, 1961; NILSON et al., 1977). Da sich für die genannten Arten Länge (b) und Breite (a) nur geringfügig unterscheiden, wurde nur eine durchschnittliche Größenangabe  $((a+b)/2)$  in die *Tabelle 1* aufgenommen. Das Verhältnis Breite/Höhe des Pollenkornes wurde mit dem Wert 1,1 angenommen (EISENHUT, 1961). Die Luftsäcke von *Picea* weisen Abmessungen von ca.  $80 \times 80 \times 40 \mu\text{m}$  auf. Für *Pinus sylvestris* können Länge und Breite des Pollenkörpers mit 34 bis  $37 \mu\text{m}$  x 43 bis  $46 \mu\text{m}$  bei einer Höhe von  $16 \mu\text{m}$  bis  $20 \mu\text{m}$  angegeben werden. Die Luftsäcke und Pollenkörper der anderen *Pinus*-Arten sind nur unwesentlich höher; Länge und Breite differieren zwischen  $40 \mu\text{m}$  bis  $65 \mu\text{m}$ .

#### 2.1.2. Pollen ohne Luftsäcke: Lärche, Douglasie und Aspe

Diese Pollen haben die Gestalt einer segmentierten Kugel. Für Pollen im wäßrigen Medium können 2 verschiedene Formen unterschieden werden (siehe Abb. 4). In der Aufsicht erscheint ein Teil der Pollen nahezu kreisrund und der andere Teil länglich, oval. Es wurden die von EISENHUT (1961) vorgeschlagenen zu erfassenden Abmessungen der Lärchen- und Douglasienpollen übernommen. Für die in der Aufsicht kreisförmig erscheinenden Pollen sind in *Tabelle 1* die optisch auffälligsten Parameter angegeben. Das sind zum einen der durchschnittliche äußere Durchmesser des Pollenkornes und zum anderen der durchschnittliche Durchmesser des inneren Pollenrandes. Bei Pollen, die im Ergebnis der Quellung starke Gestaltsänderungen aufweisen, nimmt das ursprüngliche, im ungequollenen Zustand halbkugelförmige Pollenkorn zunehmend eine längliche, rotationselliptische Form an, wobei sich die Porenöffnung verringert. Dann kippen die in Ventralansicht liegenden Mikrosporen zur Seite. Für diese Zellen, die in der Draufsicht mehr oder weniger stark von der Kreisform abweichen, wurden die jeweils größte Ausdehnung der Länge und Breite in *Tabelle 1* angegeben. Diese Werte sind zur Unterscheidung von den kreisförmigen Objekten mit einem (\*) versehen.

#### 2.2. Pollenkeimung *in vitro*

Für die Pollenkeimung im hängenden Tropfen nutzten wir stark verdünnte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (0,01%) als Keimmedium (WORSLEY, 1959). Bei der Auswertung der Keimproben wurde nach dem Grundsatz der elastischen Zählung verfahren (UTERMÖHL, 1958); je nach Keimprobe wurden mindestens 40 bis 100 Körner ausgezählt, was einem Vertrauensintervall von 0,1 entspricht (STANLEY und LINSKENS, 1974).

#### 2.3. FDA-Färbung

Der Esterasenachweis mittels Fluoresceindiacetat (FDA, Firma SERVA) wurde, wenn nicht anders vermerkt, nach 2 bis 3 Stunden Inkubationszeit unter einem Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Jena, Erregerfilter B 223g, Sperrfilter G 247) ausgewertet. Entsprechend HESLOP-HARRISON (1970) wurde eine 0,5% Stammlösung [w/v] von FDA in Aceton bei  $4^\circ\text{C}$  angesetzt und für die Färbung mit der Suspension of 0,001% bis 0,01% verdünnt.

#### 2.4. Kreuzungsexperimente

Für die Experimente wurde sowohl frisch gewonnener als auch bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagerter Pollen genutzt. Bei den Kreuzungsexperimenten wurden die weiblichen Blüten mittels Beuteln aus Polyamid- bzw. Polyesterdrahtgewebe isoliert (KÜCHLER und BRAUN, 1988), nachdem die männlichen Blüten schonend entfernt wurden (siehe auch ORR- EWING, 1956). Zur Bestäubung mit dem zu prüfenden Pollen verwendeten wir Pulverbläser nach KARPERSKE. Um dem Befall durch den Samenschädling *Megastigmus spermotrophus* vorzubeugen, blieben die Isolierbeutel bei Douglasie bis zur Zapfenernte am Baum. Der Vollkornanteil des erzeugten Saatgutes wurde durch Röntgenanalyse ermittelt (Spezialröntgengerät "FKA-2" der Firma Havemann/Helsinki).

#### 2.5. Leitfähigkeitsmessung

Der Pollen wurde in Bechergläser eingewogen und soviel Wasser zugegeben, daß sich ein Verhältnis von 1 mg Pollen zu 2 ml Aqua dest. ergab. Dabei wurde nur Pollen gleichen Pollenwassergehaltes (gleicher Feuchte) eingesetzt. Nach 15 min Inkubationszeit erfolgten die Messungen mit dem Konduktometer LM 302 (Elektroapparatebau Bannewitz) und einer 3-Elektroden-Pt-Meßzelle. Nach weiteren 15 min bis 20 min erfolgte eine 2. Messung in einem speziell für diese Messungen entwickelten Widerstandsmeßgerät. Bei diesem Meßgerät erzeugt ein Oszillator eine Wechselspannung von 1,5 V. Der Spannungsabfall über der Meßkammer wird über einen Gleichrichter aufbereitet und an einem Digitalvoltmeter angezeigt. Nach vorheriger Eichung des Gerätes mit einer Pollencharge der Keimfähigkeit 0% als Nullpunkt und einer möglichst hohen Keimfähigkeit als Endwert, wird bei weiteren Messungen die Keimfähigkeit in Prozent angezeigt. (Eine ausführliche Beschreibung und ein Schaltplan kann bei Interesse zugesandt werden).

Für Parallelvergleiche von Elektrolytfreisetzung und UV-Absorption wurde Pollen in definierter Menge in 10 ml Aqua dest. für 1 h inkubiert und dann abfiltriert. Das Filtrat wurde dann für die nachfolgenden Messungen verwendet.

#### 2.6. UV-Absorption

Nach dem Abfiltrieren der Pollen wurden 4 ml des Filtrats in einer Quarzglas-Küvette mit dem UV/VIS-Spektrophotometer D-50 (Beckman, USA) in einem Wellenlängenbereich 200 nm bis 900 nm vermessen und die entsprechenden Absorptionsmaxima zur Auswertung herangezogen.

#### 2.7. Dielektrische Einzelzellmessungen

Der experimentelle Aufbau wurde von FUHR et al. (1987) beschrieben. Dabei sind 4 nadelförmige Edelstahlelektroden so angeordnet, daß die Elektroden spitzen eine quadratische Grundform mit einem Abstand von  $500 \mu\text{m}$  bilden. Die Drehung der Objekte erfolgt durch Anlegen von  $4 \mu\text{s}$   $90^\circ$ -phasenverschobenen Rechteckimpulsen im

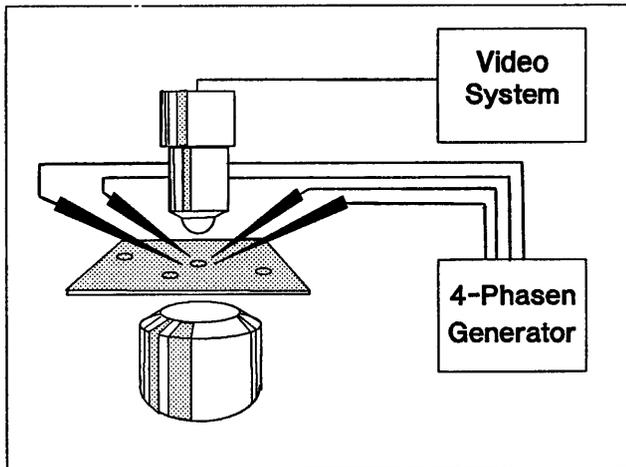


Abb. 1. — Aufbau der Meßapparatur. Die Drehung der Pollen wird über ein Mikroskop beobachtet und mit einem Videosystem aufgezeichnet.

Frequenzbereich von 1 kHz bis 32 MHz, die durch ein Oszilloskop und einen Frequenzzähler kontrolliert werden. Die Zellsuspension wird in einem Lösungstropfen (0,2 ml bis 0,5 ml) auf den Objektträger aufgebracht und die sedimentierte Pollenzelle Rotationsfeldern verschiedener Frequenzen ausgesetzt. Der Wert der gemessenen Rotationsfrequenz des Pollens wird in der Regel feldstärkennormiert ( $R = \frac{|\vec{\omega}_{\text{Körper}}|}{\vec{E}^2}$ ), wobei R als "Rotation" bezeichnet wird,  $\vec{\omega}_{\text{Körper}}$  die Winkelgeschwindigkeit der Zelle ist und  $\vec{E}$  für die elektrische Feldstärke steht).

