©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Phyton (Austria)	Vol. 14	Fasc. 1—2	97—111	16. XII. 1970

Die Calcium-Verteilung in *Oenothera*-Pflanzen und ihr möglicher Einfluß auf den Chemotropismus der Pollenschläuche und auf die Befruchtung

Von

Hans-Otto GLENK, Oskar SCHIMMER & Waldemar WAGNER *)

Aus dem Botanischen Institut und dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

Mit 7 Abbildungen

Eingelangt am 27. Juni 1970

Einleitung

Die Untersuchungen mehrerer Forscher haben erwiesen, daß Ca^{++}-Ionen für die normale Keimung des Pollens, für das Pollenschlauchwachstum und in einigen Fällen auch für die chemotropische Ausrichtung der Schläuche eine wesentliche Rolle spielen (BRINK 1924, VOM BERG 1930, GOTOH 1931, BUNGENBERG DE JONG & HENNEMANN 1934, BREWBAKER & KWACK 1963, MASCARENHAS & MACHLIS 1964, KENDALL 1967, RAO 1969). Calcium-Ionen können auch den Populationseffekt in vitro ausschalten (BREWBAKER & KWACK 1964) und entfalten eine Schutzwirkung gegen einige, das Pollenschlauchwachstum hemmende Stoffe (BRINK 1924, KWACK & KIM 1967).

Im Verlauf früherer Untersuchungen zur Pollenphysiologie der Gattung *Oenothera* (1957/1958) konnten wir feststellen, daß die Zugabe von Calciumchlorid (bis max. 0,1% $CaCl_2 . 2\,H_2O \equiv 0{,}068\ M\ Ca^{++}$) zum Keimmedium in vitro die Keimungsraten von Pollen aus unterentwickelten Knospen wesentlich erhöht (Abb. 1; aus GLENK 1960). In späteren Blühperioden mußten Calciumzusätze zwecks Erzielung guter Keimergebnisse sogar bei Verwendung von reifen Pollenkörnern erfolgen (Tab. 1).

---

*) Dr. Hans-Otto GLENK, Botanisches Institut der Universität, Schloßgarten 4, D-852 Erlangen; Apotheker Oskar SCHIMMER, Botanisches Institut der Universität, Schloßgarten 4, D-852 Erlangen; Dr. Waldemar WAGNER, Physiologisch-chemisches Institut der Universität, Wasserturmstraße 5, D-852 Erlangen.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

SCHILDKNECHT & BENONI 1963 berichteten über die chemotropische Wirksamkeit von Mischungen aus Aminosäuren, Zuckern und Kalium-Ionen auf *Oenothera*-Pollenschläuche. Es ist jedoch noch unbekannt, ob auch Calcium-Ionen einen Einfluß auf die Wachstumsrichtung der *Oenothera*-Schläuche ausüben, wie dies im Falle von *Antirrhinum*-Pollenschläuchen nachgewiesen werden konnte (MASCARENHAS & MACHLIS 1962a, 1962b, 1964). Die Tendenz zur Ausbildung verknäuelter Pollenschläuche auf Medien mit einem höheren Calciumgehalt als 10^{-2}% $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (GLENK 1960; vgl. Abb. 1) könnte in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von ROSEN 1961 immerhin auf eine gewisse chemotropische Aktivität der Calcium-Ionen auch bei *Oenothera* hinweisen [1]). In vivo müßten bei

Tabelle 1

Keimung (K) und Platzen (P) von Onagraceen-Pollen auf Medien mit oder ohne Calciumzusatz (Jahre 1962/1963)

Medium	*Oenothera longiflora*		*Oenothera argentinae*		*Oenothera scabra*		*Epilobium angustifolium*	
	K%	P%	K%	P%	K%	P%	K%	P%
334	10	30	5	10	50	50	5	90
334 + Ca^{++}	98	(+)	98	(+)	80	0	95	0

(+) = weniger als 1%. — Medium 334 (GLENK 1960): 5% Gelatine, 8% Saccharose, 0,01% Borsäure, 0,1% Hefeextrakt. — Calciumzugabe: 0,1% $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O \equiv 0{,}068\ M\ Ca^{++}$.

einer durch Calcium verursachten Chemotropie Calcium-Gradienten im reifen Gynözeum ausgebildet sein. Die Verteilung der Calciumverbindungen in *Oenothera*-Pflanzen wurde bisher aber noch nicht untersucht.

Als Beitrag zur Lösung der erwähnten Probleme führten wir von 1963—1969 in vitro-Versuche zur Chemotropie unter Verwendung von Calciumverbindungen sowie Analysen des Calcium-Gehaltes in verschiedenen Pflanzenteilen von einigen *Oenothera*-Arten durch. Über die Ergebnisse wird nachfolgend berichtet.

Wir danken den Herren Professoren Dr. J. SCHWEMMLE, Dr. E. HAUSTEIN und Dr. C. G. ARNOLD für die freundliche Überlassung von Pflanzenmaterial. Frl. Apotheker Dr. A. M. MEYER und Herrn stud. rer. nat. D. POLIK gilt unser Dank für technische Mitarbeit.

---

[1]) Verknäuelte Pollenschläuche konnten jüngst auch in Kulturen von *Beta vulgaris*-Pollen mit einem höheren Calcium-Gehalt des Mediums beobachtet werden, obwohl bei *Beta* kein positiver Chemotropismus durch Calcium bewirkt wird (GLENK, BLASCHKE & BAROCKA 1969).

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Eine Kurzfassung der Arbeit in englischer Sprache erscheint unter dem Titel „Can Calcium Ions Act as a Chemotropic Factor in *Oenothera* Fertilization ?" im Report on the International Pollen Conference at Pullman/Wash. 1969, London 1970.

