

Blütenbildung von *Pinguicula lusitanica* in vitro durch Fütterung mit Pollen*

RICHARD HARDER und INGE ZEMLIN

Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen

Eingegangen am 13. September 1967

Flowering of in vitro Cultures of *Pinguicula lusitanica* after Feeding with *Pinus* Pollen

Summary. Plants of *Pinguicula lusitanica* were grown in individual Erlenmeyer flasks on an inorganic agar medium containing no nitrogen or phosphorus. After 8 weeks of culture, twenty of the plants were fed *Pinus* pollen 4 times over a period of 5 weeks.

As a result of the feeding, the number of leaves as well as the diameters of the rosettes were increased. The leaves became turned a deeper green and aged more slowly.

The most spectacular effect of the pollen feeding was an initiation of flowering. The first buds were already visible after the second feeding. All of the treated plants flowered before the last feeding, whereas none of the untreated plants flowered. During the following 6 months, the treated plants developed 127 flowers, the largest number on a single specimen being 14. Even after this period of time the untreated plants remained vegetative.

In der Literatur finden sich einige Hinweise, daß die „insektenfressende“ *Pinguicula* vielleicht pflanzliche Beute ausnutzen könne.

So gibt KLEIN (1887) an, daß er auf den Blättern von *Pinguicula alpina* verschiedene Pflanzenteile, „besonders Blätter von *Erica carnea*“ gefunden habe, und bezeichnet *Pinguicula* als „teilweise auch pflanzenfressende Pflanze“. Auch SCHMUCKER und LINNEMANN (1959) meinen, daß gewisse Pflanzenteile und Pollenkörner „vielleicht zum Teil ausgenutzt“ werden. Irgendwelche Angaben über die Größe des Nutzens haben wir in der Literatur nicht gefunden.

Als sich gezeigt hatte, daß sich mit unseren axenischen Kulturen von *Pinguicula lusitanica* gute Erfahrungen zur Physiologie der Insektivoren machen lassen (HARDER und ZEMLIN, 1967a), haben wir den nachstehenden Versuch mit Pollenfütterung angestellt.

Methodik

Samen von *Pinguicula lusitanica* haben wir 1964 aus Coimbra und 1965 aus St. Gallen bekommen¹. Sie wurden mit Bromwasser sterilisiert und keimten leicht; seitdem halten wir im Laboratorium ständig einen Vorrat axenischer Kulturen der

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

¹ Den freundlichen Übersendern der Samen sei auch an dieser Stelle vielmals gedankt.

Art auf Agar. Die Pflanzen blühen auf geeigneten Substraten ziemlich rasch und reichlich und setzen auch Samen an; aus diesen kann man, da sie ja keimfrei sind, leicht wieder weitere Reinkulturen herstellen. Auch die Pflanzen für die nachstehenden Versuche stammen aus Samen eigener Ernte. Stecklingsvermehrung, die, wie Versuche uns gezeigt haben, bei einer ganzen Anzahl von Insektivoren leicht gelingt, hat bei *Pinguicula lusitanica* leider keinen Erfolg.

Für die nachstehenden Fütterungsversuche wurden *Einzelpflanzen* in der Mitte von 100 ml Erlenmeyerkolben gezogen, deren *Agar* die üblichen Mineralsalze, aber *ohne Stickstoff und Phosphor* enthielt. Ihre alten, matt gelbbraunen Blätter lagen dem Agar meist mehr oder weniger auf (Abb. 1), während die über ihnen stehenden

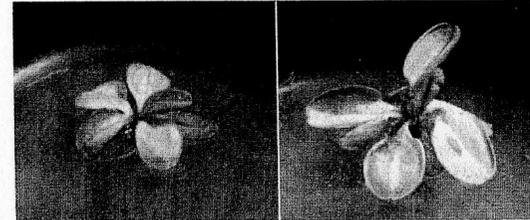


Abb. 1. *Pinguicula lusitanica*. Gleichalte ungefütterte (links) und gefütterte Pflanzen (rechts) aus Versuch 2. Etwas vergrößert. Photograph. 13. 2. 1967