Die Messungen wurden bei einer Feldstärke von 8 kV/m und einer Leitfähigkeit des Außenmedium von  $g_1 = 1 \text{ mS/m}$

ausgeführt. Um die durch das zusätzlich induzierte Membranpotential mögliche Belastung des Objektes gering zu halten, wurde die Rotation immer vom MHz- zum kHz-Bereich gemessen. Mögliche, physikalische Wechselwirkungen der Objekte untereinander konnten ausgeschlossen werden, indem jeweils nur ein Pollenkorn im Kammerzentrum vermessen wurde. Damit Kiefern- und Fichtenpollen bei dieser Meßanordnung auf den Objektträger sedimentieren, müssen die Luftsäcke durch leichten Unterdruck mit Flüssigkeit gefüllt werden. Es wurde keine Beeinflussung der Vitalität der Pollen von Douglasie und Kiefer durch das elektrische Drehfeld festgestellt. Für die Überprüfung wurden die Pollen an 3 Tagen bei 3 Wiederholungen ( $n=200$  bis 300) 10 min einem Drehfeld (10 kHz bis 5000 kHz) bei Feldstärken von 3 kV/m bis 9 kV/m ausgesetzt und die Vitalität nach WORSLEY bestimmt.

### 3. Theorie

Für ein besseres Verständnis unserer Ergebnisse erscheint es notwendig, das Prinzip der Elektrorotation näher zu erklären. Ausführliche theoretische Erläuterungen zur Drehung dielektrischer Körper in rotierenden Hochfrequenzfeldern sind von FUHR und KUZMIN (1986), SAUER und SCHLÖGL (1985) erarbeitet worden. Bringt man im einfachsten Fall einen homogenen dielektrischen Körper in ein elektrisches Feld, so werden an dessen Grenzflächen Polarisationsladungen induziert. Um diese Ladungen zu erzeugen vergeht eine bestimmte Zeitspanne, die auch als Relaxationszeit bezeichnet wird. Wandert das Feld ( $\vec{E}$ ) um die Zelle, so bleiben die induzierten Ladungen (mit einem Dipolmoment  $\vec{m}$ ) ein wenig hinter dem Feld zurück, woraus ein Drehmoment  $\vec{N} = \vec{m} \times \vec{E}$  resultiert, das die gesamte Zelle in Rotation versetzt. Die Größe und Frequenzlage des Drehmoments ist abhängig von den

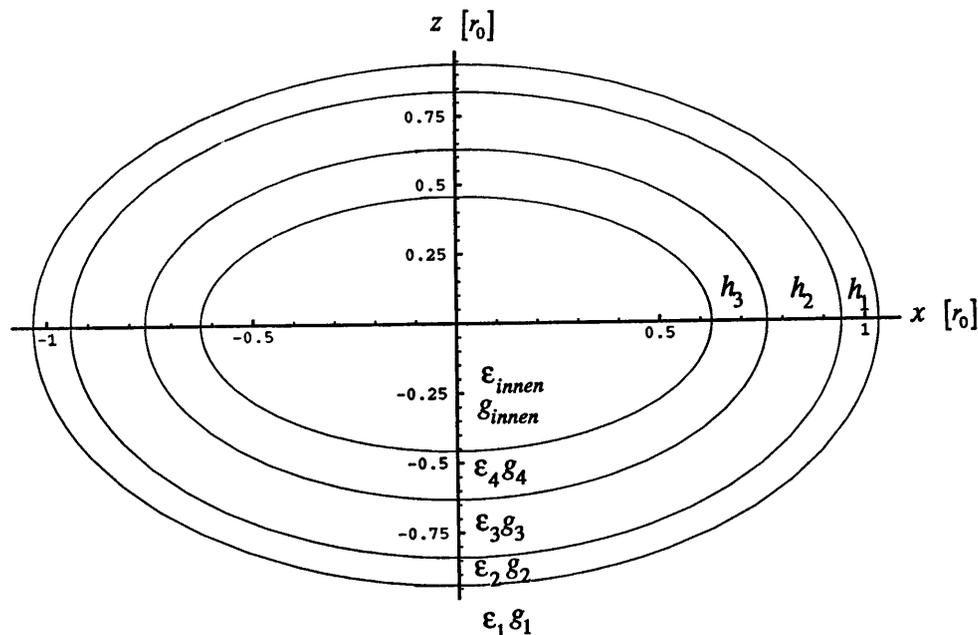


Abb. 2. — Schematischer Schalenbau (Querschnitt) eines Pollenkornes als abgeflachter Rotationsellipsoid.

$\epsilon$ -Dielektrizitätskonstante,  $g$ -spezifische elektrische Leitfähigkeit, die Indices entsprechen der morphologischen Schichtung des Pollenkornes: 1- Außenlösung, 2- Exine, 3- Intine, 4- Membran, innen-Polleninnenraum,  $h_1$ - Dicke der Exine,  $h_2$ - Dicke der Intine,  $h_3$ - Dicke der Membran,  $x[r_0]$ -Abmessung des Pollenkornes in  $x$ -Richtung,  $z[r_0]$ -Abmessung in  $z$ -Richtung. Das Achsenverhältnis entspricht  $x[r_0]/z[r_0] = 1,1$ .

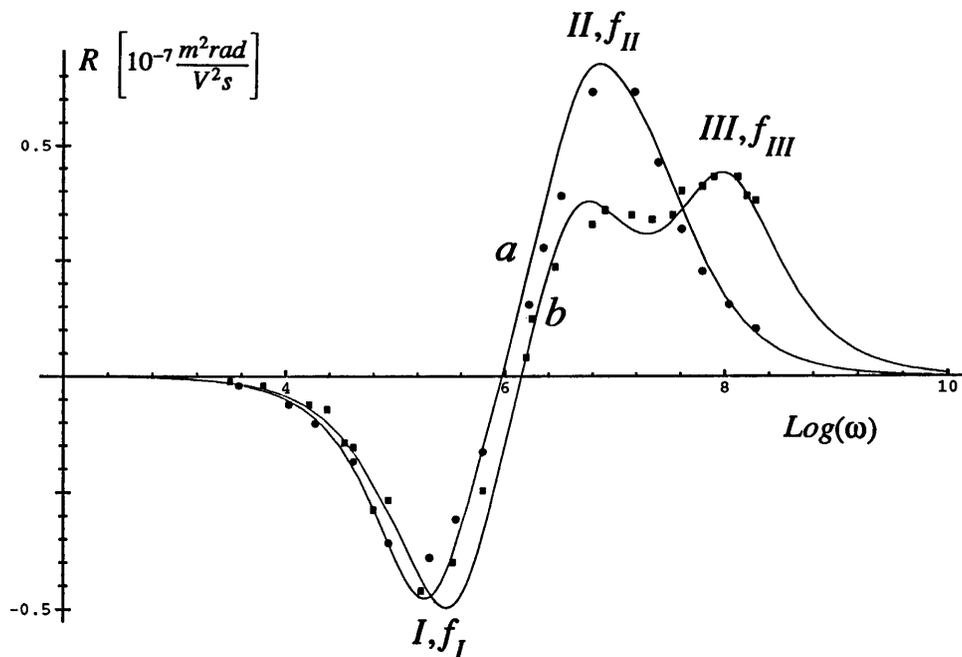


Abb. 3. — Typisches Rotationsspektrum  $R(\omega)$  eines vitalen (Kurvtyp b,  $\text{---}\blacksquare\text{---}$ ) und eines nicht vitalen (Kurvtyp a,  $\text{---}\bullet\text{---}$ ) Kiefernpollens (*Pinus strobus*); Kurvenverlauf entsprechend Gleichung (A11), Parameterindizes entsprechend Abbildung 2; geometrische Parameter:  $r_0 = 22,25 \mu\text{m}$ ,  $\eta = 1,1$ ,  $h_1 = 600 \pm 20 \text{ nm}$ ,  $h_2 = 5000 \pm 100 \text{ nm}$ ,  $h_3 = 8 \pm 2 \text{ nm}$ ;  
elektrische Parameter: Kurve a: DK:  $\epsilon_1 = 80$ ,  $\epsilon_2 = 55 \pm 2$ ,  $\epsilon_3 = 65 \pm 3$ ,  $\epsilon_4 = 4 \pm 2$ ,  $\epsilon_{\text{innen}} = 40 \pm 2$   
Leitfähigkeit in mS/m:  $g_1 = 1$ ,  $g_2 = 0,055$ ,  $g_3 = 5,5$ ,  $g_4 = 0,0005 \cdot 5$ ,  $g_{\text{innen}} = 30$ .  
Kurve b: DK:  $\epsilon_1 = 80$ ,  $\epsilon_2 = 30 \pm 1$ ,  $\epsilon_3 = 57,5 \pm 1$ ,  $\epsilon_4 = 4 \pm 2$ ,  $\epsilon_{\text{innen}} = 30 \pm 2$   
Leitfähigkeit in mS/m:  $g_1 = 1$ ,  $g_2 = 0,05$ ,  $g_3 = 3,5$ ,  $g_4 = 0,0015$ ,  $g_{\text{innen}} = 150$ .  
Rotation entgegengesetzt zum elektrischen Feld (Antifeldbereich): I;  
Rotation mit dem elektrischen Feld (Cofeldbereich): II, III.

