

Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich

Unter Mitwirkung von H. FISCHER und FR. STÜSSI

herausgegeben von

HANS STEINER

Redaktion: Zoologisches Institut der Universität Zürich, Künstlergasse 16

Druck und Verlag: Gebr. Fretz AG, Zürich

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit Quellenangabe gestattet

Jahrgang 102

Schlussheft

31. Dezember 1957

Mitteilungen

Untersuchungen über einen Pollenkeimungshemmstoff aus reifenden Samen von *Cyclamen persicum* Mill.

Von

F. H. SCHWARZENBACH (Zürich)¹⁾

(mit 7 Abbildungen im Text)

I. Problemstellung

Bei Pollenkeimungsversuchen *in vitro* fügt man den Kulturen häufig Narbenstücke, Griffelteile oder Samenanlagen zu, um die Keimrate zu erhöhen und das Pollenschlauchwachstum zu beschleunigen. In Versuchen mit Blütenstaub von *Cyclamen persicum* Mill. wurden aus diesem Grunde der Nährlösung Samenanlagen zugesetzt. Entgegen aller Erwartung trat dabei in einzelnen Fällen an Stelle der stimulierenden Wirkung eine vollständige Hemmung der Pollenkeimung auf. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, diese Hemmwirkung nach biologischen Gesichtspunkten zu analysieren, dann aber auch, physikalisch-chemische Eigenschaften des hemmenden Faktors zu bestimmen, um damit die Grundlagen für Isolierung und Konstitutionsaufklärung zu schaffen.

II. Versuchstechnik

Die Versuche über die Pollenkeimung von *Cyclamen persicum* wurden nach drei verschiedenen Verfahren durchgeführt, die im folgenden einzeln beschrieben sind.

1. Pollenkeimung im hangenden Tropfen

Man bringt einen Tropfen destillierten Wassers oder einen Tropfen einer wässrigen Nährlösung auf ein entfettetes Deckglas, impft mit Blütenstaub und setzt das Deckglas auf eine mit Vaseline abgedichtete feuchte Kammer auf. Die Keimung erfolgt im Thermostaten; der Versuch wird durch Abkühlung der Kulturen auf Temperaturen unter $+4^{\circ}\text{C}$ abgebrochen.

¹⁾ Gegenwärtige Adresse: Theodor Kocher Institut, Universität Bern.

Für die Auszählung wird die feuchte Kammer als ganzes unter das Mikroskop gebracht. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, das Deckglas abzuheben und mit dem Tropfen gegen oben auf einen Objektträger aufzulegen.

Die Pollenkeimung ist stark von der Temperatur und der Versuchsdauer abhängig; die Versuchsbedingungen werden in dieser Arbeit bei den einzelnen Experimenten angeführt.

Abmessungen der verwendeten Glaswaren: Deckgläser $32 \times 24 \times 0,5$ mm; feuchte Kammern, bestehend aus Objektträgern $76 \times 26 \times 1,2$ mm mit aufge kitteten Glasringen von 10 mm Höhe, 15 mm lichter Weite und 2 mm Wandstärke.

2. Pollenkeimung auf Filterpapier

Das Filterpapierverfahren wurde entwickelt, um bei der Isolierung des hemmenden Faktors papierchromatographische Trennmethode n anwenden zu können.

Man tränkt einen Streifen Filterpapier mit der zu untersuchenden wässrigen Lösung. Nach gründlicher Trocknung wird dieser Streifen für die Pollenkeimungsversuche in kleine Stücke von 0,5 bis 1,0 cm² zerschnitten. Man legt jedes dieser kleinen Stücke auf ein sauberes Deckglas, befeuchtet mit ein bis zwei Tropfen destillierten Wassers oder der gleichen Menge einer wässrigen Nährlösung, bis das Papier am Deckglas haftet. Überschüssige Feuchtigkeit wird mit einem Stück Fliesspapier abgesaugt. Auf das feuchte, festhaftende Papierstück tupft man den Blütenstaub mit dem Finger oder einem kleinen Pinsel auf. Nach der Impfung wird das Deckglas sofort auf eine feuchte Kammer aufgesetzt, die mit Paraffinöl oder Vaseline abgedichtet ist. Die Keimung erfolgt im Thermostaten. Der Versuch wird durch Abkühlung der Kulturen abgebrochen. Zur Vorbereitung der Auszählung wird das Filterpapierstück vom Deckglas abgezogen und in einem Wassertropfen auf einem Objektträger ausgeschwenkt. Dabei löst sich der anhaftende Blütenstaub zum grossen Teil von der Unterlage los, so dass die Auszählung im Wasserpräparat erfolgen kann.

3. Keimung in der Paraffinölkammer

Wie bei der Keimung im hangenden Tropfen bringt man einen Tropfen einer wässrigen Nährlösung auf ein Deckglas und impft mit Blütenstaub. Das Deckglas wird mit dem Tropfen nach unten auf eine mit Paraffinöl gefüllte Kammer aufgesetzt, so dass die Pollensuspension ringsum durch Paraffinöl isoliert wird. Die Auszählung der gekeimten Blütenstaubkörner erfordert kein besonderes Präparierverfahren.

Mit dieser Methode wurden sehr gute Erfahrungen gesammelt. Verglichen mit der Keimung im hangenden Tropfen dauern zwar die Versuche bedeutend länger; doch verläuft die Keimung viel gleichmässiger.

