

# Untersuchungen zur Variabilität des Pollenschlauchwachstums bei Pollen di- und tetraploider Zuckerrüben

## I. Bedingungen zur Keimung von *Beta*-Pollen in vitro\*

H. O. GLENK, G. BLASCHKE und K. H. BAROCKA

Botanisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg und  
Institut für Pflanzenzüchtung der Kleinwanzlebener Saatzucht, Einbeck

### Investigations on Variability of Pollen Tube Growth in Diploid and Tetraploid Plants of Sugar Beet

#### I. Conditions for Germination of *Beta* Pollen in vitro

**Summary.** a) Attempts to germinate freshly harvested pollen of *Beta vulgaris* L. on semisolid media were carried out in 1966/67. The basic nutrient medium consisted of 5% gelatin, 30% sucrose and 0.03% boric acid (pH 6.4). Very poor germination occurred in aqueous solutions. During the flowering time from August to October the pollen was taken from field grown plants and during the rest of the year from greenhouse plants.

b) One of the requirements for satisfactory in vitro germination rates is the optimal degree of ripeness of the pollen grains which is attained immediately after the dehiscence of the anthers.

c) From January to March in vitro germination was very poor. Highest germination rates occurred during August and September.

d) The germination of *Beta* pollen is strictly dependent upon the presence of boron in the medium. Optimal concentration of boric acid for pollen germination is  $10^{-1}$ % and for pollen tube growth  $10^{-2}$ %; pollen tubes in this case reached a maximum length of 750  $\mu\text{m}$ , in rare cases even of up to 1200  $\mu\text{m}$ . Borax and butyl boric acid are less active in promoting germination. Phenyl boric acid has a very slight promoting effect and becomes toxic with concentrations higher than  $10^{-3}$ %.

e) Highest germination rates (85%) were obtained on the basic medium at pH 5.4 to 5.7 after addition of  $n/10$  HCl.  $\text{Ca}^{++}$ -ions had no positive effect on germination.

f) Germination of *Beta* pollen as compared to other pollen is relatively slow.

g) A coating of callose was always observed on the inside of the walls of in vitro grown pollen tubes, less frequently callose plugs were found. Occasionally branching of the tubes occurred.

#### 1. Einleitung

Bei der Kulturform von *Beta vulgaris* hat die Schaffung colchicininduzierter Rohpolyploider zu einem züchterischen Fortschritt geführt. Der polyploide Zustand bietet auf Grund der Vermehrung des Chromosomensatzes eine erhöhte Kombinationsmöglichkeit sämtlicher Merkmale. Die Tatsache, daß di- und tetraploide Pflanzen nicht durch eine Sterilitätsbarriere getrennt sind und nach ihrer Kreuzung triploide Pflanzen entstehen, die sich auch durch hohe Leistungsfähigkeit auszeichnen können, führte zu einer starken Verbreitung polyploider Sorten; sie stellen meist ein Gemisch der Genomstufen von  $2x$ ,  $3x$  und  $4x$ ,  $2x$  und  $3x$  bzw.  $3x$  und  $4x$  dar.

Da Triploide nicht generativ vermehrbar sind, müssen die Kreuzungen stets neu erstellt werden. Bei Verwendung gleicher Anteile Di- und Tetraploider in der Elite-Population treten in der  $F_1$ -Generation erhebliche Abweichungen von der Erwartung

der zufallsgemäßen Paarung (Panmixie) auf. So konnten bei getrennter Ernte der  $2x$  ♀-Pflanzen etwa 10—25%, der  $4x$  ♀-Pflanzen etwa 75—85% Triploide festgestellt werden. Eine der Ursachen, die eine derartige Verschiebung der bei Panmixie erwarteten Kreuzungsanteile bedingt, könnte unter anderem die ungleiche Funktionsfähigkeit des haploiden und diploiden Pollens sein. Die Richtung in der Abweichung von der Panmixie läßt anhand zytologischer Analysen der  $F_1$ -Generation auf eine Bevorzugung der haploiden männlichen Gameten bei der Befruchtung schließen. Auf der Vorstellung der ungleichen Pollenwirksamkeit beruht für die Saatproduktion der polyploiden Sorten das Verhältnis zwischen di- und tetraploiden Pflanzen in der Elite-Population: es liegt zur Erzielung eines hohen Kreuzungsanteils für die Diploiden zwischen 20—25%, für die Tetraploiden zwischen 75—80%. Nur selten konnten aber in der Nachkommenschaft mehr als 50% Triploide erreicht werden.

SCHWANITZ (1942) und ARTSCHWAGER (1942) weisen in Keimfähigkeitsuntersuchungen auf eine Überlegenheit des  $x$ - gegenüber dem  $2x$ -Pollen hin. In Unter-

\* Mit Unterstützung der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen landwirtschaftlichen Pflanzenzüchtung (GFP), Bonn.

suchungen von MOCHIZUKI (1950) zeigte sich der x-Pollen sowohl auf diploider wie auch auf tetraploider Narbe ebenfalls vitaler als der 2 x-Pollen. Auch in den Ergebnissen von NAGAO und TAKAHASHI (1953) ist die Keimungsrate des haploiden Pollens um etwa 30% höher als die des diploiden. Nach MAGASSY (1962) bestehen zusätzlich noch Sortenunterschiede.

Die Ergebnisse von JASSEM (1961) lassen nur eine geringe Überlegenheit des x-Pollens erkennen. Die Ursache für die im Vergleich zu den Ergebnissen der anderen Autoren erhöhte Vitalität des 2 x-Pollens wird in der Verwendung tetraploider Pflanzen gesehen, die nach künstlicher Polyploidisierung eine hohe Anzahl Generationen durchlaufen haben (hohe C-Generationen) und so zu einer Abnahme der Unregelmäßigkeiten in der Meiose und zu einer Erhöhung des Anteils normal ausgebildeten Pollens geführt haben soll.

Für die züchterische Arbeit wäre es vorteilhaft, nicht nur die bestehenden Unterschiede in der Vitalität zwischen x- und 2 x-Pollen zu erfassen, sondern auch deren Variabilität zu kennen. Untersuchungen über die Variabilität der Keimfähigkeit sind nicht bekannt. Sie erst lassen abschätzen, ob eine Selektion zu einer entscheidenden Erhöhung der Wettbewerbsfähigkeit in der Befruchtungswahrscheinlichkeit des 2 x-Pollens möglich ist, wodurch sich als Folge Veränderungen in der Zusammensetzung der Elite-Population der di- und tetraploiden Komponenten ergeben würden. Die Verminderung des 4 x-Anteils in der Elite bzw. die Erhöhung des Kreuzungsanteils auf den 2 x ♀-Pflanzen schließt möglicherweise eine Leistungssteigerung der polyploiden Sorten und andere Vorteile ein. Hinweise, daß Unterschiede in der Leistungsfähigkeit der Triploiden bestehen, je nachdem ob sie von di- oder tetraploiden Müttern abstammen, sind öfter gegeben worden. Tetraploide Populationen mit veränderter Pollenkonkurrenz dürften auch zuchtmethodische Konsequenzen zur Folge haben.

