

cular weights. The CaCl_2 concentrations was kept at 100 mM. All varieties of PEG were able to stabilize and aggregate protoplasts and induce protoplast fusion at appropriate concentrations. PEG 4000 and 6000 proved to be the most effective.

The protoplast-stabilizing effects of PEG 4000 in the presence of 10 mM or 100 mM CaCl_2 are shown in Figure 2. Bursting of protoplasts was prevented at and above 25% PEG 4000 in 10 mM CaCl_2 solution, and at and above 20% PEG 4000 in the case of 100 mM CaCl_2 .

Intensive aggregation and fusion of protoplasts was brought about in both 20% and 25% PEG 4000, depending on the Ca concentration (Figure 3). The further experiments were carried out with 25% PEG 4000.

The CaCl_2 concentration of the PEG 4000 solution added to the protoplasts basically influenced the frequency of protoplast fusion. The data are also presented in Figure 3. The KCl or NaCl concentration in the fusion solution containing 100 mM CaCl_2 was also important (Figure 3).

Not only the concentrations of the monovalent cations and Ca were critical, but also the means of administering them: a fusion frequency of more than 10% could be attained in a solution containing 25% PEG 4000 in 0.1 M CaCl_2 and 0.3 M NaCl or KCl, but the frequency was negligible if the protoplasts were first suspended in 0.5 ml 0.6 M NaCl or KCl, and then 0.5 ml PEG 4000 in

0.2 M CaCl_2 was subsequently added to give the previous final concentrations. In this case no fusion at all occurred without Ca, although the intensity of aggregation was high. The plated protoplasts of the 2 auxotrophs remained viable for as long as 1 week.

Data concerning the effects of various osmotic stabilizers are shown in Figure 4. The protoplasts of the mutants in 0.6 M KCl were mixed and then washed twice by centrifugation in KCl, NaCl, CaCl_2 or MgCl_2 (0.6 M); the supernatant was removed and protoplasts were suspended in 0.15 ml of the osmotic stabilizers. 25% PEG 4000 solution was then added with or without CaCl_2 , with a supplement of the stabilizing compounds (0.3 M) or without them. Figure 4 indicates that 1. K and Na are similar in effect and the presence of Ca is needed for high-frequency fusion, 2. a very high fusion frequency can be reached if KCl is replaced by CaCl_2 , 3. additional CaCl_2 gives a lower frequency, the Ca concentration then being over the optimum, and 4. a high fusion frequency results if K is replaced by Mg. Under hyperosmotic conditions, the fusion process is diminished, to zero in some cases, independently of the osmotic stabilizer.

In other experiments it was found that most of the above conclusions can be generalized and are valid for both filamentous fungi and yeasts, and 'transfusion' of genetic material can be carried out successfully intraspecifically and interspecifically.

Das Wachstum der Zellwand in synchroner *Chlorella*

Growth of the Cell Wall in Synchronous *Chlorella*

H. RICHARD und E. BRODA

Institut für Physikalische Chemie der Universität, Währingerstrasse 42, A-1090 Wien (Österreich), 4. März 1976.

Summary. By pulse labelling, it is shown that the relative growth rate of cell wall substances in synchronous *Chlorella* has a sharp maximum at the time of autospore formation. The dependence on time of the rate of growth of the cell wall coincides with that of the rate of increase of the free space. Moreover, the increase of the nitrogen content of the cell wall also has a maximum roughly at the same time as the growth rate.

Kationische mehrwertige Spurenelemente treten nicht nur in das Innere von *Chlorella* ein, sondern sie werden auch durch die Zellwand stark adsorbiert¹⁻⁴. Die Untersuchungen sollten nun auf synchrone Algen ausgedehnt werden. Dazu sollten zunächst Aussagen über die Verteilung der Zellwandsynthese über den Wachstumszyklus erhalten werden. Die Vermehrung von *Chlorella* erfolgt durch Autosporenbildung. Die reife Algenzelle teilt sich in 2-16 Tochterzellen, die nach der Bildung neuer Zellwand und teilweisem Abbau der alten Zellwand freigesetzt werden^{5,6}.