Die Paraffinölkammern wurden, der nebenstehenden Figur (Abb. 1) entsprechend, aus Einzelteilen zusammengekittet, die folgende Abmessungen aufwiesen:

Grundplatte Glas $32 \times 32 \times 1,5$ mm
Längsstreifen Glas $32 \times 8 \times 1,5$ mm
Querstreifen Glas $16 \times 8 \times 1,5$ mm

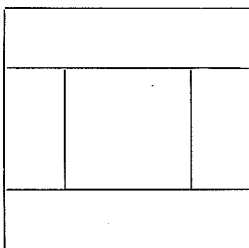


Abb. 1

III. Biologische Analyse der Hemmwirkung

1. Untersuchungen über die Abhängigkeit der Hemmwirkung vom Alter der Samenanlagen

Samenanlagen aus unbestäubten, verschiedenaltigen Blüten der gleichen Pflanze wurden in ihrer Hemmwirkung auf die Keimung von Zyklopenpollen untersucht. Blütenstaub und Samenanlagen stammten von Pflanzen der Sorte «Lachsrot» (Züchtung Gebr. MOLL, Zollikon).

Die Versuche zeigten, dass Samenanlagen aus jungen Blütenknospen stark hemmen; Samenanlagen aus Blüten, die in der Entfaltung stehen, weisen demgegenüber eine stark stimulierende Wirkung auf die Pollenkeimung auf. Mit zunehmendem Alter sinkt dieser fördernde Einfluss ab; doch zeigen selbst welkende Blüten oft noch eine schwache Keimungsförderung.

Da bei den Experimenten, die zur Auffindung der Hemmwirkung führten, Samenanlagen aus offenen Blüten verwendet wurden, fällt das Alter der unbestäubten Samenanlage für die Erklärung der Hemmwirkung ausser Betracht.

2. Untersuchungen über die Abhängigkeit der Keimungshemmung vom Befruchtungszustand der Samenanlage

Frischentfaltete Blüten der Zyklopiensorte «Leuchtfeuer» (Züchtung MOLL, Zollikon) wurden künstlich mit Blütenstaub der gleichen Sorte belegt. Zehn Tage nach der Bestäubung wurden die heranreifenden Samen im Keimungstest geprüft. Dabei zeigte sich, dass befruchtete Samenanlagen die Keimung von Zyklopenpollen vollständig blockierten. Während in sieben Kontrollversuchen im Mittel 15 % der Pollenkörner auskeimten, war in sechs Kammern bei Zusatz befruchteter Samenanlagen die Keimung völlig unterbunden. Dieses Experiment beweist, dass die Hemmwirkung vom Befruchtungszustand der Samenanlage abhängt. Befruchtete Samenanlagen hemmen die Keimung von weiteren Blütenstaubkörnern; bei unbefruchteten Samenanlagen fehlt die Keimungshemmung.

3. Lokalisation des hemmenden Faktors

Durch Zerlegung reifender Zyklamensamen in Embryo, Endosperm und Samenschale und durch die getrennte Untersuchung dieser drei Fraktionen im Keimungstest liess sich nachweisen, dass der hemmende Faktor in der Samenschale oder im unmittelbar darunter liegenden Gewebe lokalisiert ist. Stücke der Samenschale unterbinden die Pollenkeimung vollständig; das Endosperm weist eine leicht fördernde Wirkung auf, während die Zugabe von Embryonen die Keimrate nicht verändert.

4. Untersuchung über die Artspezifität der Hemmwirkung

Um festzustellen, ob befruchtete Samenanlagen von *Cyclamen persicum* nur arteigenen Blütenstaub in der Keimung hemmen, wurden Versuche mit Pollen aus kurz- und langgriffligen Blüten von *Primula obconica* angesetzt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Es ergab sich, dass Kurz- und Langgriffelpollen von *Primula obconica* durch heranreifende Samen von *Cyclamen persicum* in der Keimung teilweise gehemmt werden. Dabei reagiert Blütenstaub aus langgriffligen Blüten empfindlicher als Pollen der Kurzgriffelpflanzen. Die Hemmwirkung befruchteter Samenanlagen ist daher nicht auf arteigenen Blütenstaub beschränkt.

Tabelle 1 Hemmung artfremden Blütenstaubes durch reife Zyklamensamen

Versuchsbedingungen: Keimung in der Paraffinölkammer, Nährlösung: Glukose 0,5 molar, Temperatur 23°, Zeit: 21 h 30 min. Auszählung von je 6 × 50 Pollenkörnern.

	Anzahl Proben	Keimprozent
Kontrolle über die Keimfähigkeit des Kurzgriffelpollens von <i>Primula obconica</i>	2	31
Keimrate bei Zusatz von reifenden Zyklamensamen	2	16
Kontrolle über die Keimfähigkeit des Langgriffelpollens von <i>Primula obconica</i>	2	52
Keimrate bei Zusatz reifender Zyklamensamen	1	3

5. Untersuchung über die Lichtempfindlichkeit des hemmenden Faktors

Setzt man reife Zyklamensamen, die noch keine dunkelgefärbte Samenschale aufweisen, während mehreren Tagen dem direkten Sonnenlicht aus, so geht die Hemmwirkung allmählich verloren, während die im Dunkeln aufbewahrten Samen aus der gleichen Frucht ihre Aktivität bewahren.

Tabelle 2 Zerstörung der Hemmwirkung bei Belichtung reifender Samen

Versuchsbedingungen: Keimung in der feuchten Kammer, Nährlösung: Glukose 0,5 molar, Temperatur 23°, Zeit 6 h. Auszählung von je 6 × 50 Pollenkörnern.

A. Belichtung während zwei Tagen	Anzahl Proben	Keimprozent
Keimfähigkeitskontrolle	3	22
Keimrate bei Zusatz von Samenanlagen, die zwei Tage im Dunkeln aufbewahrt wurden	3	0
Keimrate bei Zusatz von Samenanlagen, die zwei Tage direktem Sonnenlicht ausgesetzt waren	3	10

B. Belichtung während fünf Tagen

Keimfähigkeitskontrolle	4	39
Keimrate bei Zusatz von Samenanlagen, die fünf Tage im Dunkeln aufbewahrt wurden	4	4
Keimrate bei Zusatz von Samenanlagen, die fünf Tage direktem Sonnenlicht ausgesetzt waren	4	24

IV. Versuche zur Isolierung des hemmenden Faktors

1. Untersuchungen über die Löslichkeit des hemmenden Faktors

Gemahlene Zyklamensamen wurden mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Nach Verdampfung des Lösungsmittels im Vakuum wurde eine vierprozentige Lösung von Glukose zugesetzt. Von dieser Stammlösung ausgehend prüften wir eine Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor $q = 0,1$ in ihrer Wirkung auf die Keimung von Zykamenblütenstaub.

