

# Untersuchungen zur Pollenentwicklung und Pollenschlauchbildung bei höheren Pflanzen

## V. Zeitpunkt der Teilung des generativen Kerns in die beiden Spermkerne bei Pollenschlauchkulturen von *Tradescantia paludosa*

C. U. HESEMANN

Lehrstuhl für Allgemeine Genetik der Universität Hohenheim, Stuttgart (BRD)

### The Development of Pollen Grains and Formation of Pollen Tubes in Higher Plants

#### V. The division of the generative nucleus in the pollen tube of *Tradescantia paludosa*

**Summary.** Fixed pollen tubes of *Tradescantia paludosa* were investigated cytologically to determine the precise moment of division of the generative nucleus and to measure the length of the pollen tubes at the same time.

The exact moment of division of the generative nucleus could be shown to be closely correlated with the length of the pollen tube of *Tradescantia*. In the majority of the pollen tubes the vegetative nuclei are not yet in the degenerative phase at the time of division of the generative nucleus. In all random samples investigated pollen tubes without nuclei were found. Depending on the random sample the percentage of pollen tubes without nuclei was 11–22%.

In the discussion it is pointed out that the data obtained from the cytological investigations show that the findings of the precise moment of division of the generative nucleus agree with earlier published results on the development of pollen grains and formation of pollen tubes. The development of the male gametophyte of the angiosperms is to be divided into a series of stages. The data obtained here from the cyto-morphological studies of pollen tubes of *Tradescantia* and from cyto- and biochemical investigations of others indicate that the different stages of the pollen grain and the pollen tube can be separated. In the second part of the discussion there is presented an evaluation of the hypothesis that during evolution of the angiosperms species have formed repeatedly, and in most cases probably independently from one another, in which the degenerative phase of the vegetative nucleus begins earlier and earlier during the development of the male gametophyte, or that in some instances DNA replication is either partially or entirely eliminated.

#### 1. Einleitung

Befunde über Pollenkorn- und Pollenschlauchbildung bei höheren Pflanzen wurden schon im 19. Jahrhundert erhoben. Aus dem Sammelreferat von Maheshwari (1949) über Untersuchungen zur Entwicklung des männlichen Gametophyten der Angiospermen geht hervor, daß aus der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts besonders zahlreiche und umfangreiche Veröffentlichungen verschiedener Autoren vorliegen. Diese Arbeiten befassen sich vornehmlich mit physiologischen oder cyto-morphologischen Fragestellungen der Pollenkorn- und Pollenschlauchentwicklung. In den letzten zwanzig Jahren wurde das Wissen über die Entwicklung des männlichen Gametophyten vor allem durch Untersuchungen erweitert, die mit neuen Techniken und Methoden der Bio- und Cytochemie durchgeführt wurden. Dennoch bestehen auch zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch erhebliche Lücken bezüglich des Kenntnisstandes auf diesem Gebiet.

Die vorliegenden cyto-morphologischen Untersuchungen wurden mit der Zielsetzung durchgeführt, den Zeitpunkt der Teilung des generativen Kerns in die beiden Spermkerne und gleichzeitig den Zustand

des vegetativen Kerns bei Pollenschlauchkulturen in vitro von *Tradescantia paludosa* festzustellen.

#### 2. Material und Methoden

Die vorliegenden Untersuchungen wurden bei fünf Formen von *Tradescantia paludosa* vorgenommen. Diese Formen sind bereits in der Veröffentlichung von Hese-mann (1972, im Druck) aufgeführt und bezeichnet. Das Pflanzenmaterial stammt aus den Kulturen von Herrn Dr. A. Lundquist, Institut für Genetik, Universität Lund, Schweden. Die Anzucht der Pflanzen und der Pollenschlauchkulturen erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie sie bereits in der oben genannten Veröffentlichung von Hese-mann beschrieben wurden. Die Pollenschläuche wurden in einem Gemisch von Äthylalkohol/Eisessig (3:1) fixiert und anschließend die Kerne mit Hilfe der Feulgen-Technik gefärbt.

Im einzelnen wurde bei den vorliegenden Untersuchungen erstens so vorgegangen, daß bei der Form Nr. 3 nach 8, 9, 10, 13, 13 $\frac{1}{2}$ , 14, 14 $\frac{1}{2}$  und 15 Stunden Wuchszeit jeweils Stichproben von etwa 250 Pollenschläuchen entnommen wurden. Bei den Pollenschläuchen dieser Stichproben wurde geprüft, ob der vegetative Kern noch vorhanden und der generative Kern bereits in die beiden Spermkerne geteilt ist und ob auch Fälle auftreten, bei denen beide Kerne nicht mehr nachgewiesen werden können. Zweitens wurden bei der Form Nr. 3 die Längen von Pollenschläuchen nach 15stündiger Wuchszeit bestimmt. Zum Vergleich werden die Längen nach kurzen Wuchs-

