

Das Pollenschlauch-Wachstum von *Pisum*-Mutanten unter Berücksichtigung der freien Aminosäuren

G. JAHR und W. GOTTSCHALK

Institut für Genetik der Universität Bonn (BRD)

The Pollen Tube Growth of *Pisum* Mutants under consideration of the Free Amino Acids

Summary. The germination of the pollen grains and the growth rate of the pollen tubes of eight mutants of *Pisum sativum* were compared with the parent line by in vitro investigations. All of the mutants studied showed a retardation of pollen tube growth as compared to the parent line, resulting in competitive elimination of some of the gametes in plants heterozygous for the respective mutant genes. The deficit of recessive plants in the progenies of heterozygous mutant strains of peas can be attributed to this retardation. Marked differences between the various mutants with regard to the levels of various free amino acids in their pollen grains were found. Certain amino acids may be present in greatly reduced concentration or may be present in excess. In some genotypes pollen tube growth can be stimulated by adding the deficient amino acid. This is especially true for proline, valine and threonine. As far as the other amino acids are concerned, the mutants studied showed varying reactions. The germination rate of the pollen grains is reduced by proline and threonine; germination is completely inhibited by glutamine. The amino acids isoleucine, histidine and cysteine retard pollen tube growth in all the mutants investigated. This is also true for leucine which, however, has a stimulating effect in one of the chlorophyll mutants.

Einleitung

Das Pollenschlauch-Wachstum ist ein empfindlicher physiologischer Vorgang, der in einer biochemischen Wechselwirkung zum Narben- und Griffelgewebe steht und von zahlreichen Genen gesteuert wird. Bei heterozygot-mutierten Organismen können Differenzen in der Wachstumsgeschwindigkeit der Schläuche verschiedener genetischer Konstitution zu unterschiedlichen Befruchtungschancen der Gameten führen, die sich auf das Spaltungsverhältnis in den Nachkommenschaften der betreffenden Pflanzen auswirken. Dieses Phänomen wird als Certation bezeichnet und ist vornehmlich an *Oenothera* (Renner 1919, 1921, Heribert-Nilsson 1920, Hiorth 1926, Harte 1948, 1952, 1953), aber auch an *Datura* (Sirks 1926), *Melandrium* (Correns 1917) und anderen Objekten bearbeitet worden. Das Pollenschlauch-Wachstum kann zwar unter dem Einfluß mutierter Gene verändert werden (Hiorth 1926, Emerson 1931, Buchholz und Blakeslee 1936), die Wachstumsgeschwindigkeit ist jedoch als Ergebnis aller positiv und negativ wirkenden Gene aufzufassen, die im Pollenkorn vorhanden sind (Harte 1953). Die eben erwähnten Abweichungen von den Erwartungswerten monomerer Erbgänge treten bei zahlreichen Mutanten in Form eines schwach oder sehr stark ausgeprägten Rezessivendefizits in Erscheinung. Es ist kaum anzunehmen, daß dieser übereinstimmende Effekt im Pleiotropiespektrum einer so großen Anzahl verschiedener Gene begründet ist; wir müssen vielmehr nach einer Interpretation suchen, die die Spezifität der Genwirkung unberücksichtigt läßt. Eine fast allen

Mutanten gemeinsame Eigenart liegt in der Herabsetzung ihrer Vitalität und Fertilität gegenüber der nichtmutierten Ausgangsform, die ebenfalls in keinem kausalen Zusammenhang mit der spezifischen Wirkung der mutierten Gene auf die Organgestaltung oder auf andere Eigenschaften des Organismus steht. Wenn wir diese Herabsetzung der Vitalität auf die physiologische Leistungsfähigkeit von Pollenschläuchen mit mutierten Genen übertragen, so ist eine Herabsetzung des Pollenschlauch-Wachstums zu erwarten, die in den Nachkommenschaften heterozygot-mutierter Pflanzen zum Rezessivendefizit führen müßte. Diese Arbeitshypothese liegt unseren Untersuchungen zugrunde.

Die unterschiedliche physiologische Leistung der Pollenschläuche von Mutanten könnte auf eine verschiedenartige Ausstattung der Pollenkörner mit „Reservestoffen“ zurückzuführen sein. Derartige Substanzen, die während der Keimung und des Pollenschlauch-Wachstums eine wichtige Rolle spielen, sind von zahlreichen Autoren qualitativ und quantitativ bestimmt worden. Dies gilt für Stärke, Saccharose und Glucose (Kiesel und Rubin 1929, Elser und Ganzmüller 1930), Maltose und reduzierende Zucker (Anderson und Kulp 1922, Linskens 1955, Bellartz 1956, Hrabetova und Tupy 1963), Lipide (Heyl 1922), Enzyme (Haeckel 1951, Linskens 1966) und Proteine (Linskens 1958). Eine wesentliche Rolle scheint in diesem Zusammenhang den freien Aminosäuren zuzukommen (Bathurst 1954, Bellartz 1956, Tupy 1961, 1963, 1964, Britikov *et al.* 1964, Linskens und Tupy 1966). Tupy (1963) hat bei verschiedenen

Apfelsorten eine Korrelation zwischen der Pollenfertilität und dem Prolin-Histidin-Gehalt im Pollen nachgewiesen. Auch der große Anteil an Prolin, der von Britikov *et al.* (1964) im Pollen zahlreicher Pflanzenarten gefunden wurde, weist auf die Bedeutung dieser Aminosäure für das Pollenschlauch-Wachstum hin. Beim Mais wurden für Alanin und Asparagin Unterschiede zwischen Individuen verschiedener genotypischer Konstitution bekannt (Khoo und Stinson 1957).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Pollenkeimung und das Pollenschlauch-Wachstum verschiedener Erbsenmutanten zu studieren und festzustellen, ob bestimmte Korrelationen zwischen der Wachstumsleistung und der Ausstattung des Pollens mit freien Aminosäuren bestehen. Außerdem sollte festgestellt werden, wie die Pollenschläuche der Mutanten auf die Zugabe freier Aminosäuren zum Nährmedium reagieren und ob sich gewisse Mangelerscheinungen hierdurch ausgleichen lassen.

Material und Methode

Für die Untersuchungen wurden 8 röntgeninduzierte Mutanten der Sorte 'Dippes gelbe Viktoria' von *Pisum sativum* verwendet (Tab. 1). Die betreffenden Genotypen werden seit Jahren in Form homozygoter Linien am Institut kultiviert; sie zeigen sowohl im Hinblick auf ihre Spaltungsverhältnisse als auch die Samenproduktion starke Unterschiede (Einzelheiten hierüber bei Gottschalk 1964).

Die Pollen wurden an Freilandmaterial aus geschlossenen Blüten in einem Stadium gesammelt, in dem sie den Pollensack gerade verlassen hatten. In diesem Stadium zeigen sie ein optimales Verhalten im Hinblick auf Keimung und Pollenschlauch-Wachstum. Als Nährmedium wurde eine wäßrige Lösung von 30% Saccharose und 1% Agar-Agar unter Zusatz von 0,001% Borsäure verwendet. Die Nährlösung wurde vor jedem Versuch frisch bereitet, in Petrischalen ausgegossen und in Form kleiner Scheiben von 1,5 mm Dicke auf Objektträger übertragen. Nach dem Aufstäuben des Pollens wurden die Objektträger im Exsikkator bei 25 °C und konstanter relativer Luftfeuchtigkeit aufbewahrt. Das Wachstum der Pollenschläuche wurde 3, 6 und 12 Stunden nach Versuchsbeginn photographisch festgehalten und anhand der Vergrößerungen ausgewertet. Da sich die Pollen bei der Keimung und beim Wachstum gegenseitig beeinflussen können (Branscheidt 1930, Kuhn 1937, Schmucker 1935, Visser 1955), wurden für die Auswertung nur jene Areale berücksichtigt, in denen die Pollen in einer optimalen räumlichen Entfernung voneinander lagen.