Die Experimente zeigten, dass der Faktor in Wasser leicht löslich ist. Ausserdem lässt er sich mit Methanol extrahieren, ist aber in Äther und Azeton unlöslich.

Extrahiert man Zyklamensamen ein erstes Mal mit heissem Methanol, ein zweites Mal mit heissem Wasser, so weisen beide Extrakte hemmende Wirkung auf. Daraus kann geschlossen werden, dass der hemmende Faktor sich in Wasser leichter als in Methylalkohol löst.

2. Untersuchung über die Eignung papierchromatographischer Verfahren zur Isolierung des hemmenden Faktors

A. Vorversuche zur Auswahl geeigneter Lösungsmittel

Da sich Blütenstaub von *Cyclamen persicum* auf Filterpapier leicht zur Keimung bringen lässt, liegt es nahe, für die Isolierung des hemmenden Faktors papierchromatographische Verfahren heranzuziehen. Die Anwendung dieser Methoden ist nur möglich, wenn der Faktor durch die in Frage kommenden Lösungsmittel nicht verändert wird und wenn die Lösungsmittel die Keimung des Blütenstaubes nicht beeinflussen. Beide Punkte wurden in Vorversuchen experimentell abgeklärt.

Methode: Von drei gleichen Filterpapierstreifen bleibt der erste unbehandelt. Der zweite Streifen wird mit destilliertem Wasser, der dritte mit einem wässrigen Extrakt aus Zyklamensamen getränkt. Diese beiden Streifen trocknet man in der Dunkelkammer, um eine Beeinflussung des Extraktes durch Licht zu vermeiden (s. nächstes Kapitel). Nach der Trocknung werden die beiden Streifen mit dem zu prüfenden Lösungsmittel benetzt und erneut getrocknet. Stücke aller drei Streifen werden nach dem Filterpapierverfahren auf ihre Aktivität im Keimungstest geprüft.

Aus den Kulturen, die auf dem unbehandelten Streifen angesetzt werden, lässt sich die Keimfähigkeit des Blütenstaubes bestimmen. Deckt sich die Keim-

rate der Kulturen auf Stücken des zweiten Streifens mit den Werten der Kontrolle, so weist das Lösungsmittel keine toxische Wirkung auf. Keimt auf dem dritten Streifen der Blütenstaub aus, so wird der Extrakt in seiner Wirkung durch das Lösungsmittel beeinträchtigt.

Versuchsergebnisse: Azeton, Pyridin, Essigsäure, Essigester, Äthanol, Butanol und Phenol wurden auf ihre Giftigkeit im Keimungstest untersucht. Die gleichen Lösungsmittel prüften wir in ihrem Einfluss auf wässrige Extrakte aus Zyklamensamen. Bei diesen Versuchen verzichteten wir teilweise auf die Mitführung einer Keimfähigkeitskontrolle.

Tabelle 3 Versuche über die Resistenz des hemmenden Faktors gegenüber Lösungsmitteln und über die Giftigkeit von Lösungsmitteln im Keimungstest

Versuchsbedingungen: Keimung auf Filterpapier, Nährlösung: Glukose 0,5 molar, Temperatur 23°, Zeit 3 h. Auszählung von je 6 × 50 Pollenkörnern.

Lösungsmittel	I		II		Hemmung	III		Abbau des Hemmstoffes
	n	%	n	%		n	%	
Azeton	3	29	3	18	+	3	0	kein Abbau
Pyridin			3	23	—	4	6	fraglich
Essigsäure			3	7	++	3	3	kein Abbau
Essigester	3	29	6	6	++	3	3	kein Abbau
Äthanol			3	1	+++	3	1	nicht feststellbar
Butanol	4	27	20 ¹⁾	27	—	4	2	kein Abbau
Phenol			3	6	++	3	1	kein Abbau

¹⁾ Auszählung von je 100 Pollenkörnern pro Kammer statt wie üblich von 300.

Zeichenerklärung:

I Keimfähigkeit des Pollens auf unbehandeltem Filterpapierstreifen

II Test auf toxische Wirkung des Lösungsmittels: — keine toxische Wirkung, + bis+++ zunehmende toxische Wirkung des Lösungsmittels

III Beeinflussung des Extraktes durch das Lösungsmittel

Die geprüften Lösungsmittel lassen sich nach zunehmender toxischer Wirkung im Pollenkeimungstest in folgende Reihe stellen: Butanol, Pyridin, Azeton, Essigsäure, Essigester, Phenol und Äthanol. Äthylalkohol wirkt selbst in Spuren toxisch; dagegen konnte in späteren Versuchen die Giftwirkung der Essigsäure, des Essigesters, des Pyridins und des Azetons durch sorgfältige Trocknung der Filterpapierstreifen zum Verschwinden gebracht werden.

Der hemmende Faktor wird in seiner Aktivität durch Azeton, Essigsäure, Essigester, Butanol und Phenol nicht beeinflusst. Eine partielle Zerstörung der Aktivität durch Pyridin ist unsicher; eine Beeinflussung des Extraktes durch Äthanol ist nicht feststellbar, da das Lösungsmittel für sich allein ebenfalls keimungshemmend wirkt.