zeiten, im Höchstfall vier Stunden, fixierter Pollenschläuche der *Tradescantia-paludosa*-Formen Nr. 1–5 angegeben. Die Kulturen mit kurzen Wuchszeiten wurden unter den gleichen Bedingungen wie diejenigen mit langen Wuchszeiten gehalten. Die Längen der Pollenschläuche mit kurzen Wuchszeiten wurden bereits bei den Untersuchungen über den Einwanderungsmodus der Kerne bestimmt (Hesemann, 1972a, im Druck). Innerhalb dieser Gruppe konnten keine Pollenschläuche beobachtet werden, bei denen der generative Kern schon in die Spermakerne geteilt war. Im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchungen wurde darauf verzichtet, bei der Analyse der Länge der Pollenschläuche die Gruppe mit kurzen Wuchszeiten entsprechend diesen Zeiten in zahlreiche Untergruppen aufzugliedern, wie es in der Arbeit von Hesemann (1972, im Druck) über den Einwanderungsmodus der Kerne bei *Tradescantia paludosa* getan worden ist. Vielmehr wurde die Gruppe der Kulturen mit kurzer Wuchszeit nur in zwei Untergruppen unterteilt. In der ersten Untergruppe wurden die Längen derjenigen Pollenschläuche zusammengefaßt, die nach 30 Minuten und nach 60 Minuten Wuchszeit fixiert worden waren, in der zweiten Untergruppe derjenigen, die vor der Fixierung 2, 3 oder 4 Stunden gewachsen waren. Ein Sonderfall liegt bei der Form Nr. 5 insofern vor, als bei dieser Form nur nach sehr kurzen Wuchszeiten, nämlich nach 5, 10, 15, 20, 25 und nach 30 Minuten Stichproben entnommen und diese hinsichtlich der Pollenschlauchlängen analysiert wurden. Auch im Falle der Form Nr. 5 wurden die Längen der Pollenschläuche nicht entsprechend den verschiedenen sehr kurzen Wuchszeiten für die statistischen Erhebungen getrennt verrechnet, sondern en bloc ausgewertet. Da bei diesen Untersuchungen nicht die Absolutwerte, sondern die Relativwerte der Pollenschlauchlängen von Bedeutung sind, wurden die Längen nicht auf  $\mu$ -Werte umgerechnet, sondern in Meßarbeitseinheiten (MAE) angegeben, wie sie vom Okularschraubenmikrometer abgelesen wurden. Um die in dem vorliegenden Beitrag in Arbeitseinheiten aufgeführten Mittelwerte der Längen der Pollenschläuche in „ $\mu$ “ umrechnen zu können, wird der entsprechende Umrechnungsfaktor angegeben. Es entspricht  $1 \text{ MAE} = 37,74 \mu$ . Die optische Ausrüstung bestand aus: Objektiv: Ph 2 Neofluar  $25 \times / 0,60$ ; Okulare: Kpl – W  $12,5 \times$ . Okularschraubenmikrometer mit K  $16 \times$ ; Kondensor: Achromatisch – aplanatischer Hellfeld/Phasenkontrast-Kondensor V/Z, Hellfeld 1,4. Bei der Bestimmung der Pollenschlauchlängen wurde bei Pollenkörnern, die zwei Pollenschläuche gebildet hatten, jeweils nur der längere berücksichtigt. Längen-Messungen kernloser Pollenschläuche wurden bei diesen Untersuchungen nicht durchgeführt. Bei der Längenbestimmung von Pollenschläuchen, die nach kurzer, maximal vierstündiger Wuchszeit fixiert worden sind, wurden nur Pollenschläuche berücksichtigt, die vegetative Kerne enthielten, während bei der Ermittlung der Längen von Pollenschläuchen, die nach 15stündiger Wuchszeit analysiert wurden, auch Pollenschläuche erfaßt wurden, die keine vegetativen Kerne besaßen.

### 3. Ergebnisse

Wie man aus Tab. 1 ersehen kann, finden sich in der nach 8 Stunden Wuchszeit entnommenen Stichprobe von insgesamt 298 analysierten zu 67% Pollenschläuche, bei denen der generative Kern noch nicht in die beiden Spermakerne geteilt und der vegetative Kern noch vorhanden ist. Ein ganz ähnliches Bild bezüglich des Anteils an Pollenschläuchen, die bereits in Spermakerne geteilte generative Kerne aufweisen, ergibt sich, wenn man die nach 9 und 10 Stunden Wuchszeit untersuchten Stichproben betrachtet. Wie