Zur Ermittlung der Variabilität der *Beta*-Pollens verschiedener Ploidiestufen wurden von uns seit 1966 keimphysiologische Untersuchungen *in vitro* durchgeführt. Hierüber gibt es bisher nur wenige Veröffentlichungen (KATO und HOSOKAWA 1953, NAGAO und TAKAHASHI 1953, MAGASSY 1962 und POLOVINKINA 1967). Leider sind die Ergebnisse dieser Autoren teilweise nicht reproduzierbar, da die methodischen Ausführungen unvollständig und ungenau sind. Im Rahmen der uns gestellten Aufgabe war es daher zunächst notwendig, einen brauchbaren Nährboden zu entwickeln und die physiologischen Grundlagen der *Beta*-Pollenkeimung zu analysieren.

## 2. Material und Methode

### 2.1. Pollen

Die Untersuchungen wurden in den Jahren 1966 und 1967 mit frischen Rübenpollen durchgeführt, die etwa

1–2 Stunden vor dem Aufbringen auf den Nährboden von blühenden Pflanzen abgenommen und in Petrischälchen gesammelt wurden. Das Pflanzenmaterial stammte größtenteils aus Aufzuchten der Firma Kleinwanzlebener Saatzucht, Einbeck. Jeweils im Spätsommer wurden auch Schosser von Feldrüben aus der Umgebung von Erlangen-Nürnberg als Pollenlieferanten herangezogen. Die Pollengewinnung erfolgte anfangs durch einfaches Ausschütteln aus reichlich blühenden Infloreszenzen. Wegen der dabei unvermeidlichen, massiven Infektion mit Pilzsporen und aus anderen störenden Gründen (vgl. 3.1.) wurden später einzelne Antheren mit einer Pinzette den Blüten entnommen. Das Aufreißen der Lokuli erfolgte dann erst in geschlossenen Glasschälchen. Auf diese Weise konnte Material von einzelnen Trieben der Infloreszenzen gewonnen werden.

### 2.2. Methode

Als Kulturmedien dienten halbsteife Gelatine-Substrate mit 5–7,5% Gelatinegehalt. Die Gelatine wurde nach mehrstündigem Wässern in fließendem Leitungswasser durch Erhitzen auf dem Wasserbad gelöst, mit den notwendigen Zusätzen versehen und auf keimfreien Objektträgern ausgegossen (Schichtdicke 1–2 mm, Fläche 25 mal 30 mm; vgl. LOERTZER 1954, SCHNEIDER 1956 und GLENK 1960). Nach 20–30 Minuten erfolgte die Aussaat der Pollen auf die erkalteten und erstarrten Nährböden mit Hilfe eines feinen Pinsels. Anschließend kamen die Objektträger in feuchte Kammern (geschlossene Petrischalen mit einigen Tropfen dest. Wasser). Die Keimung erfolgte bei 20 °C im Thermostaten. Die Auswertung der Versuche wurde meist 25 Stunden nach dem Ansatz durchgeführt, und zwar nach der bei GLENK (1960) beschriebenen Methode. Es wurden notiert: Keimprozent, Anzahl der Pollenkörner (PK) mit vorgewölbten Keimporen, geplatzte Pollen (meist sehr wenige; vgl. Abb. 8) und Länge der Pollenschläuche (PS).

Bei Verwendung von ungewässertem Gelatine waren die Keimprozent zwar gleich, die Pollenschläuche blieben aber meist kürzer und zeigten gesteigerte Tendenz zur Plasmoptyse. Agar-Substrate (vgl. LAYNE and HAGEDORN 1964, POLOVINKINA 1967) und Wasserkulturen in Hängetropfen (vgl. MÜNZNER 1960, FRÖHLICH 1964) erwiesen sich ebenso wie Aussaaten auf Cellophan-Filterpapier-Unterlagen (NARASIMHAN 1963) als weniger günstig.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

Soweit nicht anders vermerkt, diente für alle Versuche folgendes Grundmedium: 5% Gelatine, 30% Saccharose und 0,03% Borsäure (pH 6,4). Dieses Substrat hatte sich in Vorversuchen als günstig erwiesen.

### 3.1. Pollenalter

Die Ergebnisse von Versuchsreihen mit ausgeschüttelten Pollen bzw. Pollen aus zunächst noch geschlossenen Antheren (vgl. 2.1.) zeigen deutliche Unterschiede hinsichtlich des Keimverhaltens. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, sind die Keimprozent der Pollen aus geschlossenen Antheren bei verschiedenen pH-Werten stets wesentlich höher als diejenigen der älteren Pollenkörner, die aus bereits geöffneten Antheren ausgeschüttelt werden können. Die Schlauchlänge der gekeimten Pollen ist dagegen in beiden Fällen annähernd gleich. Werden die Antheren aus noch geschlossenen Knospen entnommen und die Pollen somit noch vor dem Zeitpunkt der Anthese

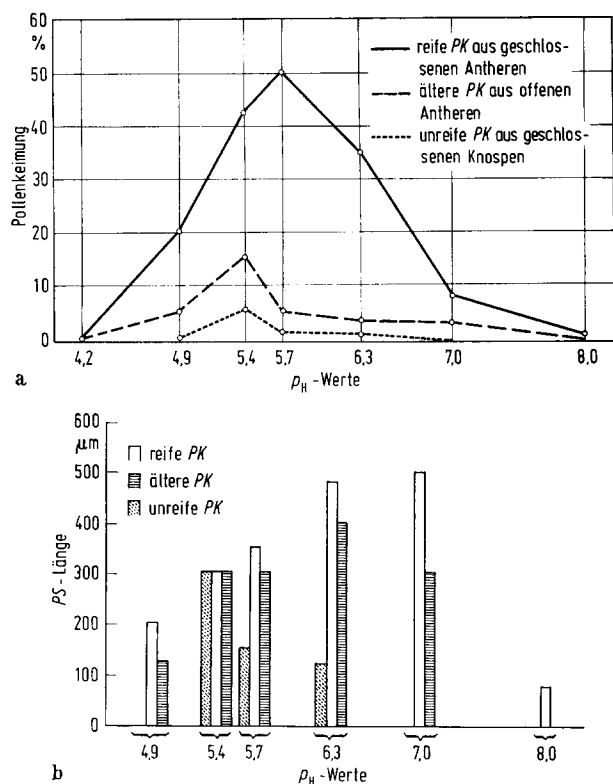


Abb. 1. Einfluß des Pollenalters auf Keimung und Schlauchwachstum in vitro bei unterschiedlichen pH-Werten. a) Keimung; b) Schlauchwachstum (Grundmedium vgl. S. 198; pH-Änderungen durch HCl- bzw. KOH-Zusatz)

ausgesät, so sind die Ergebnisse unbefriedigend: nur bei pH 5,4 erfolgt nennenswerte Keimung (5%), die Pollenschläuche erreichen eine Länge von 310  $\mu\text{m}$ . Offensichtlich nimmt also die Vitalität der *Beta*-Pollen bis zur Anthese zu und nach dem Aufreißen der Lokuli schnell ab. Die wichtigste Vorbedingung zur Erzielung befriedigender Pollenkeimraten in vitro ist somit der richtige Reifegrad der Pollenkörner.