Relaxationseigenschaften der Polarisationsladungen und damit von den elektrischen Eigenschaften der entsprechenden Grenzfläche (Dielektrizitätskonstante (Dk,  $\epsilon$  des Körpers und der Umgebungslösung) sowie der Geometrie des verwendeten Körpers. Analytische Resultate für das auf einen Probekörper wirkende Drehmoment lagen bisher nur für relativ einfache Geometrien vor (HERTZ, 1881; sowie HAGEDORN und FUHR, 1984, für sphärische Körper; SAUER und SCHLÖGL, 1985, für unendlich lange Zylinder; BART und LANG, 1989, für flache Scheiben; sowie PAUL und OTWINOWSKI, 1991, für homogene Ellipsoide). Pollen sind komplizierter aufgebaute Körper und können, wie in Abbildung 2 dargestellt als schalenförmige Dielektrika entsprechend dem 3-schichtigen morphologischen Aufbau der Gymnospermenpollen (NILSON et al., 1977) angesehen werden. Ein leitfähiger Innenraum (innen) mittlerer Dk wird von einer Membran (4) mit hohem elektrischen Widerstand und geringer Dk umhüllt. Darüber lagern sich eine leitfähige, pektinreiche Intine (3) hoher Dk und die Exine (2).

Um die Geometrie der Pollenkörner besser berücksichtigen zu können, wurde die Theorie der dielektrischen Einzelzellspektroskopie auf schalenförmig aufgebaute Rotationsellipsoide erweitert. Zur Erklärung der hier durchgeführten Experimente können wir uns dabei auf 4 als homogen bzgl. DK und Leitfähigkeit angenommene Kompartimente (siehe Abb. 2; Innenraum, Membran, Intine, Exine) beschränken. Prinzipiell ließen sich weitere Unterteilungen vornehmen, dies erscheint jedoch auf Grund der gemessenen Anzahl der Extrema im Rotationsspektrum nicht sinnvoll. Die Berechnung der Potentialverteilung

ist schon für homogene Ellipsoide (siehe PAUL und OTWINOWSKI, 1991) relativ aufwendig (Details im mathematischen Anhang), die numerische Auswertung ist jedoch unkompliziert und wurde von uns als Programmpaket für Mathematica realisiert. Da bei der gewählten Darstellung die Dicke der Schichten geringfügig variiert (siehe Abb. 2), sind, um den Fehler zu minimieren, die Schichtdicken am Äquator festzulegen, wo auch der größte Feldeinfluß herrscht.

Das komplizierte Rotationsspektrum einer solchen Zelle weist bis zu 4 Extrema auf. Auf der Basis des in der Abbildung 2 angegebenen Modells (unter Zugrundelegung der in der Abb. 3 angenommenen Parameter) überlagern sich jedoch 2 Peaks und ein Frequenzspektrum mit 3 Extrema entsteht. Die Lage und Höhe der Extrema werden sowohl durch die elektrischen Eigenschaften des Modells als auch von dessen Geometrie bestimmt.

#### 4. Resultate und Diskussion

##### 4.1. Rotationsexperimente

Pollen von 4 verschiedenen Baumarten (Kiefer, Fichte, Lärche, Douglasie) wurden hinsichtlich des passiven dielektrischen Verhaltens miteinander verglichen. Dabei kamen vitale und nicht vitale Pollenchargen derselben Klone zur Untersuchung. In Abbildung 3 sind stellvertretend für die ähnlich verlaufenden Rotationsspektren von Fichte-, Lärche- und Douglasiepollen die gemessenen und modellierten Spektren von vitalen und von nicht mehr keimfähigen Kiefernpollen dargestellt.

**Tabelle 1.** — Zusammenfassung (Mittelwerte) der charakteristischen Abmessungen und Frequenzen ( $f_I$ ,  $f_{II}$ ,  $f_{III}$ ) für vitale und nichtvitale Pollen von Kiefer, Lärche und Douglasie. Die Bezeichnung a (nichtvital) und b (vital) beziehen sich auf den Kurventyp in *Abbildung 3*. Die mit einem (\*) versehenen Größenangaben beziehen sich auf stark ovale Objekte.

Objekt		Anzahl	$f_I$ in kHz	$f_{II}$ in MHz	$f_{III}$ in MHz	Größe in $\mu\text{m}$
<i>Pinus sylvestris</i>	a)	30	$35.4 \pm 4$	$3.4 \pm 0.4$		$43.8 \pm 2.5$
	b)	30	$52 \pm 10$	$3.4 \pm 0.65$	$22.1 \pm 4.4$	$44.5 \pm 3$
<i>Pinus nigra</i>	a)	6	$34.5 \pm 15$	$2.6 \pm 0.5$		$46.9 \pm 1.3$
	b)	6	$43 \pm 17$	$2.6 \pm 0.3$	$19.0 \pm 3$	$48.6 \pm 2.4$
<i>Pinus strobus</i>	a)	7	$17.6 \pm 3$	$1.8 \pm 0.5$		$46.2 \pm 4$
	b)	7	$24.4 \pm 7.7$	$1.5 \pm 0.3$	$17.4 \pm 3.7$	$45.8 \pm 2.4$
<i>Pinus peuce</i>	a)	6	$21.9 \pm 2.5$	$2.7 \pm 1$		$47.7 \pm 3.5$
	b)	6	$34 \pm 11$	$1.8 \pm 0.9$	$19.3 \pm 4$	$48 \pm 4.3$
<i>Pinus wallichiana</i>	a)	5	$21.9 \pm 4$	$2.7 \pm 0.9$		$47 \pm 4$
	b)	5	$23 \pm 3$	$1.5 \pm 0.3$	$18.3 \pm 3$	$47.9 \pm 2.2$
<i>Larix decidua</i>						
4 Klone	a)	60	$20.7 \pm 10$	$9.9 \pm 1$		$71 \pm 4$
2 Klone	b)	10	$28 \pm 6$	$7 \pm 3$	$24 \pm 3.5$	$105 \pm 10 \times 72 \pm 6^*$
<i>Pseudotsuga menziesii</i>						
15 Klone	a)	80	$14 \pm 7$	$10.8 \pm 1.5$		$89.5 \pm 5$
6 Klone	b)	30	$20.4 \pm 8$	$4 \pm 2$	$26 \pm 4$	$127 \pm 14 \times 89 \pm 8^*$

Im Ergebnis der Rotationsuntersuchungen wurden 2 prinzipiell unterschiedliche Rotationsspektren gefunden, wobei bei keimenden Chargen in annähernd gleichem Prozentsatz Kurventyp b, bei nicht mehr keimenden Chargen Kurventyp a auftrat. Kurventyp a) weist jeweils einen nahezu symmetrischen Peak im Anti- und Co-Feld Bereich auf. Dabei liegen die Rotationsmaxima bei  $f_I = 10$  kHz und  $f_{II} = 10$  MHz für Lärche/Douglasie. Dieser Kurventyp ist typisch für relativ rund erscheinende Objekte (*Abb. 4*). Während für Kiefer/Fichte Werte von  $f_I = 20$  kHz bis 40 kHz und  $f_{II} = 1,5$  MHz bis 5 MHz gefunden worden. Für Kurventyp b) ist charakteristisch, daß einem symmetrischen Anti-Feld-Peak bei 20 kHz bis 50 kHz ein unsymmetrischer, deformierter Co-Feld-Peak gegenübersteht. Dabei können bei *Pinus/Picea* die Deformationen so stark ausgebildet sein, daß sogar 2 getrennte Maxima im Co-Feld-Bereich auftreten. Die charakteristischen Frequenzen für beide Co-Feld-Peaks liegen für Kiefer/Fichte bei  $f_{II} = 3$  MHz bis 5 MHz und  $f_{III} = 20$  MHz bis 24 MHz und für Lärche/Douglasie bei  $f_{II} = 4$  MHz bis 7 MHz und  $f_{III} = 22$  MHz bis 30 MHz.

Kurventyp b) ist charakteristisch für mehr oder weniger ovale und durch Quellung vergrößerte Pollen (*Abb. 4*). Die charakteristische Frequenz ( $f_I$ ) der keimenden Pollen ist i. a. höher als die von nichtkeimenden Pollen. Neben artmäßigen Unterschieden ist eine starke Streuung der  $f_I$ -Werte auch innerhalb einer Art bzw. eines Klones

festzustellen. Die genannten Unterschiede zwischen keimenden und nicht mehr keimenden Pollen treten auch auf, wenn die Charge der keimungsfähigen Pollen durch Toluol (1%) oder durch Hitze (1 h, 90° C) behandelt wurde. Dann waren die Rotationsspektren der überlagerten und der so behandelten Charge gleich (*Abb. 3*, Kurve a). In *Tabelle 1* sind die Ergebnisse der Messung an Kiefer, Lärche und Douglasie zusammengefaßt. Für die einzelnen Chargen durchgeführte Keimungsversuche zeigten, daß Kurventyp a) bei nichtkeimenden und Kurventyp b) bei keimenden Pollen auftrat. Die prozentuale Einschätzung der Keimungsfähigkeit im Vergleich von Elektrorotation und klassischer Methode führten zur gleichen Aussage.