aus Tab. 1 hervorgeht, steigt nämlich auch nach 9 bzw. 10 Stunden Wuchszeit der Prozentsatz an Pollenschläuchen, die Spermakerne besitzen, maximal nur auf 2% an. Offenbar sind unter den Bedingungen des Experiments längere Wuchszeiten erforderlich, um bei den Pollenschläuchen Längen erreichen zu können, die für das Einsetzen der Teilung des generativen Kerns als Mindestmaß gegeben sein müssen. Nach 13 Stunden Wuchszeit ist der Anteil an Pollenschläuchen mit Spermakernen auf über 55% angestiegen. Der Versuch wurde bei 15 Stunden Wuchszeit abgebrochen, da man auch bei längeren Wuchszeiten keine höheren Prozentsätze als die bei dieser Wuchszeit gefundenen 86% an spermakernhaltigen Pollenschläuchen erwarten kann, weil, wie unten noch näher angeführt wird, bei allen Stichproben in der Regel mindestens 10% Pollenschläuche angetroffen werden, bei denen keine Kerne nachgewiesen werden können. Auf Grund der dargelegten Befunde kann man demnach schließen, daß nach 15stündiger Wuchszeit der überwiegende Teil der Pollenschläuche keine ungeteilten generativen Kerne mehr enthält. In den oben angeführten Prozentsätzen der spermakernhaltigen Pollenschläuche sind nur diejenigen enthalten, bei denen auch noch der vegetative Kern vorhanden war. Der Prozentsatz an Pollenschläuchen, in denen Spermakerne vorgefunden wurden, erhöht sich noch je nach Stichprobe um ca. 1–8%, wenn man in die Berechnungen diejenigen Pollenschläuche mit einbezieht, in denen der vegetative Kern mit Hilfe der Feulgen-Färbung nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Tab. 1). Bei *Tradescantia paludosa* ist also zum Zeitpunkt der Teilung des generativen Kerns in die beiden Spermakerne bei der Mehrzahl der Pollenschläuche der vegetative Kern noch vorhanden. Die Degeneration des vegetativen Kerns findet bei diesem Objekt offenbar zu einem sehr späten Zeitpunkt der Pollenschlauchentwicklung, nämlich erst nach der Teilung des generativen Kerns statt. Untersuchungen über den genauen Zeitpunkt der Degeneration des vegetativen Kerns sind im Gange. Aus Tab. 1 geht weiterhin hervor, daß bei den Stichproben, die nach 8, 9 und 10 Stunden Wuchszeit entnommen worden waren, zu 18–23% Pollenschläuche auftreten, die ungeteilte generative, aber keine vegetativen Kerne enthalten. Bei den längeren Wuchszeiten von 13–15 Stunden wurden Pollenschläuche, deren generativer Kern noch ungeteilt ist und die keinen vegetativen Kern mehr enthalten, je nach Stichprobe gar nicht oder nur zu einem sehr geringen Prozentsatz angetroffen. Wenn man die Prozentsätze der Pollenschläuche, die ungeteilte generative Kerne oder Spermakerne, aber keine vegetativen Kerne enthalten, in Abhängigkeit von der Wuchszeit der Pollenschlauchkulturen vergleicht, stellt man erstens fest, daß bei den kurzen Wuchszeiten zwischen 8–10 Stunden je nach Stichprobe bis zu 23% an Pollenschläuchen mit Spermakernen auftreten. Zweitens ergibt sich aus diesem Vergleich,

daß bei den langen Wuchszeiten zwischen 13–15 Stunden Pollenschläuche mit ungeteilten generativen Kernen nur bei einer Stichprobe zu 8%, bei den übrigen zu 0–2% vertreten sind, Pollenschläuche mit Spermakernen jedoch je nach Stichprobe nur zu 1–8%. Auf Grund der Befunde bei den Pollenschläuchen mit ungeteilten generativen Kernen und kurzen Wuchszeiten hätte man im Vergleich dazu bei langen Wuchszeiten einen etwa entsprechend hohen Prozentsatz an Pollenschläuchen mit Spermakernen erwarten können. Die tatsächlich gefundenen Prozentsätze dieser Pollenschläuche liegen jedoch weit aus niedriger als die der Erwartungswerte. Eine Erklärung für die Diskrepanz bei diesen Werten kann noch nicht gegeben werden, bevor nicht eine weitaus größere Anzahl von Pollenschläuchen als bei den hier vorliegenden Untersuchungen bezüglich dieser Fragestellung analysiert worden ist.

keine vegetativen Kerne aufwiesen. Es wird die Auffassung vertreten, daß ein Vergleich zwischen den Längen der Pollenschläuche auch dann gezogen werden kann, wenn diese Längen der beiden zu vergleichenden Gruppen nicht unter völlig gleichen Voraussetzungen bestimmt wurden. Die Fehlerquelle, die sich bei dem Vergleich dieser Längenbestimmungen von Pollenschläuchen ergibt, wird für so gering erachtet, daß die Befunde in ihrer Aussagekraft nicht beeinträchtigt werden. In Tab. 2a sind die Mittelwerte der Längen von Pollenschläuchen der fünf *Tradescantia-paludosa*-Formen und die dazugehörigen mittleren Abweichungen bei verschiedenen Wuchszeiten der Pollenschlauchkulturen aufgeführt. Bei den Stichproben, die nach sehr kurzen Wuchszeiten (30 Min. und 1 Std.) und im Sonderfall von Form Nr. 5 nach 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten Wuchszeit entnommen wurden, finden sich Längen-Mittel-

Tab. 1. Analyse der Pollenschläuche von *Tradescantia paludosa* Nr. 3 bei unterschiedlicher Wuchszeit bezüglich des Auftretens in Spermakern geteilter generativer Kerne und des Vorhandenseins vegetativer Kerne

