Gartenbauwissenschaft, **65** (1). S. 1–5, 2000, ISSN 0016–478X. © Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

Messung der Wachstumsraten von Pollenschläuchen *in vitro* mittels Bildanalyse

Measuring Growth Rates of Pollen Tubes *in vitro* Using Image Analysis

D. Köpcke, P. Baur und J. Schönherr
(Institut für Gemüse- und Obstbau, Abteilung Obstbau, Universität Hannover, Sarstedt)

Zusammenfassung

Das Wachstum der Pollenschläuche von Apfel (cv. Golden Delicious) *in vitro* wurde unter Verwendung eines Stereomikroskops und einer Videokamera in Abständen von 60 Minuten aufgezeichnet. Wachstumsraten der Pollenschläuche von 300 bis 500 Pollen je Wiederholung konnten so bei 4 Wiederholungen simultan gemessen werden. Das Pollenschlauchwachstum begann zwei Stunden nach Aufbringen rehydratisierter Pollen auf das Agarmedium, und eine Stunde später wurden bereits maximale Wachstumsraten beobachtet. Danach nahmen die Wachstumsraten kontinuierlich bis etwa 8 Stunden ab. Das Verfahren ist schnell und einfach und erlaubt die quantitative Messung der Wachstumsraten von Pollenschläuchen sehr großer Stichproben. Außerdem können auch durch Chemikalien induzierte morphologische Veränderungen der Pollenschläuche beobachtet werden. Der Einfluß der Konzentration von Chemikalien auf die Wachstumsraten kann zeitabhängig und quantitativ erfaßt und Dosis-Wirkungskurven erstellt werden.

Summary

Using time-lapse video microscopy and image analysis we have studied growth rates of pollen tubes of apple (cv. Golden Delicious) pollen. Large numbers of pollen (300 to 500 per replicate and 4 replicates) were analysed simultaneously and growth rates of pollen tubes of very large populations were measured quantitatively, accurately and much faster than with conventional methods. Germination started after about 2 h and highest growth rates of pollen tubes were observed already one hour later. Thereafter, rates decreased rapidly. Alterations in pollen tube morphology caused by treatment with chemicals can be observed easily. Effects of chemicals on growth rates of pollen tubes as affected by concentration and time can be studied quantitatively and dose response curves can be obtained quickly.

Einleitung

Vitalität der Pollen ist Voraussetzung für einen guten Befruchtungserfolg und sie wird daher in der Blütenbiologie oft untersucht (MARCUCCI 1984, STONE et al. 1995). Aber auch für andere Zwecke ist die Schätzung der Pollenvitalität von Bedeutung, etwa zur Optimierung der Lagerbedingungen von Pollen (BARNABAS 1994, HANNA 1994, VISSER 1955), beim Studium der Pollenphysiologie (GRABE und KRISTEN 1997, VAN BILSEN et al. 1994) in der Pflanzenzüchtung (ZERBOWSKA 1995, SUSÍN und ÁLVAREZ 1997) und zur Bestimmung der Toxizität von Umweltchemikalien (KRISTEN 1997). Verschiedene Vitalitätskriterien werden verwendet. Das Auszählen gekeimter Pollen und die Messung der Länge der Pollenschläuche mit dem Okularmikrometer ist wahrscheinlich das häufigste Verfahren (SHIVANNA und RANGASWAMY 1992). Es ist allerdings extrem zeitaufwendig, da für repräsentative Untersuchungen viele Hunderte von Pollen ausgewertet werden müssen. Viel weniger aufwendig ist der *in vitro* Test von KRISTEN und KAPPLER (1995), der auf der photometrischen Bestimmung der Masse angefärbter Pollenschläuche beruht. Nachteilig dabei ist, daß Veränderungen der Form der Pollenschläuche (Verdickungen, Verzweigungen) bei diesem Test nicht auffallen. Bei dem Keimtest von SCHUBERT et al. (1995) werden mit der Zählkammer (Schilling-Kreuznetz) lediglich die Keimraten gemessen, nicht aber die Wachstumsraten der Pollenschläuche. Das gilt auch für Vitalfärbungen (Fluorescein, Lactophenol-Anilin Blau), die lediglich Information über die Pollenvitalität, nicht aber über Keimraten, Wachstumsraten und Pollenschlauchmorphologie liefern. Bei unseren Untersuchungen zur Blütenausdünnung und zum Einfluß von Formulierungshilfsstoffen auf die Befruchtung soll der Einfluß verschiedener Chemikalien auf die Wachstumsraten der Pollenschläuche quantitativ gemessen werden. Da uns die bisher zur Verfügung stehenden Verfahren wenig geeignet schienen, haben wir ein Verfahren entwickelt, mit dem *in vitro* Wachstumsraten der Pollenschläuche schnell und einfach gemessen werden können.