Für die Ermittlung der empirischen Befunde wurden folgende Kriterien ausgewertet: die Keimungsrate und -geschwindigkeit der Pollen, die Geschwindigkeit des Pollenschlauch-Wachstums sowie die Gesamtlänge der Schläuche bei Abschluß des Versuchs.

Um den Einfluß freier Aminosäuren auf die Keimung und das Pollenschlauch-Wachstum zu prüfen, wurde dem Nährmedium jeweils eine 0,02%ige Lösung folgender gut wasserlöslicher Aminosäuren zugesetzt: Alanin, Asparagin, Cystein, Glutamin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Prolin, Serin, Threonin und Valin. Darüber hinaus wurden die freien Aminosäuren der Ausgangsform sowie aller Mutanten papierchromatographisch bestimmt. Hierzu wurden von jedem Genotypus die Pollen von 20 bis 50 Blüten gleicher Entwicklungsstadien zu einer Probe vereinigt, nach Bestimmung des Frischgewichts bei 0 °C mit 70%igem Äthylalkohol zerrieben (Tupy 1961) und

anschließend zentrifugiert (7000/min). Das Überstehende wurde bei -20 °C aufbewahrt. Die quantitative Bestimmung der freien Aminosäuren erfolgte nach chromatographischer Auftrennung (Heilmann *et al.* 1957) im Spektralphotometer nach Linskens (1958) bei 504 nm. Prolin wurde nach Isantinfärbung bei 610 nm gemessen (Hrabetova und Tupy 1960).

Die empirischen Befunde

1. Pollenkeimung und Pollenschlauch-Wachstum ohne Aminosäure-Zusatz

Die Keimung der Pollenkörner erfolgte 20 bis 30 Minuten nach dem Auftragen auf das Nährmedium; später wurden keine Keimungen mehr beobachtet. Alle für unsere Untersuchungen verwendeten Mutanten verhielten sich in dieser Beziehung wie die Ausgangsform, es war also kein Einfluß der mutierten Gene auf die Keimgeschwindigkeit nachweisbar. Auffällenderweise wurden für die Keimungsrate, also den prozentualen Anteil der gekeimten Pollen, bei den meisten Genotypen ähnliche Ergebnisse erhalten; sie sind in Abb. 1 graphisch dargestellt. Die Mutanten 58C, 445A, 1206A und 138 zeigen große Schwankungen, die möglicherweise auf geringfügige physiologische Unterschiede der Pollen zurückzuführen sind. Die aus der Abbildung ersichtlichen Differenzen zwischen den Genotypen 3, 138, 1206A und 94A gegenüber der Ausgangsform sind signifikant. Die Mutanten sind in der Reihenfolge abnehmender Samen-erträge angeordnet. Während sich die Genotypen 58C und 39 in der Samenproduktion und damit in einem der wesentlichsten Kriterien für die Beurteilung des Selektionswerts mutierter Gene nicht vom Kontrollmaterial unterscheiden, zeigen die Chlorophyllmutanten 1206A und 138 sehr geringe Erträge. Im Hinblick auf den Gesamtchlorophyllgehalt erreichen sie nur Werte von 53 bzw. 69% der Ausgangsform (Gottschalk und Müller 1964), ihre geringe Kapazität wird also teilweise auf die eingeschränkte

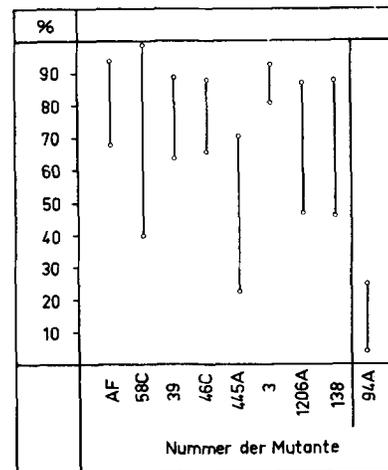


Abb. 1. Die Streuung der Keimungsraten der Pollen der Ausgangsform und einiger Mutanten von *Pisum*. Von jedem Genotypus wurden 9 Wiederholungen mit jeweils 300 Pollenkörnern ausgewertet

Tab. 1. Die Spaltungsverhältnisse und der Fertilitätsgrad der in der Arbeit verwendeten Mutanten

Nr. der Mutante	Abweichung gegenüber der Ausgangsform	Gesamtspaltung	prozentualer Anteil der Mutanten in spaltenden Familien (*)	Grad der Abweichung von der 3:1-Spaltung (**)	Samenproduktion in % der Vergleichswerte der Stammform in mehreren Generationen
1206A	Chlorophyllmutante, kein Chlorophyll b vorhanden	1717:184	9,5	+++	36—49
138	kleinblättrige, graugrüne Chlorophyllmutante	101:12	10,6	+++	23—35
3	Chlorophyllmutante	235:36	13,3	+++	51—64
94A	Blütenmutante mit Anomalien in den Geschlechtsorganen	250:78	23,8	—	22—73
46C	Frühreife	238:86	26,5	—	59—104
445A	Wachslosigkeit	189:72	27,6	—	70—85
39	geringfügige Abweichung in der Fiederform	nur homozygot vorhanden	—	—	89—113
58C	schwacher Chlorophylldefekt	nur homozygot vorhanden	—	—	90—119

(*) ohne Berücksichtigung der Spaltungen in der M₂-Generation, die durch die Chimärennatur der M₁-Pflanzen verfälscht sein können.

(**) Es bedeuten: —: Abweichung von der 3:1-Spaltung nicht signifikant; +++: Abweichung signifikant, $P < 0,001$.

Tab. 2. Der Gehalt an freien Aminosäuren im Pollen der Normalform und 8 Mutanten von *Pisum sativum* (Menge in µg/mg frischen Pollens)

Genotypus	Glutamin	Asparagin	Glycin	Threonin	Alanin	Valin	Leucin + Isoleucin	Prolin
Ausgangsform	1,4 ± 0,09	0,7 ± 0,05	0,6 ± 0,04	1,0 ± 0,05	1,0 ± 0,07	0,8 ± 0,05	0,9 ± 0,03	13,5 ± 0,50
Mutante 3	0,6 ± 0,05	1,4 ± 0,08	1,2 ± 0,09	0,8 ± 0,06	2,0 ± 0,12	0,6 ± 0,05	0,8 ± 0,04	11,5 ± 0,50
Mutante 39	1,3 ± 0,08	0,6 ± 0,04	0,5 ± 0,05	0,6 ± 0,04	1,0 ± 0,08	0,8 ± 0,04	0,8 ± 0,05	12,3 ± 0,75
Mutante 46C	0,6 ± 0,07	1,0 ± 0,08	1,1 ± 0,09	0,8 ± 0,05	2,0 ± 0,10	0,4 ± 0,03	0,9 ± 0,03	12,3 ± 0,55
Mutante 58C	1,3 ± 0,08	1,1 ± 0,09	0,5 ± 0,04	1,2 ± 0,09	2,5 ± 0,15	0,6 ± 0,05	0,6 ± 0,04	16,6 ± 1,10
Mutante 94A	1,8 ± 0,07	1,1 ± 0,09	1,0 ± 0,07	1,5 ± 0,09	2,0 ± 0,10	1,6 ± 0,09	2,1 ± 0,09	9,8 ± 0,60
Mutante 138	2,0 ± 0,09	1,1 ± 0,08	0,9 ± 0,07	1,4 ± 0,10	2,5 ± 0,12	0,6 ± 0,05	0,7 ± 0,05	12,3 ± 0,60
Mutante 445A	0,9 ± 0,07	0,7 ± 0,06	0,6 ± 0,04	0,7 ± 0,06	3,0 ± 0,11	0,6 ± 0,05	0,8 ± 0,04	13,5 ± 0,60
Mutante 1206A	0,9 ± 0,07	0,7 ± 0,07	0,6 ± 0,06	0,6 ± 0,05	0,8 ± 0,06	0,6 ± 0,04	0,4 ± 0,03	7,0 ± 0,40

Photosyntheseleistung zurückzuführen sein. Sie wirkt sich nicht auf die Keimfähigkeit der Pollen aus.