Zahl der analysierten Pollenschläuche	Wuchszeit in Stunden	generativer Kern geteilt		generativer Kern ungeteilt		Pollenschläuche ohne nachweisbare Kerne in %
		veget. Kern vorhanden in %	veget. Kern nicht vorhanden in %	veget. Kern vorhanden in %	veget. Kern nicht vorhanden in %	
298	8	0,67	—	67,11	17,79	14,43
241	9	1,24	0,42	58,92	17,84	21,58
324	10	2,16	—	53,40	23,46	20,99
323	13	55,73	7,12	20,43	8,36	8,36
270	13 <sup>1/2</sup>	77,04	6,30	11,85	1,85	2,96
255	14	68,63	3,92	15,69	—	11,76
292	14 <sup>1/2</sup>	67,47	7,88	10,27	2,40	11,99
247	15	86,24	1,21	1,62	—	10,93

Weiterhin kann man aus Tab. 1 ersehen, daß bei allen Stichproben, die nach den verschiedenen Wuchszeiten entnommen worden sind, Pollenschläuche ohne Kerne auftraten. In die Untersuchungen wurden nur diejenigen Pollenschläuche einbezogen, die über die gesamte Länge intakt und noch in festem Verband mit dem Pollenkorn waren, um Fehlermöglichkeiten gerade bei der Analyse dieses besonderen Typs von Pollenschläuchen weitgehend auszuschließen. Die Prozentsätze für diesen speziellen Pollenschlauchtyp liegen zwischen 11–22%, wenn man von der Stichprobe bei 13<sup>1/2</sup> Stunden Wuchszeit absieht, in welcher dieser Pollenschlauchtyp mit nur 3% unterrepräsentiert ist.

Wie bereits in Abschnitt 2 erläutert worden ist, wurde bei der Längenbestimmung der Pollenschläuche folgendermaßen vorgegangen: bei den Pollenschläuchen, die nach kurzer, maximal vierstündiger Wuchszeit fixiert wurden, fanden bei den Messungen nur diejenigen Berücksichtigung, die vegetative Kerne enthielten, während bei den Pollenschläuchen, die 15 Stunden gewachsen waren, in die Längenermittlungen auch diejenigen einbezogen wurden, die

werte, die je nach *Tradescantia-paludosa*-Form von 1,52 bis 4,55 MAE reichen. Bei den Stichproben, die nach 2, 3 und 4 Stunden Wuchszeit analysiert wurden, liegen die Längen-Mittelwerte zwischen 3,67 bis 5,38 MAE. Bei der nach 15 Stunden Wuchszeit untersuchten Stichprobe von *Tradescantia paludosa* Nr. 3 ergibt sich ein Mittelwert von 12,96 MAE. Die Ergebnisse der Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Längen-Mittelwerten mit Hilfe von *t*-Tests sind in Tab. 2b zusammengefaßt. Erstens kann man aus dieser Tabelle entnehmen, daß der Mittelwert der Pollenschläuche von *Tradescantia paludosa* Nr. 5 — die Pollenschläuche dieser Form wurden nach extrem kurzen Wuchszeiten von 5 Minuten bis zu 30 Minuten fixiert — sich von allen übrigen ermittelten Mittelwerten bis auf eine Ausnahme signifikant unterscheidet. Die Längen-Mittelwerte von Pollenschläuchen jeweils einer Form, von der Stichproben nach sehr kurzer Wuchszeit (30 Min. und 1 Std.) und kurzer Wuchszeit (2, 3 und 4 Std.) entnommen wurden, weichen nicht oder nur schwach laut Signifikanztest voneinander ab. Eine Ausnahme bildet *Tradescantia paludosa* Nr. 1. Die entsprechen-

den beiden Mittelwerte unterscheiden sich bei dieser Form signifikant. Drittens läßt sich aus der Tab. 2b ablesen, daß der Längen-Mittelwert der nach 15 Stunden Wuchszeit fixierten Pollenschläuche von *Tradescantia paludosa* Nr. 3 gegenüber allen übrigen Mittelwerten einen hoch signifikanten Unterschied aufweist. Eine detaillierte Analyse aller Einzelmittelwerte und ihrer mittleren Abweichungen in Abhängigkeit von der Wuchszeit soll hier nicht gegeben werden. Vielmehr soll im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen ein Vergleich gezogen werden zwischen den Längen von Pollenschläuchen, die nach sehr kurzer (bis zu 1 Std.) bzw. nach kurzer (bis zu

4 Std.) Wuchszeit analysiert wurden und ungeteilte generative Kerne enthielten, und den Längen von Pollenschläuchen, die nach langer (15 Std.) Wuchszeit untersucht wurden und in Spermakerne geteilte generative Kerne besaßen.

#### 4. Diskussion

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß die Teilung des generativen Kerns in die beiden Spermakerne innerhalb des Pollenschlauchs von *Tradescantia paludosa* erst dann erfolgte, wenn der Pollenschlauch eine Mindestlänge erreicht hatte. Unter den Bedingungen im Experiment mußten 15 Stunden Wuchszeit zur Verfügung gestellt werden, um diese Mindestlänge zu erreichen, bei welcher bei der Mehrzahl der Pollenschläuche die Teilung des generativen Kerns stattfand. Mit Hilfe dieser hier dargelegten Befunde wurde der Beweis erbracht, daß der Zeitpunkt der Teilung des generativen Kerns starr an eine Mindestlänge des Pollenschlauchs gebunden ist.