Vitalitätsänderungen durch Reifungs- und Alterungsvorgänge der Pollen in den Antheren sind auch von *Oenotheren* bekannt (GLENK 1960). Inwieweit bei dem raschen Vitalitätsverlust der *Beta*-Pollen auch atmosphärische Einflüsse mitwirken, wie sie u. a. von KÜHLWEIN (1939) und WERFFT (1951) in Betracht gezogen werden, müßte im einzelnen noch untersucht werden.

Die geschilderten Vitalitätsverluste der *Beta*-Pollen lassen sich auch durch Lagerung der Pollen bei tiefen Temperaturen im Kühlschrank nicht vermeiden. In welchem Maße sich die Keimfähigkeit reifer Pollen durch Gefrietrocknung erhalten läßt, wird derzeit geprüft.

### 3.2. Jahreszeitliche Schwankungen der Pollenvitalität

Im Verlauf der Untersuchungen konnte beobachtet werden, daß trotz Beachtung optimaler Pollenreife

und Verwendung günstiger Nährmedien die Keimerfolge in den Monaten Januar bis März mit Pollen von Gewächshauspflanzen stark zurückgingen. Die größten Keimraten in vitro wurden im August und September mit Pollen von Feldrübenschossern erhalten. Bei Versuchen zu verschiedenen Jahreszeiten sind daher die erzielbaren Keimraten trotz Konstanz der Keimungsbedingungen sehr unterschiedlich. Daraus erklären sich die starken Abweichungen hinsichtlich der Keimungshöchstwerte (vgl. die Abb. 1, 3, 6, 7 mit den Abb. 2 und 11). Hierbei könnte der Lichtfaktor während der Blütenentwicklung eine entscheidende Rolle spielen (vgl. auch KNOX and HESLOP-HARRISON 1966). Möglicherweise ist aber auch eine endogene, jahreszeitliche Periodizität mitbeteiligt. Unsere bisherigen Ergebnisse reichen zu einer Klärung dieses Fragenkomplexes noch nicht aus.

Im Zusammenhang mit der schlechten Keimung der Pollenkörner zu Jahresbeginn steht die Beobachtung, daß der Prozentsatz der mit Karminessigsäure färbbaren Pollenkörner bei den im Winter im Treibhaus zur Blüte gebrachten Pflanzen deutlich geringer ist als im Sommer. Obwohl die Karminessigsäurefärbung kein sicheres Kriterium für die Pollenvitalität darstellt (MEHROTRA and SANGHI 1966), weist dieser Befund doch auf gewisse Störungen in der Pollenentwicklung während der lichtarmen Jahreszeit hin. Die zur Blütenbildung ausreichende Belichtung (Kunstlicht; Langtagsbedingungen) bietet offensichtlich noch keine Gewähr für hohe Pollenvitalität.

### 3.3. Saccharosekonzentration

Das Verhalten der *Beta*-Pollen folgt hinsichtlich der Saccharose-Konzentration in vitro einer einfachen Optimumkurve (Abb. 2). Ohne Zuckerzusatz im Nährboden platzen die Pollenkörner häufig. Bei 8 bis 15% Saccharosegehalt sind die Keimungsraten verhältnismäßig gering; sie steigen bei 20 bis 25% stetig an, um bei 30% das Optimum zu erreichen. Bei höheren Saccharosekonzentrationen fallen die Keimprozent wieder ab (in einer einzigen Versuchsreihe keimten die Pollen bei 40% Saccharose stärker als bei 30%). NAGAO and TAKAHASHI (1953) verwendeten als Kulturmedium für *Beta*-Pollen einen Agar-Nährboden mit nur 24% Saccharose.

Verschiedene Untersuchungen zur Feststellung der Reservestoffe in *Beta*-Pollen ergaben, daß weder die Pollen der 2 n-, noch die der 4 n-Pflanzen Fett oder Stärke enthalten. Als Vorratsstoffe sind vorwiegend Disaccharide (Saccharose) vorhanden. Dies dürfte der Hauptgrund für die recht hohen Zuckerkonzentrationen sein, die aus osmoregulatorischen Gründen zur Keimung von *Beta*-Pollen in vitro nötig sind.

### 3.4. Boreinfluß

Seit der Entdeckung der grundlegenden Rolle des Bors für die Pollenphysiologie durch SCHMUCKER (1933 und 1935) wurde die Bedeutung dieses Faktors für die Pollen vieler Pflanzen nachgewiesen (vgl. z. B.

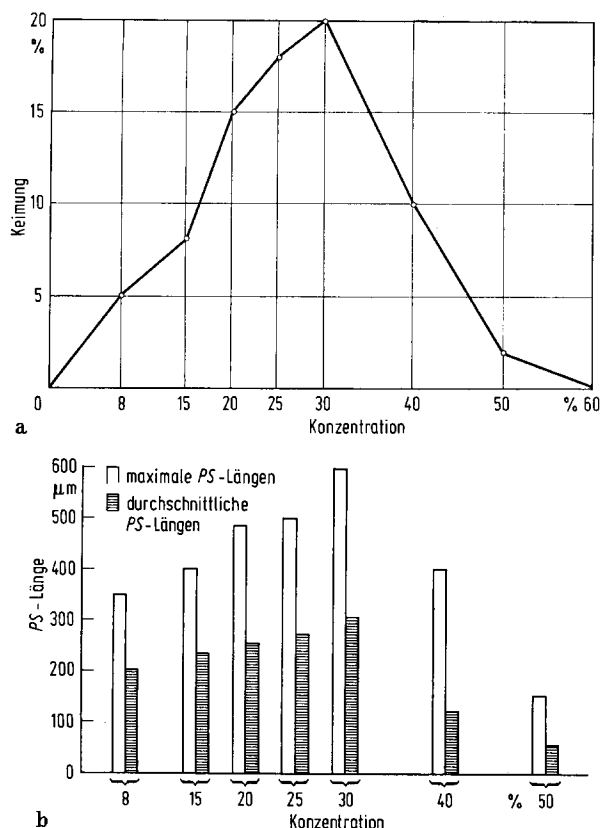


Abb. 2. Keimung und Schlauchwachstum bei verschiedenem Saccharosegehalt in vitro. a) Keimung; b) Schlauchwachstum (Grundmedium vgl. S. 198; versch. Saccharosezusätze)

GLENK und WAGNER 1961, VASIL 1962, STANLEY and LICHTENBERG 1963 und FÄHRICH 1964). Borsäure wirkt nach KATO und HOSOKAWA (1953) sowie nach MAGASSY (1962) in niedrigen Konzentrationen auch bei der in vitro-Keimung von *Beta*-Pollen stark fördernd. Unseren Erfahrungen nach ist darüber hinaus ein gewisser Borgehalt des Mediums eine *conditio sine qua non*. In keinem Fall konnte ohne Zusatz von Borverbindungen eine Ausbildung von Pollenschläuchen beobachtet werden; nur in wenigen Versuchen wurde bei Fehlen von Bor im Nährsubstrat eine Vorwölbung von Keimporen registriert. Wenn andere Autoren die absolute Borabhängigkeit der *Beta*-Pollenkeimung nicht auffanden, so mag dies daran liegen, daß die Nährbodenbestandteile schon von vornherein Borspuren enthielten. Insbesondere gilt dies von Agar-Agar, der in unseren Versuchen durch die borfreie Gelatine ersetzt war. Bei unseren Keimversuchen wurden 4 verschiedene Borverbindungen getestet.