B. Versuche über die papierchromatographische Isolierung des Hemmstoffes

Das Filterpapierverfahren erlaubt es, Papierchromatogramme im Pollenkeimungstest biologisch auszutesten und damit die Lage einer hemmenden

Fraktion im Chromatogramm zu bestimmen. Versuche erfolgten mit verschiedenen Kombinationen von Lösungsmitteln, um geeignete Phasen für die papierchromatographische Trennung des hemmenden Extraktes aus Zyklamensamen aufzufinden. Bei diesen Experimenten wurde der hemmende Faktor mit destilliertem Wasser in der Siedehitze extrahiert. Diesen Auszug trägt man in Mengen von 0,05 bis 0,30 ml auf den Chromatogramstreifen auf. Der Extrakt wird eindimensional, aufsteigend chromatographiert. Nach gründlicher Trocknung des Chromatogrammes zerschneidet man den Streifen in Stücke von 1 cm Länge. Die Lage dieser Abschnitte im Chromatogramm wird markiert, um die Hemmwirkung nachträglich lokalisieren zu können. Jedes einzelne Papierstreifchen wird nach dem Filterpapierverfahren im Pollenkeimungstest mit Blütenstaub von *Cyclamen persicum* untersucht. Zum Vergleich führt man mehrere Kontrollen mit, die auf Abschnitten des Chromatogrammes angesetzt werden, die von den Lösungsmitteln, nicht aber vom Hemmstoffextrakt durchflossen worden sind. Auf diese Weise lassen sich allfällige Hemmwirkungen, die durch Rückstände von Lösungsmitteln bedingt sind, erkennen.

Die Keimung dauert bei 24° 2½ bis 3 Stunden.

Die Versuche mit verschiedenen Gemischen von Lösungsmitteln sind in den folgenden graphischen Darstellungen zusammengefasst. Auf der Abszisse wird in Zentimetern die Entfernung des Chromatogrammabschnittes von der Stelle angegeben, an welcher der Extrakt aufgetropft wurde. Dabei liegt der Abschnitt, der z. B. die Bezeichnung «5» trägt, zwischen den Grenzen 4 und 5 cm. Auf der Ordinate findet sich zu jedem Abschnitt die dazugehörige Keimrate, die durch Auszählung von 100 Pollenkörnern bestimmt wurde.

Ergab die erste Prüfung des Chromatogrammes für einen bestimmten Bereich eine Hemmwirkung, so wurden die entsprechenden Abschnitte in einem parallel mitgeführten, zweiten Chromatogramm untersucht. Gelegentlich erfolgte eine genauere Lokalisation, indem dieses zweite Chromatogramm in Abschnitte von ½ cm unterteilt wurde.

Lokalisation des hemmenden Faktors im Chromatogramm mit Butanol

Extraktion: 2,5 g gemahlene Zyklamensamen wurden mit 25 cm³ H₂O dest. in der Siedehitze extrahiert.

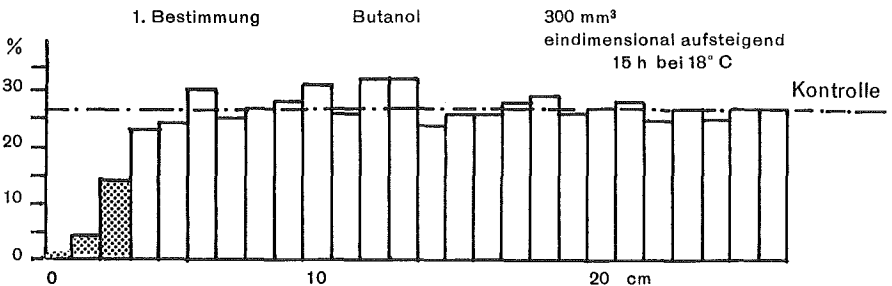


Abb. 2

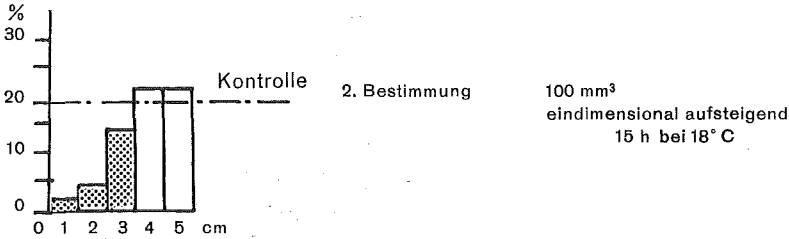


Abb. 2

Im ersten Versuch mit 300 mm³ Extrakt ergab sich ein r_f -Wert, der kleiner als 0,12 ist. Dieses Ergebnis liess sich in einem Parallelversuch mit 100 mm³ bestätigen (Abb. 2).

Lokalisation des hemmenden Faktors im Chromatogramm mit Pyridin-Essigester

Die Herstellung des Extraktes erfolgte wie bei den Versuchen mit Butanol. Ein erstes Experiment mit 300 mm³ Extrakt zeigte im Chromatogramm zwei Bereiche mit hemmender Wirkung (Abb. 3). Ein erster Abschnitt mit starker Hemmwirkung lag hart hinter der Front des Lösungsmittels (r_f -Wert 0,95); daneben trat eine weitere Hemmung bei der Auftragungsstelle des Extraktes auf. Die Vermutung, dass diese zweite Hemmung durch Rückstände von Lösungsmitteln bedingt sei, liess sich bestätigen, indem bei zweimaliger, sorgfältiger Trocknung des Chromatogrammes unter Reduktion der Extraktmenge auf 100 mm³ diese Hemmung verschwand.