*Tradescantia*-Arten sind gerade in den letzten zwanzig Jahren ein bevorzugtes Forschungsobjekt geworden, um mit modernen Techniken Fragen der Pollenkorn- und Pollenschlauchbildung zu untersuchen. So ergibt sich aus neueren, mit cytologischen, cyto- und biochemischen sowie elektronenmikroskopischen Methoden geführten Untersuchungen zur Pollenkornbildung bei *Tradescantia*, daß sich

Tab. 2a. Mittelwerte in Meßarbeitseinheiten (MAE) und mittlere Abweichungen der Längen von Pollenschläuchen bei fünf Formen von *Tradescantia paludosa* bei verschiedenen Wuchszeiten der Pollenschlauchkulturen

<i>Tradescantia paludosa</i> -Formen	Wuchszeit in Min. bzw. Std.	Zahl der gemessenen Pollenschläuche	Längen-Mittelwerte in MAE	mittlere Abweichungen
Nr. 1	30 Min. u. 1 Std.	48	1,52	1,38
	2, 3 und 4 Std.	75	4,05	3,54
Nr. 2	30 Min. u. 1 Std.	53	4,55	2,66
	2, 3 und 4 Std.	77	3,84	3,24
Nr. 3	30 Min. u. 1 Std.	57	2,81	1,89
	2, 3 und 4 Std.	83	3,67	2,72
	15 Std.	105	12,96	6,47
Nr. 4	30 Min. u. 1 Std.	53	3,71	3,15
	2, 3 und 4 Std.	85	5,38	4,90
Nr. 5	5, 10, 15, 20, 25 und 30 Min.	164	1,87	1,34

Tab. 2b. Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den in Tab. 2a aufgeführten Mittelwerten der Pollenschlauchlängen von fünf *Tradescantia-paludosa*-Formen

<i>Tradescantia-paludosa</i> -Formen	Nr. 3			Nr. 1		Nr. 2		Nr. 4		Nr. 5
	30 Min. + 1 Std.	2, 3 + 4 Std.	15 Std.	30 Min. + 1 Std.	2, 3 + 4 Std.	30 Min. + 1 Std.	2, 3 + 4 Std.	30 Min. + 1 Std.	2, 3 + 4 Std.	5—30 Min.
Nr. 3 30 Min. + 1 Std.	*	***	***	***	**	***	*	—	***	***
2, 3 + 4 Std.		***	***	***	—	—	—	—	***	***
15 Std.			***	***	***	***	***	***	***	***
Nr. 1 30 Min. + 1 Std.					***	***	***	***	***	—
2, 3 + 4 Std.						—	—	—	—	***
Nr. 2 30 Min. + 1 Std.										***
2, 3 + 4 Std.								—	*	***
Nr. 4 30 Min. + 1 Std.									*	***
2, 3 + 4 Std.										***

Es bedeuten: — nicht signifikant; \* signifikant bei 5%; \*\* signifikant bei 2%; \*\*\* signifikant bei 1%.

die Entwicklung des Pollenkorns in mehrere Stadien gliedern läßt, die sich in charakteristischer Weise voneinander unterscheiden (Hesemann, unveröffentlicht; Mephram and Lane, 1970; Woodard, 1958). Auf die Ergebnisse dieser Untersuchungen kann jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher eingegangen werden. Als ein Beispiel sei der Fall angeführt, daß das Stadium des reifen, auskeimbereiten Pollenkorns cytologisch und cytochemisch von demjenigen des unreifen Pollenkorns deutlich unterschieden werden kann. Aus der Veröffentlichung von Hesemann (1972, im Druck) geht hervor, daß sich auch der Verlauf der Entwicklung des Pollenschlauchs in mehrere Teilabschnitte gliedern läßt. Der erste Abschnitt ist dadurch gekennzeichnet, daß das Pollenkorn auskeimt, in den noch jungen und kurzen Pollenschlauch aber noch keine Kerne einwandern. Dieses Stadium leitet in den zweiten Entwicklungsabschnitt über: der Pollenschlauch hat eine Mindestlänge erreicht, bei der die Kerne, und zwar zuerst der generative, in den Pollenschlauch einzuwandern beginnen. Im Verlauf des dritten Stadiums ist das Pollenschlauchwachstum fortgeschritten, inzwischen sind beide Kerne eingewandert, der vegetative Kern erreicht auf seiner Wanderung den generativen oder setzt sich in allerdings geringer Entfernung vor diesen. Ein weiterer Teilabschnitt der Pollenschlauchbildung wurde durch die hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse näher analysiert und soll die bisherigen Kenntnisse über den in verschiedenen Einzelschritten erfolgenden Verlauf der Pollenschlauchbildung ergänzen. In diesem vierten Stadium wird von den Pollenschläuchen im Normalfall eine Länge erreicht, bei der die Teilung des generativen Kerns erfolgt. Zu diesem Zeitpunkt läßt sich der vegetative Kern noch nachweisen. Ausführliche Untersuchungen über das nachfolgende Stadium der Pollenschlauchentwicklung, in dessen Verlauf der vegetative Kern degeneriert, sind noch im Gange. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen, in denen ein vierter Teilabschnitt der Pollenschlauchentwicklung cytomorphologisch näher analysiert wurde, ergänzen die bisher vorliegenden Befunde über die Bildung des Pollenschlauchs bei *Tradescantia* und fügen sich nahtlos in den bisherigen Erkenntnisstand über die Entwicklung von Pollenkorn und Pollenschlauch ein.