Material und Methoden

I. Pflanzenmaterial

Pollen für die in vitro-Untersuchung des Chemotropismus sowie Pflanzenteile für die Calciumanalysen wurden von *Oenothera longiflora*, *Oe. argentinae* und *Oe. hookeri* zur Zeit der Hochblüte (August, September) ge-

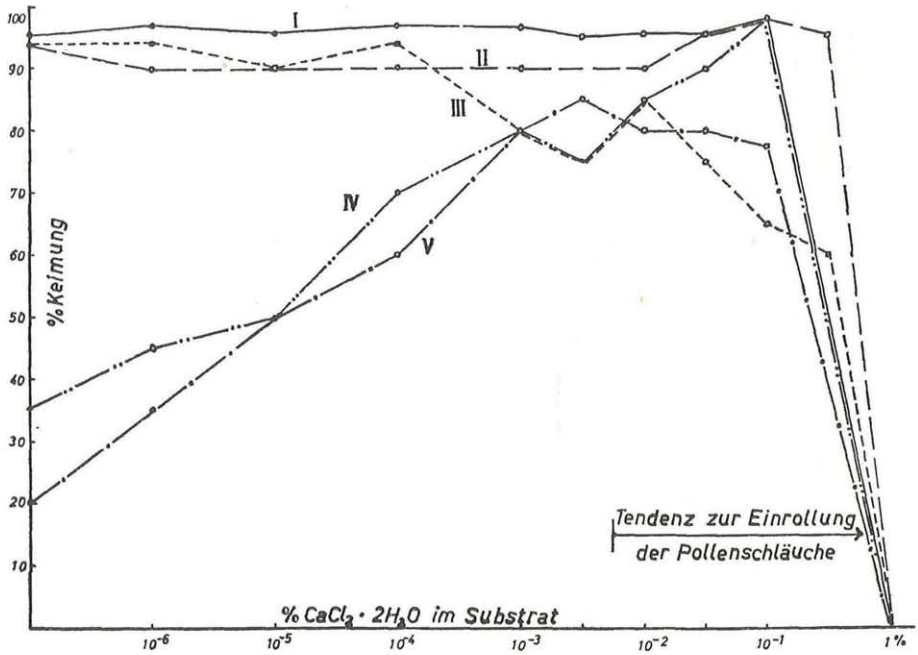

Abb. 1. Einfluß von Calcium-Ionen auf die Keimung von *Oenothera*-Pollen in vitro (Jahre 1957/1958; aus Glenk 1960). I—III Keimung reifer Pollenkörner, IV—V Keimung von Pollenkörnern aus unterentwickelten Knospen.

wonnen. Die Versuchspflanzen stammten aus den Kulturen von Prof. Schwemmle, Prof. Haustein und Prof. Arnold im Botanischen Garten der Universität Erlangen-Nürnberg. Da Griffel und Fruchtknoten von *Oe. longiflora* und *Oe. hookeri* sehr lang (5—10 cm) sind, waren diese beiden Arten für die chemische Untersuchung der Calciumverteilung im Gynözeum besonders geeignet. Zum Vergleich mit dem Material von den Versuchs-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

feldern wurden auch Teile von zwei Pflanzen der *Oe. longiflora* herangezogen, die in einem Gewächshaus mehrere Jahre lang unter Langtagsbedingungen kultiviert worden waren (vgl. Tab. 3). Eine mehrjährige Kultur der an sich für einjährig gehaltenen *Oe. longiflora* bereitet bei sorgfältiger Pflege keine besonderen Schwierigkeiten.

II. Methode der Chemotropieversuche in vitro

Die Untersuchungen zum Chemotropismus der *Oenothera*-Pollenschläuche wurden auf unserem Gelatinemedium 334 (Glenk 1960; vgl. auch Tab. 1) nach der Methode von Schneider 1956, welche Rosen 1964 als

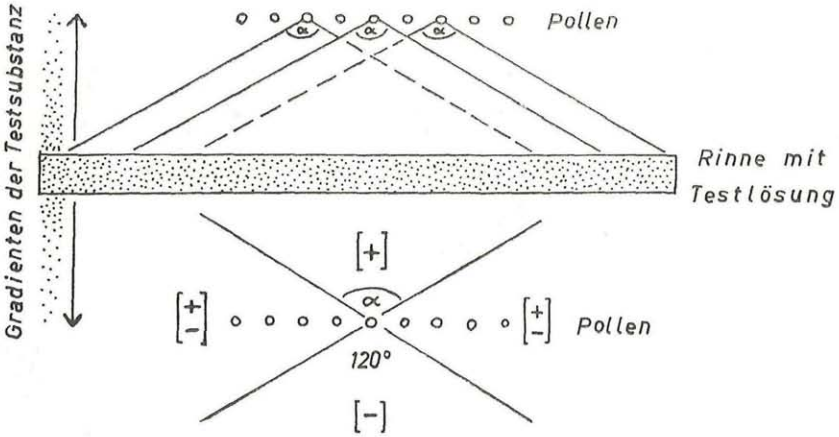

Abb. 2. In vitro-Test zum Chemotropismus der Pollenschläuche nach Schneider („Angle Test").

„angle test" (Abb. 2) bezeichnet, durchgeführt. Folgende Calciumverbindungen wurden auf ihre chemotropische Aktivität hin geprüft: Calciumchlorid; Calciumnitrat; Calciumsulfat; primäres, sekundäres und tertiäres Calciumphosphat; Calciumlactat und Calciumcitrat.

Äquivalente Lösungen (0,068 *M* Ca^{++}) wurden in eine Rinne im Substrat gegossen. Im Falle geringer Löslichkeit der Verbindung wurde die feste Substanz in die Vertiefung des Mediums ausgelegt. Anschließend wurden die Substrate 24 Stunden lang zur Entwicklung von Calciumgradienten stehen gelassen. Dann kamen die Pollenkörner beiderseits der Calciumquelle im Abstand von 1,5 mm zur Aussaat. In einigen Versuchsreihen wurde der Abstand zwischen Pollen und zu prüfender Substanz erhöht (max. bis zu 10,0 mm). 18—24 Stunden nach der Aussaat wurde die Wuchsrichtung der Pollenschläuche mikroskopisch geprüft. Alle Schläuche, die vom Pollenkorn als Mittelpunkt aus in einem Sektor von

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

120° zur Calciumquelle hin gewachsen waren, wurden als positiv chemotrop gewertet. Betrug die Zahl der positiv beeinflußten Pollenschläuche mehr als 33% der Gesamtzahl der Schläuche, so wurde der ganze Test als positiv betrachtet (vgl. Tab. 2).