jungen, noch nicht oder erst eben ausgewachsenen Blätter matt grün waren und mit ihrer Spitze oft ein wenig schräg nach oben standen. Zur *Fütterung* wurde mit einem feinen, sterilisierten Spatel etwas trockener Pollen sehr vorsichtig auf jedes einzelne junge Blatt unter Vermeidung der Bestreuung von alten oder — bei Wiederholung der Fütterung — von bereits vorher einmal beschickten Blättern gestäubt. Ein einmal bestäubtes Blatt wurde also nicht wieder gefüttert, sondern bei jeder neuen Fütterung kamen stets nur inzwischen nachgewachsene Blätter an die Reihe. — Der *Pollen*, mit dem gefüttert wurde, war vor Jahren im botanischen Garten bei sonnigem Wetter aus den sehr reich stäubenden Blüten von *Pinus montana* in sterile Petrischalen geklopft worden und wurde in einem mit Wattebausch verschlossenen sterilen Glaskolben in einem Laboratoriumsschrank aufbewahrt; er war also völlig ausgetrocknet. — Alle Manipulationen wurden in einem modifizierten Whiteschen Kasten (WHITE, 1963) vorgenommen; dadurch kam es in dem ganzen Versuch nur zweimal zu einer kleinen Verunreinigung. — Alle Pflanzen, gefütterte wie ungefütterte Kontrollen, wurden im Laboratorium bei Zimmertemperatur 47 cm unter *Osrām-Leuchtröhren* (abwechselnd 40W/30 und 40W/32) aufgestellt. Die Beleuchtungsstärke an den Pflanzen war etwa 8000 Lux.

Der Versuch

Am 6. 1. 67 wurden 40 Kolben mit gleichmäßig entwickelten Pflanzen aus einer 2 Monate alten Vorratsgruppe ausgesucht. Bei 20 von ihnen wurden die jungen Blätter mit Pollen bestäubt, die anderen 20 blieben als Kontrollen unbehandelt. Die Fütterung wurde am 14. 1. an den inzwischen nachgewachsenen neuen Blättern wiederholt; eine 3. Fütterung folgte am 1. 2. und eine letzte am 13. 2.

Bei Durchsicht der Pflanzen 8 Tage nach der 1. Fütterung war der Pollen noch etwas feucht-klumpig auf den ausgebreiteten Blattspreiten

Table. *Pinguicula lusitanica*. Beblätterung, Rosettendurchmesser und Blütenbildung der 20 gefütterten und 20 ungefütterten Pflanzen. Fütterung mit *Pinuspollen* am 6. 1., 14. 1., 1. 2. und 13. 2. 67

Datum	Mittlere Blattzahl		Mittlerer Durchmesser der Rosette (mm)		Blühende Pflanzen		Gesamtzahl der Blüten		Anzahl der vorausgegangenen Fütterungen
	un-gefüttert	gefüttert	un-gefüttert	gefüttert	un-gefüttert	gefüttert	un-gefüttert	gefüttert	
23. 1.	6,4	7,0	10,7	13,0	0	0	0	0	2
13. 2.	8,7	10,6	11,3	17,8	0	16	0	21	3
30. 8.	26,6	31,8	12,1	21,2	0	20	0	127	4

zu erkennen; eine Einrollung der Ränder, wie sie nach Fütterung mit Fliegen oder Eiweiß eintritt, schien nicht stattgefunden zu haben; sie war aber nach der 3. und 4. Fütterung deutlich (Abb. 1), wenn auch nicht so stark wie nach Fütterung mit einer *Drosophila*. Die Blätter der Versuchs- wie der Kontrollpflanzen waren zwar innerhalb der ersten Woche etwas größer geworden, und im Zentrum der Rosette war ein neues Blatt nachgewachsen, sonst war aber am 14. 1. keine Veränderung an den Pflanzen zu erkennen.

Den Stand nach den ersten beiden Fütterungen (23. 1.) zeigt die Tabelle. Blattzahl, Anzahl der grün gebliebenen Blätter und Durchmesser der Rosette waren bei den gefütterten Pflanzen etwas größer als bei den Kontrollen, die Werte ließen sich aber nicht statistisch sichern. Am 1. 2. traten dann die ersten Blütenknospen des Versuchs auf, und zwar an zwei der gefütterten Pflanzen. Im Laufe der nächsten Tage wurde die Zahl der Blütenknospen ständig größer; am 8. 2., also rund einen Monat nach der ersten und eine Woche nach der 3. Fütterung, waren es schon 14, und zwar alle an gefütterten Exemplaren. Bereits 2—3maliges kräftiges Bestäuben junger Blätter hatte also schon genügt, um die Blütenbildung bei der Mehrzahl der gefütterten Pflanzen auszulösen. Im übrigen zeigt das Protokoll vom 13. 2. (Tabelle), daß die Blattzahl usw. im ganzen gestiegen war und sich zugunsten der gefütterten Pflanzen vermehrt hatte. Ihre Blütenstiele waren aber noch kurz (Abb. 1). Besonders auffällig ist, wie viel länger die Blätter der gefütterten Gruppe grün blieben als die der Kontrollen; dadurch hatten die

gefütterten Pflanzen fast doppelt so viel grüne Blätter als die ungefütterten. Außerdem war die Grünfärbung bei den Versuchspflanzen eindeutig intensiver als bei den Kontrollen.