Kernlose Pollenschläuche wurden erstmals bei *Petunia*-Formen beschrieben (Hesemann, Veröffentlichung in Vorbereitung). Bei den *Petunia*-Formen tritt dieser Typ von Pollenschläuchen zu einem sehr hohen Prozentsatz auf, der je nach Form zwischen 57–72% liegt. In den vorliegenden Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß derartige kernlose Pollenschläuche, wenn auch zu einem sehr viel geringeren Prozentsatz, der maximal bei 22% liegt, außer bei *Petunia* bei einem zweiten Objekt, nämlich *Tradescantia*, bei Pollenschlauchkulturen *in vitro* angetroffen werden. Untersuchungen zur Entwicklung der-

artiger kernloser Pollenschläuche bei *Tradescantia* wurden eingeleitet.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde festgestellt, daß der vegetative Kern zum Zeitpunkt der Teilung des generativen Kerns in die beiden Spermkerne noch vorhanden ist. Seine vollständige Degeneration erfolgt also erst nach Abschluß der Teilung des generativen Kerns. Verglichen mit verschiedenen anderen näher untersuchten Pflanzenarten, deren reifer Pollen zweikernig ist, erfolgt die Degeneration des vegetativen Kerns bei *Tradescantia* relativ spät im Verlauf der Pollenschlauchentwicklung. Bei einem weiteren näher untersuchten Objekt, Mutanten von *Petunia hybrida*, konnte durch quantitative Analysen nachgewiesen werden, daß der vegetative Kern bei einem Teil der reifen Pollenkörner bereits vollständig degeneriert, bei einem anderen Teil der Pollenkörner jedoch zum Zeitpunkt der Teilung des generativen Kerns noch unversehrt erhalten ist (Hesemann, 1971). Nach den bisherigen, noch nicht abgeschlossenen eigenen Untersuchungen an Pollenkörnern des Usambara-Veilchens scheinen die Verhältnisse denjenigen von *Petunia* insofern zu entsprechen, daß auch bei dieser Art zumindest bei einem großen Teil der Pollenkörner der vegetative Kern mit der Feulgen-Färbung nicht mehr nachgewiesen werden kann. Bei anderen Arten hingegen, von denen allerdings nur reife Pollenkörner und keine Pollenschläuche bezüglich des Vorhandenseins des vegetativen Kerns analysiert wurden, ergibt sich aus den Untersuchungen, daß der vegetative Kern zum Zeitpunkt der Pollenreife wie im Falle *Tradescantia* noch nicht degeneriert ist. Es wurde von Jalouzot (1969) bei *Lilium candidum* nachgewiesen, daß bezüglich der Erhaltung des vegetativen Kerns im reifen Pollenkorn zumindest ähnliche Verhältnisse wie bei *Tradescantia* vorliegen. Im reifen Pollenkorn ist der vegetative Kern noch vollständig erhalten. Aus den begonnenen eigenen Untersuchungen bei *Vicia faba* scheint ebenfalls hervorzugehen, daß bei Pollenreife der vegetative Kern noch nicht degeneriert ist. Man muß folglich Brewbaker (1967) zustimmen, wenn er den Standpunkt vertritt, daß die Verhältnisse bei *Tradescantia* nicht auf alle Arten mit reifen zweikernigen Pollenkörnern übertragen werden können. Andererseits wird die Ansicht von Brewbaker nicht geteilt, daß *Tradescantia* bezüglich der langen Erhaltung des vegetativen Kerns einen Ausnahmefall darstelle. Zur Stützung seiner Annahme führt Brewbaker an, daß bei 58,3% von 602 untersuchten zweikernigen Arten in Pollenkörnern nach Karminessigsäurefärbung keine vegetativen Kerne nachgewiesen werden konnten. Es kann jedoch bei diesen Angaben von Brewbaker in Frage gestellt werden, ob die untersuchten Arten einen echten repräsentativen Querschnitt widerspiegeln. Zweitens treten Zweifel darüber auf, ob bei der angewandten Färbetechnik in allen Fällen eindeutig entschieden werden konnte, daß der vegetative Kern bereits vollständig degeneriert war. Aus