Material und Methode

Pollengewinnung und -lagerung

Apfelpollen (*Malus domestica* Borkh., cv. 'Golden Delicious' Typ Smoothee) wurden von Bäumen in unserem Versuchsbetrieb gewonnen. Kurz vor der Blüte wurden Zweige mit Blüten im Ballonstadium abgeschnitten und im Labor bei Zimmertemperatur (20±2 °C) vorgetrieben. Nach ca. 24 h wurden einige hundert geöffnete Blüten abgenommen, von den Blütenblättern befreit und unter fünf nebeneinander

angeordneten Neonröhren plaziert. Der Abstand zu den Lampen betrug etwa 30 cm, wodurch die Temperatur unter den Lampen ca. 30 °C erreichte. Durch diese Behandlung wurden die Pollensäcke getrocknet und nach einigen Stunden zum Platzen gebracht. Sobald die Pollensäcke geplatzt waren, wurden die Pollenkörner mit dem rotierenden Metallstift einer elektrischen Zahnbürste von den Pollensäcken abgeschüttelt und auf einer Glasscheibe aufgefangen. Mit einem Stückchen Kartonpapier wurden die Pollenkörner zusammengeschoben und in Schraubdeckelgläschen übertragen. Die Pollen wurden zunächst über Kieselgel im Exsikkator für 12 h bei –20 °C getrocknet und dann in kaltes (–20 °C) Aceton (p.A., Riedel de Haën, Seelze) überführt und darin für etwa 7 Monate gelagert.

Messung der Wachstumsraten der Pollenschläuche

Das Pollen-Lösungsmittel-Gemisch wurde zunächst mit Aceton verdünnt, so daß die Pollenkonzentration etwa 80 Pollen pro μl betrug. Mit einem gläsernen Kapillarröhrchen wurden 5 μl entnommen, wobei das Aceton/Pollengemisch mit einem Magnetrührer in ständiger Bewegung gehalten wurde, um eine Sedimentation zu verhindern. Durch Aufsetzen auf weißes Kopierpapier wurden die Röhrchen entleert, und die Pollen ordneten sich dabei ringförmig auf dem Papier an. Sobald das Aceton vollständig verdunstet war, wurden die Pollen für 30 min bei Zimmertemperatur (20±2 °C) und hoher relativer Luftfeuchte (>90 %) rehydratisiert.

Als Kultursubstrat diente ein Agar-Nährboden mit folgender Zusammensetzung: 10 g/l Agar (Agar-Agar, Sigma Chemicals, Deisenhofen), 100 g/l Saccharose (Merck, Darmstadt), 300 mg/l Calciumnitrat (Merck, Darmstadt) und 20 mg/l Borsäure (Merck, Darmstadt) (verändert nach CALZONI et al. 1979). Das Medium hatte einen pH-Wert von 6 und wurde im Autoklav bei 121 °C 15 min lang sterilisiert und dann in Petrischalen gegossen, so daß diese bis etwa zur Hälfte gefüllt waren. Die rehydratisierten Pollen wurden durch kurzes Aufdrücken des Papierstreifens auf die Agaroberfläche quantitativ übertragen.