Eine Sonderstellung nimmt die Blütenmutante 94A ein, deren Pollen eine sehr schlechte Keimfähigkeit aufweist. Das rezessive Gen wird erst während der Ausdifferenzierung des Vegetationskegels zur Blüte wirksam und hat eine eigenartige Anomalie der Geschlechtsausprägung zur Folge. Die äußeren beiden Glieder des Staubfadenrohres werden teilweise mit in den Fruchtblatt-Kreis einbezogen und erlangen dadurch eine sexuelle Doppelnatur: sie sind an der Außenflanke männlich, an der Innenflanke weiblich determiniert. Der Fruchtknoten ist normal gestaltet, die Mikrosporogenese verläuft störungsfrei. Trotzdem ist die Samenproduktion dieser Mutante außerordentlich gering. Dies ist offensichtlich auf den geringen Keimungsgrad der Pollen sowie auf das stark herabgesetzte Pollenschlauch-Wachstum zurückzuführen.

Zur Ermittlung des Pollenschlauch-Wachstums wurde die Länge der Schläuche bei allen Mutanten in Abständen von 3, 6 und 12 Stunden nach der Aussaat gemessen und auf die Vergleichswerte der Ausgangsform bezogen. Da sich unter den gegebenen Kulturbedingungen nach Ablauf von 12 Stunden keine weitere Längenzunahme der Schläuche nachweisen ließ, wurden die Versuche einheitlich nach 12 Stunden abgebrochen. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt. Das Material läßt sich in 4 verschiedene Gruppen aufgliedern. Zunächst ist festzustellen, daß keine der geprüften Mutanten die Intensität des Pollenschlauch-Wachstums der Stammform erreicht. Die geringste Abweichung tritt bei der Mutante 39 auf, einer typischen „Kleinmutante“ im

Sinne von Gaul (1965), die auch im Hinblick auf ihre Vitalität und Samenproduktion mit der Stammform vergleichbar ist. Die zweite Gruppe setzt sich aus den Chlorophyllmutanten 58C, 138 und 1206A zusammen. Die Wachstumsleistung ihrer Pollenschläuche weicht während der ersten drei Stunden nicht von derjenigen des Kontrollmaterials ab, anschließend tritt jedoch ein deutlicher Abfall ein. Die dritte Gruppe (Mutanten 3, 46C, 445A) zeigt von Anfang an eine geringere Wachstumsintensität; nach Abschluß des Versuchs werden Längen erreicht, die denen der zweiten Gruppe entsprechen. Die Mutante 94A schließlich, die schon im Hinblick auf die Keimungsrate stark von allen übrigen Formen abweicht, zeigt auch im Pollenschlauch-Wachstum ein sehr ungünstiges Verhalten: Es werden Gesamtlängen erreicht, die unterhalb von 50% der Vergleichswerte der Stammform liegen. Der aus der Mutationsforschung allgemein bekannte negative Selektionswert mutierter Gene, der sich in einer Einschränkung der Lebensleistung und des Fortpflanzungsdruckes der überwiegenden Mehrzahl aller Mutanten äußert, wird also auch beim Pollenschlauch-Wachstum erkennbar, während er im Keimverhalten der Pollen nicht in Erscheinung tritt.

2. Die freien Aminosäuren der Pollen

Mit Hilfe papierchromatographischer Methoden sollte festgestellt werden, ob sich die Mutanten im Hinblick auf die freien Aminosäuren ihrer Pollen qualitativ oder quantitativ voneinander und gegenüber der Ausgangsform unterscheiden. Im Versuchsmaterial konnten insgesamt 12 Aminosäuren nachgewiesen werden. Außerdem trat eine weitere blaugefärbte, ninhydrinpositive Substanz auf, die mit Hilfe der zugegebenen Aminosäuren nicht identifiziert werden konnte. Für *Petunia*-Pollen sind derartige Substanzen ebenfalls bekannt (Linskens 1955). Histidin, Lysin und Serin lagen in so geringen Mengen vor, daß sie nicht quantitativ erfaßt werden konnten. Leucin und Isoleucin ließen sich mit der angewendeten Methode nicht trennen, sie wurden daher gemeinsam quantitativ bestimmt.

Die Ergebnisse der papierchromatographischen Analysen sind in Tab. 2 zusammengestellt. Aus der Tabelle geht hervor, daß die freien Aminosäuren ungefähr 2% des Frischgewichts der Pollen ausmachen. Der Mittelwert der Mehrzahl aller geprüften Genotypen liegt in dieser Größenordnung. Der Wert für die Chlorophyllmutante 58C liegt deutlich höher, während die Pollen der Mutante 1206A eine auffallend geringe Menge freier Aminosäuren besitzen. Das Spektrum der Aminosäuren weicht in qualitativer Beziehung bei keiner der untersuchten Mutanten von demjenigen der Stammform ab, es sind jedoch sehr gravierende Unterschiede im mengenmäßigen Anteil der einzelnen Aminosäuren feststellbar. Die geringste Abweichung zeigt wiederum die Kleinmutante 39: Sie besitzt weniger Threonin, während die Menge aller übrigen Aminosäuren der bei der Ausgangsform reali-

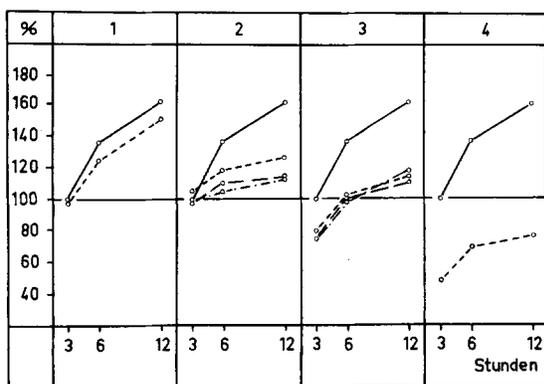


Abb. 2. Das Pollenschlauch-Wachstum der Mutanten innerhalb von 12 Stunden, bezogen auf den 3-Stunden-Wert der Ausgangsform = 100%.