den genannten Gründen kann die Argumentation von Brewbaker (1967) nicht überzeugen, zumal wenn man bedenkt, daß bisher nur sehr wenige Pflanzenarten in dieser Hinsicht einer zuverlässigen qualitativen und/oder quantitativen Analyse, z. B. nach Anfärbung der Kerne mit Hilfe der Feulgen-Färbung, unterzogen worden sind. Die bisherigen noch sehr lückenhaften Befunde erlauben noch keinen schlüssigen Beweis, daß bei den Pflanzenarten mit bei Reife zweikernigen Pollenkörnern bis auf Ausnahmefälle wie *Tradescantia* der vegetative Kern sehr frühzeitig im Verlaufe der Entwicklung des männlichen Gametophyten, in den meisten Fällen schon im heranreifenden Pollenkorn, degeneriert. Im Gegensatz zu den von Brewbaker aufgestellten Behauptungen wird die Annahme vertreten, daß die Degeneration des vegetativen Kerns je nach Pflanzenart zu einem recht verschiedenen Zeitpunkt in der Entwicklung des männlichen Gametophyten ablaufen kann. Diese Annahme wird durch die oben angeführten Befunde der wenigen bezüglich des Zeitpunktes der Degeneration des vegetativen Kerns näher untersuchten Pflanzenarten gestützt: bei *Tradescantia*, *Lilium* und wahrscheinlich auch *Vicia faba* einerseits findet man im Stadium der Pollenreife noch unversehrte vegetative Kerne vor. Andererseits wurden Pflanzenarten analysiert, bei denen nach den cyto-morphologischen, aber wie bereits oben erläutert, vermutlich nicht in allen Fällen zuverlässigen Befunden von Brewbaker alle oder wie im Falle des oben angeführten Usambara-Veilchens mit großer Wahrscheinlichkeit zumindest ein Teil der reifen Pollenkörner keine vegetativen Kerne mehr enthält. Bei *Petunia*-Formen, einem gut untersuchten Objekt, findet man alle Übergänge bezüglich des Stadiums der Degeneration des vegetativen Kerns: die Skala reicht von Pollenkörnern, die bei Reife keinen vegetativen Kern mehr enthalten, bis zu Pollenschläuchen, bei denen zum Zeitpunkt der Teilung des generativen Kerns in die Spermakerne der vegetative Kern noch keine Degeneration erfahren hat. Eingehende Analysen von Pflanzenarten, bei denen in allen reifen Pollenkörnern keine vegetativen Kerne mehr nachgewiesen werden können, sind bisher noch nicht erfolgt.

Vor das Stadium der Degeneration des vegetativen Kerns kann eine Phase der DNS-Replikation desselben geschaltet sein. In Abhängigkeit von der Pflanzenart kann der vegetative Kern im Verlauf der Entwicklung des männlichen Gametophyten vor seiner Degeneration eine vollständige oder partielle DNS-Replikation erfahren oder aber dieselbe kann auch ganz unterbleiben. Die verschiedenen Möglichkeiten, in welchem Umfang die DNS-Replikation des vegetativen Kerns je nach Objekt realisiert wird, sollen hier jedoch nicht im einzelnen erörtert werden. Es wird auf die Arbeit von Hesemann (1973) verwiesen.

Auf Grund dieser bisherigen, noch sehr lückenhaften Befunde über Degeneration und DNS-Replika-

tion des vegetativen Kerns im Verlauf der Pollenkorn- und Pollenschlauchbildung bei Pflanzenarten mit zweikernigem Pollen wird die folgende Hypothese zur Diskussion gestellt. Bei der Weiterentwicklung des männlichen Gametophyten ist der vegetative Kern im Verlauf der Evolution der Angiospermen einem fortschreitenden Reduktionsprozeß unterworfen. Bei den fortgeschrittenen Arten wird der Zeitpunkt der Degeneration des vegetativen Kerns während der Pollenkorn- und Pollenschlauchentwicklung immer weiter vorverlegt. Eine zweite, nicht synchron mit der ersten verlaufende Entwicklungstendenz ist bei der DNS-Replikation des vegetativen Kerns zu bemerken. Bei „primitiven“ Arten läuft eine vollständige DNS-Replikation beim vegetativen Kern ab, bei den übrigen Formen findet nur noch eine partielle oder keine DNS-Replikation statt. Der Reduktionsprozeß, dem der vegetative Kern im Verlaufe der Evolution der Angiospermen durch Vorverlegung der Degenerationsphase in ein immer früheres Stadium der Pollenentwicklung und durch allmählichen Verlust der Fähigkeit zur DNS-Replikation unterworfen ist, steht in direktem Zusammenhang zur Reduktion der Funktion, welche die gesamte vegetative Zelle während des Evolutionsgeschehens erfahren hat. Diese Zelle teilt sich bei der normalen Pollenkorn- und Pollenschlauchbildung nicht mehr. Nur in Ausnahmefällen, wie der Erzeugung von haploiden Pflanzen aus Antheren, kann man beobachten, daß die vegetative Zelle in Teilungen eintritt. Bei der Entwicklung des männlichen Gametophyten jedoch ist die Aufgabe der vegetativen Zelle vornehmlich darauf beschränkt, einen Pollenschlauch von einer Länge auszubilden, der den beiden Spermakernen die Befruchtung ermöglicht.