Obwohl die Frequenzlage der einzelnen Peaks artspezifisch geringfügige Unterschiede aufweist, ist der generelle Kurvenverlauf für keimende und nichtkeimende Pollen überall gleich. Wie die beschriebenen Messungen an Pollen von Douglasie und Lärche ergaben, können aber nicht alle oval aussehenden Pollenkörner als keimfähig klassifiziert werden. Solche ovalen Pollenkörner z.B. von Douglasie (120x90  $\mu\text{m}$ ) rotierten ca. 10 bis 20 mal langsamer entgegen dem Feld und zeigten nur einen symmetrischen Co-Feld-Peak bei 5 MHz (Messung 30 min bis 180 min nach Inkubation in Aqua dest.). Das deutet auf einen sehr geringen Elektrolytgehalt im Polleninneren hin. Bei einigen dieser Pollen konnte schon zu diesem frühen Zeitpunkt ein morphologischer Unterschied gefunden wer-

den; das Plasma füllt den Raum bis zur Exine nicht mehr voll aus. Dadurch erscheint der Saum zwischen Plasma und Exine durchsichtig. Das experimentell gefundene Frequenzverhalten der Pollen läßt sich sehr gut mit der Rotationsanalyse erklären. Diese wurde exemplarisch für Kiefernpollen durchgeführt (siehe *Abb. 3* und *Legende*). Für die Widerspiegelung der passiven elektrischen Eigenschaften im Rotationsspektrum gelten folgende Zuordnungen:

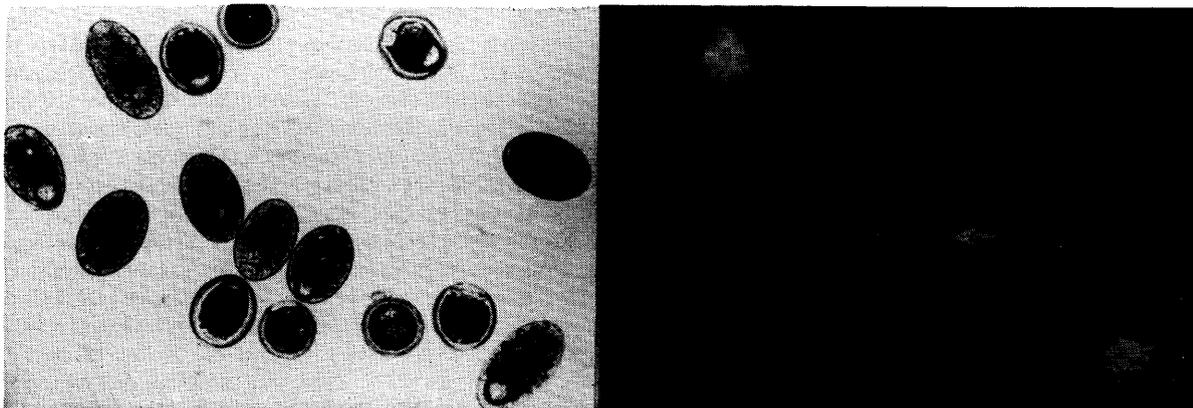
Die vitalen und nichtvitalen Pollen unterscheiden sich im wesentlichen in 4 Parametern:  $\sigma_{\text{innen}}$ ,  $\sigma_3$ ,  $\epsilon_3$ , und  $\epsilon_2$ . Nach der Modellierung können folgende Zuordnung der Peaks zu den Zellkompartimenten getroffen werden: Ein elektrolythaltiger Innenraum ( $\epsilon_{\text{innen}}$ ,  $\sigma_{\text{innen}}$ ) bestimmt die charakteristische Frequenz  $f_{\text{III}}$  im Co-Feld-Bereich. Verliert der Pollen seine Vitalität, so verringert sich der Elektrolytgehalt von 0,15 S/m auf 0,03 S/m und  $\epsilon_{\text{innen}}$  erhöht sich von 30 auf 40. Entsprechend steigt die meßbare Leitfähigkeit in der Außenlösung an (*Abb. 5*). Erste Untersuchungen an Pollen von Kiefer mit der Röntgenstrahl-Mikroanalyse belegen, daß nicht mehr keimender Pollen nur noch 20% bis 25% des Kaliumgehaltes keimender Pollen aufweist, während die Unterschiede in den anderen Hauptelementen geringer sind (siehe auch CHING und CHING, 1976; IWANAMI et al., 1988). Der Elektrolytverlust nach Schädigung der Membran führt dazu, daß die  $f_{\text{III}}$ -Werte sinken und die zuvor mehr oder weniger getrennten Co-Feld-Maxima (Peak II und III) in einem nahezu symmetrischen Peak zusammenfließen. Die passiven elektrischen Eigenschaften der Intine, als eine pektin- und cellulosereichen Schicht, liegen in einem ähnlichen Bereich, wie sie für Zellwandsysteme höherer Pflanzen, Hefen und die Zona pellucida von Eizellen bestimmt wurden (GEIER et al., 1987; FUHR und KUZMIN, 1986; MÜLLER et al., 1990) und haben einen wesentlichen Einfluß auf den ersten Co-Feld Peak (II). Die Leitfähigkeit der Intine nichtvitaler Pollen steigt an (von 3,5 mS/m auf 5,5 mS/m), was auf den Ionenefflux zurückzuführen ist. Die Eigenschaften der Exine beeinflussen entscheidend den Anti-Feld-Peak ( $f_{\text{II}}$ ). Dabei muß beachtet werden, daß beide Peaks eine Überlagerung der Eigenschaften beider Schichten darstellen und somit nicht unabhängig voneinander sind. Für die Verringerung der  $f_1$ -Werte und die geringeren Rotationswerte der nichtvitalen Chargen ergibt sich aus den Rechnungen neben der Veränderung der Leitfähig-

keit der Intine, eine Erhöhung der DK der Exine (30 auf 55) und der Leitfähigkeit der Exine ( $5,5 \cdot 10^{-5}$  auf  $5 \cdot 10^{-5}$  S/m). Dieses Ergebnis bedeutet, daß sich die passiven elektrischen Eigenschaften der Exine während des Alterns ändern müßten, z.B. durch Ablösung bzw. Auflockerung von Strukturen und Wassereinlagerung in die Exinschichten.

Im Unterschied zu allen bisher mit der Elektrorotation untersuchten Objekte wie z. B. Eizellen, Protoplasten und Blutzellen (Übersicht bei ARNOLD und ZIMMERMANN, 1988; FUHR et al., 1990) ist in überraschender Weise der Einfluß der Plasmamembran auf den Anti-Feld-Peak zu vernachlässigen. Das äußert sich darin, daß Veränderungen der Membraneigenschaften von  $10^{-8}$  S/m bis  $10^{-4}$  S/m, der Dk und Membrandicke (um 100%) sich wenig im Verlauf der Kurve niederschlagen. Es muß aber angemerkt werden, daß die Modellierungen auf bestimmten Vereinfachungen beruhen (siehe Kap. 3.). Isolierte Exinen von Lärchen- und Douglasiepollen zeigen ein dielektrisches Verhalten, das nur mit der Annahme 2er unterschiedlicher Dielektrika erklärt werden kann. In der Berechnung wurde die Exine als homogen angenommen. Weiterhin ist eine Dickenveränderung der Exine und Intine während der Alterung denkbar, es finden sich in der Literatur jedoch keine Hinweise dazu. Unabhängig davon ändern sich die qualitativen Aussagen zu den passiven dielektrischen Eigenschaften toter und vitaler Pollen durch diese Einschränkungen nicht. Die für Kiefern-Pollen ermittelten Zusammenhänge konnten auch für Fichte, Douglasie, Lärche in ähnlicher Weise bestätigt werden. Neuere Arbeiten an Pollen von Aspe, Haselnuß, Sonnenblume und Birke führen zu gleichen Aussagen. Um die Interpretation der Elektrorotationsdaten abzusichern, wurden analog Untersuchungen mit bekannten Methoden ausgeführt.

#### 4.2. FDA-Färbung

Vergleiche der Ergebnisse der FDA-Färbung mit der Elektrorotation (*Tab. 1*) bzw. den klassischen Keimbestimmungsverfahren (*Tab. 2*) zeigen, daß nur die Pollenkörner mit ausgeprägter Fluoreszenz, und Douglasie/Lärche-Pollen, einem Achsenverhältnis  $\geq 1,5$  als keimfähig bzw. vital einzuschätzen sind. Die Korrelation der Fluoreszenz zur Vitalität beruht auf einer Barrierefunktion des Plasmalemmas (HESLOP-HARRISON, 1970; REGAN und MOFFATT, 1990). Es wurde während der ersten 15 min bis 30 min eine Zunahme der Fluoreszenz für fast alle Pollen



*Abb. 4.* — Vergleich von Normalbild und Fluoreszenzbild von Douglasiepollen nach 7 h Inkubation in 0,001% FDA-Lösung. Die ovalen und fluoreszenten Pollenkörner wurden mit der Elektrorotation als vitale (elektrolytreiche) Objekte charakterisiert. Sowohl das mit dem Pfeil gekennzeichnete ovale als auch die übrigen, annähernd kugelförmigen Pollenkörner sind FDA negativ und wurden mit der Elektrorotation als nichtvital, elektrolytverarmte Pollen identifiziert (siehe *Abb. 3*).