Die Pflanzen blieben nach der 4. Fütterung (13. 2.) bis zum 30. August an ihrem Platz unter den Leuchtröhren stehen. Die Fütterungen wirkten sich in dieser Zeit weiter zugunsten der gefütterten Exemplare aus (Tabelle), vor allem blühten nun nicht nur sämtliche gefütterten Pflanzen und von den nichtgefütterten nicht eine einzige, sondern es hatte sich

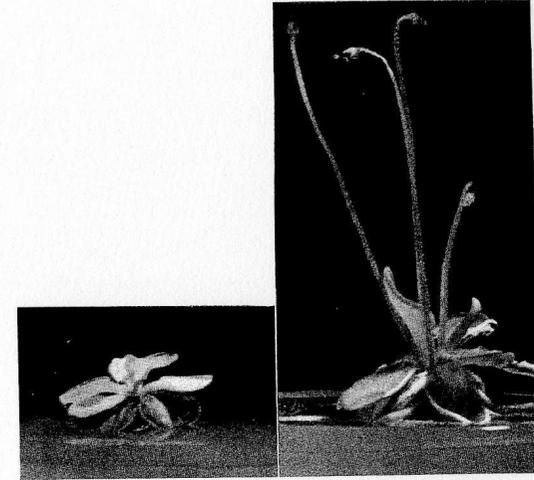


Abb. 2. *Pinguicula lusitanica*. Gleichalte ungefütterte (links) und gefütterte Pflanzen (rechts) aus Versuch I (zwischen 9. 11. 66 und 18. 1. 67 ~ 7mal mit Pollen gefüttert). Photogr. 18. 1. 1967

die Gesamtzahl der Blüten bei den gefütterten auf 127 gesteigert, wobei die langen Blütenstiele — wie in Abb. 2 — z. T. an den Wattebausch des Kolbens stießen; die größte Blütenzahl eines Einzelkolbens (= Einzelpflanze) war 14, der Mittelwert je Pflanze 7,0. Von drei gefütterten und drei ungefütterten Exemplaren wurden das Frisch- und das Trockengewicht bestimmt; das Frischgewicht war 193, 218 und 225 mg, im Mittel also 212 mg; das der ungefütterten nur 35, 37 und 39 mg, im Mittel 37 mg. Die Trockengewichte waren bei den drei gefütterten Pflanzen 20, 21 und 23 mg, Mittelwert 21 mg, bei den ungefütterten 4, 5 und 5 mg, Mittelwert rund 5 mg. Die Trockenmasse der gefütterten Pflanzen war also 4mal größer als die der ungefütterten.

Dem vorstehend mitgeteilten Versuch war schon ein gleichartiger vorausgegangen, bei dem das Pflanzenmaterial aber weniger gleichmäßig ausgesucht, die Fütterung weniger sorgfältig ausgeführt und mit weniger Pflanzen gearbeitet worden war. Er führte aber schon zum gleichen Ergebnis: starke Förderung des Wachstums und des Blühens durch die Fütterung mit Pollen (Abb. 2).

Diskussion

Die Fütterung von *Pinguicula lusitanica* mit *Pinus*pollen hatte also für das vegetative Wachstum wie für die Blütenbildung überraschend guten Erfolg. Dabei war die verwendete Pollenmenge gewichtsmäßig gering. Um sie nachträglich zu ermitteln, haben wir kleine Papiermodelle der Blätter hergestellt und in genau der gleichen Weise wie die Laubblätter bestäubt. Ihre Auswägung ergab ein Pollengewicht von 0,17 mg je Blatt und Fütterung. Bei der ersten Fütterung wurden 3, bei der zweiten 1 und bei den beiden anschließenden je 2 Blätter bestäubt, im ganzen also 8 Blätter je Pflanze = 1,36 mg Pollen. Addieren wir dazu, um sicher keinen zu niedrigen Wert einzusetzen, noch 50% für vielleicht unvorsichtiges Füttern und unbemerkte Bestreuung alter oder schon einmal gefütterter Blätter hinzu, so ergeben sich rund 2 mg Pollen je Pflanze für die ganze Fütterungsperiode. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Pollenkörner ausgetrocknet waren, so daß mehr von ihnen auf die Gewichtseinheit gingen als von frischem Pollen. Nach Beendigung des Versuchs war die Membran der Pollen noch intakt; in den meisten Körnern war auch der geschrumpfte Protoplast noch zu sehen, relativ wenige waren leer.