- | | |
|-----------------------|----------------|
| 1. Gruppe: | 3. Gruppe: |
| (von oben nach unten) | — Ausgangsform |
| — Ausgangsform | — Mutante 3 |
| — Mutante 39 | — Mutante 445 |
| 2. Gruppe: | — Mutante 46C |
| — Ausgangsform | 4. Gruppe: |
| — Mutante 58C | — Ausgangsform |
| — Mutante 138 | — Mutante 94A |
| — Mutante 1206A | |

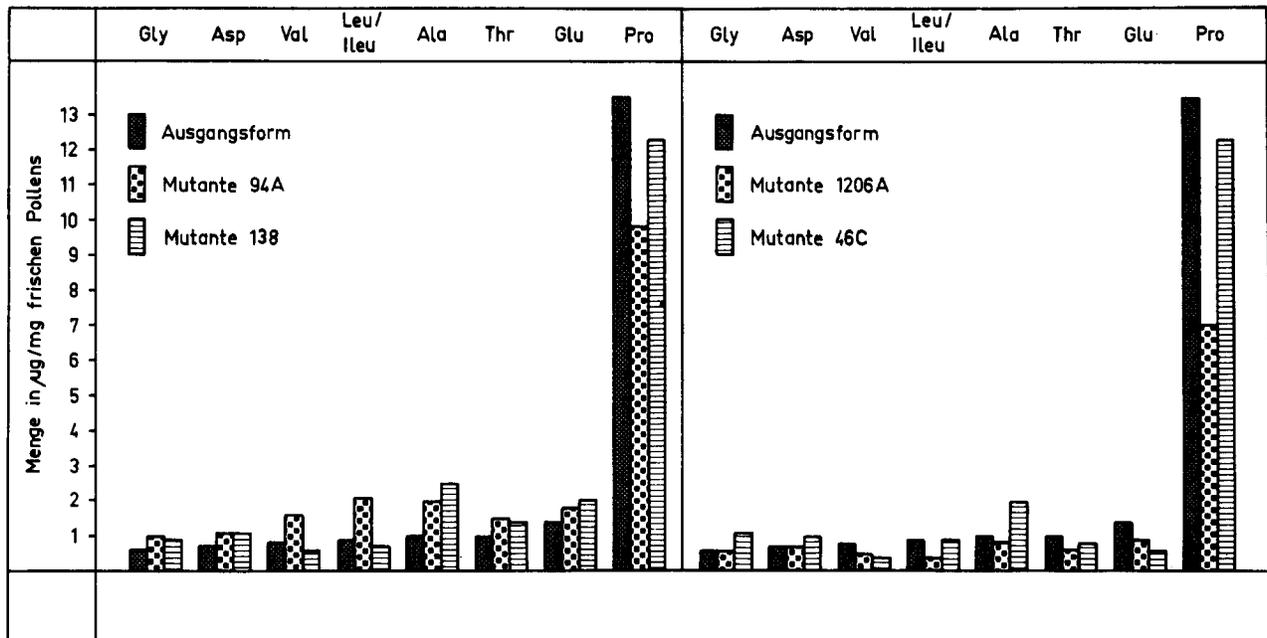


Abb. 3. Der mengenmäßige Anteil verschiedener Aminosäuren im Pollen der Ausgangsform sowie der Mutanten 94A, 138, 1206A und 46C

sierten Situation entspricht. Die stärksten Abweichungen finden sich bei den Mutanten 138 und 94A, bei denen sich die Genwirkung auf jeweils 8 Aminosäuren bezieht. Einzelheiten können der Tabelle entnommen werden. Ein Teil der Befunde ist in Abb. 3 graphisch dargestellt, dadurch kommen die zwischen den Genotypen realisierten Unterschiede wesentlich deutlicher zum Ausdruck. So bildet die Blütenmutante 94A von allen berücksichtigten Aminosäuren größere Mengen als die Ausgangsform, lediglich der Prolingehalt ihrer Pollen liegt auffallend niedrig. Bei der Mutante 1206A liegen alle Werte unterhalb der Kontrollwerte oder erreichen sie bestenfalls, während die Mutanten 138 und 46C keine allgemeingültige Tendenz erkennen lassen: einige Aminosäuren werden in erhöhter, andere in verminderter Menge produziert. Das *Prolin* nimmt wegen seines hohen Anteils am Gesamtgehalt der freien Aminosäuren eine Sonderstellung ein. Der Prolingehalt schwankt bei den verschiedenen Genotypen zwischen 0,7% (Mutante 1206A) und 1,6% (Mutante 58C) der Gesamtmenge der freien Aminosäuren im Pollen.

3. Keimung und Pollenschlauch-Wachstum nach Zusatz von Aminosäuren

Aus Untersuchungen an *Malus*, *Zea* und *Nicotiana* haben sich deutliche Beziehungen zwischen der Pollenfertilität und dem Gehalt der Pollen an freien Aminosäuren, besonders an Prolin, ergeben (Khoo und Stinsan 1957, Tupy 1961, 1963). Wie aus Tab. 2 ersichtlich ist, tritt bei einigen unserer Mutanten ein Mangel an Prolin, Valin, Threonin und Glutamin auf. Wir haben das Pollenschlauch-Wachstum dieser Ge-

notypen nach Zugabe der betreffenden Aminosäuren geprüft und haben auch in dieser Beziehung deutliche Unterschiede in der Reaktion der verschiedenen Mutanten gefunden.

a. Die Keimung der Pollen. Ein Zusatz der Aminosäuren *Glutamin*, *Histidin* und *Cystin* in Form 0,02%iger Lösungen zum Nährmedium hatte sowohl bei der Ausgangsform als auch bei allen Mutanten eine völlige Sistierung des Pollenschlauch-Wachstums zur Folge. Die übrigen Aminosäuren hatten keinen Einfluß auf die Keimgeschwindigkeit der Pollen. Lediglich für *Isoleucin* konnte ein Stimulations-effekt nachgewiesen werden: Die ersten Auskeimungen erfolgten bei allen Genotypen bereits nach 10 Minuten, während die Keimung in allen übrigen Fällen nach 20 Minuten einsetzte. Im Hinblick auf die Keimungsrate waren die Befunde nicht so einheitlich. Einige der angebotenen Aminosäuren verursachten bei bestimmten Mutanten eine Erhöhung, bei anderen Genotypen eine Herabsetzung der Anzahl gekeimter Pollen, wobei sich für die betreffenden Aminosäuren unterschiedliche Wirkungen ergaben. Tab. 3 gibt einen Überblick über unsere Befunde. Alle Angaben sind auf die Keimungsrate der jeweiligen Genotypen auf einem Nährmedium ohne Aminosäure-Zusatz bezogen. Die Rate der Ausgangsform wird durch Zugabe von *Asparagin*, *Leucin* und *Valin* nicht verändert, wird jedoch durch *Prolin* und *Glycin* herabgesetzt. Die Blütenmutante 94A reagiert sehr viel stärker auf die Substanzen, und zwar ausschließlich in negativer Weise, während die Kleinmutante 39 auch in dieser Beziehung wieder eine sehr geringe Reaktion zeigt. Eine Erhöhung der Keimungsrate

Tab. 3. Die Keimungsrate der Pollen der Ausgangsform und einiger Mutanten auf Nährmedien mit Aminosäure-Zusatz

Zugegebene Aminosäure	Ausgangsform	445A	39	46C	1206A	3	94A	138	58C
Glycin	—	0	0	0	0	—	—	0	0
Asparagin	0	0	0	0	—	0	—	+	0
Valin	0	0	0	0	0	0	—	+	+
Leucin	0	—	0	0	—	—	—	0	+
Prolin	—	0	—	—	0	—	0	—	0

0: keine Abweichung gegenüber Nährmedium ohne Aminosäure-Zusatz
 +: Zunahme der Keimungsrate um mehr als 20%
 -: Abnahme der Keimungsrate um mehr als 20%

ist für *Asparagin*, *Leucin* und *Valin* nachweisbar, aber nur bei bestimmten Mutanten. Vergleichen wir das Wirkungsspektrum der 5 Aminosäuren, so ergibt sich für *Prolin* die breiteste Wirkung: Es beeinflusst die Keimungsrate von 5 der 9 geprüften Genotypen negativ. Den geringsten Einfluß zeigt *Valin*, auf das eine Mutante negativ, zwei andere Mutanten positiv reagieren.