III. Calciumanalysen

Zur Calciumbestimmung wurden verschiedene vegetative und generative Teile der *Oenothera*-Pflanzen (vgl. Tab. 3) auf Papptellern an der Luft getrocknet und anschließend über Silicagel in Vakuumexsikkatoren mehrere Monate hindurch gelagert.

Der Wassergehalt der einzelnen Pflanzenteile wurde an entsprechendem frischen Material durch Auswiegen vor und nach scharfer Trocknung in einem Trockenschrank bei 110° C ermittelt (hinsichtlich der Wassergehalte von *Oenothera*-Teilen vgl. auch GLENK & WAGNER 1960).

Der Gehalt an Gesamtcalcium wurde nach nasser Veraschung des getrockneten Materials flammenphotometrisch mit dem Gerät PF 5 der Firma Zeiss unter Verwendung des Ca-Filters 622 nm in einer Azetylen-Preßluftflamme bestimmt.

Aufschluß: Zur Einwaage kamen jeweils zwischen 100 und 300 mg der trockenen, grob gepulverten Substanz. Die Proben wurden in Kjeldahlkölbchen nach der von WILLIAMS & TWINE beschriebenen Methode naß verascht (vgl. LINSKENS & TRACEY 1962). Die Substanz wurde mit Perchlorsäure, konz. Salpetersäure und konz. Schwefelsäure versetzt, langsam erhitzt und mit gleichbleibender Flamme die Salpetersäure vertrieben. Nach Beendigung der Verkohlung erfolgte ein nochmaliger Zusatz von etwas Salpetersäure. Sodann wurden durch Erhitzen sowohl die Salpetersäure als auch die Perchlorsäure ausgetrieben. In der zurückbleibenden Schwefelsäure lagen dann die mineralischen Pflanzenstoffe mehr oder weniger gelöst vor. Nach dem Abkühlen wurden jeweils 15 ml Wasser zugesetzt, wodurch Konzentrationsniederschläge in Lösung gebracht werden konnten. In keinem Falle blieb ein Rückstand. Die Lösungen wurden nun zum Sieden erhitzt und durch aschefreie Filter in Meßkölbchen filtriert. Die Kjeldahlkölbchen wurden mit wenig Wasser fünfmal nachgewaschen. Sodann wurde auf 50 ml aufgefüllt.

Photometrische Bestimmung: Jeweils 15 ml wurden entnommen und mit 5 ml einer Standardlösung verdünnt, die nach WILLIAMS & TWINE 4% Mg als Sulfat, 0,1% K als Chlorid und 0,1% Na als Chlorid sowie 1% Schwefelsäure enthielt. Durch diesen Zusatz wird die Störung der Ca-Flammenphotometrie durch die üblicherweise in Pflanzen vorkommenden Ionen umgangen (vgl. HERRMANN & ALKEMADE 1960). Die fertig aufgearbeiteten Lösungen wurden nun unverzüglich im Flammenphotometer versprüht. Die erhaltenen Werte konnten auf Grund einer zuvor ermittelten Eichkurve auf mg Ca^{++}/L umgerechnet werden. Die flammenphotometrische Calciumbestimmung liefert in der beschriebenen Durchführung Ergebnisse, die mit denjenigen anderer chemischer Methoden gut übereinstimmen. Von jedem Pflanzenteil wurden drei Proben untersucht. Jede Probe wurde dreimal photometrisch gemessen und das arithmetische Mittel gebildet.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Der Gehalt an löslichem Calcium in den wesentlichen Teilen des Gynözeums wurde dadurch ermittelt, daß von den Gesamtcalciumwerten der flammenphotometrischen Analysen die durch Zählung an Gefrierschnittserien im polarisierten Licht und Gewichtsberechnung bestimmte Menge der in den einzelnen Teilen vorhandenen Calciumoxalatniederschläge abgezogen wurde (vgl. Tab. 4).

Ergebnisse und Diskussion

I. Chemotropieversuche mit Calciumverbindungen in vitro

Mit den zuvor erwähnten Calciumverbindungen (vgl. S. 100) wurden 14 Serien von Chemotropieversuchen ausgeführt. Eine Orientierung der wachsenden Pollenschläuche zur Calciumquelle hin, d. h. Einwachsen von mehr als 33% aller Schläuche in den Sektor von 120° zwischen Pollenkorn und Calciumtestsubstanz (Fig. 2), war nur sehr selten zu beobachten. Die wenigen positiven Tests (4 bzw. 6 von 102 Einzelversuchen) waren nicht reproduzierbar. Im Durchschnitt ergaben sich bei allen geprüften Calciumverbindungen zufällige Wuchsrichtungen der Pollenschläuche (Tab. 2).

Dadurch ist nachgewiesen, daß Calcium-Ionen allein keine chemotropische Aktivität auf *Oenothera*-Pollenschläuche in vitro ausüben. In Über-

Tabelle 2

Chemotropie-Versuche mit Calciumverbindungen in vitro ("Angle Tests") (*Oenothera longiflora*, *Oe. argentinae*, *Oe. hookeri*; Medium 334 — vgl. Tab. 1 —; keine Calciumzugabe zum Medium; Keimraten 40—60%)

Calciumverbindung	Pollenschläuche innerhalb des Sektors von 120° [1] (%)	Zahl der Tests positiv	Zahl der Tests Gesamt
$CaCl_2$	33+4	(1)	14
$Ca(NO_3)_2$	33+20	2	14
$Ca(H_2PO_4)_2$	33+2	(1)	12
$CaHPO_4$	33+0	0	12
$Ca_3(PO_4)_2$	zufällige	0	12
$CaSO_4$	Wachstumsrichtung	0	14
Calciumlactat	33+25	2	14
Calciumcitrat	33+0 zufällige Wachstumsrichtung	0	10
	Summe:	4 (6)	102

[1]) Erklärung siehe S. 100 f.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 3

Verteilung des Gesamt-Calciums in verschiedenen Organen von *Oenothera longiflora* und *Oe. hookeri*