Die synchrone Züchtung erfolgte im Hell-Dunkel-Zyklus^{7,8}. *Chlorella fusca*, Stamm 211-8b, wurde in einem Zyklus von 16 h Licht und 12 h Dunkel in einer 2,5 l Algensuspension fassenden Säule gehalten⁹. Zur Bestimmung des Zellwandzuwachses wurden die Algen jeweils 20 min in Flachgefäßen, wie sie auch für Ionenaufnahmeversuche verwendet werden¹⁰, mit $^{14}\text{CO}_2$ pulsmarkiert. Die Gefäße waren mit einer zusätzlichen, durch eine Serumkappe verschliessbaren Öffnung versehen, durch welche die Algen mittels Injektionsspritze eingebracht wurden. Nach Markierung wurden die Algen im Zellhomogenisator aufgebrochen und die Zellwände durch Zentrifugation bei 800 g isoliert^{11,12}, zweimal mit 200 ml Wasser gewaschen und bei 95°C getrocknet. Die Ausbeute an Zellwandtrockengewicht, bezogen auf Algen-

trockengewicht, war 8%. Nach Nassverbrennung¹³ wurde die spezifische Aktivität durch Szintillationszählung bestimmt. Die isolierten Zellwände waren – je nach Wachstumsphase – mit 0-5% Stärke verunreinigt. Deren Beitrag zur Masse und Aktivität wurde nach Heisswasserextraktion und Filtration durch die Jod-Stärke-Reaktion bzw. durch Szintillationszählung nach Verbrennung bestimmt und in Rechnung gestellt.

Die spezifische Aktivität der Zellwand ist dem während des Pulses (Δt) erzielten Zuwachs (ΔZ) direkt und der Menge an bereits vorhandener Zellwand (Z) verkehrt proportional. Dabei ist $\Delta Z \ll Z$. Bei konstanter Radiokohlen-

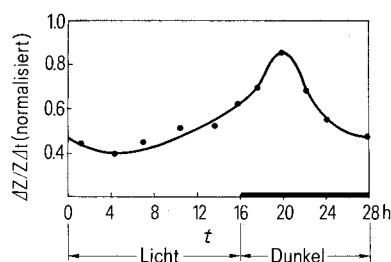


Fig. 1. Verhältnis der relativen Zuwachsgeschwindigkeiten der Zellwandmasse und der Zellmasse bei synchroner *Chlorella*.

stoffaufnahme je Einheit an gesamter Zellsubstanz wäre daher $\Delta Z/\Delta t$ ein Mass für die «relative Zuwachsgeschwindigkeit» (Zellwandzuwachs je Zellwandmasse und Zeiteinheit). Da jedoch die Aufnahme an $^{14}\text{CO}_2$ von der Wachstumsphase abhängt, wurden die Werte durch Berücksichtigung der Aktivität der Einheitsmasse an Zellsubstanz normalisiert (Figur 1).

Der Anstieg bis zur 20. Zyklusstunde beruht offenbar auf der Neusynthese der Zellwand nach erfolgter Teilung. Die Kurve konnte mit einer analogen Kurve für den freien Raum (V) als Funktion der Wachstumsphase verglichen werden. Der freie Raum vom *Chlorella* war

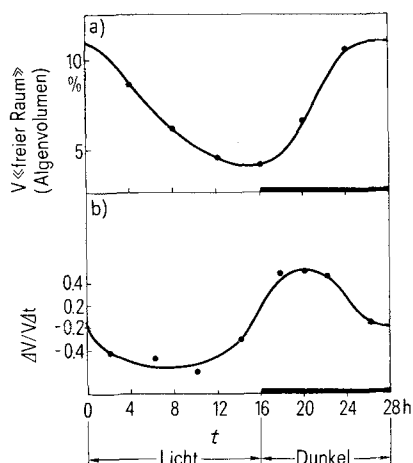


Fig. 2. Freier Raum von synchroner *Chlorella*. a) Grösse des freien Raums (Prozent des Zellvolumens). b) Relative Zuwachsgeschwindigkeit des freien Raums.

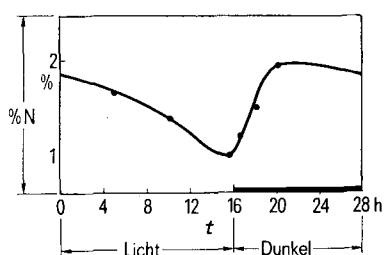


Fig. 3. Stickstoffgehalt der Zellwand synchroner *Chlorella*.

nämlich nach einer Isotopenverdünnungsmethode bestimmt worden¹⁴. Wird der freie Raum als das zugängliche Volumen der Zellwand interpretiert, so kann aus der Grösse des freien Raums in Abhängigkeit von der Wachstumsphase die «relative Zuwachsgeschwindigkeit des freien Raums» ermittelt werden ($\Delta V/V\Delta t$). Die ursprüngliche wie auch die jetzt in dieser Weise abgeleitete Kurve sind der Figur 2 zu entnehmen.