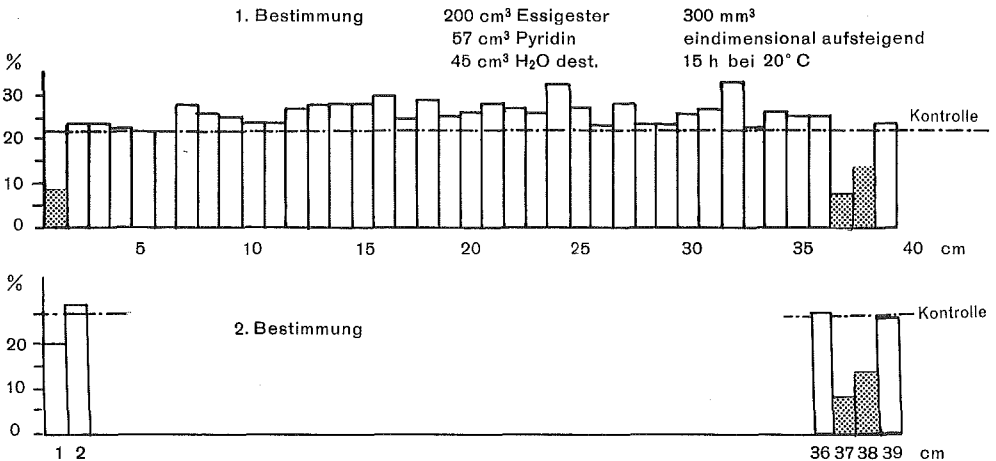


Abb. 3

In einem weiteren Versuch wurde die Zusammensetzung der beiden Phasen geändert. Wiederum traten zwei Bereiche mit hemmender Wirkung an den

beiden Enden des Chromatogrammes auf. Wie im vorhergehenden Versuch wird die Hemmung am distalen Ende dem hemmenden Faktor aus dem Extrakt zugeschrieben; die Hemmung am Ursprung des Chromatogrammes lässt sich auf Rückstände der Lösungsmittel zurückführen.

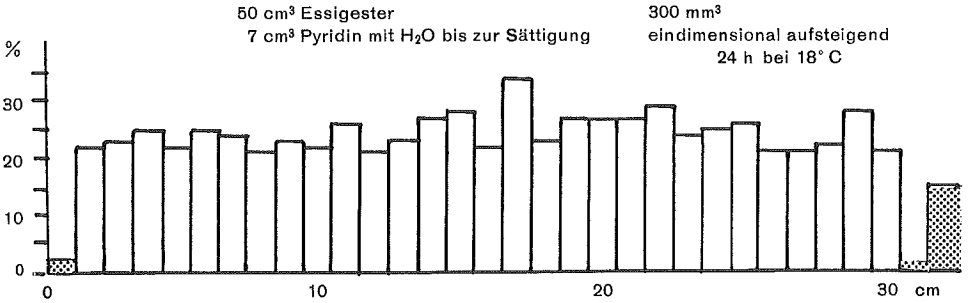


Abb. 4

Lokalisation des hemmenden Faktors im Chromatogramm mit Butanol, Eisessig und Wasser

Wie bei den früheren Versuchen wurden 2,5 g gemahlene Zyklamensamen mit 25 cm³ destilliertem Wasser in der Siedehitze erschöpfend extrahiert.

In einem ersten Versuch mit 75 cm³ Butanol, 55 cm³ Eisessig und 20 cm³ destilliertem Wasser fanden sich im Chromatogramm zwei Partien mit Hemmwirkung, die erste unmittelbar hinter der Front des Lösungsmittels, die zweite in der Nähe des Ursprunges (Abb. 5). Da in Kontrollversuchen gezeigt werden konnte, dass auch Frontabschnitte des Chromatogrammes, die ausserhalb der Fliesszone des Hemmstoffes liegen, die Pollenkeimung hemmen, ist anzunehmen, dass die Fronthemmung nicht durch den Hemmstoff bedingt wird. Möglicherweise wird diese ausgeprägte Hemmung durch Schwermetallionen verursacht, die aus dem Papier stammen und durch Lösungsmittel mitgerissen werden.

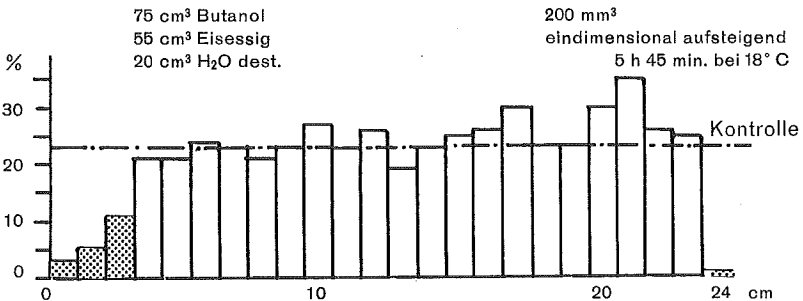


Abb. 5

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Zusammensetzung der Lösungsmittel geändert (Abb. 6). Im ersten Chromatogramm traten dabei drei Stellen mit hemmender Wirkung auf. Neben hemmenden Partien an den beiden Enden fand sich eine schwach ausgeprägte Hemmwirkung in einer Entfernung von 21 cm vom Ursprung des Chromatogrammes, was einem r_f -Wert von 0,50—0,55 entspricht. In einem zweiten Versuch wurden die entsprechenden Abschnitte erneut geprüft, wobei sich der hemmende Abschnitt in der Mitte des Chromatogrammes nicht mehr auffinden liess, so dass es sich vermutlich um eine zufällige, starke Abweichung der Keimrate vom Kontrollwert handelt. Die hemmende Wirkung der Abschnitte hinter der Front des Lösungsmittels wird nicht durch den Extrakt bedingt (vgl. vorhergehenden Versuch), so dass dem hemmenden Faktor ein r_f -Wert zukommt, der kleiner als 0,12 ist.