### 5. Zusammenfassung

Pollenkörner von *Tradescantia paludosa* wurden in künstlicher Nährlösung zum Auskeimen und zur Bildung von Pollenschläuchen gebracht. Von diesen Pollenschlauchkulturen wurden Stichproben entnommen und analysiert, nach welcher Wuchszeit der Pollenschläuche die generativen Kerne die Teilung in die Spermakerne vornehmen. Zugleich wurden bei einigen Stichproben, die nach unterschiedlichen Wuchszeiten fixiert worden waren, die Längen der Pollenschläuche bestimmt.

Es konnte nachgewiesen werden, daß bei *Tradescantia paludosa* der Zeitpunkt der Teilung des generativen Kerns in die beiden Spermakerne von der Länge des Pollenschlauchs abhängig ist.

Zum Zeitpunkt der Teilung des generativen Kerns ist bei der Mehrzahl der Pollenschläuche der vegetative Kern noch nicht degeneriert.

Bei den Pollenschlauchkulturen von *Tradescantia paludosa* konnten in allen Stichproben kernlose Pol-

lenschläuche festgestellt werden. Ihr Anteil betrug je nach Stichprobe 11–22%.

Im Diskussionsteil wird erstens darzulegen versucht, daß die erhaltenen Befunde über den Zeitpunkt der Teilung des generativen Kerns mit den übrigen bisher bekannten Ergebnissen über die Bildung des Pollenkorns und Pollenschlauches in Einklang stehen. Die Entwicklung des männlichen Gametophyten der Angiospermen läßt sich in eine Reihe von Stadien gliedern, die man, wie bei den vorliegenden Untersuchungen mit cyto-morphologischen und in anderen Fällen auch mit Hilfe cyto- sowie biochemischer Methoden gegeneinander abgrenzen konnte. Zweitens wird in diesem Abschnitt auf Grund der bisher bekannt gewordenen Befunde die Hypothese diskutiert, daß sich im Verlauf der Evolution der Angiospermen in wiederholten Fällen, wahrscheinlich meistens unabhängig voneinander, Arten herausgebildet haben, bei denen die Degenerationsphase des vegetativen Kerns immer weiter in die Frühentwicklung des männlichen Gametophyten vorverlegt wurde und/oder die DNS-Replikation des vegetativen Kerns nur noch partiell oder gar nicht mehr erfolgte.

Mein Dank gilt Herrn Dr. A. Lundquist, Lund, Schweden, für die Überlassung des Pflanzenmaterials, Herrn Prof. Dr. F. Mechelke für die Anregung zu diesem Themenkreis und Fräulein H. Nagel für gute technische Unterstützung.

Eingegangen am 17. Januar 1972

Angenommen durch F. Mechelke

#### Literatur

1. Brewbaker, J. L.: The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the Angiosperms. *Am. J. Bot.* **54**, 1069–1083 (1967). —
2. Hesemann, C. U.: Untersuchungen zur Pollenentwicklung und Pollenschlauchbildung bei höheren Pflanzen. I. Quantitative Bestimmungen des DNS-Gehalts generativer und vegetativer Kerne in Pollenkörnern und Pollenschläuchen von *Petunia-hybrida*-Mutanten. *Theoret. Appl. Genetics* **41**, 338–351 (1971). — 3. Hesemann, C. U.: Untersuchungen zur Pollenentwicklung und Pollenschlauchbildung bei höheren Pflanzen. II. Analyse der Beziehungen zwischen Zeitpunkt der Einwanderung von generativem und vegetativem Kern und Länge des Pollenschlauchs bei *Tradescantia paludosa*. *Flora* (1972a, im Druck). — 4. Hesemann, C. U.: Untersuchungen zur Pollenentwicklung und Pollenschlauchbildung bei höheren Pflanzen. III. DNS-Replikation bei vegetativen und Sperma-Kernen in reifen Pollenkörnern von Gerste. *Theor. Appl. Gen.* **43**, 232–241 (1973). — 5. Hesemann, C. U.: Untersuchungen zur Pollenentwicklung und Pollenschlauchbildung bei höheren Pflanzen. IV. Pollenschläuche mit und ohne nachweisbare Kerne bei *Petunia*. Veröffentlichung in Vorbereitung. — 6. Jalouzot, R.: Différenciation nucléaire et cytoplasmique du grain de pollen de *Lilium candidum*. *Exptl. Cell Res.* **55**, 1–8 (1969). — 7. Maheshwari, P.: The male gametophyte of angiosperms. *Bot. Rev.* **15**, 1–75 (1949). — 8. Mephram, R. H., Lane, G. R.: Observations on the fine structure of developing microspores of *Tradescantia bracteata*. *Protoplasma* **70**, 1–20 (1970). — 9. Woodard, J. W.: Intracellular amounts of nucleic acids and protein during pollen grain growth in *Tradescantia*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 383–390 (1958).

Dr. C. U. Hesemann  
Lehrstuhl für Allgemeine Genetik  
der Universität Hohenheim  
Kirchnerstr. 7  
D-7 Stuttgart 70 (Germany/BRD)