	Calcium in % des Trockengewichts			Wassergehalt im Gewebe [1]) %	Calcium in % des Frischgewichts
Pflanzenteil	*Oe. hookeri*	*Oe. longiflora* (mehrjährige Pflanzen)	*Oe. longiflora* (junge Pflanzen)		
Wurzeln			1,98	82,0	0,356
Rübe			1,01	77,2	0,230
Sproßachse, unten			0,44	85,0	0,066
Sproßachse, oben			0,80	78,1	0,175
Sproßgipfel			3,52	82,3	0,623
Blätter, unten			4,55	82,7	0,787
Blätter, oben (Brakteen)	2,79	3,09	3,84	77,8	0,852
Hypanthium	0,73	0,67	0,63	88,5	0,072
Kelchblätter	0,99		1,88	82,6	0,327
Kronblätter	0,29		0,29	92,3	0,022
Filamente	0,23		0,16	89,0	0,018
Antheren mit Pollen	0,41		0,22	64,7	0,078
Narbe	0,49	0,58	0,60	91,1	0,052
Griffel, ganz	0,51	0,51	0,48	90,6	0,046
Griffel, ob./3			0,61	91,3	0,053
Griffel, mittl./3			0,56	91,7	0,046
Griffel, unt./3			0,39	90,7	0,036
Fruchtknoten, ganz	1,75	2,54	2,57	82,3	0,455
Fruchtknotenwand, ob./3			2,43	80,0	0,486
Fruchtknotenwand, mittl./3			2,55	81,0	0,484
Fruchtknotenwand, unt./3			2,20	80,6	0,427
Placenta (einschl. steriler Mittelsäule [2])			**3,65**	81,3	**0,683**
Samenanlagen			1,25	74,7	0,316
Früchte (reife Kapseln mit Samen)		2,00	2,33	17,6	**1,920**

[1]) vgl. Glenk & Wagner 1960.

[2]) vgl. Glenk 1964.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

einstimmung mit diesem negativen Ergebnis fanden ROSEN 1961 bei *Lilium longiflorum* und STANLEY (persönliche Mitteilung von Prof. R. G. STANLEY, Univ. of Florida, Gainesville/Flor., USA) bei *Petunia* ebenfalls keinen durch Calcium bewirkten Chemotropismus der Pollenschläuche.

Eine völlige chemotropische Unwirksamkeit von Calcium auf *Oenothera*-Pollenschläuche kann jedoch aus dem negativen Ausfall unserer in vitro-Experimente nicht erschlossen werden. In vivo sind nämlich wahrscheinlich verschiedene chemische Faktoren in die chemotropische Reaktion verwickelt (vgl. SCHILDKNECHT & BENONI 1963). Daher ist es durchaus denkbar, daß in situ möglicherweise existierende Calcium-Gradienten zusammen mit anderen Ionen oder gelösten Stoffen beim Chemotropismus mitwirken. Um die Rolle des Calciums als Kofaktor beim Chemotropismus der *Oenothera*-Pollenschläuche beurteilen zu können, war es somit notwendig, die Calciumverteilung im Gynözeum zu analysieren.

II. Die Verteilung von Calcium in *Oenothera*-Pflanzen

A) Gesamt-Calcium

Im Zusammenhang mit der Bestimmung der Gesamtcalciumgehalte im Gynözeum analysierten wir auch den Calciumgehalt in den vegetativen Teilen von *Oenothera*-Pflanzen. Die Ergebnisse unserer flammenphotometrischen Analysen sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Die höchsten Calciumwerte im Trockengewicht wurden in den Blättern und Brakteen von *Oenothera longiflora* aufgefunden. Ähnliches ist auch von anderen Pflanzen her bekannt, z. B. von *Helianthus annuus* (BAUMEISTER 1958). Zweifelsohne findet in den Blättern eine Anhäufung von Calcium auf Grund des Transpirationsstromes statt.

In bezug auf das Frischgewicht wiesen reife Kapseln mit Samen die höchsten Calciumgehalte auf, was auf den geringen Wassergehalt dieser Teile (nur 17,6% im Vergleich zu 60—92% in den anderen analysierten Teilen) zurückzuführen ist.

Im allgemeinen wurden keine bemerkenswerten Unterschiede im Calciumgehalt zwischen den Teilen von *Oenothera hookeri* und denjenigen von *Oenothera longiflora* festgestellt, jedoch müssen zwei Besonderheiten erwähnt werden: Bei *Oe. hookeri* enthalten die Antheren mit Pollen nahezu doppelt soviel Calcium wie bei *Oe. longiflora*. Die Narbe von *Oe. hookeri* dagegen weist nur 84% des Calciumgehaltes von dem der *Oe. longiflora*-Narbe auf. Das Verhältnis des Gesamtcalciums in den Antheren (mit Pollen) zum Gesamtcalcium in der Narbe ist daher bei *Oe. hookeri* 1:1,19, bei *Oe. longiflora* aber 1:2,72. Möglicherweise hat diese Calciumverteilung einen Einfluß auf die Pollenkeimung in situ. Es ist jedoch nichts näheres hierüber bekannt.

Von den Teilen des Gynözeums zeigt die Placenta den höchsten

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Gehalt an Gesamtcalcium (3,65% des Trockengewichts ≡ 0,683% des Frischgewichts). Unsere Ergebnisse stimmen mit denjenigen von MASCARENHAS & MACHLIS (1962a, 1964) bei *Antirrhinum* gut überein (vgl. Abb. 3).