#### 3.4.1. Borsäure

Die durchgeführten Borsäurereihen umfaßten einen Bereich von  $10^{-4}$  bis 1,0%  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Borsäure p. a. Merck). Bei geringeren Borgaben oder Borfreiheit des Nährbodens tritt keine Veränderung der Rüb-

pollen auf. Ein Platzen der Pollen, wie bei *Oenothera* beobachtet (GLENK 1960), konnte nicht festgestellt werden. Wie Abb. 3 a zeigt, erhält man optimale Pollenkeimung mit  $10^{-1}$ %  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Dagegen werden bei  $10^{-2}$ %  $\text{H}_3\text{BO}_3$  die längsten Pollenschläuche ausgebildet (Abb. 3 b und 4). In einem mittleren Bereich von etwa  $3-5 \cdot 10^{-2}$ %  $\text{H}_3\text{BO}_3$  liegt die Borsäurekonzentration, bei der noch hohe Keimraten und ein günstiges Schlauchwachstum zu verzeichnen sind (Abb. 5).

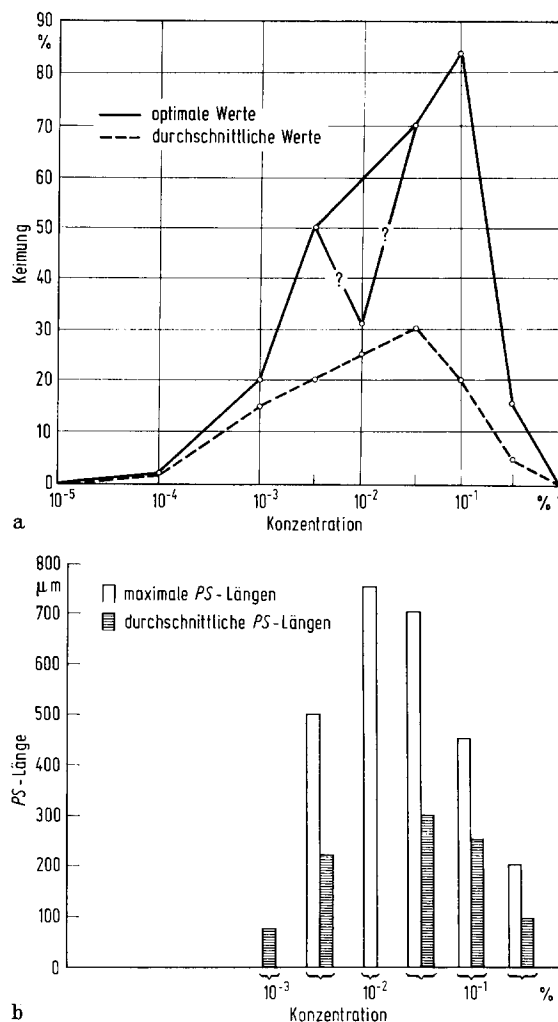


Abb. 3. Einfluß verschiedener Borsäurekonzentrationen auf Keimung und Schlauchwachstum in vitro. a) Keimung; b) Schlauchwachstum (Grundmedium vgl. S. 198; versch. Borsäurezusätze)

#### 3.4.2. Andere Borverbindungen

Wie Abb. 6 zeigt, bleiben die Keimprozentage bei den anderen drei geprüften Borverbindungen (Borax p. a. Merck, Butyl- und Phenylborsäure<sup>1</sup> deutlich hinter den Werten von Borsäure zurück. Das Kei-

<sup>1</sup> Die Organo-Borverbindungen wurden freundlicherweise von Herrn Dipl.-Chem. Dr. H. STAHL, Ohm Polytechnikum Nürnberg, für unsere Versuche hergestellt.

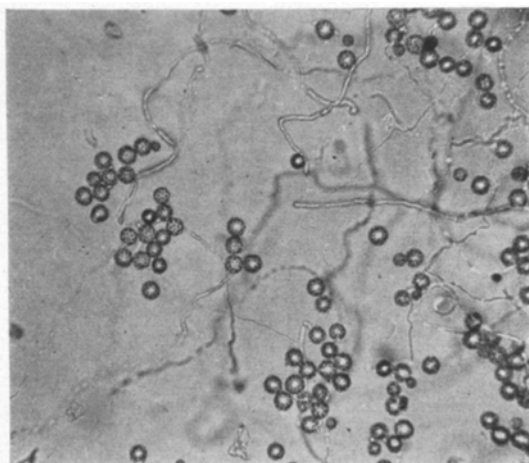


Abb. 4. Lange Pollenschläuche auf Grundmedium mit  $10^{-2}$  % Borsäure (maximal 1275  $\mu$ m). Vergr. 100fach

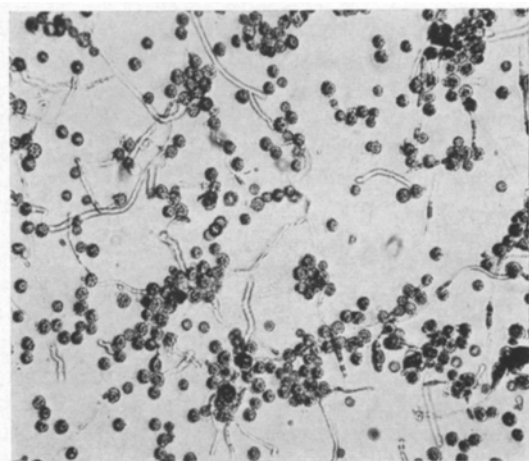


Abb. 5. Hohe Keimraten, günstiges Schlauchwachstum auf Grundmedium mit  $5 \cdot 10^{-2}$  %  $H_3BO_3$ . Vergr. 80fach

mungsoptimum erhält man bei Borax bereits bei  $5 \cdot 10^{-3}$  %, wobei die Pollenschlauchlängen etwa denen bei Borsäure entsprechen. Wird das Bor in Form von Butylborsäure geboten, so sind die Keimergebnisse bei etwa  $5 \cdot 10^{-2}$  % optimal, doch liegen die Schlauchlängen höchstens bei 150  $\mu$ m. Mit Phenylborsäure erhielten wir nur im Bereich um  $10^{-3}$  % etwa 1% Keimung. Ähnliches haben STANLEY und LICHTENBERG (1963) bei *Pinus*-Pollen festgestellt. Ihren Angaben nach wirkten alle geprüften Borverbindungen mit Ausnahme von Phenylborsäure fördernd auf Keimung und Schlauchwachstum ein. Letztere Verbindung soll von Kiefernpollen weit schneller aufgenommen werden als Borsäure- und Boraxlösungen. Die unbeschränkte Aufnahme von Phenylborsäure soll deshalb einer der Gründe dafür sein, daß diese Verbindung bereits in sehr niedrigen Konzentrationen toxisch wirkt. Für die schlechteren Keimergebnisse bei Verwendung von Borax dürfte