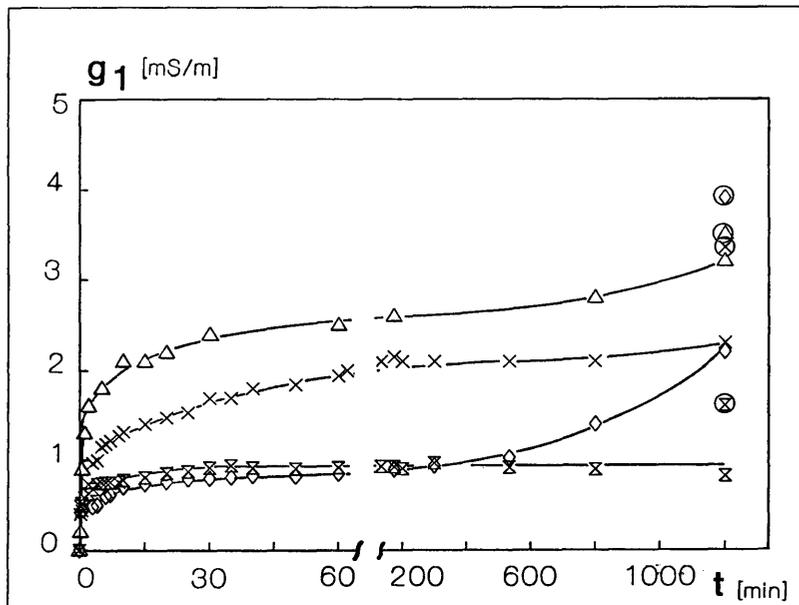


Abb. 5. — Zeitlicher Verlauf der Veränderung der Leitfähigkeit des Außenmediums ( $g_1$ ) durch Inkubation von Pollen (5 mg/10 ml Aqua dest.). Die mit (o) gekennzeichneten Werte zeigen den Leitfähigkeitswert des Mediums nach Behandlung der Pollen mit Toluol 1% oder Hitze 90 °C 120 min als Maximalwert an.  
 . x . Gemeine Kiefer, Hk 893, 85% keimend. . o . Douglasie D301, 84% vital,  
 . x . Lärche La 74, 22,5% vital, . Δ . Aspe 5053, 0% vital

festgestellt. Später trat eine Entfärbung der kleinbleibenden, runden Körner ein und das austretende Fluorescein färbt die Außenlösung gelb; diese Objekte weisen dann nur noch eine schwache Fluoreszenz auf, die auf die Autofluoreszenz des Sporopollenins zurückgeht (HESLOP-HARRISON, 1970; KNOX, 1984). Die Pollenkörner, bei denen eine zunehmende Volumenvergrößerung und eine Verschiebung der Achsenverhältnisse bis 1/1,5 auftrat, zeigten bis zu einer Zeitspanne von 3 h bis 6 h eine sich verstärkende Fluoreszenz, die dann konstant blieb. Bei der Beobachtung der Pollen trat nach 5 min bis 15 min eine deutliche Verringerung der Fluoreszenzintensität auf, was auf die lichtinduzierte Konversion des Fluorophors (Bleaching, vgl. TAYLOR und SALMON, 1989; LARKIN, 1976) zurückzuführen ist.

#### 4.3. Leitfähigkeit und UV-Absorption

##### 4.3.1. Spezifische elektrische Leitfähigkeit

Für unsere Untersuchungen stand nach der Analyse des Gesamtelektrolytgehaltes des Pollens durch die Rotationsmethode zunächst die Frage nach der Auslaufkinetik der Elektrolyte ins Außenmedium im Vordergrund. Dabei wurde an Kiefer, Fichte, Douglasie, Lärche und Aspe die Veränderung der spezifischen elektrischen Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Keimraten untersucht (Abb. 5).

Dabei zeigte sich, daß sich die Außenleitfähigkeit bei Anwesenheit keimender Pollen nur geringfügig erhöht und dann über Stunden und Tage annähernd konstant bleibt. Im Gegensatz dazu steigt die Außenleitfähigkeit nach der Inkubation nichtkeimender Pollen sprunghaft an und bleibt nach 20 min bis 60 min für Stunden ebenfalls unverändert. Bei verschiedenen Douglasie-Klonen wurde allerdings bei Inkubation länger als 10 h in großen Volumina (30 ml Bechergläser) ein Anstieg der Leitfähigkeit, bei gleichzeitiger Verringerung der Vitalitätsrate festgestellt.

##### 4.3.2. UV-Absorption

CHING und CHING (1964, 1976) hatten in ihren Arbeiten als Bezugsparameter die UV-Absorption bei 260 nm (Verbindungen mit organischen Ringstrukturen, wie Purine und Pyrimidine) herangezogen. Ungeklärt blieb, ob noch andere Absorptionsmaxima für die Korrelationsbeziehungen

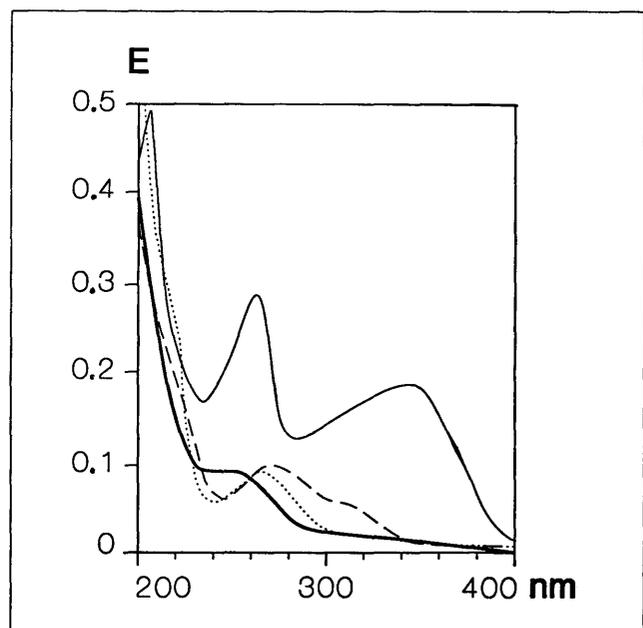


Abb. 6. — Abhängigkeit der Extinktion (E) des Außenmediums von der eingestrahelten Wellenlänge (UV-VIS Spectrophotometer, Beckman). 5 mg Pollen/10 ml Aqua dest. (Aspe 2 mg/10 ml) für 1h inkubiert, dann die Pollen abfiltriert.  
 1 — Aspe 5053, 0% vital  
 2 — — — Douglasie D 24, 0% vital  
 3 . . . . . Lärche ILa 74, 22, 5% vital  
 4 — Spirke, *Pinus uncinata* 1413, 0% vital

gen zur *in vitro*-Keimung herangezogen werden können. In *Abbildung 6* sind die typischen Extinktionsspektren für die Pollenarten von Kiefer, Fichte, Douglasie, Lärche und Aspe im Wellenlängenbereich 200 nm bis 400 nm aufgetragen; oberhalb 400 nm bis 900 nm ging die Extinktion stark zurück.

Die Lage der Absorptionsmaxima für die verschiedenen Arten bzw. Gattungen unterscheiden sich im Bereich um 260 nm nur geringfügig. Das Maximum liegt für Douglasie (12 Klone) bei 270 nm, für Lärche (6 Klone) bei 265 nm, Aspe (3 Klone) bei 264 nm. Ein Plateau im Absorptionsverlauf weisen dagegen *Pinus strobus* (3 Klone, Plateau 260 nm bis 265 nm), *Pinus peuce* (3 Klone), Plateau 250 nm bis 260 nm, *Pinus uncinata* (4 Klone, Plateau 240 nm bis 250 nm), *Pinus sylvestris* (250 nm bis 260 nm), und Fichte (250 nm bis 270 nm) auf. Deutlich ausgeprägte Nebenmaxima traten nur bei Aspe (340 nm) und bei Douglasie (305 nm bis 310 nm) auf. Eine unterschiedlich stark ausgeprägte „Schulter“ im Extinktionsspektrum im Bereich um 220 nm wurde für Fichte, Kiefer, Lärche und Douglasie detektiert. Eine genaue Zuordnung zu den chromophoren Gruppen der eventuell in Frage kommenden chemischen Verbindungen (z.B. Aminosäuren, Proteine, Nukleinsäuren) ist aus diesen UV-Spektren allein aber nicht möglich.

Es besteht eine qualitative Übereinstimmung in der Korrelation der verschiedenen Extinktionsmaxima zu den Vitalitätsangaben; im Maximum um 255 nm bis 270 nm wurden die besten Korrelationswerte zu Einwaage (Pollenmenge) und Vitalität erzielt.

#### 4.3.3. Zusammenhang Leitfähigkeit, UV-Absorption und Einwaage

Es bestand die Frage, inwieweit mit geringsten Einwaagen verlässliche Ergebnisse erhalten werden können, da andere Autoren nur mit großen Pollenmengen (siehe

GODDARD und MATTHEWS, 1981) gearbeitet hatten. In *Abbildung 7* ist die Abhängigkeit der Leitfähigkeit und UV-Absorption in Abhängigkeit von der Einwaage bei verschiedenen Objekten dargestellt.

Es besteht in allen Fällen ein linearer Zusammenhang von  $g = g(\text{Pollenmenge})$  und  $E = E(\text{Pollenmenge})$  mit Korrelationskoeffizienten  $> 0,975$ . Vergleichbare Ergebnisse wurden ebenfalls an verschiedenen Arten der Kiefer und an Fichte gewonnen. Wird für die Untersuchung der Filtrationsschritt weggelassen, so verändern die in der Lösung befindlichen Pollen die Leitfähigkeitswerte nicht. Demgegenüber sind die Extinktionswerte um bis zu 50% erhöht, durch die zusätzliche Absorption der Pollenkörner selbst. Hier kann ein deutlicher Fehler auftreten, wenn der Filtrationsschritt nicht sauber durchgeführt wird.