Verfolgt man den Weg, den die wachsenden Pollenschläuche von der Narbe zum Fruchtknoten zurücklegen müssen, so resultiert ein ansteigender Calciumgehalt von 0,49%—1,75% bei *Oenothera hookeri* bzw. von 0,51%—2,17% bei *Antirrhinum*. Man könnte daher geneigt sein anzunehmen, daß die Pollenschläuche durch diesen Gradienten in ihrer Wuchsrichtung beeinflußt würden. Bei *Oe. longiflora* allerdings nimmt die Calciumkonzen-

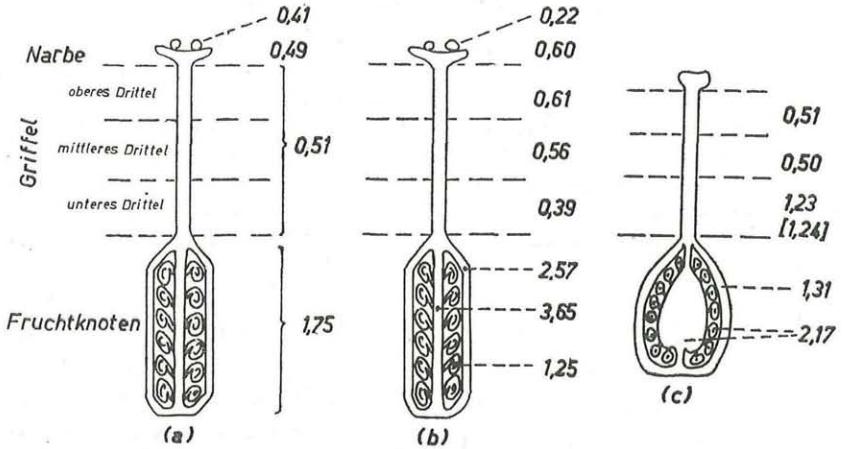

Abb. 3. Calcium-Verteilung im Gynözeum (schematisch). a: *Oenothera hookeri*, b: *Oenothera longiflora*, c: *Antirrhinum majus* (nach MASCARENHAS & MACHLIS 1962a, 1964). — % Ca im Trockengewicht.

tration vom oberen Drittel des Griffels zum unteren Drittel hin ab. Erst von dort zur Placenta (einschließlich der sog. „sterilen Mittelsäule"; GLENK 1964) erfolgt wieder ein bemerkenswerter Calciumanstieg (0,39%—3,65% Calcium im Trockengewicht bzw. 0,036%—0,683% im Frischgewicht). So könnten selbst bei *Oe. longiflora* die herunterwachsenden Pollenschläuche vom Ende des Griffels aus zur Placenta hingezogen werden, sofern Calcium an der chemotropischen Reaktion beteiligt wäre. Allerdings wären dadurch Befruchtungen noch nicht gesichert, weil die Pollenschläuche zum Erreichen der Mikropylen und Einwachsen in die Samenanlagen die Placenta verlassen müssen. In den Samenanlagen liegt der Calciumgehalt jedoch wieder sehr viel niedriger als in der Placenta, nämlich bei 1,25% des Trockengewichts bzw. 0,316% des Frischgewichts. Würde also Calcium hier als Chemotropicum wirken, so müßten die Pollenschläuche auf der Placenta bleiben und könnten die Samenanlagen nicht erreichen.

Ein derartiges Verhalten der Schläuche kommt tatsächlich in den

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Fällen vor, in denen die sog. „sexuelle Affinität" zwischen Samenanlagen und Pollenschläuchen fehlt (GLENK 1964). Hier wachsen die Pollenschläuche innerhalb besonderer Gewebestreifen der Placenten („Placentataschen") bis zum Ende des Fruchtknotens hinunter und kommen daher nicht zur Befruchtung (Abb. 4). Bei normalen Kreuzungen mit vorhandener sexueller Affinität verlassen dagegen die Schläuche die Placentataschen und erreichen die Samenanlagen trotz der oben erwähnten ungünstigen Calciumverteilung. Zweifelsohne sind an diesem normalen Wuchsverhalten der Pollenschläuche chemotropisch aktive Substanzen anderer Art beteiligt, die artspezifisch sind und von SCHWEMMLE „Gamone" genannt wurden (SCHWEMMLE, ARNOLD & GLENK 1958, SCHWEMMLE 1968; vgl. Abb. 5).

Bei den Calciumanalysen von MASCARENHAS & MACHLIS (1962, 1964) an *Antirrhinum* wurde nicht zwischen Placenta und Samenanlagen unterschieden. Später konnte jedoch MASCARENHAS auch an diesem Objekt einen abnehmenden Calciumgehalt von der Placenta zu den Samenanlagen hin feststellen und zwar durch histochemische Farbreaktion des Ca^{++}-Ions mit GBHA (Glyoxal-bis-[2-hydroxy-anil]; MASCARENHAS 1966). Er folgerte daraus, daß Ca^{++}-Ionen als Chemotropicum nur bis zur Placenta wirksam sein könnten, daß beim weiteren Wachstum der Pollenschläuche zu den Samenanlagen jedoch andere Faktoren im Spiel sein müßten.

B) Lösliche Calciumverbindungen (Ca^{++}-Ionen) im Gynözeum

Trotz des negativen Ausfalls der Chemotropieversuche mit Calciumverbindungen in vitro und des in situ nicht vorhandenen Konzentrationsanstiegs des Gesamtcalciums von der Placenta zu den Samenanlagen hin müssen wir noch eine letzte Möglichkeit einer chemotropischen Calciumaktivität berücksichtigen, nämlich die Beeinflussung der wachsenden Pollenschläuche ausschließlich durch die gelösten und dissoziierten Calciumverbindungen = Ca^{++}-Ionen. Die in den einzelnen Teilen des *Oenothera*-Gynözeums herrschenden aktuellen Ca^{++}-Ionenkonzentrationen lassen sich aus unseren flammenphotometrischen Analysen nicht erkennen, da die Organe in unterschiedlichen Mengen Calciumoxalatniederschläge in Form von Rhaphiden, Einzelkristallen und Oxalatsand (Mikrokristalle) enthalten.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß bei manchen Dikotyledonen-Familien eine enzymatische Oxydation von Calciumoxalat erfolgen kann (BORNKAMM 1969). Das im Oxalat gebundene Calcium ist also nicht irreversibel festgelegt, sondern kann wieder in lösliche und stark dissoziierbare Verbindungen überführt und für den Stoffwechsel reaktiviert werden. Wir wissen jedoch noch nicht, ob auch im *Oenothera*-Gynözeum ein enzymatischer Calciumoxalatabbau stattfindet bzw. ob die wachsenden Pollenschläuche selbst einen derartigen Abbau durchführen können. Im Fall sehr niedriger P_H-Werte der Umgebung könnte nach BREWBAKER [1]) das Calciumoxalat den Pollenschläuchen