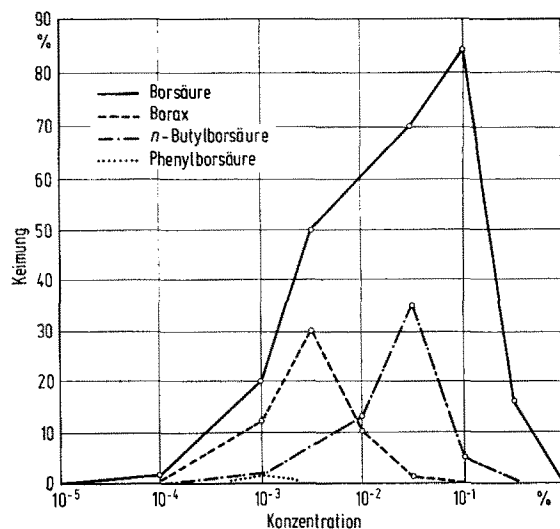


Abb. 6. Keimung in vitro bei Zusatz verschiedener Borverbindungen (Grundmedium vgl. S. 198)

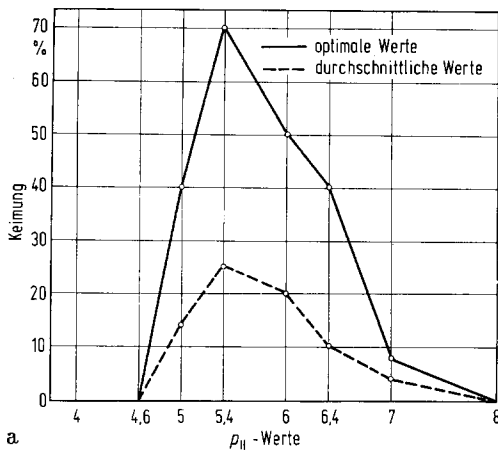
in unseren Versuchen der zu hohe pH-Wert verantwortlich sein.

### 3.5. Wasserstoffionen-Konzentration

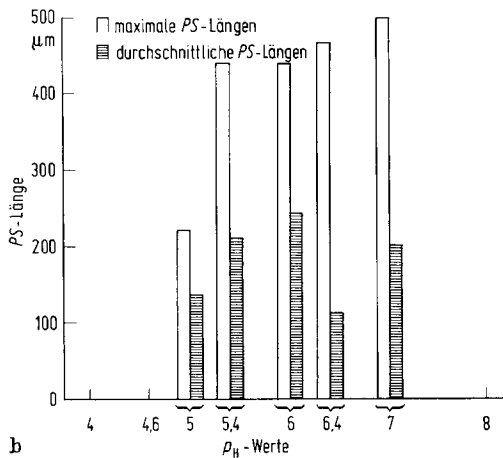
Die Bedeutung des pH-Wertes bei Pollenkeimversuchen ist bereits von verschiedenen Autoren beschrieben worden (BRINK 1925, BRANSCHIEDT 1930, KÜHLWEIN 1937 und 1939). FÄHNRICH (1964) ermittelte bei Hängetropfenkulturen von *Antirrhinum*- und *Petunia*-Pollen ein Keimungsoptimum bei pH 5.

In unseren Versuchen erfolgte die Einstellung des pH-Wertes durch Zugabe von n/10 HCl p. a. bzw. n/10 KOH p. a. zum heißen, noch flüssigen Gelatine-substrat. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß  $K^+$ - bzw.  $Cl^-$ -Ionen in Form von KCl p. a. sowohl die Pollenkeimung als auch das Pollenschlauchwachstum in den mittleren Konzentrationsbereichen nicht beeinflussen. Wie aus Abb. 1 und 7 hervorgeht, werden die höchsten Keimungsraten von Rübepollen bei pH 5,4 bis 5,7 erzielt. Höhere Wasserstoffionenkonzentrationen wirken sich sowohl auf die Pollenkeimung wie auch auf das Schlauchwachstum ungünstig aus und führen oft zum Platzen der Pollenkörner (vgl. Abb. 8). Dagegen erreicht man am Neutralpunkt zwar nur geringe Keimprozent, doch dauert bei ausgekeimten Pollenkörnern das Schlauchwachstum länger an, so daß man maximale Pollenschlauchlängen erhält (Abb. 9). Die gleiche Tatsache hat FÄHNRICH (1964) bei Pollen von *Antirrhinum majus* festgestellt. Im alkalischen Bereich wurden nur in 2 von 11 Versuchsreihen bei pH 9 einige Pollenschläuche von maximal 80  $\mu$  beobachtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß *Beta*-Pollen in einem pH-Bereich von 4,6 bis 9,0 keimen. Optimale Pollenkeimung erfolgt bei pH 5,4 bis 5,7, das Schlauchwachstum ist in einem pH-Bereich von 5,4 bis 7,0 etwa gleich mit einem leichten Maximum beim Neutralpunkt.



a



b

Abb. 7. Keimung und Schlauchwachstum in vitro bei verschiedenen pH-Werten.

a) Keimung; b) Schlauchwachstum (Grundmedium vgl. S. 198; pH-Einstellung durch HCl- bzw. KOH-Zusatz)



Abb. 8. Geplatzte Pollenkörner auf zu sauerem Medium (Grundmedium vgl. S. 198; pH 4,6 durch HCl-Zusatz), im hinteren Teil des ausgekeimten Pollenschlauches Kallosebeläge. Vergr. 400fach

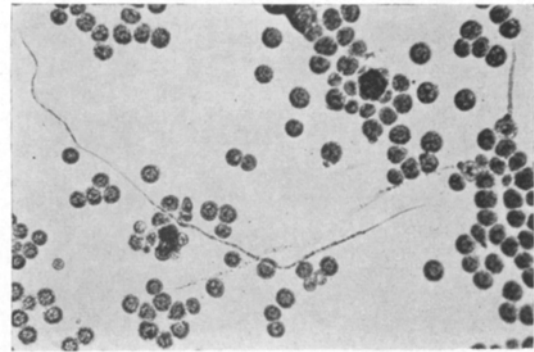


Abb. 9. Geringe Keimraten, jedoch einzelne, lange Pollenschläuche bei pH 7,0. Vergr. 100fach

### 3.6. Einfluß von Kalzium-Ionen

Verschiedentlich wurde über den günstigen Einfluß von Ca-Ionen auf die in vitro-Keimung von Pollen berichtet (vgl. BRINK 1924, GLENK 1960, BREWBAKER and KWACK 1963, KWACK and MACDONALD 1965, DE BRUYN 1966, KWACK and KIM 1967).