Reine Pectinase (Merck, Darmstadt) oder β-1,3 Glucanase (Fluka, Neu-Ulm) wurden in wäßriger Saccharoselösung (100 g/l) gelöst und etwa 30 Minuten nach Beginn der Pollenkeimung auf die Pollenschläuche pipettiert, um den Einfluß der Enzyme auf das Pollenschlauchwachstum zu demonstrieren.

Mit einer am Stereomikroskop (Leica Wild M 10) aufgesetzten und mit einem Computer verbundenen Videokamera (Hitachi KP-M1, 2/3" S/W CCIR CCD, 768 (H) × 581 (V) effektive Bildpunkte) wurden im Abstand von meist 60 min Bilder der keimenden Pollen aufgenommen, zum Computer weitergeleitet und gespeichert. Der Computer war mit einer Frame Grabber Karte PCLL5 ausgestattet.

Zur Messung des Pollenschlauchwachstums wurden während der Wachstumsphase nacheinander je Kultur 8 Bilder bei 8facher Vergrößerung aufgezeichnet. Dabei wurden die zeitgleich aufgenommen Bilder von vier Kulturen, die als Wiederholungen dienten, in ein Bild eingelesen und als Datei abgespeichert. Nach Beendigung des Versuchs wurden diese Bilder dann mit der Bildverarbeitungssoftware Image P2 (H+K Meßsysteme, Berlin) ausgewertet. Da der Agar-Nährboden eine einheitliche Graufärbung aufwies, wurde dessen sichtbarer Anteil an der Gesamtfläche mittels Graustufenanalyse ermittelt. Die restliche Fläche war mit den Pollenschläuchen bedeckt und wurde als „Flächenbewuchs" (in mm²) berechnet. Aus den so ermittelten Daten wurde eine Wachstumskurve aufgestellt. Aus den Steigungen der einzelnen Kurvenabschnitte wurden Wachstumsraten errechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Zur Schätzung der Anzahl der Pollenkörner je Behandlung wurde eine Eichkurve angefertigt, indem die Pollenquerschnittsfläche hydratisierter, aber noch nicht gekeimter, Pollenpopulationen bekannter Größe auf Agar bestimmt wurde.

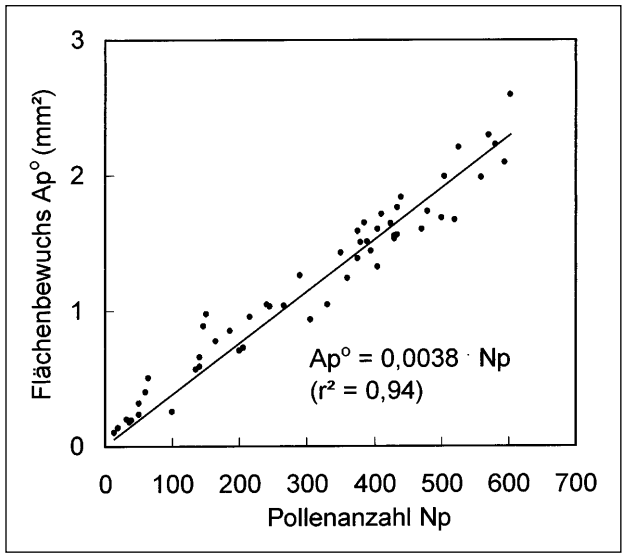


Abb. 1. Die projizierte Fläche (A_p^0) gequollener Pollenkörner (*Malus domestica*, cv. 'Golden Delicious') als Funktion der Anzahl (N_p) der Pollenkörner.
Projected area (A_p^0) of hydrated pollen grains (Malus domestica, cv. 'Golden Delicious') as a function of the number (N_p) of pollen grains.

Ergebnisse

Die mit Bildanalyse gemessene Gesamtfläche der Pollen zur Zeit t = 0 (A_p^0 in mm²) nahm linear mit der Menge der Pollen (N_p) zu, so daß die Anzahl der Pollen aus der Gleichung

$$N_p = \frac{A_p^0}{0.0038} \qquad (1)$$

berechnet werden kann (Abb. 1). Für $N_P = 1$ ergibt sich aus der Gleichung ein mittlerer Radius der gequollenen Pollenkörner von 35 μm.