[1]) Vgl. die Diskussion über Chemotropismus von Pollenschläuchen in „Pollen Physiology and Fertilization", ed. LINSKENS 1964: 182.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

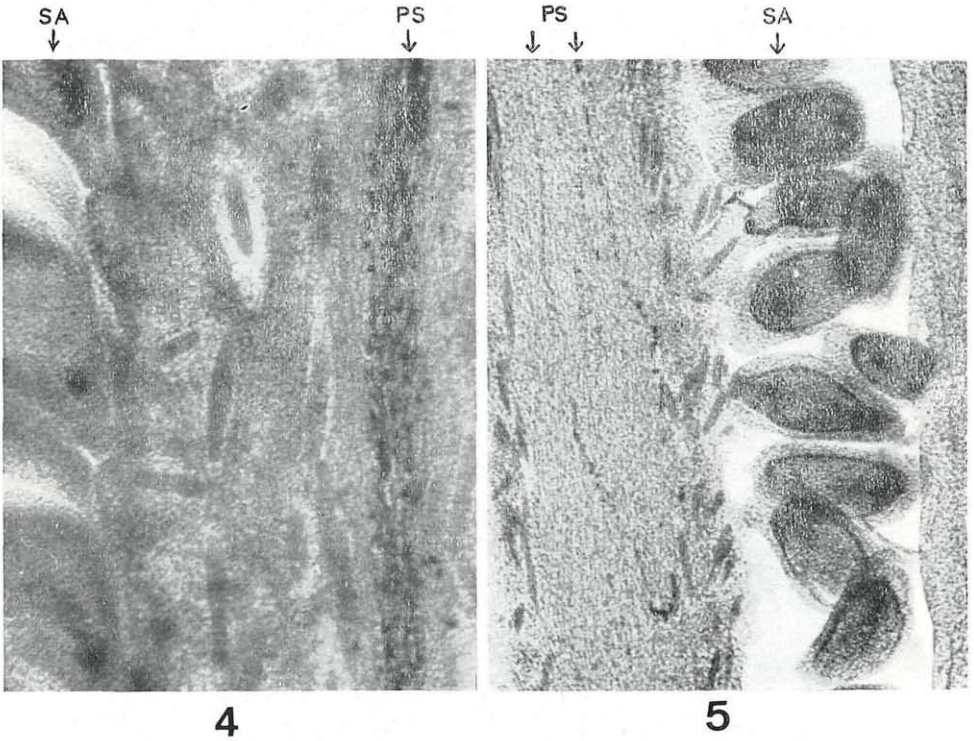

Abb. 4. Wachstum der Pollenschläuche innerhalb der Placentataschen des Fruchtknotens bei einer Kreuzung ohne sexuelle Affinität (*Oenothera berteriana* × *Oe. hookeri*). Längsschnitt, Chloralhydrat-Jod-Färbung (vgl. GLENK 1958), 300× vergr. PS = Pollenschläuche, SA = Samenanlagen.

Abb. 5. Wachstum der Pollenschläuche im Fruchtknoten bei einer Kreuzung mit sexueller Affinität (*Oenothera berteriana* × *Oe. scabra*). Längsschnitt, Chloralhydrat-Jod-Färbung (vgl. GLENK 1958), 80× vergr. PS = Pollenschläuche, SA = Samenanlagen.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

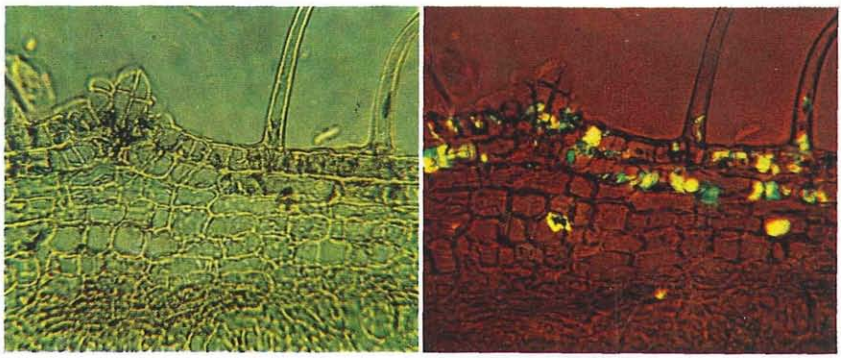

Abb. 6 (a) Abb. 6 (b)

Abb. 7 (a) Abb. 7 (b)

Abb. 6. Querschnitt durch die Fruchtknotenwand von *Oenothera* spec., 330× vergr. (a) im normalen Licht, (b) im polarisierten Licht bei Verwendung eines λ/4 Filters. — Die Calciumoxalatabscheidungen sind deutlich kontrastiert.
Abb. 7. Längsschnitt durch Placenta und Samenanlagen von *Oenothera* spec., 80× vergr. (a) im normalen Licht, (b) im polarisierten Licht unter Verwendung eines λ/4 Filters. — Die Raphiden, Oxalateinzelkristalle und der Oxalatsand sind klar erkennbar.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

direkt als Calciumquelle dienen, da sein Dissoziationsgrad bei hoher Wasserstoffionenkonzentration stark ansteigt. Die Pollen der Oenotheren keimen und wachsen jedoch nach unseren Beobachtungen sowohl in vitro als auch in vivo bei P_H 5,8—6,5 (GLENK 1960). Bei diesen P_H-Werten ist die Dissoziation von Calciumoxalat sehr gering. Wir müssen daher annehmen, daß bei *Oenothera*-Pollenschläuchen in erster Linie das gelöste, ionisierte Calcium physiologisch wirksam ist.

Die Konzentrationen an gelöstem Calcium konnten als Differenz lösliches Calcium = Gesamtcalcium — unlösliches Calcium (Calciumoxalat) aus unseren o. a. Analysenwerten leicht errechnet werden, nachdem die Mengen der Oxalatkristalle in den einzelnen Organen aus Zählungen und Messungen im polarisierten Licht (vgl. Abb. 6, Abb. 7) sowie anschließenden Volumina- und Gewichtsberechnungen bestimmt worden waren.