Wir haben dem unter 3. genannten Grundmedium Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  p.a. Merck) zwischen  $10^{-3}$  bis 1,0% bzw. Calciumnitrat ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  p. a. Merck) von  $10^{-3}$  bis 2,0% zugesetzt. Dabei zeigte sich, daß mit steigendem Calciumchloridgehalt des Nährbodens die Pollenschlauchkeimraten gleichmäßig abnehmen (Abb. 11 a). Die gebildeten Schläuche hatten bis zu einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-2}\%$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  annähernd gleiche Länge (Abb. 11 b), doch waren sie, offenbar durch starke irreguläre Wachstumsanregung vielfach am Ende gedreht (Abb. 10). Bei Calciumnitrat konnte in einer einzigen Versuchsreihe eine geringfügige Erhöhung der Keimraten beobachtet werden.

Um die Rolle des Calciums bei der Pollenkeimung besser beurteilen zu können, wäre es wichtig, die Ca-Verteilung in der Rübenpflanze (vegetativer und generativer Teil) zu untersuchen. Möglicherweise enthalten nämlich die *Beta*-Pollen bereits vor der Aussaat die für die pollenphysiologischen Vorgänge

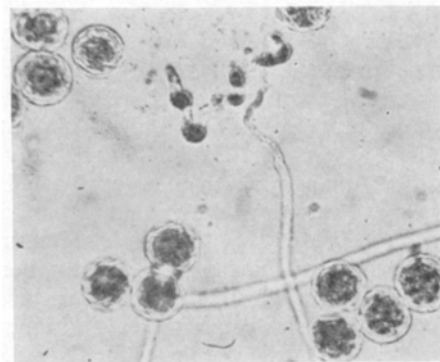


Abb. 10. Gewundene Pollenschläuche auf Medium mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz (0,005%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 15–20% Keimung). Vergr. 270fach

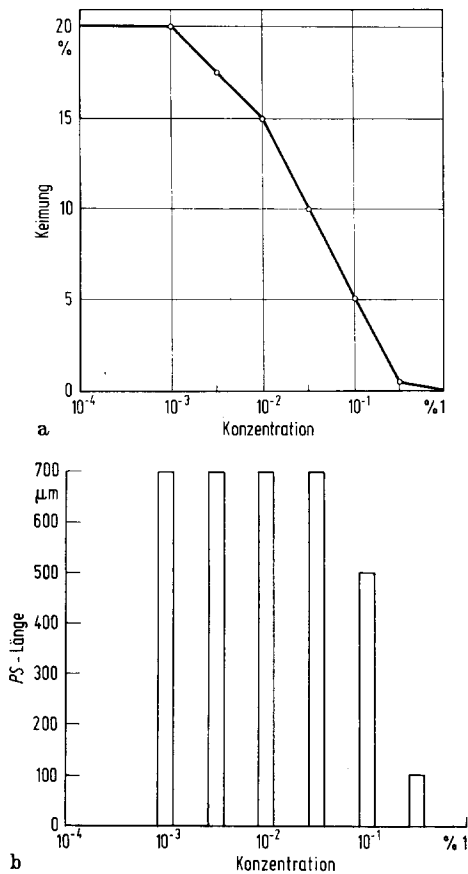


Abb. 11. Keimung und Schlauchwachstum auf Medien mit CaCl<sub>2</sub>-Zusatz.  
a) Keimung; b) Schlauchwachstum (Grundmedium vgl. S. 198; Zugaben von CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O)

nötigen Ca-Mengen, so daß der Optimalbereich der Ca-Konzentration durch Zugabe von Ca<sup>2+</sup>-Ionen zum Substrat überschritten wird.

3.7. Zeitlicher Ablauf der Keimvorgänge

Im Vergleich zu anderen Objekten erfolgen die Keimungsvorgänge bei *Beta*-Pollen relativ langsam. Während z. B. bei *Oenothera* längstens 45 Minuten nach der Aussaat die Pollenkeimung des größten Teiles der Pollenkörner erfolgt und nach etwa 24 Stunden die Endlänge der Pollenschläuche erreicht ist (GLENK 1960), zeigt sich bei *Beta*-Pollen eine weitere Längenzunahme der Schläuche noch nach 25 Stunden. Ebenso können Pollenkörner, die anfangs auf dem Nährboden nur vorgetriebene Keimporen aufweisen, noch im Zeitraum von 25 bis 51 Stunden Pollenschläuche ausbilden (Abb. 12). Die größte Längenzunahme der Schläuche erfolgt 6 bis 16 Stunden nach der Aussaat und erscheint damit im Vergleich zu den Pollenschläuchen anderer Dicotyledonen ebenfalls verzögert (vgl. DATTA and NEOGY 1965).

Daraus folgt, daß bei Kulturversuchen mit *Beta*-Pollen eine im Vergleich zu anderen Objekten ver-

längerte Versuchsdauer nötig ist. Eine endgültige Auswertung der Keimversuche kann nicht vor 25 Stunden nach Ansatz erfolgen. Noch besser gesicherte Versuchsergebnisse erhält man, wenn die Versuche 36–48 Stunden dauern. Bei derartig langer Versuchsdauer macht sich allerdings die mikrobielle Kontamination (bes. Wachstum von Pilzmycelien) sehr störend bemerkbar. Eine gewisse Abhilfe ist durch die Pollengewinnung nach der unter 2.1. geschilderten Methode zu erreichen. Inwieweit eine Eindämmung des Pilzbefalls durch Oberflächensterilisation der geschlossenen Antheren (vgl. PETRU, HRABETOVA and TUPY 1964) bei *Beta* möglich ist, ohne die Pollenvitalität zu beeinträchtigen, muß noch geprüft werden.

Es ist möglich, daß die Keimung der *Beta*-Pollen in vivo schneller verläuft als bei unseren Experimenten. Der in vitro notwendige hohe Zuckergehalt des verwendeten Mediums könnte nämlich, wie aus vergleichenden Versuchen mit *Narcissus*-Pollen hervorgeht, keimverzögernd wirken (vgl. Tabelle). Wahr-

Tabelle. Keimung von *Narcissus*-Pollen in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration (Grundmedium mit 5% Gelatine und 0,01% Borsäure)

Keimung nach	Saccharose-Konzentration		
	10%	20%	30%
3 Stunden	27–36%	23–30%	0%
32 Stunden	28–36%	23–30%	25–36%