Die Keimfähigkeit der in Aceton gelagerten Pollen betrug 98 %, und auf den Bildern der wachsenden Pollenkulturen (Abb. 2) ist zu erkennen, daß sich die Pollenschläuche infolge des zentrifugalen Wachstums kaum überlagerten. Nur in wenigen Fällen kam es nach einigen Stunden zu Überlappungen einiger Pollenschläuche. Mit Hilfe des Bildanalysesystems war es möglich, die Graustufen des Agarhintergrundes zu ermitteln und durch einen einzigen Farbton – in Abb. 2

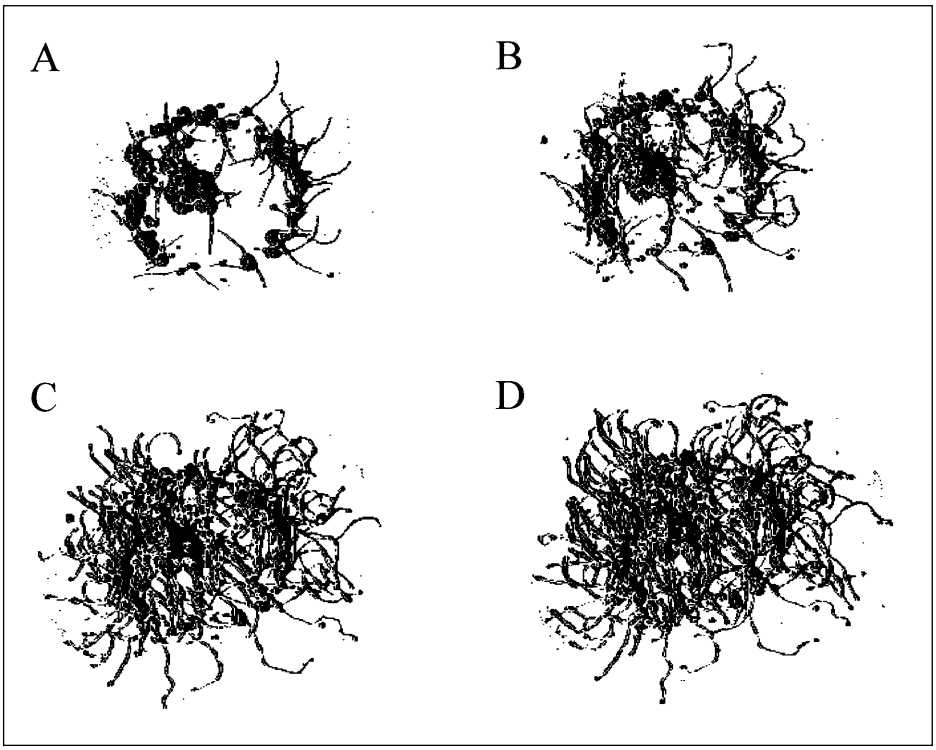
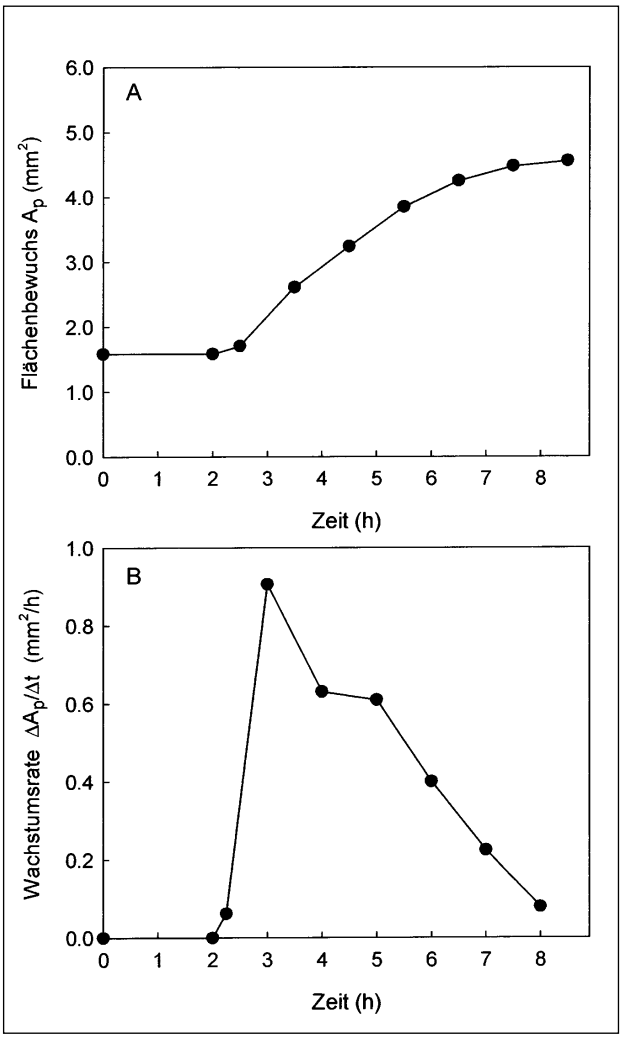