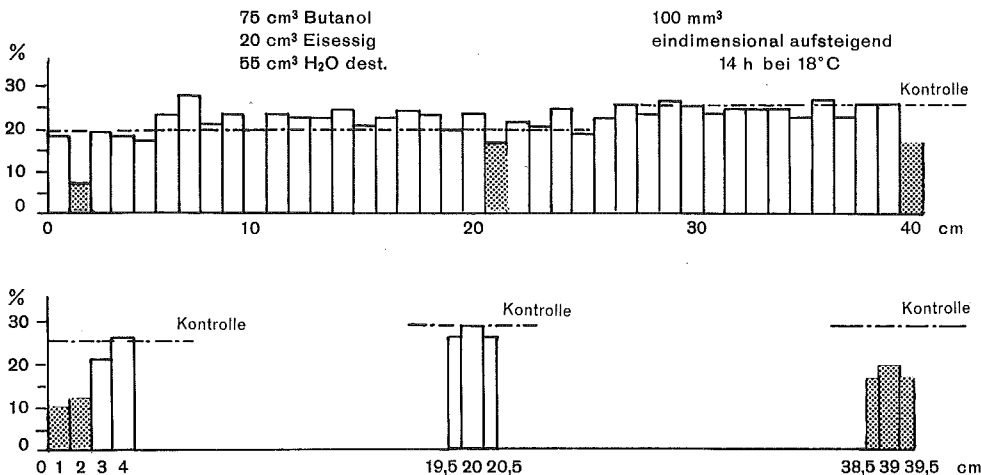


Abb. 6

Zusammenstellung der r_f -Werte in verschiedenen Lösungsmitteln

Die Versuche über papierchromatographische Analyse des Extraktes machen es wahrscheinlich, dass im Extrakt aus Zyklamensamen ein einziger Hemmstoff auftritt. Die r_f -Werte dieses Hemmstoffes in verschiedenen Lösungsmitteln sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Lösungsmittel:

Lösungsmittel:			r_f -Wert
Butanol			0,00—0,12
Butanol	75 cm ³	Eisessig 55 cm ³	0,00—0,12
Butanol	75 cm ³	Eisessig 20 cm ³	0,02—0,05
Essigester	200 cm ³	Pyridin 57 cm ³	0,92—0,98
Essigester	50 cm ³	Pyridin 7 cm ³	0,95—1,00
		Wasser 20 cm ³	
		Wasser 55 cm ³	
		Wasser 45 cm ³	
		Wasser bis Sättigung	

V. Physikalische und physikalisch-chemische Eigenschaften des hemmenden Faktors

1. Thermostabilität

Ein wässriger Extrakt (0,1 g gemahlene Zyklamensamen mit 10 cm³ kaltem Wasser extrahiert) wurde während 15 Minuten im Autoklaven bei 125° C sterilisiert. Die Hemmwirkung im Pollenkeimungstest blieb erhalten, so dass dem hemmenden Faktor eine hohe Thermostabilität zukommt.

Tabelle 4 **Thermostabilität des hemmenden Faktors**

Versuchsbedingungen: Keimung in der feuchten Kammer, Nährlösung: Glukose 4 %, Temperatur 24°, Zeit 4 h. Auszählung von je 6 × 50 Pollenkörnern.

	Anzahl Proben	Keimprozent
Kontrolle	4	23
Frisch hergestellter, wässriger Extrakt	3	0
Wässriger Extrakt, während 15 Minuten bei 125° C im Autoklaven erhitzt	2	0

2. Lichtempfindlichkeit des hemmenden Faktors

A. Empfindlichkeit gegenüber diffusem Tageslicht

Die Vorversuche hatten gezeigt, dass bei mehrtägiger Bestrahlung mit direktem Sonnenlicht die Hemmwirkung der heranreifenden Zyklamensamen teilweise verloren geht. Da die Vermutung bestand, dass die Zerstörung des hemmenden Faktors vor allem durch die UV-Komponente des Sonnenlichtes bedingt sei, wurde ein Belichtungsversuch mit diffusem Tageslicht unter Abschirmung des Ultraviolettlichtes durchgeführt. Dabei setzten wir einen sterilisierten, wässrigen Extrakt während 24 Tagen diffusem Tageslicht aus und prüften ihn von Zeit zu Zeit auf seine Hemmwirkung im Keimungstest mit Zyklamenpollen. Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, war nach 24 Tagen die Hemmwirkung erst zum Teil aufgehoben, so dass angenommen werden kann, dass durch diffuses Tageslicht der Hemmstoff nur in geringem Masse inaktiviert wird.

Tabelle 5 **Belichtung eines wässrigen Extraktes mit diffusem Tageslicht**

Versuchsbedingungen: Keimung in der Paraffinölkammer, Nährlösung: Glukose 4 %, Temperatur 24°, Zeit 6 h. Auszählung von je 6 × 50 Pollenkörnern.

Dauer der Belichtung in Tagen	Keimfähigkeitskontrolle		Wirkung des Extraktes	
	n	%	n	%
0	2	23	2	1
½	2	30	2	1
1½	2	28	2	1
2½	2	19	2	1
5	2	25	2	4
24	2	23	2	6

Zeichenerklärung: n = Anzahl Proben, % = Keimprozent bei Auszählung von 300 Pollenkörnern.

B. Spektrale Empfindlichkeit des hemmenden Faktors

Versuchstechnik

Für den Versuch wird ein Stück Filterpapier in der Grösse einer Photoplatte zurechtgeschnitten und in die Kassette eines Quarzspektrographen eingelegt. Mit Bleistift werden die Umrisse des Kassettenschlitzes markiert. Man unterteilt dieses abgegrenzte Rechteck in Streifen von 1 cm Breite, wobei die Begrenzungslinien parallel zu den Spektrallinien laufen. Mit Hilfe der Wellenlängenskala bestimmt man die Grenzen der Spektralbereiche, die bei der nachfolgenden Exposition des Streifens auf die einzelnen Abschnitte des markierten Rechteckes einstrahlen.