b. Das Pollenschlauch-Wachstum. Die zugesetzten Aminosäuren haben eine sehr unterschiedliche Wirkung auf das Pollenschlauch-Wachstum der untersuchten Genotypen. Es würde zu weit führen, diese Unterschiede in der vorliegenden Arbeit im einzelnen zu diskutieren, wir wollen das Prinzip vielmehr anhand einiger Beispiele ableiten (Abb. 4). *Isoleucin* hat bei allen Genotypen einen negativen Einfluß, es hemmt das Pollenschlauch-Wachstum. Auf *Glycin*

reagieren einige Mutanten ebenfalls negativ. Dies gilt jedoch nicht für die Chlorophyllmutante 58C, die in ihrem Pollen einen gewissen Mangel an Glycin aufweist. Eine Zugabe dieser Aminosäure bewirkt eine Förderung des Pollenschlauch-Wachstums, so daß die Vergleichswerte der Stammform erreicht werden. Die im Kurvenverlauf der Abb. 2 erkennbare Wachstumshemmung ist bei dieser Mutante offenbar teilweise auf den herabgesetzten Glycingehalt zurückzuführen. Die unterschiedliche Wirkung verschiedener Aminosäuren geht aus den Kurven der Abb. 4 deutlich hervor. Zu beachten ist die starke Wachstumsförderung, die sich nach Zugabe von *Prolin* und *Serin* bei 58C feststellen läßt, während die wachstlose Mutante 445 besonders auf Serin ausgesprochen negativ reagiert. Ein Zusatz von *Asparagin* hat den umgekehrten Effekt auf die beiden Genotypen: er bewirkt bei 445 eine Förderung gegenüber der Stammform, während die Mutante 58C die Vergleichswerte der Ausgangsform nicht erreicht. Im unteren Teil der Abb. 4 ist der Gehalt der betreffenden Aminosäure im Pollen der beiden Genotypen angegeben.

Ein allgemeingültiger Trend zwischen Aminosäuregehalt und Reaktion auf Aminosäurezugabe ist bei den Mutanten nicht feststellbar, jeder Genotypus reagiert

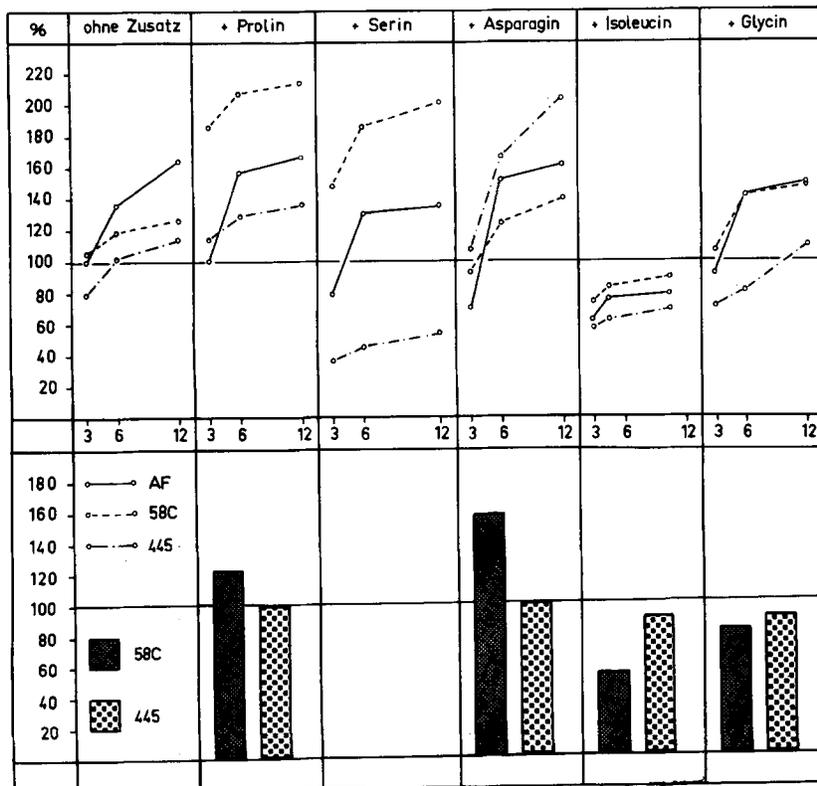


Abb. 4. Oben: Das Pollenschlauch-Wachstum der Mutanten 58C und 445 sowie der Ausgangsform nach 3, 6 und 12 Stunden bei Zusatz von Aminosäuren. (Die Pollenschlauch-Längen sind auf die nach 3 Stunden erreichten Längen der Ausgangsform ohne Aminosäure-Zusatz = 100% bezogen.) Im unteren Teil der Abbildung sind die Aminosäure-Mengen im Pollen der beiden Mutanten angegeben, bezogen auf den Vergleichswert der Stammform = 100%. Serin konnte wegen der zu geringen Menge nicht quantitativ erfaßt werden