Über die chemische Natur der wirksamen Substanz können wir nichts Sicheres aussagen. Wir glauben aber, daß eine Stickstoffquelle mindestens mit dabei gewesen sein muß. Nach unseren früheren Versuchen (HARDER u. ZEMLIN, 1967 a) — und unsere jetzigen Kontrollpflanzen haben es bestätigt — vermag *Pinguicula lusitanica* auf Substraten ohne N und P nicht zu blühen. Daß sie darauf überhaupt wächst, mag auf dem N- und P-Gehalt der Samen — so winzig sie auch sind — und auf Verunreinigungen im Agar beruhen. Die Pflanzen blühten aber, als wir sie mit Fliegen, Eiweiß oder Ammoniumphosphat fütterten. Also müssen unsere Pflanzen auch im vorstehenden Versuch, bei dem sie ja auf N- und P-freiem Agar gezüchtet wurden, das N- und P-Defizit aus dem Pollen gedeckt haben. Nach ELSNER und GANZMÜLLER (1930) sind im *Pinus*pollen rund 12% Eiweiß enthalten; jeder Pflanze dürften also durch die Pollenfütterung rund 0,25 mg Proteinstoffe geboten worden sein.

Da im Pollen viele Aminosäuren, Nucleinsäuren, Lipide, Wirkstoffe und Kohlenhydrate vorkommen (LINSKENS, 1967), könnte auch von diesen eine günstige Wirkung ausgegangen sein. Nach den Ergebnissen unserer noch laufenden Untersuchungen an *Utricularia*arten in vitro, deren Blütenbildung stark durch verschiedene Zucker gefördert wird, liegt für uns der Gedanke an eine Mitwirkung von Zuckern besonders nahe (HARDER u. ZEMLIN, 1967 b; PRINGSHEIM, 1967). *Pinguicula* haben wir noch nicht mit Zuckern gefüttert, wir haben ihr aber Sucrose über die Wurzeln geboten und dabei bisher weder im Licht noch im Dunkeln eine wesentliche Förderung verzeichnen können. *Pinguicula lusitanica*

scheint also auf Zucker mindestens über die Wurzeln nicht zu reagieren. Der Kohlenhydratanteil an der Gesamtsubstanz beträgt beim *Pinus*pollen nach ELSNER und GANZMÜLLER (1930) zudem auch nur 1,6% für Invertzucker und 5,8% für Rohrzucker; das Zuckerangebot durch den Pollen ist also gering und dürfte wohl kaum eine große Rolle für den Erfolg der Pollenfütterung gespielt haben.

Ob der Pollenanflug in der Natur je groß genug ist, daß *Pinguicula* dadurch zum Blühen kommt, darf man wohl bezweifeln. Wohl nur im Laboratorium kann man damit die Blütenbildung auslösen. Das zeigt, wie recht PRINGSHEIMS (1967) haben, wenn sie die Bezeichnungen Carnivorie und Insektivorie für „wenig glücklich gewählt halten, da es sich nie um Fleisch und nicht immer um Insekten handelt. Fallenstellerei oder Pedicovorie wäre treffender“. Da die Beute aber doch in der überwiegenden Zahl der Fälle aus Insekten besteht, haben wir die alt eingeführte Bezeichnung Insektivorie wenigstens vorläufig beibehalten.

Zusammenfassung

Pinguicula lusitanica wurde in vitro auf stickstoff- und phosphorfreiem Mineralsalzagar kultiviert; jede Pflanze stand für sich in einem Erlenmeyerkolben.

Als die Pflanzen 8 Wochen alt waren, wurden 20 Exemplare innerhalb von 5 Wochen viermal mit *Pinus*pollen gefüttert. 20 gleichgroße und gleichalte dienten als Kontrollen.

Durch die Fütterung steigerte sich die Blattzahl und der Durchmesser der Blattrosette, die Blätter wurden intensiver grün und alterten langsamer.

Vor allem wurde durch die Pollenfütterung die Blütenbildung ausgelöst. Schon nach der 2. Fütterung traten die ersten Knospen auf, eine Woche darauf blühten bereits 70% und noch vor der letzten Fütterung alle gefütterten Pflanzen, von den ungefütteten dagegen keine einzige. In dem anschließenden halben Jahr entwickelten die 20 gefütterten Pflanzen im ganzen 127 Blüten; die größte Blütenzahl einer Einzelpflanze war 14. Die nichtgefütterten Pflanzen waren auch jetzt noch rein vegetativ.