Nach dieser Vorbereitung wird der Filterpapierstreifen mit einem wässrigen Extrakt aus Zyklamensamen getränkt und während 24 Stunden in der Dunkelkammer getrocknet. Für die Belichtungsversuche legt man das getrocknete Filterpapier an Stelle einer Photoplatte in die Kassette des Quarzspektrographen ein und belichtet während zwei bis vier Stunden. Nach Ablauf dieser Belichtungszeit wird der Streifen entsprechend der vorbereiteten Einteilung in Stücke von 1 cm Breite zerschnitten. Jeden dieser Abschnitte unterteilt man wieder in drei Streifchen (quer zur Richtung der Spektrallinien). Diese Aufteilung erlaubt es, im Keimungstest drei Parallelversuche anzusetzen und auf diese Weise an Stelle einer einzigen Bestimmung Mittelwerte aus drei Auszählungen zu berechnen.

Nach der Filterpapiermethode werden die einzelnen Streifchen mit einer vierprozentigen Glukoselösung befeuchtet und auf Deckgläser gelegt. Die überschüssige Glukoselösung wird mit einem Fliesspapier abgesaugt, bis die Papierstreifchen am Glas festhaften. Nach Impfung mit Zyklamenpollen werden die Deckgläser auf feuchte Kammern aufgesetzt. Die Keimung des Blütenstaubes dauert bei 24° C 2½ bis 3 Stunden. Für die Auszählung der gekeimten Pollenkörner wird das Filterpapierstreifchen in einem Tropfen Wasser auf einem Objektträger ausgeschwenkt. Die Bestimmung der Keimrate erfolgt durch Auszählung von 6×50 Pollenkörnern.

Im Versuch sind zwei Kontrollen mitzuführen. In einer ersten Serie von Vergleichskulturen wird die Keimfähigkeit des Pollens auf Filterpapier bestimmt; in einer zweiten Gruppe prüft man auf unbelichteten Stellen des mit dem Extrakt getränkten Filterpapiers den hemmenden Faktor auf seine Wirkung im Pollenkeimungstest.

Wird in einem Experiment der hemmende Faktor durch einen bestimmten Spektralbereich nicht beeinflusst, so treten Keimzahlen auf, welche der Kontrolle auf unbelichteten Partien des Filterpapiers entsprechen. Bei photochemischer Inaktivierung des hemmenden Faktors steigt die Keimrate an und erreicht bei vollständiger Zerstörung des Hemmstoffes die Höhe der Keimfähigkeitskontrolle.

Erfahrungen mit der Versuchstechnik

Das Versuchsergebnis wird durch die Konzentration des Hemmstoffextraktes und durch die Dosierung der Belichtung bestimmt.

Für Versuche, die miteinander verglichen werden sollen, wählt man immer die gleiche Stammlösung des wässrigen Extraktes. Die Konzentration dieser Stammlösung ist so festzulegen, dass in der Dunkelkontrolle die Hemmwirkung des Extraktes noch deutlich nachzuweisen ist. Andererseits aber sollte die Stammlösung soweit verdünnt sein, dass bei einer Belichtung von zwei bis vier Stunden Dauer die Hemmwirkung nachweisbar aufgehoben wird. Gute Resultate ergaben sich bei einer Verdünnung des wässrigen Extraktes, welche die Keimrate des Zyklopenpollens auf 30 bis 50 % der Keimfähigkeitskontrolle herabsetzte.

Die geeignete Konzentration ist durch Vorversuche zu bestimmen, da sie weitgehend durch das vorhandene Samenmaterial bedingt wird.

Die Dosierung der Belichtung erfolgt bei gegebener Spaltbreite des Spektrographen durch Variation von Stromstärke und Belichtungsdauer. Diese beiden Faktoren sind für die verwendete Apparatur empirisch festzulegen. Bei einer Kohlenbogenlampe als Lichtquelle und einer auf 0,5 mm festgelegten Spaltbreite des benützten Hilger-Quarzspektrographen ergab eine Belichtungszeit von zweieinhalb bis drei Stunden bei 5,5 Ampere gute Resultate.

Ergebnisse der Versuche über die spektrale Empfindlichkeit des hemmenden Faktors

Die Resultate eines Versuches mit drei Parallelbestimmungen finden sich in Abb. 7. Wie aus dieser graphischen Darstellung hervorgeht, weist die Kurve der spektralen Empfindlichkeit zwei Maxima bei 264—273 $m\mu$ und 360—394 $m\mu$ auf. Drei Minima liegen in den Spektralbereichen 232—237 $m\mu$, 246—254 $m\mu$ und 274—286 $m\mu$. Die stärkste Inaktivierung des Hemmstoffes findet sich im kurzwelligen Bereich zwischen 264—273 $m\mu$; das zweite Maximum zwischen 360 und 394 $m\mu$ ist etwas weniger ausgeprägt. Sichtbares Licht ist sehr wenig wirksam, was die Ergebnisse der Versuche mit diffusem Tageslicht unter Abschirmung der UV-Komponente bestätigt.

Der Verlauf der in Abb. 7 dargestellten Kurve ist durch weitere Versuche sichergestellt.

Das biologisch bestimmte Empfindlichkeitsspektrum dürfte bei der Isolierung und der Aufklärung der chemischen Konstitution des Hemmstoffes von Bedeutung sein.

Auf eine Bestimmung der Intensitätsverteilung der Strahlung innerhalb des untersuchten Spektralbereiches musste verzichtet werden, obwohl die Kenntnis dieser Versuchsbedingung bei der Interpretation der Empfindlichkeitskurve von grosser Bedeutung wäre. Die Bestimmung der Intensitätsverteilung scheiterte an experimentellen Schwierigkeiten.

In diesem Zusammenhang möchte ich den Herren Prof. Dr. J. EGGERT und Dr. AMSLER vom Photographischen Institut der E.T.H. Zürich für die eingehende Diskussion der optischen Probleme bestens danken.