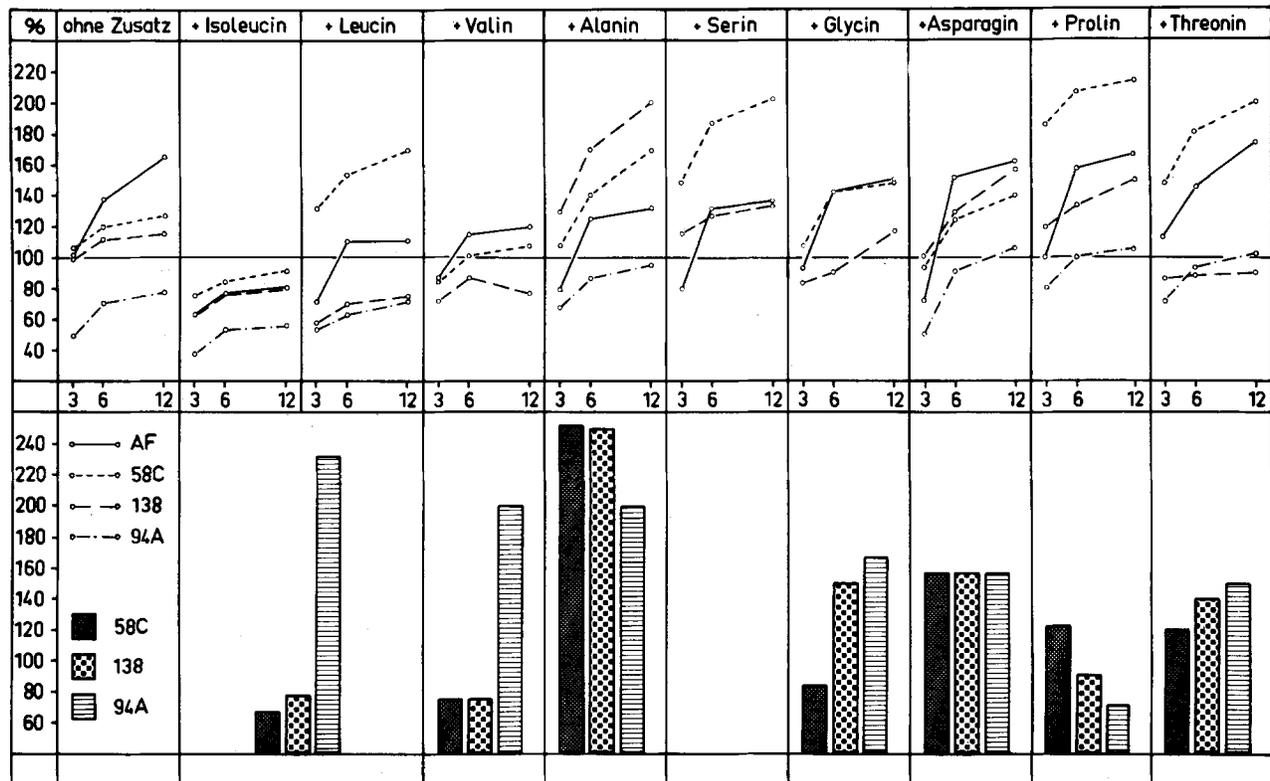


Abb. 5. Oben: Das Pollenschlauch-Wachstum der Mutanten 58C, 94A und 138 im Vergleich zur Ausgangsform nach Zugabe verschiedener Aminosäuren, gemessen 3, 6 und 12 Stunden nach Aussaat der Pollen im Kulturmedium. Alle Werte wurden auf die Pollenschlauchlänge der Stammform nach 3 Stunden bezogen. Unten: Der Gehalt der Pollen der Mutanten an den betreffenden Aminosäuren, bezogen auf den Vergleichswert der Stammform = 100%. Serin konnte wegen der zu geringen Menge nicht quantitativ erfaßt werden; Leucin und Isoleucin ließen sich mit der angewandten Methode nicht trennen

durchaus spezifisch. So ist *Prolin* im Pollen von 58C ohnehin schon im Überschuß vorhanden; auf eine weitere Zugabe reagiert die Mutante mit einer Wachstumsförderung. *Asparagin* ist in noch größeren Mengen vorhanden, eine Zugabe wirkt leicht hemmend. Ähnliche Unterschiede ergeben sich zwischen den übrigen, in der Abbildung nicht berücksichtigten Mutanten im Hinblick auf die restlichen Aminosäuren.

In Abb. 5 ist die Reaktion der Stammform sowie der Mutanten 58C, 94A und 138 auf die ganze Breite der zugegebenen Aminosäuren dargestellt; außerdem sind die im Pollen vorhandenen Mengen der betreffenden freien Aminosäuren angegeben. Die Abbildung zeigt besonders deutlich, daß sich die Mutanten nicht nur von der Ausgangsform, sondern auch voneinander stark unterscheiden. Als ordnendes Prinzip ist in der Abbildung die zunehmende Förderung des Pollenschlauch-Wachstums der Ausgangsform durch die verschiedenen Aminosäuren verwendet worden. Der für die Stammform charakteristische Trend wird bei keiner der drei Mutanten erkennbar, jede von ihnen reagiert auf jede einzelne der zugegebenen Aminosäuren spezifisch. Die ungünstige Situation der Blütenmutante 94A kommt in allen Feldern der Abbildung zum Ausdruck; nach Zugabe von *Valin*,

Serin und *Glycin* kommt sogar eine völlige Sistierung des Pollenschlauch-Wachstums zustande. Diese negative Reaktion ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß fast alle der analysierten freien Aminosäuren im Pollen dieser Mutante ohnehin schon im Überschuß vorhanden sind. Es wurde jedoch bereits darauf hingewiesen, daß diese Korrelation nicht generell gilt. So besitzen die Chlorophyllmutanten 58C und 138 in ihren Pollen ungewöhnlich große Mengen von Alanin, trotzdem läßt sich bei beiden Genotypen durch einen Zusatz von Alanin eine starke Erhöhung des Pollenschlauch-Wachstums erzielen.

Einheitliche oder doch nahezu einheitliche Reaktionen der untersuchten Genotypen konnten nur für *Prolin*, *Threonin* und *Isoleucin* festgestellt werden. *Prolin* zeigt bei allen Genotypen einen unterschiedlich stark fördernden Effekt auf das Pollenschlauch-Wachstum. Dies gilt im Prinzip auch für *Threonin* mit Ausnahme der Mutante 138. Ihre Pollen besitzen bereits einen Überschuß an *Threonin*; ein weiterer Zusatz wirkt hemmend. Bei der Mutante 58C hingegen, deren Pollen ebenfalls mehr *Threonin* enthalten als diejenigen der Stammform, kommt nach Zugabe der Aminosäure eine weitere Wachstumssteigerung zustande. *Isoleucin* hingegen verursacht — wie bereits erwähnt — bei allen geprüften Genotypen eine

Wachstumshemmung. Auf die übrigen Aminosäuren reagieren die verschiedenen Mutanten unterschiedlich.

Diskussion

Die Bearbeitung umfangreicher Mutantensortimente zeigt, daß bei der Mehrzahl aller Mutanten neben der spezifischen Wirkung des mutierten Gens noch ein unspezifischer Effekt erkennbar wird. Er äußert sich in Form einer Herabsetzung der Vitalität und Fertilität und ist für den negativen Selektionswert zahlreicher Mutanten verantwortlich. Er ist nicht mit meiotischen Unregelmäßigkeiten korreliert, scheint vielmehr auf einer allgemeinen physiologischen Schwächung der Mutanten zu beruhen, über die noch keine Einzelheiten bekannt sind. Nicht nur bei *Pisum*, sondern auch bei anderen genetisch intensiv bearbeiteten Objekten ist darüber hinaus noch die Tendenz für das Auftreten eines Rezessivdefizits in den Nachkommenschaften heterozygot mutierter Pflanzen feststellbar. Wenn wir die soeben erwähnte Herabsetzung der Vitalität auch für die Haplophase annehmen, so wird das Rezessivdefizit verständlich: die Pollenschläuche mit dem mutierten Allel *a* werden im Mittel langsamer wachsen als die Schläuche mit dem nichtmutierten Allel *A*. In einer heterozygot mutierten Pflanze *Aa* werden bei Selbstbefruchtung folglich die Zygotenkombinationen

$$A \text{♀} A \text{♂} \text{ und } a \text{♀} A \text{♂}$$

häufiger realisiert werden als die Kombinationen

$$A \text{♀} a \text{♂} \text{ und } a \text{♀} a \text{♂};$$

das muß zu einem Rezessivdefizit führen. Diese seit langem als „Zertation“ bekannte Erscheinung ist schwierig nachzuweisen. Wir haben versucht, an einigen *Pisum*-Mutanten festzustellen, ob die Haplophase generell gegenüber der nichtmutierten Ausgangsform benachteiligt ist. Der Nachteil unserer Methode besteht darin, daß wir in vitro arbeiten mußten, daß wir folglich die erhaltenen Befunde nicht ohne weiteres auf das Pollenschlauch-Wachstum in vivo übertragen können. Untersuchungen von Schwemmler (1952), Harte (1967) u. a. haben gezeigt, daß es zwischen dem wachsenden Pollenschlauch und dem Narben- und Griffelgewebe zu Wechselwirkungen kommen kann, die sich auf die Gonenkonkurrenz auswirken können.