#### 4.3.4. Leitfähigkeit und *in vitro*-Keimrate

Zunächst erfolgte die Analyse der Elektrolytfreisetzung in Beziehung zur Vitalität bzw. Keimfähigkeit der Pollen über eine Verdünnungsreihe (*Abb 8*). Damit sollten vorhandene klonspezifische Unterschiede in der Elektrolytfreisetzung ausgeschlossen werden. Nach der Inkubation von Pollen unterschiedlicher Vitalität in Wasser gibt es deutliche Art- bzw. Gattungsunterschiede in der Elektrolytabgabe. Die Höhe des Ionenabgabenniveaus steigt in der Reihenfolge Spirke (*P. uncinata*), Rumelische Weymouthskiefer (*P. peuce*) und Lärche. Douglasie und Weymouthskiefer (*P. strobus*) lassen sich schlecht in diese Reihe einordnen, da die Elektrolytabgabe in Abhängigkeit von der Vitalität wesentlich gespreizter (flacher) verläuft und eine Extrapolation auf hohe Vitalitätswerte (um 100%) anhand der vorliegenden Meßwerte nicht zuverlässig erscheint. Es zeichnen sich signifikante Artunterschiede ab, wobei auch Unterschiede zwischen den Farbvarietäten der Douglasie (grün/blau) deutlich werden. Aspenpollen verschließt sich sowohl den Vitalitätstests nach WORSLEY bzw.

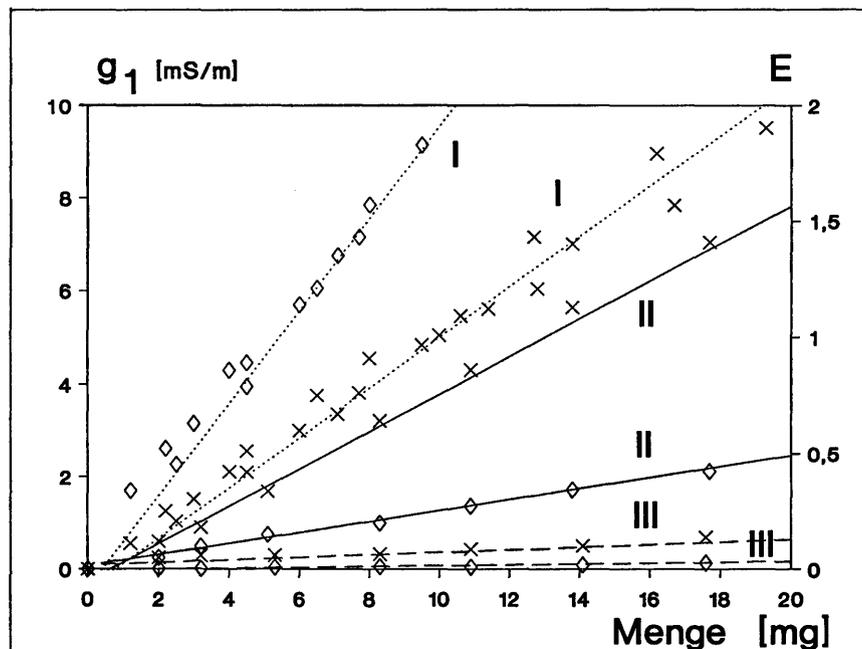


Abb. 7. — Abhängigkeit der spezifischen elektrischen Leitfähigkeit ( $g$ ,  $\times$ ) und der Extinktion ( $E$ ,  $\diamond$ ) bei 260 nm in Abhängigkeit von der Pollenmenge in 10 ml Aqua dest. für Douglasie, Lärche und Aspe nach 1 h Inkubation und Filtration.

Dabei gilt  $E = E_{\text{probe}} - E_{\text{wasser}}$ ,  $g = g_{\text{probe}} - g_{\text{wasser}}$

I- Aspe 5053, 0% vital; II- Lärche La74, 35% vital; III- Douglasie D301, 85% vital;

Korrelationskoeffizient  $r$  in allen Fällen  $r > 0,975$ , bei  $\alpha = 0,05$ .

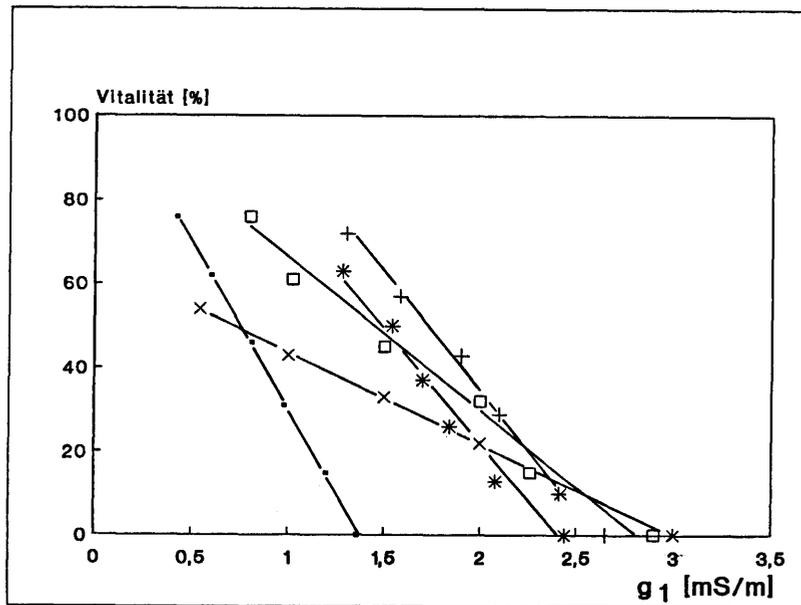


Abb. 8. — Vitalität (nach WORSLEY) in Abhängigkeit von der freigesetzten Elektrolytmenge ( $g_1$ ) nach 10 min Inkubation. Die unterschiedlichen Vitalitäten wurden durch Mischen der Probe mit einer nichtvitalen Probe desselben Klones eingestellt. Die Korrelation entsprechend der Form  $y=mx + n$  lag für alle Proben bei  $r > 0,99$ , für *Pinus peuce* und *Pinus strobus* betrug  $r=0,96$ .  
 —■—, *Pinus uncinata*,  $m=-80,3$ ,  $n=110$ . —□—, Douglasie (grün) 24,  $m=-34,9$ ,  $n=99,4$ ,  
 —x—, Douglasie (blau) 84,  $m=-22,2$ ,  $n=65,8$ , —\*—, Japanlärche 74,  $m=-56,7$ ,  $n=134,4$ ,  
 —+—, Hybridlärche 1037,  $m=-54,5$ ,  $n=144$ ,  
*Pinus peuce*  $m=-80$ ,  $n=146$ , *Pinus strobus*  $m=-15$ ,  $n=38,8$

dem FDA-Test als auch einer Nutzung der Leitfähigkeitsmessung für Vitalitätsaussagen. Er entläßt innerhalb weniger Sekunden einen Großteil des Elektrolytgehaltes in das umgebende wäßrige Medium, unabhängig von seinem Vitalitätsniveau *in vivo*. Rotationsmessungen an Aspe ergeben, daß Pollen, der *in vivo* Vollkörner erbringt, signifikant höhere Rotationswerte zeigt als *in vivo* nichtvitaler Pollen (5 MHz → 3,5 MHz). Dies ist ein Hinweis, daß sich die physikochemischen Eigenschaften dieser Objekte unterscheiden, aber in einem *in vitro*-Test schwer zu detektieren sind. Diese Befunde betonen die Artspezifität entsprechender Polleneigenschaften; bei CHING und CHING, sowie bei FOSTER und BRIDGWATER (1979) werden solche Beobachtungen nicht mitgeteilt. Die Versuchsergebnisse (Abb. 8) legen den Schluß nahe, daß auf Grund des hohen Auflösungsvermögens der Methode Artvarietäten (Douglasie) bzw. Hybriden und Eltern (Lärche) auch in den Polleneigenschaften nachweisbar sind. Diese Unterschiede erlangen z. B. in der differierenden Lagerfähigkeit von Pollen verschiedener Klone einer Art praktische Bedeutung (siehe DIETZE, 1973).

Erste Untersuchungen zu art- und klonspezifischen Unterschieden der Rotationsspektren von Pollen scheinen die Unterschiede in der Elektrolytfreisetzung zu bestätigen. So sind zum einen die Rotationswerte (und damit in erster Näherung die Leitfähigkeit) von *P. peuce* generell höher als von *P. strobus* (vgl. Tab. 1), parallel dazu differiert die Elektrolytfreisetzung beider Arten (Abb. 8). Ähnlich verhalten sich die hier gezeigten Klone von Douglasie D 24 und D 84.

#### 4.4 Vitalitätsvergleich und Beziehung zur "in vivo"-Vitalität

Ausschlaggebend für alle Pollenvitalitätstests ist die Verifizierung der Befunde im Kreuzungsexperiment. Daß es dabei nicht zu einer linearen Beziehung zwischen Pol-

lenvitalität und erzielten Hybridembryonen kommen kann, liegt in der Natur der Kreuzung:

1. Es wird bei der Bestäubung mit einem enormen Pollenüberschuß gearbeitet.
2. Zwischen Bestäubung und Ernte der reifen Zapfen (Samen) liegen 6 bis 18 Monate (Douglasie-Kiefer). In diesem Zeitraum kann es durch vielerlei Einflüsse noch zu signifikanten Verlusten kommen.