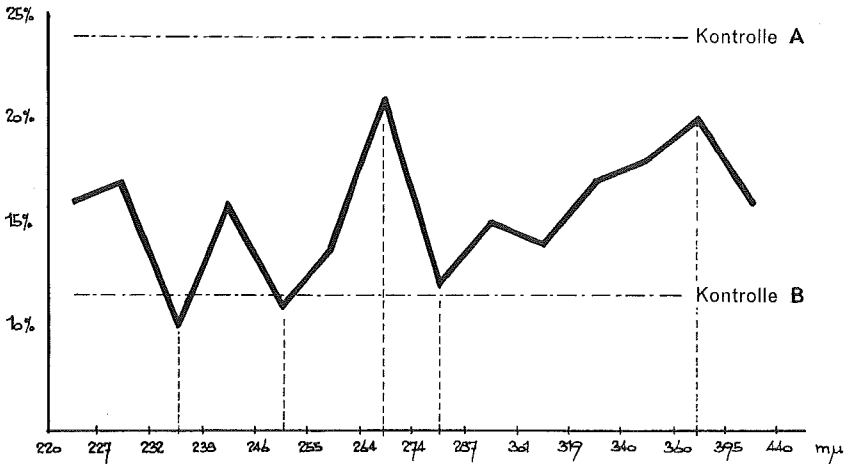


Abb. 7

Zeichenerklärung:

Kontrolle A: Keimfähigkeitskontrolle auf unbehandeltem Filterpapier.

Kontrolle B: Hemmwirkung des verwendeten Extraktes bei Prüfung unbelichteter Abschnitte des mit dem wässrigen Auszug getränkten Filterpapiers.

Ordinate: Mittelwerte der Keimraten in Prozenten aus drei Parallelbestimmungen.

Abszisse: Untersuchte Spektralbereiche; Angaben der Grenzen in $m\mu$.

VI. Experimente zur Konstitutionsaufklärung

Da leider nicht genügende Mengen von *Cyclamen persicum* Mill. für die Untersuchung zur Verfügung standen, musste auf Experimente zur Konstitutionsaufklärung des Hemmstoffes verzichtet werden.

VII. Zusammenfassung

1. In reifenden und reifen Samen von *Cyclamen persicum* Mill. findet sich ein Faktor, der die Keimung von Blütenstaub der gleichen Pflanzenart vollständig unterbindet.

2. Der hemmende Faktor wird nach der Befruchtung gebildet; er fehlt in Samenanlagen, die unbestäubten Blüten entnommen werden.

3. Durch Zerlegung reifender *Cyclamen* Samen und nachfolgender Prüfung der einzelnen Fraktionen lässt sich zeigen, dass der hemmende Faktor in der Samenschale oder im unmittelbar darunter liegenden Gewebe lokalisiert ist. Die Zugabe von Embryonen beeinflusst die Keimung von *Cyclamen* Pollen nicht; Endosperm erhöht dagegen die Keimrate.

4. Reifende Samen von *Cyclamen persicum* hemmen ausser dem arteigenen Pollen auch Blütenstaub aus kurz- und langgriffligen Blüten von *Primula obconica*.

5. Der hemmende Faktor lässt sich mit Wasser oder Methanol extrahieren; er ist in Äther und Azeton unlöslich.

6. Wässrige Extrakte des hemmenden Faktors ertragen Sterilisation im Autoklaven bei 125° C während 15 Minuten.

7. Durch Belichtung mit kurzwelligem Licht wird der hemmende Faktor inaktiviert, die wirksamen Spektralbereiche für die photochemische Inaktivierung liegen zwischen 264 und 273 $m\mu$ und zwischen 360 und 394 $m\mu$. Bei Belichtung mit den Spektralbereichen 232—237 $m\mu$, 246—254 $m\mu$ und 274—286 $m\mu$ wird die Hemmwirkung des Extraktes nicht zerstört (Abb. 7).

8. Eine Reihe von Lösungsmitteln wurde auf ihre Eignung zur papierchromatographischen Isolierung des Hemmstoffes geprüft. Für papierchromatographische Verfahren eignen sich Butanol, Pyridin, Essigester und Essigsäure unter der Voraussetzung, dass vor der biologischen Untersuchung der Chromatogramme die Papierstreifen sorgfältig getrocknet werden. Äthanol wirkt selbst in Spuren noch stark hemmend auf die Keimung von Zyklamenpollen. Eine Beeinträchtigung des hemmenden Faktors durch die Lösungsmittel liess sich nicht nachweisen.

9. Es wird eine Methode beschrieben, die es erlaubt, Papierchromatogramme biologisch im Keimungstest mit Zyklamenpollen zu untersuchen.

10. In Versuchen zur papierchromatographischen Isolierung des hemmenden Faktors wurden Experimente mit verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Die r_f -Werte in verschiedenen Phasen finden sich in der Tabelle S. 326.

11. Die papierchromatographischen Experimente ergaben keine Anhaltspunkte für das Vorkommen mehrerer Hemmstoffe im Extrakt aus reifen Zyklamensamen.

12. Versuche zur Isolierung und Konstitutionsaufklärung des hemmenden Faktors mussten aus Mangel an Zyklamensamen zurückgestellt werden.

VIII. Literatur

MEYER, A. E. H., SEITZ, E. O.: Ultraviolette Strahlen; ihre Erscheinung, Messung und Anwendung in Medizin, Biologie und Technik. Verlag Walter de Gruyter. Berlin 1949.

IX. Verdankungen

Die Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich unter Leitung von Prof. Dr. H. WANNER ausgeführt. Herr Prof. Dr. H. SCHMID am Chemischen Institut der Universität Zürich hat die Untersuchung durch zahlreiche Anregungen und durch die Durchführung der papierchromatographischen Trennungen unterstützt. Beiden Herren danke ich für ihr Entgegenkommen und ihre Unterstützung.