Je 150 Zählungen anhand von Gefrierschnittserien hoher Schnittdicke [1]) ergaben die größte Zahl von Raphiden und anderen Kristallformen in der Placenta (Tab. 4). Für die Oxalatniederschläge wurden folgende Gewichte errechnet: 6 γ im unteren Drittel des Griffels, 71 γ in der Placenta eines Fruchtknotens und 0,25 γ in einer Samenanlage. In Prozent des Frischgewichts ausgedrückt repräsentieren diese Werte 0,024% unlösliches Calcium im unteren Drittel des Griffels, 0,240% in der Placenta und 0,171% in den Samenanlagen. Bei der Subtraktion dieser Werte von den entsprechenden Ergebnissen der flammenphotometrischen Bestimmungen ergaben sich folgende Konzentrationen für gelöstes Calcium: 0,012% im unteren Griffeldrittel, 0,443% in der Placenta und 0,145% in den Samenanlagen. Auch das lösliche Calcium zeigt somit keine ansteigende Konzentration innerhalb des Gynözeums von *Oenothera* von der Placenta zu den Samenanlagen hin. Calciumgradienten, welche die wachsenden Pollenschläuche chemotrop zu den Mikropylen führen könnten, sind also weder im Falle des Gesamtcalciums noch im Falle des gelösten, ionisierten Calciums vorhanden.

Das Gesamtergebnis unserer Untersuchungen beweist, daß dem Calcium keine Bedeutung bei der chemotropischen Ausrichtung der *Oenothera*-Pollenschläuche zukommt.

Zusammenfassung

Zur Überprüfung der Hypothese von MASCARENHAS und MACHLIS, wonach Calcium bei den höheren Pflanzen das allgemeine Prinzip für die chemotropische Leitung der Pollenschläuche zu den Samenanlagen darstellt, wurden verschiedene Untersuchungen an *Oenothera*-Arten durchgeführt.

---

[1]) Die Schnittdicke wurde mit 60—80 μm absichtlich hoch gewählt, um Oxalatverluste durch Herausfallen von Calciumoxalatpartikeln aus angeschnittenen Zellen möglichst klein zu halten.

Tabelle 4

Quantitatives Verhältnis von Gesamt-Calcium, unlöslichem Calcium (Calciumoxalat) und gelöstem Calcium (Ca^{++}-Ionen) im Gynözeum von *Oenothera longiflora* (alle %-Angaben sind auf das Frischgewicht bezogen)

Teil des Gynözeums	(1) Frischgewicht (mg)	(2) % Gesamt-Ca	Calciumoxalat [1]) (3) Zahl und Einzelgewicht von Raphiden und Oxalatkristallen: Rhaphiden Zahl	Rhaphiden Gewicht (γ)	Oxalatkristalle Zahl	Oxalatkristalle Gewicht (γ)	(4) Gewicht aller Raphiden (γ)	Gewicht aller Kristalle (γ)	(5) Summe (γ)	(6) % Ca-oxalat	(7) % unlösl. Calcium	(8) % gelöst. Ca (Ca^{++}-Ionen)
Griffel (unt. Drittel)	7,0 (1 Stück)	0,036	15	0,391	10	0,025	5,86	0,25	6,11	0,087	0,024	0,012
Placenta (einschl. d. sterilen Mittel-säule	8,1 (in 1 Fruchtknoten)	0,683	180	0,391	30	0,025	70,40	0,75	71,15	0,878	0,240	0,443
Samenanlagen	0,04 (1 Stück)	0,316	0	0,391	10	0,025	0,0	0,25	0,25	0,625	0,171	0,145

Erklärungen:

(2) Werte aus Tab. 3;
(3) Mittelwerte aus 150 Zählungen;
(7) Werte aus (6) $\times \frac{40}{146}$;
(8) Werte aus (2) − (7).
Weiteres vgl. S. 106—107.

[1]) Calciumoxalat = $Ca(COO)_2 \cdot H_2O$, Whewellit, M 146; d = 2,23;

	Rhaphiden	Einzelkristalle	
Länge	195 μm	28 μm	Durchschnitte aus 150 Messungen
Breite	30 μm	20 μm	
Höhe	30 μm	20 μm	
Volumen	175.500 μm^3	11.200 μm^3	
Einzelgewicht	0,391 γ	0,025 γ	

(Volumen und Gewicht der Mikrokristalle [Kristallsandpartikel] sind verschwindend gering und können daher vernachlässigt werden.)

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Chemotropieversuche nach der Methode von SCHNEIDER (angle test) ließen keine Beeinflussung wachsender Pollenschläuche durch Calcium-Gradienten erkennen.

Es wurden Bestimmungen des Calciumgehaltes in den einzelnen Pflanzenteilen durch flammenphotometrische Analyse und des in Form von Calciumoxalat festgelegten Anteils durch Auszählung und Vermessung der Kristalle durchgeführt. Insbesondere wurde geprüft, ob ein Konzentrationsgradient des Gesamtcalciums oder des löslichen Calciums in Richtung von der Narbe zu den Samenanlagen hin besteht.

Im Fruchtknoten wurden die höchsten Calciumkonzentrationen (Gesamtcalcium und lösliches Calcium) in der Placenta, nicht jedoch in den Samenanlagen aufgefunden.

Aus unseren Versuchen ergaben sich weder in vitro noch in vivo Anhaltspunkte für eine chemotropische Wirkung des Calciums auf die Pollenschläuche von *Oenothera*. Dagegen fördern Calcium-Ionen die Pollenkeimung und das Schlauchwachstum.

Summary

In order to confirm the hypothesis of MASCARENHAS and MACHLIS that calcium were the general principle for the chemotropic direction of pollen tube elongation down to the ovules in higher plants, various investigations were carried out with *Oenothera* species.

Angle tests on chemotropism according to SCHNEIDER did not yield positive results. The growing pollen tubes were not attracted by calcium gradients in vitro.