Abb. 2. Aufsicht auf eine Pollenkultur 2 h (A); 3 h (B); 5 h (C) bzw. 7 h (D) nach Aufbringen von 300 bis 500 hydratisierter Pollenkörner auf das Agarmedium. Die Grautönung des Agarmedium wurde subtrahiert und die Pollenschläuche optisch eingedunkelt.
Birds view of a pollen culture 2 (A); 3 (B); 5 (C) and 7 h (D) after placing 300 to 500 hydrated pollen grains on the agar-medium. Note centrifugal growth of pollen tubes. The grey background of the agar medium was eliminated and the pollen tubes were darkened optically.



mit der Farbe weiß – zu ersetzen. Zur Kontrastverstärkung wurden die Graustufen der Pollenschläuche schwarz eingefärbt.

Das Pollenschlauchwachstum begann etwa 2–2,5 Stunden nach Aufbringen der hydratisierten Pollenkörner, und die Wachstumsraten erreichten schon nach 3 h mit 0.9 mm²/h ihre maximalen Werte, um dann kontinuierlich abzufallen (Abb. 3). Nach 8 h war die Pollenschlauchwachstumsrate auf unter 0,1 mm²/h abgefallen. Nach 5 h begannen sich die Pollenschläuche innerhalb der Pollenkultur zu überlagern, so daß das Pollenschlauchwachstum nach 5–8 h in Wirklichkeit etwas höher gewesen sein dürfte. Die noch ungekeimten Pollenkörner bedeckten zu Beginn der Messungen eine Fläche von 1,65 mm², das heißt die Wachstumsraten beziehen sich auf 410 Pollenkörner, von denen 98% keimten.

Bei stärkerer Vergrößerung wird deutlich, daß die Pollenschläuche glatte Wände haben und geradeaus wuchsen (Abb. 4A). Der Radius der sichtbaren Pollen-

Abb. 3. Zunahme der projizierten Fläche (A_P) der Pollenschläuche als Funktion der Zeit (t) (A) und Wachstumsraten ($\Delta A_p/\Delta t$) der Pollenkulturen während des Versuchzeitraums (B). Zum Zeitpunkt t = 0 wurden die hydratisierten Pollen auf die Agaroberfläche aufgebracht. Aus dem Achsenabschnitt ergibt sich unter Verwendung von Gleichung (1) eine Pollenanzahl von 410.
Increase of projected area (A_p) of pollen tubes as a function of time (t). At t = 0 hydrated pollen grains having a projected area of about 1.65 mm² were placed on the agar surface (A). In (B) growth rates of pollen tubes calculated as second derivatives ($\Delta A_p/\Delta t$) of the graph shown in A are depicted. From the y-intercept of Fig. 3A the number of pollen (410) can be calculated using eq. (1).