Aus unseren Befunden lassen sich einige allgemeingültige Schlüsse ziehen, die wahrscheinlich für die befruchtungsbiologische Situation vieler Mutanten verschiedener Arten gültig sind. Im Hinblick auf die Keimungsrate und Keimgeschwindigkeit unterscheiden sich die geprüften Genotypen — mit Ausnahme einer Blütenmutante — nicht oder nur geringfügig von der Normalform. In der Intensität des Pollenschlauch-Wachstums sind jedoch alle Mutanten der Stammform unterlegen. Dies gilt vornehmlich für die späteren Wachstumsphasen, wobei die Tendenz in Erscheinung tritt, daß die Wachstumsgeschwindigkeit

um so stärker verringert wird, je größer die Anfangsgeschwindigkeit war. Auch die endgültig erreichte Pollenschlauchlänge ist in vitro bei den meisten Mutanten geringer als bei der Ausgangsform. Es besteht also kein Zweifel, daß die verminderte Konkurrenzfähigkeit der Mutanten auch in der Haplophase in Erscheinung tritt; sie ist fraglos eine der Ursachen für das Rezessivdefizit in spaltenden Familien. Eine direkte Korrelation zwischen der Höhe dieses Defizits und dem Grad der Herabsetzung des Pollenschlauch-Wachstums konnte in unserem Material jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Chlorophyllmutanten Nr. 3, 138 und 1206A zum Beispiel zeigen ein ganz besonders hohes Rezessivdefizit, sind im Pollenschlauch-Wachstum jedoch nicht gegenüber den Mutanten 46C und 445A benachteiligt, die normale Spaltungsverhältnisse aufweisen.

Ehlers (1951) hat in seinen Untersuchungen zur Ernährungsphysiologie der Pollenschläuche bei verschiedenen Species unterschiedliche Nährstoffreserven im Pollen gefunden, die sich auf die Intensität des Pollenschlauch-Wachstums auswirken. Ähnliche Verhältnisse könnten bei unseren Mutanten vorliegen. Die quantitative Bestimmung der freien Aminosäuren hat für unser Material deutliche Unterschiede im Reservestoffhaushalt ergeben. Wenn wir für ein optimales Pollenschlauch-Wachstum die in der Ausgangsform realisierte „ideale“ Zusammensetzung der freien Aminosäuren annehmen, so wird jede Abweichung eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit verursachen. Hierbei kann sich ein Mangel ebenso hemmend auswirken wie ein Überschuß, eine Gesetzmäßigkeit, die in unserem Material mehrfach nachgewiesen wurde. In einigen Fällen führt der Ausgleich des Mangels bestimmter Aminosäuren durch Zugabe der betreffenden Substanz zu einer Erhöhung des Pollenschlauch-Wachstums. Hieraus kann geschlossen werden, daß die verminderte Wachstumsleistung tatsächlich auf die genetisch bedingte Veränderung des Aminosäure-Spektrums der Mutanten zurückzuführen ist.

Eine besondere Rolle für die Physiologie der Pollenschläuche spielt das Prolin, das sich schon wegen seines hohen mengenmäßigen Anteils von allen übrigen freien Aminosäuren des Pollens abhebt. Untersuchungen von Britikov *et al.* (1964) mit markiertem Prolin zeigen, daß die Substanz entweder direkt in Proteinmoleküle eingelagert oder zu Hydroxyprolin umgewandelt wird, einem Strukturelement, das für die Bildung der Primärwand der Zellen notwendig ist. Die obengenannten Autoren sehen im Prolin eine Substanz von höchster physiologischer Aktivität, die die Synthese von anderen Aminosäuren und von Proteinen intensiviert und als H_2 -Akzeptor unmittelbar an Redox-Reaktionen teilnimmt. Diese wichtige Rolle wird auch aus unseren Befunden deutlich. Ein Defizit an Prolin ist bei jeder Mutante mit einer Herabsetzung der Wachstumsgeschwindigkeit der Pollen-

schläuche verbunden; der Ausgleich dieses Defizits führt zu einer Stimulierung des Wachstums. Die Keimung der Pollenkörner wird jedoch durch den Zusatz von Prolin gehemmt.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Keimungs- und Wachstumsphysiologie von Pollen und Pollenschläuchen unter dem Einfluß mutierter Gene in vielfältiger Weise modifiziert werden kann. Bei den bisher analysierten Mutanten wirkt sich dieser Einfluß ausnahmslos negativ aus und ist als eine der Ursachen für den negativen Selektionswert der Mehrzahl aller mutierten Gene anzusehen. Alle in der vorliegenden Arbeit behandelten Mutanten unterscheiden sich von der Stammform jeweils nur in einem einzigen rezessiven Gen. Die quantitativen Unterschiede der freien Aminosäuren der Pollen und die hieraus resultierenden Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit der Pollenschläuche sind folglich als Teile der pleiotropen Wirkungsspektren der betreffenden Gene aufzufassen. Es ist anzunehmen, daß die Fertilitätsminderung zahlreicher Mutanten — soweit sie nicht auf meiotische Anomalien zurückzuführen ist — ähnliche Ursachen hat. Für die schwach fertile Blütenmutante 94A unseres Sortiments wurde dies bereits nachgewiesen. Wir haben die Absicht, diese Untersuchungen an einem breiteren Mutantenmaterial fortzuführen und damit einen Beitrag zur Genphysiologie der Pollenkeimung und des Pollenschlauch-Wachstums zu liefern.

Zusammenfassung

Die Pollenkeimung und das Pollenschlauch-Wachstum von 8 *Pisum*-Mutanten sowie der Ausgangsform wurden in vitro untersucht. Außerdem wurden die freien Aminosäuren der Pollen analysiert und die Reaktion der Pollenschläuche auf Zugabe von Aminosäuren getestet. Hierbei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Alle Mutanten zeigen gegenüber der Normalform ein verlangsamtes Pollenschlauch-Wachstum, das die Gonenkonkurrenz in heterozygot-mutierten Pflanzen beeinflußt. Hiermit findet das in den Nachkommenschaften heterozygot-mutierter Erbsen häufig auftretende Rezessivendefizit seine Erklärung.

2. Die geringe Fertilität einer Blütenmutante unseres Sortiments ist nicht auf meiotische Störungen, sondern auf die drastische Herabsetzung der Pollenkeimung und des Pollenschlauch-Wachstums zurückzuführen. Für die geringe Keimungsrate der Pollen ist wahrscheinlich ihre vorzeitige Alterung verantwortlich.

3. Der Gesamtgehalt der freien Aminosäuren im Pollen entspricht bei allen Mutanten — von einer Ausnahme abgesehen — der bei der Stammform realisierten Situation. Im Hinblick auf die quantitativen Verhältnisse der einzelnen Aminosäuren sind jedoch bei den verschiedenen Genotypen starke Unterschiede feststellbar, die sowohl in Form eines Defi-

zits als auch eines Überschusses bestimmter Aminosäuren in Erscheinung treten.

4. Durch Zusatz der in zu geringer Menge vorhandenen Aminosäure konnte das Pollenschlauch-Wachstum bei einigen Mutanten stimuliert und demjenigen der Ausgangsform angeglichen werden. Dies gilt vornehmlich für Prolin, Valin und Threonin. Auf Zugabe der übrigen Aminosäuren reagierten die Mutanten unterschiedlich.

5. Die Keimungsrate der Pollen wird durch Prolin und Threonin herabgesetzt; Glutamin verhindert die Keimung völlig. Die Aminosäuren Isoleucin, Histidin und Cystein haben bei allen untersuchten Mutanten einen negativen Effekt auf das Pollenschlauch-Wachstum. Dies gilt auch für Leucin, das bei einer unserer Chlorophyllmutanten jedoch stimulierend wirkt.