Die annähernde Kongruenz der beiden Kurven in den Figuren 1 und 2b (Konstanz des Verhältnisses der relativen Zuwachsgeschwindigkeiten von Zellwandmasse bzw. -volumen) zeigt, dass der freie Raum je Einheitsmasse an Zellwand während des Wachstumszyklus von synchroner *Chlorella* in Licht und Dunkel konstant bleibt. Die derart definierte «Porosität» der Zellwand ist also bei jungen und alten Zellen etwa die gleiche.

Eine ähnliche Periodizität wie die Masse und der freie Raum der Zellwand zeigt der Stickstoffgehalt der Zellwand (Figur 3). Nach Abbauversuchen mit dem proteolytischen Enzympräparat Pronase an Wänden von lebenden Zellen in verschiedenen Zyklusstadien scheint es sich dabei mindestens teilweise um Proteinstickstoff zu handeln¹⁵. Eine Deutung ist nicht evident, solange die Rolle der Proteine innerhalb der pflanzlichen Zellwand zweifelhaft ist¹⁶.

- ¹ I. SCHUSTER und E. BRODA, Mh. Chem. 101, 285 (1970).
- ² G. FINDENEGG, H. PASCHINGER und E. BRODA, Planta 99, 163 (1971).
- ³ S. MATZKU und E. BRODA, Planta 92, 29 (1970).
- ⁴ E. BRODA, Naturwiss. Rundschau 26, 381 (1973).
- ⁵ J. BURCZYK, H. GRZYBEK, J. BANAS und E. BANAS, Expl. Cell Res. 63, 451 (1970).
- ⁶ A. W. ATKINSON, B. E. S. GUNNING und P. C. L. JOHN, Planta 107, 1 (1972).
- ⁷ H. LORENZEN, in *Synchrony in Cell Division and Growth* (Ed. E. ZEUTHEN; Interscience, New York 1964), p. 571.
- ⁸ H. TAMIYA, Ann. R. Plant Physiol. 17, 1 (1966).
- ⁹ G. FINDENEGG und H. SPRINGER-LEDERER, Allg. prakt. Chemie 18, 297 (1967).
- ¹⁰ H. SPRINGER-LEDERER und D. L. ROSENFELD, Physiologia plant. 21, 435 (1968).
- ¹¹ M. MERCKENSCHLÄGER, K. SCHLOSSMANN und W. KURZ, Biochem. Z. 329, 332 (1957).
- ¹² D. H. NORTHCOLE, Biochem. Soc. Symp. 22, 105 (1962).
- ¹³ D. D. VAN SLYKE und J. FOLCH, J. biol. Chem. 136, 509 (1940).
- ¹⁴ H. W. TROMBALLA und E. BRODA, Arch. Microbiol. 86, 281 (1972).
- ¹⁵ H. RICHARD, Dissertation, Wien 1974.
- ¹⁶ R. D. PRESTON, *The Physical Biology of Cell Walls* (Chapman and Hall, London 1974).

Low Pressure Storage of Seeds

E. C. LOUGHEED, D. P. MURR, P. M. HARNEY and J. T. SYKES¹

Horticultural Science Department, University of Guelph, Guelph (Ontario N1G 2W1, Canada), 1 March 1976.

Summary. Storage of celery, cabbage and onion seed for 14 weeks under conditions of reduced atmospheric pressure decreased the deleterious effects of high temperature and high relative humidity upon the germination of these short-lived seeds.

The effects of storage in a partial vacuum upon seed viability have not been pronounced²⁻⁴, although results of recent experiments with high moisture feed grains stored under reduced pressure in static or semistatic systems have been encouraging^{5,6}. The new technique of low pressure storage (LPS) differs from that previously used for seed storage (sealed chambers or packages) in that there is constant air exchange. LPS conditions modify

¹ Acknowledgments. The authors gratefully acknowledge the financial support of the National Research Council of Canada.

² L. V. BARTON, Boyce Thompson Inst. Contrib. 77, 87 (1953).

³ L. N. BASS, D. C. CLARK and E. JAMES, Crop Sci. 3, 425 (1963).

⁴ A. J. BOCKHOLT, J. S. ROGERS and T. R. RICHMOND, Crop Sci. 9, 151 (1969).

⁵ M. B. HYDE, Ann. techn. Agric. 22, 707 (1973).

⁶ M. THERIEZ, J. LEDU and G. MOLENAT, Ann. Zootech. 22, 433 (1973).