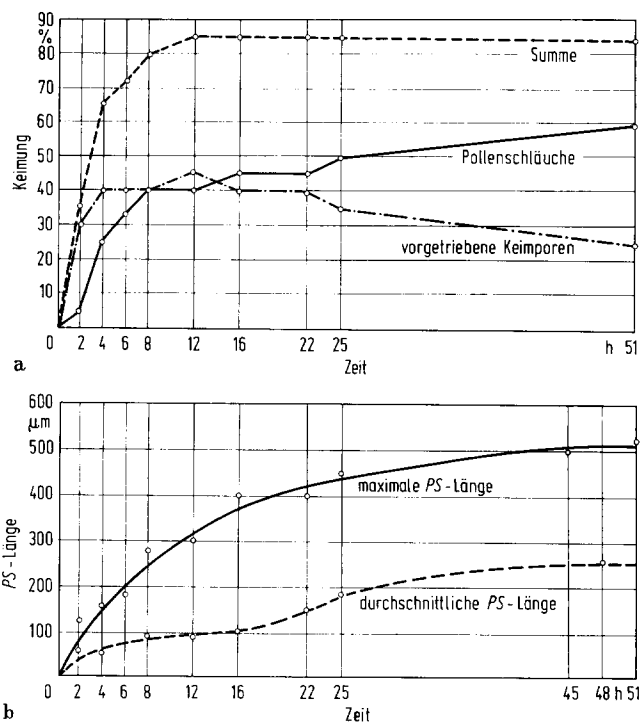


Abb. 12. Zeitlicher Ablauf der Keimvorgänge in vitro.  
a) Keimverlauf; b) Schlauchwachstum (Grundmedium vgl. S. 198)

scheinlich sind hierfür osmotische Gründe maßgebend (Verlangsamung der Wasseraufnahme durch die Pollenkörner nach der Aussaat infolge des beträchtlichen osmotischen Wertes des Mediums).

### 3.8. Kallosebildung

Kalloseeinlagerungen in Pollenschläuchen sind schon sehr früh beobachtet (ELFVING 1879) und später vielfach bestätigt worden (z. B. HAECKEL 1951, LINSKENS und ESSER 1957, GLENK 1960).

Auch bei *Beta*-Pollenschläuchen finden sich oft wandständige Kallosebeläge (vgl. Abb. 8), dagegen ist die Ausbildung von Kallosepfropfen in vitro weniger häufig zu sehen. Wir konnten meist nur einen Kallosepfropfen pro Schlauch finden und auch dies nur in sehr langen Pollenschläuchen.

### 3.9. Andere Wachstumserscheinungen

Während normalerweise auf unseren Nährböden eine monosiphone Pollenkeimung erfolgte, fanden sich doch vereinzelt Ansätze zu bisiphoner Keimung: Einzelne Pollenkörner hatten einen Pollenschlauch ausgetrieben, während eine weitere Keimpore vorgewölbt war (Abb. 13). Bei anderen Pflanzenfamilien, deren Pollenkörner ebenfalls viele Keimporen besitzen, scheint dagegen polysiphone Keimung die Regel (vgl. DATTA and NEOGY 1966). Selbst Pollen mit wenig Keimporen keimen teilweise bi- oder trisiphon (eigene unveröffentlichte Untersuchungen an *Epilobium*/Onagraceae und *Narcissus*/Amaryllidaceae). Erwähnenswert ist noch das gelegentliche Auftreten verzweigter Pollenschläuche (Abb. 14). Pollenschlauchverzweigungen entstehen entgegen einer früher verbreiteten Ansicht (vgl. KAIENBURG 1950) nicht durch Wachstumshemmung. Vielmehr handelt es sich hierbei um ein bei vielen Pflanzen verbreitetes, offenbar physiologisch normales Phänomen (vgl. GLENK 1964, DATTA and NEOGY 1966), welches in vivo dem leichteren Auffinden der Mikropyle dienlich sein könnte.

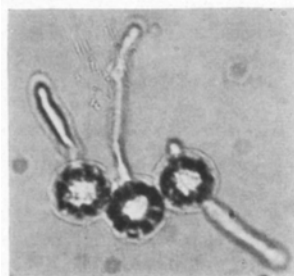


Abb. 13. Ansatz zu bisiphoner Pollenkeimung (Grundmedium vgl. S. 198). Vergr. 360fach



Abb. 14. Pollenschlauchbifurkation (Grundmedium vgl. S. 198). Vergr. 360fach

## 4. Zusammenfassung

a) Mit frisch geernteten Pollen von *Beta vulgaris* L. wurden in den Jahren 1966/67 in vitro-Keimversuche auf halbfesten Gelatinesubstraten durchgeführt.

Grundmedium: 5% Gelatine, 30% Saccharose, 0,03% Borsäure (pH 6,4). Kulturversuche in wässrigen Lösungen brachten nur geringe Erfolge.

b) Für die Erzielung befriedigender Pollenkeimungsraten in vitro ist der optimale Reifegrad der Pollenkörner, der unmittelbar nach dem Aufreißen der Antheren erreicht wird, entscheidend.

c) Maximale Keimfähigkeit der Pollen konnte nur in den Monaten August und September beobachtet werden.

d) Die Keimung der *Beta*-Pollen ist borabhängig: Ohne Zusatz von Borverbindungen zum Nährboden erfolgt keine Keimung. Die optimalen Konzentrationen sind bei Borsäure  $10^{-1}$ % für die Pollenkeimung,  $10^{-2}$ % für das Pollenschlauchwachstum, die längsten Pollenschläuche erreichten hierbei  $750 \mu\text{m}$ , in einzelnen Fällen sogar  $1200 \mu\text{m}$ . Borax und Butylborsäure sind weniger wirksam als Borsäure. Phenylborsäure fördert die pollenphysiologischen Vorgänge nur in sehr geringem Maße und wirkt in Konzentrationen von mehr als  $10^{-3}$ % toxisch.

e) Die höchsten Keimraten in vitro (85%) erhielten wir auf dem Grundmedium bei pH 5,4–5,7 nach Zusatz von n/10 HCl. Eine Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zum Nährboden erwies sich als überflüssig.