Determinations of calcium content in the different parts of the plants by flame photometrical analysis and counts and measurements of calcium oxalate crystals (i. e. insoluble calcium) were performed. In the course of our investigations we tried to find out whether an increasing gradient of total or soluble calcium from the stigma to the ovules really exists.

In the pistils the highest concentrations of total calcium as well as of soluble calcium were determined in the placenta and not in the ovules.

Our experiments proved that there is no chemotropic action of calcium on the pollen tubes of *Oenothera* neither in vitro nor in vivo. On the other hand calcium ions are effective in promoting pollen germination and pollen tube growth.

Schrifttum

BAUMEISTER W. 1958. Hauptnährstoffe. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie 4: 482—557. — Berlin.

BERG = VOM BERG.

BORNKAMM R. 1969. Typen des Oxalathaushaltes bei einigen dikotylen Familien. — Ber. dtsch. bot. Ges. 82: 159—160.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

BREWBAKER J. L. & KWACK B. H. 1963. The essential Role of Calcium Ion in Pollen Germination and Pollen Tube Growth. — Amer. J. Bot. 50: 859—865.

— & — 1964. The Calcium Ion and Substances influencing Pollen Growth. — Pollen Phys. and Fertilization (ed. LINSKENS): 143—151. — Amsterdam.

BRINK R. A. 1924. Preliminary study of role of salts in pollen tube growth. — Bot. Gaz. 78: 361—377.

BUNGENBERG DE JONG H. G. & HENNEMANN J. P. 1934. Preliminary experiments on the influence of neutral salts on the germination of *Lathyrus* pollen. — Rec. Trav. bot. néerl. 31: 743—751.

COOK F. S. & WALDEN D. B. 1967. The male gametophyt of *Zea Mays* L. III. The influence of temperature and calcium on pollen germination and tube growth. — Canad. J. Bot. 45: 605—613.

GLENK H. O. 1958. Methoden zur Sichtbarmachung von Pollenschläuchen im Griffelgewebe an Ganzpräparaten. — Mikrokosmos 47: 121—125.

— 1960. Keimversuche mit *Oenothera*-Pollen in vitro. — Flora 148: 378—433.

— 1964. Untersuchungen über die sexuelle Affinität bei Oenotheren. — Pollen Phys. and Fertilization (ed. LINSKENS): 170—181. — Amsterdam.

— BLASCHKE G. & BAROCKA K. H. 1969. Untersuchungen zur Variabilität des Pollenschlauchwachstums bei Pollen di- und tetraploider Zuckerrüben. I. Bedingungen zur Keimung von *Beta*-Pollen in vitro. — Theor. appl. Genetics 39: 197—205.

— & WAGNER W. 1960. Untersuchung über die Borverteilung in einigen Oenotheren. — Ber. dtsch. bot. Ges. 73: 463—470.

— — & SCHIMMER O. 1970. Can Ca^{++}ions act as a chemotropic factor in *Oenothera* fertilization ? — Rep. Intern. Pollen Confer. Pullman/Wash., Aug. 1969. — London (im Druck).

GOTOH K. 1931. Physiological researches on pollen with special reference to the artificial germination of Gramineae pollen. — Mem. Fac. Sci. Agric., Taihoku Imp. Univ. 3: 61—197.

HERRMANN R. & ALKEMADE C. Th. J. 1960. Flammenphotometrie, 2. Aufl. — Berlin.

KENDALL W. A. 1967. Growth of red clover pollen. II. Elongation in vitro. — Crop Sci. 7: 342—344.

KWACK B. H. & KIM J. H. 1967. Effects of calcium ion and the protective action on survival and growth inhibition of pollen. — Physiol. Plantarum (Kbh.) 20: 73—82.

LINSKENS H. F. & TRACEY M. V. 1962. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, 5. — Berlin.

MASCARENHAS J. P. 1966. The distribution of ionic calcium in the tissues of the gynoecium of *Antirrhinum majus*. — Protoplasma 62: 53—58.

— & MACHLIS L. 1962 (a). Chemotropic response of *Antirrhinum majus* pollen to calcium. — Nature 196: 292—293.

— — 1962 (b). The pollen tube chemotropic factor from *Antirrhinum majus*: Bioassay, extraction and partial purification. — Am. J. Bot. 49: 482—489.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

— — 1964. Chemotropic response of the pollen of *Antirrhinum majus* to calcium. — Plant Physiol. 39: 70—77.

RAO C. H. 1969. Stimulation of in vitro germination and tube growth of diploid and autotetraploid pollen of *Hibiscus*. — Indian J. exp. Biol. 7: 127—129.

ROSEN W. G. 1961. Studies on pollen tube chemotropism. — Am. J. Bot. 48: 889—895.

— 1964. Chemotropism and fine structure of pollen tubes. Pollen Phys. and Fertilization (ed. LINSKENS): 159—166. — Amsterdam.

SCHILDKNECHT H. & BENONI H. 1963. Über die Chemie der Anziehung von Pollenschläuchen durch die Samenanlagen von Oenotheren. — Z. Naturforschg. 18b: 45—54.

SCHNEIDER G. 1956. Wachstum und Chemotropismus von Pollenschläuchen. — Z. Bot. 44: 175—205.

SCHWEMMLE J. 1968. Selective fertilization in *Oenothera*. — Advanc. Genet. 14: 225—324.

— ARNOLD C. G. & GLENK H. O. 1958. Preuve et bases chimiques de la fertilisation sélective chèz les Oenotheres. — Proc. X. Intern. Congr. Genet. Montreal, 2.

VOM BERG H. 1930. Beiträge zur Kenntnis der Pollenphysiologie. — Planta 9: 105—143.

WILLIAMS C. H. & TWINE J. R. 1960. C. S. I. R. O. Div. of Plant Ind., Divisional Rep. 19 (zitiert nach LINSKENS & TRACEY 1962).

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1970

Band/Volume: 14_1_2

Autor(en)/Author(s): Gleink Hans-Otto, Schimmer Oskar, Wagner Waldemar

Artikel/Article: Titel. 97-111