Die statistische Auswertung aller in Tabelle 2 angegebenen Daten für die *in vitro*-Vitalitätstests ergibt ( $\alpha=0,05$ ) eine signifikante Korrelation  $r$  im Bereich von 0,78 bis 0,88. Die *in vitro*-Tests zeigen in Beziehung zu Vollkorn/Zapfen ebenfalls eine Korrelation im Bereich 0,46 bis 0,65 und liefern Werte, die mit denen von FOSTER und BRIDGWATER (1979) für andere Koniferenarten angegebenen, vergleichbar sind. Aus den in Tabelle 2 zusammengefaßten Ergebnissen geht klar hervor, daß hohe Vollkornzahlen nur mit Pollen einer hohen Vitalität erzielt werden konnten. Pollen geringer Vitalität erbrachte in der Regel keine oder nur wenige Vollkörner; d. h. die elegante Methode der Vitalitätsbestimmung mittels Leitfähigkeitsmessung ist trotz ihrer Schnelligkeit in ihrer Aussage ebensogut wie die aufwendigeren Methoden des Keimtests. Mit dem Einsatz des unter 2.5. vorgestellten Kammermeßgerätes ist eine weitere Zeiteinsparung gegeben. Dieses Gerät muß vor jeder Meßreihe für den Pollen der entsprechenden Art geeicht werden (Zeitaufwand ca. 5 Minuten); nach erfolgter Eichung benötigt man pro Messung ca. 1 Minute und liest den Vitalitätswert ab. Für die Messung benötigt man nur ca. 2 ml Meßlösung, also 1 mg Pollen. Arbeitet man mit einem herkömmlichen Leitfähigkeitsmeßgerät, muß für jede Pollenart eine Eichkurve erarbeitet werden. Diese Vorarbeiten erfordern einen deutlich höheren

Tabelle 2. — Zusammenfassung von Vitalität und Vollkorn/Zapfen-Ertrag verschiedener Nadelbaumpollen.

Art	Klon	Pollenjahr	Vitalität			Vollkorn/Zapfen im Kreuzungs- experiment
			WORSLEY	FDA	Meßkammer	
			in %			
<i>Pinus</i>	1410	1989	65	68	94	12.5
<i>uncinata</i>	1413	1988	76	70	76	8.9
	1413	1986	0	0	0	0
	1418	1988	73	69	89	4.9
<i>Pinus</i>	1513	1988	27	39	50	18.6
<i>strobis</i>	1514	1989	0	0	0	0
<i>Pinus peuce</i>	1810	1987	34	15	17	6.7
	1812	1988	65	49	36	11.5
	1810	1989	0	0	0	0
<i>Douglasie</i>	301	1989	52.5	37	83	17
<i>menziessii</i>	24	1990	69	58	46	14
	24	1987	0	0	2	-
	84	1990	54	47	46	26
	84	1989	18	15	10	7.3
	266	1990	26-49	20	54	9.5
	165	1989	0	1	5	2.5
	723	1986	0	0.5	0	-
<i>Larix</i>	1037	1989	68	34	40	28
<i>decidua</i>	B	1989	0	0	0	0
	B	1990	55	23	20	22
	74	1990	71	52	60	59
	74	1988	0	0	0	0
	274	1987	0	0	0	0

Zeitaufwand und auch eine größere Pollenmenge als die Arbeit mit dem Kammermeßgerät.

### 5. Mathematischer Anhang

Berechnung der Rotationsfrequenz für schalenförmige Ellipsoide in Abhängigkeit von der Feldfrequenz

Für die schalenförmig aufgebauten zusammengedrückten Rotationsellipsoide wählen wir die folgende parametrische Darstellung:

$$\begin{aligned} x_k &= c\sqrt{\sigma_k^2 + 1} \sin(\vartheta) \cos(\varphi) & y_k &= c\sqrt{\sigma_k^2 + 1} \sin(\vartheta) \sin(\varphi) \\ z_k &= c\sigma_k \cos(\vartheta) \end{aligned} \tag{A1}$$

wobei  $0 \leq \varphi \leq 2\pi$  und  $0 \leq \vartheta \leq \pi$  gilt. Der halbe Abstand der Brennpunkte  $c$  sowie die Exzentrizität  $e$  der Ellipsoide ergibt sich aus dem geforderten Achsenverhältnis (Abplattung)  $\eta = \frac{a}{b} > 1$  unter der Annahme, daß der betrachtete Körper aus einer Kugel mit dem Radius  $r_0$  gleichen Volumens hervorgegangen ist zu:

$$e = \sqrt{\eta^2 - 1} \quad c = \frac{r_0 e}{\sqrt[3]{1 + e^2}} \tag{A2}$$

Für die Koordinaten der Exine erhalten wir  $\sigma_1 = \frac{1}{e}$  (Grenze Pollen-Flüssigkeit). Die Koordinaten der inneren Ellipsoide bestimmen sich aus den Schalendicken am Äquator  $h_k$  gemäß:

$$\sigma_{k+1} = \sqrt{\left[ \sqrt{1 + \sigma_k^2} - \frac{h_k}{c} \right]^2 - 1} \quad (\text{A3})$$

Bei harmonischer Zeitabhängigkeit kann die Gleichung für das Potential  $\Phi$  des elektrischen Feldes

$$(\text{A4})$$

$$E = -\nabla\Phi, \quad \Phi(x, y, z, t) = \text{Re}(\phi(x, y, z) \exp(i\omega t))$$

durch Kombination der Poissongleichung, der Kontinuitätsgleichung sowie des Ohmschen Gesetzes unter Vernachlässigung des Ladungstransportes durch die Rotation

des Körpers ( $\omega_{\text{Körper}} \ll \omega_{\text{Feld}}$ ) zu:

$$\nabla[(g(x, y, z) + i\omega\epsilon(x, y, z))\nabla\phi(x, y, z)] = 0 \quad (\text{A5})$$

$$\phi_k = E_0 c \sin(\vartheta) \cos(\varphi) [a_k p(\sigma) + b_k q(\sigma)]$$

$$\text{mit } p(\sigma) = \sqrt{\sigma^2 + 1} \quad \text{und} \quad q(\sigma) = p(\sigma) \left[ \arctan\left(\frac{1}{\sigma}\right) - \frac{\sigma}{p^2(\sigma)} \right] \quad (\text{A7})$$

angesetzt werden, wobei die Koeffizienten  $a_k$  und  $b_k$  aus den Randbedingungen

$$\begin{aligned} \phi_k(\sigma)|_{\sigma \rightarrow \sigma_k} &= \phi_{k+1}(\sigma)|_{\sigma \rightarrow \sigma_k} \\ [g_k + i\omega\epsilon_k \epsilon_0] \frac{\partial}{\partial \sigma} \phi_k(\sigma)|_{\sigma \rightarrow \sigma_k} &= [g_{k+1} + i\omega\epsilon_{k+1} \epsilon_0] \frac{\partial}{\partial \sigma} \phi_{k+1}(\sigma)|_{\sigma \rightarrow \sigma_k} \end{aligned} \quad (\text{A8})$$

zu berechnen sind. Die Lösung des resultierenden algebraischen Gleichungssystems läßt sich in iterativer Form finden:

$$a(\omega)_{\text{innen}} = 1 \quad b(\omega)_{\text{innen}} = 0$$

$$a(\omega)_{j-1} = \frac{q'(\sigma_j) [a(\omega)_j p(\sigma_j) + b(\omega)_j q(\sigma_j)] - q(\sigma_j) \left[ \epsilon_0 \epsilon_j + \frac{g_j}{i\omega} \right] [a(\omega)_j p'(\sigma_j) + b(\omega)_j q'(\sigma_j)]}{p(\sigma_j) q'(\sigma_j) - p'(\sigma_j) q(\sigma_j)}$$

$$b(\omega)_{j-1} = [a(\omega)_{j-1} - a(\omega)_j] \frac{p(\sigma_j)}{q(\sigma_j)} + b(\omega)_j$$

$$(\text{A9})$$

so daß sich prinzipiell beliebig vielschalige Modelle berechnen lassen.

Da sich  $q(\sigma)$  asymptotisch wie  $-\frac{2}{3\sigma^2} + O[\sigma^{-3}]$  verhält, bestimmt  $b_1$  die Größe des induzierten Dipolmomentes.

Der Ausdruck  $\chi = \frac{b_1}{a_1} \left[ \frac{8}{3} \pi \epsilon_0 \epsilon_1 c^3 \right]$  charakterisiert die

Antwortreaktion der Zelle auf ein äußeres elektrisches Feld (komplexe Suszeptibilität, der Index 1 bezieht sich auf das den Pollen umgebende Medium).