## Literatur

- ARTSCHWAGER, E.: Colchicine induced tetraploidy in sugar-beets: Morphological effects shown in progenies of a number of selections. Proc. Amer. Soc. Sug. Beet Techn. **3**, 296–303 (1942).
- BRANSCHIEDT, P.: Zur Physiologie der Pollenkeimung und ihrer experimentellen Beeinflussung. Planta **11**, 368–456 (1930).
- BREWBAKER, J. L., and B. H. KWACK: The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Amer. J. Bot. **50**, 859–865 (1963).
- BRINK, R. A.: Preliminary study of role of salts in pollen tube growth. Bot. Gaz. **78**, 361–377 (1924).
- BRINK, R. A.: The influence of hydrogen-ion concentration on the development of pollen tube of sweet pea (*Lathyrus odoratus*). Amer. J. Bot. **12**, 149–162 (1925).
- BRUNY, J. A. DE: The in vitro germination of pollen of *Setaria sphacelata*. II. Relationships between boron and certain cations. Physiol. plant. (Kbh.) **19**, 322–327 (1966).
- DATTA, R. M., and A. K. NEOGY: Comparative studies on the rates of growth of pollen tubes of some species of *Crotalaria*. Acta biol. Acad. Sci. hung. **16**, 35–41 (1965).
- DATTA, R. M., and A. K. NEOGY: Germination studies of pollen grains in vitro of certain *Malvaceae*. Lilloa **32**, 29–33 (1966).
- ELFVING, F.: Studien über die Pollenkörner der Angiospermen. Jen. Z. Nat.wiss. **13**, 1–28 (1879).
- FÄHNRIICH, P.: Untersuchungen zur Pollenkeimung und zum Pollenschlauchwachstum. I. Der Einfluß von Borsäure und Wasserstoffionen auf Pollenkulturen von *Petunia* und *Antirrhinum*. Planta (Berl.) **61**, 187–195 (1964).
- FRÖHLICH, H. J.: Pollenbank und Pollenkeimung. Der Forst- und Holzwirt (Hannover) **19/9**, 1–3 (1964).
- GLENK, H. O.: Keimversuche mit *Oenothera*-Pollen in vitro. Flora **148**, 378–433 (1960).
- GLENK, H. O.: Untersuchungen über die sexuelle Affinität bei Oenotheren. In: Pollen Physiology and Fertilization, edited by H. F. Linskens, Amsterdam, p. 170–181 (1964).
- GLENK, H. O., und W. WAGNER: Untersuchungen über die Borverteilung in einigen Oenotheren. Ber. dt. Bot. Ges. **73**, 463–470 (1961).
- HAECKEL, A.: Beitrag zur Kenntnis der Pollenfermente. Planta **39**, 431–549 (1951).
- JASSEM, M.:



- Biology of pollination and fertilization in diploid  $\times$  tetraploid sugar beet crosses. Part I. Experiments on the germination of pollen produced by diploids and tetraploids. *Genetica Polonica* **2**, 1–20 (1961). — 17. KAIENBURG, A.: Zur Kenntnis der Pollenplastiden und der Pollenschlauchleitung bei einigen Oenotheraceen. *Planta* **38**, 377–430 (1950). — 18. KATO, K., und S. HOSOKAWA: Über die zur in vitro-Keimung der Zuckerrüben-Pollen erforderlichen besonderen Bedingungen (japanisch). *Proc. Crop Sci. Soc. Jap.* **21**, 298–299 (1953). — 19. KNOX, R. B., and J. HESLOP-HARRISON: Control of pollen fertility through the agency of the light regime in the grass *Dichanthium aristatum*. *Phyton* (Horn, N. Ö.) **11**, 256–267 (1966). — 20. KÜHLWEIN, H.: Zur Physiologie der Pollenkeimung etc. bei Gymnospermen. *Beih. bot. Zbl., Abt. A*, **57**, 37–104 (1937). — 21. KÜHLWEIN, H.: Pollenphysiologische Studien zum Stärkeproblem. *Bot. Arch.* **39**, 245–262 (1939). — 22. KWACK, B. H., and I. KIM: Effects of calcium ion and the protective action on survival and growth inhibition of pollen. *Physiol. Plant. (Kbh.)* **20**, 73–82 (1967). — 23. KWACK, B. H., and T. MACDONALD: The role of calcium in pollen growth as expressed by various water-soluble substances. *Bot. Mag. Tokyo* **78**, 164–170 (1965). — 24. LAYNE, R. E. C., and D. J. HAGEDORN: Effect of boron and agar on germination of pea pollen in sucrose media. *Crop Sci.* **4**, 39–42 (1964). — 25. LINSKENS, H. F., und K. ESSER: Über eine spezifische Anfärbung der Pollenschläuche im Griffel und die Zahl der Kallosepfropfen nach Selbstung und Fremdung. *Nat. Wiss.* **44**, 16 (1957). — 26. LOERTZER, B.: Weitere Untersuchungen zur selektiven Befruchtung II. Diss. Erlangen 1954 (unveröffentlicht). — 27. MAGASSY, L.: Data on the pollen physiology of diploid and tetraploid sugar beets (ungarisch mit engl. Zusammenfassung). *Növénytermelés* **11**, 167–174 (1962). — 28. MEHROTRA, N., and N. K. SANGHI: Studies in *Sesamum indicum*, L. I. Evaluation of different methods of determining pollen viability. *Sci. and Culture* **32**, 416–417 (1966). — 29. MOCHIZUKI, A.: Pollen tube growth in polyploid sugar beet (japanisch). *Jap. J. Genet.* **25** (1950). — 30. MÜNZNER, R.: Untersuchungen zur Physiologie von Pollenkeimung und Schlauchwachstum unter besonderer Berücksichtigung der Borsäurewirkung. *Biol. Zbl.* **79**, 59–84 (1960). — 31. NAGAO, S., and M. TAKAHASHI: Studies on polyploid varieties of sugar beet. I. On the development of the pollen and on the artificial germination of the pollen. 1953; zitiert nach P.B.A. **26**, 3572 (1956). — 32. NARASIMHAN, R.: Mass culture of pollen on cellophane-filter paper supports. *Stain Technol.* **38**, 340–341 (1963). — 33. PETRU, E., E. HRABETOVA and J. TUPY: The technique of obtaining germinating pollen without microbial contamination. *Biol. plant. (Praha)* **6**, 68–69 (1964). — 34. POLOVINKINA, E. V.: Cytogenetische Untersuchung der Pollensterilität der Zuckerrübe. *Genetika (Moskau)* **7**, 20–29 (1967). — 35. SCHMUCKER, TH.: Zur Blütenbiologie tropischer *Nymphaea*-Arten. II. Bor als entscheidender Faktor. *Planta* **18**, 641–650 (1933). — 36. SCHMUCKER, TH.: Über den Einfluß der Borsäure auf Pflanzen, insbesondere keimende Pollenkörner. *Planta* **23**, 264–283 (1935). — 37. SCHNEIDER, G.: Wachstum und Chemotropismus von Pollenschläuchen. *Z. Bot.* **44**, 175–205 (1956). — 38. SCHWANITZ, F.: Über die Pollenkeimung einiger diploider Pflanzen und ihrer Autotetraploiden in künstlichen Medien. *Der Züchter* **14**, 273–282 (1942). — 39. STANLEY, G., and E. A. LICHTENBERG: The effect of various boron compounds on in vitro germination of pollen. *Physiol. plant. (Kbh.)* **16**, 337–346 (1963). — 40. VASIL, I. K.: Studies on pollen germination of certain leguminosae and cruciferae. *Beitr. Biol. Pflanzen* **38**, 137–159 (1962). — 41. WERFFT, R.: Über die Lebensdauer der Pollenkörner in der freien Atmosphäre. *Biol. Zbl.* **70**, 354–367 (1951).

Eingegangen 24. Februar 1969

Angenommen durch H. F. LINSKENS

Dr. H. O. GLENK und G. BLASCHKE,  
Botanisches Institut der Universität  
Erlangen-Nürnberg  
Schloßgarten 4  
852 Erlangen (BRD)

Dr. K.-H. BAROCKA  
Institut f. Pflanzenzüchtung der Kleinwanz-  
lebener Saatzucht A.G.  
Postfach 146  
3352 Einbeck (BRD)