Literatur

- Anderson, R. J., Kulp, W. L.: Analysis and composition of corn pollen. *J. biol. Chem.* **50**, 433 (1922).
- Bathurst, N. O.: The amino-acids of grass pollen. *J. exp. Bot.* **5**, 252—256 (1954).
- Bellart, S.: Das Pollenschlauchwachstum nach artemeiner und artfremder Bestäubung einiger Solanaceen und die Inhaltsstoffe ihres Pollens und ihrer Griffel. *Planta* **47**, 588—612 (1956).
- Branscheidt, O.: Zur Physiologie der Pollenkeimung und ihrer experimentellen Beeinflussung. *Planta* **11**, 368—456 (1930).
- Britikov, E. A., Muskova, N. A., Valdimitseva, S. V., Prosenko, M. A.: Proline in the reproductive system of plants. In: *Pollen Physiology and Fertilization* p. 77—86 (ed. H. F. Linskens) 1964.
- Buchholz, J. T., Blakeslee, A. F.: Genes from radium treatment affecting pollen-tube growth in *Datura*. *Genetics* **21**, 731—751 (1936).
- Correns, C.: Ein Fall experimenteller Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses. *Sitzber. preuß. Akad. Wiss.* **51**, 685—717 (1917).
- Ehlers, H.: Untersuchungen zur Ernährungsphysiologie der Pollenschläuche. *Biol. Zbl.* **70**, 432—451 (1951).
- Elser, E., Ganzmüller, J.: Die chemische Zusammensetzung einiger Blütenstaubarten. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **194**, 21—22 (1930).
- Emerson, S.: Genetic and cytological studies on *Oenothera*. II. Certain crosses involving *Oe. rubicalyx* and *Oe. „franciscana sulfurea“*. *Z. Vererbgs.* **59**, 381—394 (1931).
- Gaul, H.: The concept of macro- and micro-mutations and results on induced micro-mutations in barley. *The Use of Induced Mutations in Plant Breeding*, Suppl. *Rad. Bot.* **5**, 407—428 (1965).
- Gottschalk, W.: Die Wirkung mutierter Gene auf die Morphologie und Funktion pflanzlicher Organe. *Bot. Studien* **14**, 1—359 (1964).
- Gottschalk, W., Müller, F.: Quantitative Pigmentuntersuchungen an strahleninduzierten Chlorophyllmutanten von *Pisum sativum*. II. Die fertilen und sterilen Chlorophyllmutanten. *Planta* **62**, 1—21 (1964).
- Haeckel, A.: Beitrag zur Kenntnis der Pollenfermente. *Planta* **39**, 431—459 (1951).
- Harte, C.: Cytologisch-genetische Untersuchungen an spaltenden *Oenothera*-Bastarden. *Z. Vererbgs.* **82**, 495—640 (1948).
- Harte, C.: Untersuchungen über die Nachkommenschaft von Heterozygoten der *graminifolia*-Kopplungsgruppe von *Antirrhinum majus*. *Z. Vererbgs.* **84**, 480—507 (1952).
- Harte, C.: Untersuchungen über Gonenkonkurrenz und crossingover bei spaltenden *Oenothera*-Bastarden. *Z. Vererbgs.* **85**, 97—117 (1953).
- Harte, C.: Gonenkonkurrenz. *Handbuch der Pflanzenphysiologie* **18**, 445 bis 478 (1967).
- Heilmann, J., Barrolier, J., Watzke, E.: Beitrag zur Aminosäurebestimmung auf Papierchromatogrammen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **309**,

- 219–220 (1957). — 20. Heribert-Nilsson, N.: Zuwachsgeschwindigkeit der Pollenschläuche und gestörte Mendelzahlen bei *Oenothera Lamarckiana*. *Hereditas* **1**, 41 bis 67 (1920). — 21. Heyl, F. W.: The phytosterols of ragweed pollen. *J. Amer. chem. Soc.* **44** (1922), zit. nach Linskens 1967. — 22. Hiorth, G.: Zur Kenntnis der Homozygoteneliminierung und der Pollenschlauchkonkurrenz bei *Oenothera*. *Z. Vererbgs.* **43**, 171–237 (1926). — 23. Hrabětova, E., Tupy, J.: Quantitative determination of proline by paper chromatography. *J. Chromat.* **3**, 199–201 (1960). — 24. Hrabětova, E., Tupy, J.: The growth effect of some sugars and their metabolism in pollen tubes. In: *Pollen Physiology and Fertilization* 95–101 (ed. H. F. Linskens) 1963. — 25. Khoo, U., Stinsan, H. T.: Free amino acid differences between cytoplasmic male sterile and normal fertile anthers. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **43**, 603–607 (1957). — 26. Kiesel, A., Rubin, B.: Untersuchungen über pflanzliche Fortpflanzungszellen. II. Beitrag zur Kenntnis der Bestandteile der Pollenkörner der Zuckerrübe. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **182**, 241 (1929). — 27. Kuhn, E.: Physiologie der Pollenkeimung bei *Matthiola*. *Planta* **27**, 304–333 (1937). — 28. Linskens, H. F.: Physiologische Untersuchungen der Pollenschlauch-Hemmung selbststeriler Petunien. *Z. Bot.* **43**, 1–44 (1955). — 29. Linskens, H. F.: Physiologische Untersuchungen zur Reifeteilung. II. Mitt. Über die Änderung des Nukleinsäuregehaltes während der Pollenmeiose und Pollenentwicklung von *Lilium henryi*. *Acta Bot. Neerl.* **7**, 61–68 (1958). — 30. Linskens, H. F.: Die Änderung des Protein- und Enzym-Musters während der Pollenmeiose und Pollenentwicklung. *Planta* **69**, 79–91 (1966). — 31. Linskens, H. F.: Pollen. *Handbuch der Pflanzenphysiologie* **18**, 368–406 (1967). — 32. Linskens, H. F., Tupy, J.: The amino-acids pool in the style of self-incompatible strains of *Petunia* after self- and cross-pollination. *Genetics and Breeding Res.* **36**, 151–158 (1966). — 33. Renner, O.: Zur Biologie und Morphologie der männlichen Haplonten einiger *Oenotheren*. *Z. Bot.* **11**, 305–380 (1919). — 34. Renner, O.: Das Rotnervenmerkmal der *Oenotheren*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **39**, 264 bis 270 (1921). — 35. Schmucker, Th.: Über den Einfluß von Borsäure auf Pflanzen, insbesondere keimende Pollenkörner. *Planta* **23**, 264–289 (1935). — 36. Schwemmler, J.: Gibt es eine selektive Befruchtung? II. *Biol. Zbl.* **70**, 193–252 (1951). — 37. Schwemmler, J.: Selektive Befruchtung als Erklärung unerwarteter Kreuzungsergebnisse. *Biol. Zbl.* **71**, 353–384 (1952). — 38. Schwemmler, J.: Selektive Befruchtung bei der *Oenothera odorata*. *Biol. Zbl.* **72**, 405–424 (1953). — 39. Sirks, M. J.: Mendelian factors in *Datura*. *Genetica* **8**, 485–500 und 518–524 (1926). — 40. Tupy, J.: Investigation of free amino-acids in cross-, self- and non-pollinated pistils of *Nicotiana glauca*. *Biol. plant.* **3**, 47–64 (1961). — 41. Tupy, J.: Free amino-acids in apple pollen from the point of view of its fertility. *Biol. plant.* **5**, 154–160 (1963). — 42. Tupy, J.: Metabolism of proline in styles and pollen tubes of *Nicotiana glauca*. In: *Pollen Physiology and Fertilization* 86–95 (ed. H. F. Linskens) 1964. — 43. Visser, T.: Germination and storage of pollen. *Med. Landb. Wageningen* **55**, 1–68 (1955).

Eingegangen am 21. Juli 1972

Angenommen durch H. Stubbe

Dr. G. Jahr und
Prof. Dr. W. Gottschalk
Institut für Genetik
der Universität Bonn
Kirschallee 1
D-53 Bonn (Germany/BRD)