Der Imaginärteil von  $\chi$  bestimmt dann die Größe des für

bestimmt werden. Dabei bezeichnet  $\nabla$  den gewöhnlichen Nabla-Operator,  $g(x, y, z)$  die Leitfähigkeit und  $\epsilon(x, y, z)$  die Dielektrizitätskonstante. Da die einzelnen Schichten hier als homogen angesehen werden, genügt das Potential dort der Laplacegleichung:

$$\Delta\phi_k(x, y, z) = 0 \quad (\text{A6})$$

Nehmen wir ferner an, daß in hinreichender Entfernung vom Untersuchungsobjekt das elektrische Feld axial-symmetrisch zur  $z$ -Achse ist und über 4 Extrema verfügt (4 verwendete Elektroden), so kann die Lösung in niedrigster Ordnung in der Form:

die Rotation des Pollens verantwortlichen Drehmomentes:

$$\vec{N} = -\vec{e}_z E_0^2 \text{Im} \chi \quad (\text{A10})$$

Die Winkelgeschwindigkeit des Körpers ( $\omega = 2\pi f$ ) ergibt sich nun aus dem berechneten Drehmoment und der dynamischen Viskosität  $\eta$  zu:

$$\vec{\omega}_{\text{Körper}} = \frac{\vec{N}}{8\pi\eta r_0^3} \left\{ \frac{1}{3e} \frac{d}{d\sigma} \ln \left[ \frac{d}{d\sigma} \left( \sigma \arctan\left(\frac{1}{\sigma}\right) - 1 \right) \right]_{\sigma=\frac{1}{\sigma_j}} \right\}^{-1} \quad (\text{A11})$$

Vollständig analog lassen sich langgestreckte Rotationsellipsoide  $\eta < 1$

$$\left( \sigma_k^2 + 1 \rightarrow \sigma_k^2 - 1 \text{ in A1}, \quad e = \sqrt{1 - \eta^2}, \quad \sigma_{k+1} = \sqrt{1 - \left[ \sqrt{\sigma_k^2 - 1} - \frac{h_k}{c} \right]^2} \right)$$

behandeln, wobei die Lösungen von (A6) in der Form (A7) mit:

(A12)

$$p(\sigma) = \sqrt{\sigma^2 - 1} \quad q(\sigma) = \frac{1}{2} p(\sigma) \ln \left\{ \frac{\sigma+1}{\sigma-1} \right\} - \frac{\sigma}{p(\sigma)}$$

anzusetzen sind. Dies führt wieder auf (A9) und man erhält schließlich für die komplexe Suszeptibilität

$$\chi = -\frac{b_1}{a_1} \left[ \frac{4}{3} \pi \epsilon_0 \epsilon_1 c^3 \right] \quad (A13)$$

und für die Winkelgeschwindigkeit

(A14)

$$\tilde{\omega}_{Körp} = \frac{\tilde{N}}{8\pi\eta r_0^3} \left\{ \frac{1}{3e} \frac{d}{d\sigma} \ln \left[ \frac{d}{d\sigma} \left( \frac{\sigma}{2} \ln \frac{\sigma+1}{\sigma-1} \right) \right] \right\}_{\sigma=\frac{1}{e}}^{-1}$$

## 6. Danksagung

Dr. KÜCHLER führte seine Untersuchungen am ehemaligen Institut für Forst- und Holzwirtschaft Eberswalde, Außenstelle Graupa durch. Die Arbeiten der Berliner Gruppe wurden vom BMFT (Förderkennzeichen Nr. 0310260A) unterstützt.

## 7. Literatur

ARNOLD, W. M. and ZIMMERMANN, U.: Rotating-field induced rotation and measurement of the membrane capacitance of single mesophyll cells of *Avena sativa*. *Z. Naturforsch.* 37c, 908–915 (1982). — ARNOLD, W. M. and ZIMMERMANN, U.: Electro-rotation: development of a technique for dielectric measurements on individual cells and particles. *J. Electrostatics* 21, 151–191 (1988). — BART, S. F. and LANG, J. H.: Electroquasistatic induction micromotors. *IEEE* 89, 7–12 (1989). — CHING, T. M. and CHING, K. K.: Freeze-Drying Pine Pollen. *Plant Physiol.* 39 (5), 705–709 (1964). — CHING, T. M. and CHING, K. K.: Rapid viability tests and aging study of some coniferous pollen. *Can. J. For. Res.* 6, 516–522 (1976). — CHRISTIANSEN, M.: On the development of pollen and the fertilization mechanism of *Larix* and *Pseudotsuga menziesii*. *Silv. Gen.* 21, 166–174 (1972). — DIETZE, W.: Gefriertrocknung und Lagerung von Pollen verschiedener Waldbaumarten. *Silv. Gen.* 22, 154–162 (1973). — EISENHUT, G.: Untersuchungen über die Morphologie und Ökologie der Pollenkörner heimischer und fremdländischer Waldbäume. In: *Forstwissenschaftl. Forschungen Beihefte zum Forstwiss. Zentralblatt* 15, 68. Verlag Paul Parey, Hamburg (1961). — FOSTER, G. S. and BRIDGWATER, F.: Viability Tests to Evaluate Pollen Reliability in Loblolly Pine Controlled Pollinations. *Forest*

*Sci.* 25 (2), 270–274 (1979). — FUHR, G. and KUZMIN, P. I.: Behaviour of cells in rotating electrical fields with account to surface charges and cell structures. *Biophys. J.* 50, 789–795 (1986). — FUHR, G., MÜLLER, T., WAGNER, A. and DONATH, E.: Electrorotation of oat protoplasts before and after fusion. *Plant Cell Physiol.* 28, 549–555 (1987). — FUHR, G., RÖSCH, P., MÜLLER, T., DRESSLER, V. and GÖRING, H.: Dielectric spectroscopy of chloroplasts isolated from higher plants. Characterization of the double membrane system. *Plant Cell Physiol.* 31, 975–985 (1990). — GEIER, B. M., WENDT, B., ARNOLD, W. M. and ZIMMERMANN, U.: The effect of mercuric salts on the electro-rotation of yeast cells and comparison with a theoretical model. *Biochim. Biophys. Acta* 900, 45–55 (1987). — GODDARD, R. E. and MATTHEWS, F. R.: Pollen Testing. In: *Pollen Management Handbook*. Ed. F. E. CARLYLE. pp. 40–43. Agriculture Handbook 587, Washington D. C. (1981). — HERTZ, H.: Über die Vertheilung der Electricität auf der Oberfläche bewegter Leiter. *Wied. Ann.* 13, 266–275 (1881). — HESLOP-HARRISON, J. and HESLOP-HARRISON, Y.: Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain technol.* 45 (3), 115–120 (1970). — IWANAMI, Y., SASAKUMA, T. and YAMADA, Y.: Pollen: Illustration and scanning electromicrographs. S. 198. Kodansha LTD., Tokyo (1988). — KNOX, R. B.: Pollen-Pistil Interactions. In: "Cellular Interactions". Edited by LINSKENS, H. F. and HESLOP-HARRISON, J. pp. 508–521. "Encyclopedia of Plant Physiology". Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1984). — KÜCHLER, L. und BRAUN, H.: Erprobung des Einsatzes von Planktongaze (Polyamiddrahtgewebe) zur Blütenisolierung für eine rationelle Erzeugung von Hybridembryonen vorzugsweise bei Douglasie. Abschlussbericht zur VNL 3-88. Institut für Forstwissenschaften, Eberswalde (1988). — LARKIN, P. J.: Purification and Viability Determinations of Plant Protoplasts. *Planta* 128, 213–216 (1976). — MÜLLER, T., FUHR, G., GEISSLER, F. and HAGEDORN, R.: Rotation spectra of mouse eggs up to 35 MHz. *Stud. Biophys.* 139, 77–94 (1990). — NILSON, S., PRAGLOWSKI, J. and NILSON, L.: Atlas of airborne pollen grains and spores in northern Europe. S. 149. Natur och Kultur, Stockholm (1977). — ORR-EWING, A. L.: Controlled pollination techniques for the Douglas-fir. *Forest Sci.* 2, 251–257 (1956). — PAUL, R. and OTWINOWSKI, M.: The Theory of the Frequency Response of Ellipsoidal Biological Cells in Rotating Electrical fields. *J. theor. Biol.* 148, 495–519 (1991). — REGAN, S. M. and MOFFATT, B. A.: Cytochemical Analysis of Pollen Development in Wild-Type Arabidopsis and Male-Sterile Mutant. *Plant Cell* 2, 877–889 (1990). — RYNNÄNEN, L.: Determination of Quality of Pollen from Finnish Deciduous Tree Species. *Folia Forestalia* 366, 1–12 (1978). — SAUER, F. A. and SCHLÖGL, R. N.: Torques exerted on cylinders and spheres by external electromagnetic fields. A contribution to the theory of field-induced cell rotation. In: *Interactions between Electromagnetic Fields and Cells*. Edited by CHIABRERA, A., NICOLINI, C. and SCHWAN, H. P. pp. 203–251. Plenum Press, New York (1985). — STANLEY, R. G. and LINSKENS, H. F.: Pollen-Biology, Biochemistry, Management. p. 309. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1974). — TAYLOR, D. L. and SALMON, E. D.: Basic Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture. Part A. Eds. YU-LI WANG and D. L. TAYLOR. pp. 231. Academic Press, Inc., San Diego (1989). — UTERMÖHL, H.: Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplanktonmethodik. *Mitt. internat. Verein. Limnol.* 9, 1–38 (1958). — WORSLEY, R. G. F.: The processing of Pollen. *Silv. Gen.* 8, 143–148 (1959).

# Selection for an Optimum Tree Growth Curve

By S. MAGNUSSEN<sup>1</sup>) and A. KREMER<sup>2</sup>)

(Received 5th May 1993)

## Abstract

Height growth trajectories of 100 half-sib families of *Pinus pinaster* Arr. were subject to selection that aimed at a constant improvement (here 20%) for all ages or a

gradual improvement of  $p \cdot \log(\text{age}) \cdot 100\%$  (here  $p=0.05$ ). Height growth was under strong additive genetic control and prospects of genetic gain were promising. A 2nd degree polynomial on a log-log scale was successfully used to describe the height-age relationship in all trees. Classical SMITH-HAZEL selection indices, growth curve parameter indices, and continuous selection indices were also computed for the 2 improvement objectives. The continuous selection index was a second degree polynomial on a log

<sup>1</sup>) Forestry Canada, Petawawa National Forestry Institute, Chalk River, Ontario K0J 1J0, Canada

<sup>2</sup>) Institut national de la recherche agronomique, Laboratoire d'amélioration des arbres forestiers, Pierroton, F-33610 Cestas, France