Literatur

- ELSNER, E., u. I. GANZMÜLLER: Die chemische Zusammensetzung einiger Blütenstaubarten. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **194**, 21—32 (1930). Zit. nach LINSKENS.
- HARDER, R., u. I. ZEMLIN: Förderung der Entwicklung und des Blühens von *Pinguicula lusitanica* durch Fütterung in axenischer Kultur. Planta (Berl.) **73**, 181—193 (1967 a).
- — Förderung carnivorier *Utricularia*arten durch Zucker in axenischen Licht- und Dunkelkulturen. Naturwissenschaften **54**, 543—544 (1967 b).

- KLEIN, I.: *Pinguicula alpina* als insektenfressende Pflanze und in anatomischer Beziehung. Beitr. Biol. Pflanzen **3**, 163—186 (1887).
- LINSKENS, H. F.: „Pollen“. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd. 18, S. 368—406. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967.
- PRINGSHEIM, E. G., u. O. PRINGSHEIM: Kleiner Beitrag zur Physiologie von *Utricularia*. Z. Pflanzenphysiol. **57**, 1—10 (1967).
- SCHMUCKER, TH., u. G. LINNEMANN: Carnivorie. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 11, S. 198—283. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.
- WHITE, PH. R.: The cultivation of animal and plant cells, 2nd ed. New York: Ronald Press Co. 1963.

Prof. Dr. R. HARDER
Dipl.-Biol. INGE ZEMLIN
Pflanzenphysiologisches Institut der Universität
34 Göttingen, Untere Karspüle 2

Enhanced Photosynthesis at Low Oxygen Concentrations: Differential Response of Temperate and Tropical Grasses

R. W. DOWNES and J. D. HESKETH

Division of Plant Industry, C. S. I. R. O., Canberra, Australia

Received September 11, 1967

Summary. When leaves of grasses of the tribes *Oryzeae*, *Festuceae*, *Hordeae*, *Aveneae*, *Phalarideae*, *Agrostideae* and *Stipeae* were exposed to air containing a low oxygen concentration, photosynthesis was enhanced between 23 and 60%. No such increase was observed in grasses of the tribes *Paniceae*, *Andropogoneae*, *Maydeae*, *Zoisiaceae*, *Chlorideae* and *Eragrostaceae* which are known (HATCH et al., 1967) to possess the C₄ carbon pathway of photosynthesis. The latter group consists of tropical grasses and the former, except for the *Oryzeae*, are grasses of temperate regions.

Introduction

Although the pathway of CO₂-fixation established by CALVIN and others (CALVIN and BASSHAM, 1962) obtains in many species, a different pathway has been found in sugar cane (KORTSCHAK et al., 1965; HATCH and SLACK, 1966). In this case the ¹⁴C fixed is found initially in oxaloacetate, malate, and aspartate.

Further studies showed that the sugar cane (C₄) pathway operates in a number of other tropical grasses, namely *Saccharum*, *Erianthus*, *Sorghum*, *Zea*, *Paspalum*, *Axonopus*, *Digitaria*, *Chloris* and *Eragrostis* (HATCH et al., 1967). In the temperate cereals *Triticum* and *Avena* and in *Leersia* and *Bambusa*, little or no labelled C₄ products were detected after a brief period of photosynthesis in ¹⁴CO₂.

Tropical and temperate grasses also differ in the rates of photosynthesis attained by single leaves in intense light (EL-SHARKAWY and HESKETH, 1964). *Zea mays*, *Cynodon dactylon* and *Sorghum vulgare* were capable of high rates of photosynthesis while *Avena sativa* was not (EL-SHARKAWY and HESKETH, 1965; HESKETH and MOSS, 1963). In studies with whole plants, *Zea*, *Euchlaena*, *Sorghum*, *Cynodon*, *Chloris*, *Paspalum* and *Echinochloa* exhibited high photosynthetic rates while *Lolium*, *Dactylis*, *Triticum*, *Hordeum* and *Secale* did not (MURATA and IYAMA, 1963; MURATA et al., 1965).

Oxygen has been found to have two different effects on the CO₂ exchange of illuminated, detached tobacco leaves, either stimulating CO₂ evolution or inhibiting CO₂ absorption (TREGUNNA et al., 1966). Oxygen depletion can increase photosynthetic CO₂ assimilation by 40—50% in