

Über die Entwicklung des Embryosacks und die Befruchtung der Reben

von

H.-H. KASSEMAYER und G. STAUDT

Development of the embryo sac and fertilization in grapevine

Summary. — The development of embryo sacs has been described. At the beginning of flowering they consist of two synergids, the egg cell and the secondary embryo sac nucleus. Investigations with the cvs. Gewürztraminer, Weisser Burgunder and a hybrid Müller-Thurgau × *V. armata* showed equal volumes of the nuclei of the egg cells at the beginning of flowering. 24 h thereafter, the volume of the egg cell nuclei was 1.53 times enlarged in the pollinated ovaries. This enlargement can be explained by the duplication of the DNA content which is due to fertilization. An increase of the volume (1.76 times) was also observed in the secondary embryo sac nuclei of the pollinated ovaries. On the other hand, the ovaries which were not pollinated showed no enlargement of the volume of the egg cell nuclei and the secondary embryo sac nuclei. 4 d after the beginning of flowering, the unfertilized egg cells began to degenerate. In consideration of the temperatures during the day when flowering began, fertilization occurred 12–24 h after the opening of the flowers.

Einleitung

Bei der Mehrzahl der Rebsorten ist die Befruchtung eine unabdingbare Voraussetzung für die normale Entwicklung der Beeren. Aus der Verschmelzung des einen männlichen Gametenkerns mit dem Kern der Eizelle geht die diploide Zygote und aus der Verschmelzung des anderen männlichen Kerns mit dem sekundären Embryosackkern der triploide primäre Endospermkern hervor. Im Anschluß an diese doppelte Befruchtung beginnt die Samenentwicklung, in deren Verlauf sich aus der Zygote der Embryo, aus dem primären Endospermkern — und Cytoplasma — das Endosperm, aus den Integumenten die Testa und aus den Karpellen das saftige Perikarp entwickelt.

Auf die Bedeutung der Befruchtung für die Samen- und Beerenentwicklung hat schon MÜLLER-THURGAU (1883) hingewiesen. In der Folge wurde von vielen Autoren schlechter Beerenansatz durch Verrieselung auf Störungen der Befruchtung zurückgeführt, ohne daß dafür die cytologischen Beweise erbracht worden waren (SARTORIUS 1926, KOBLET 1961, 1966, HUGLIN und BALTHAZARD 1963, WILHELM 1963). Um den Ursachen der Störungen der Samen- und Beerenentwicklung nachgehen zu können, war es notwendig, zunächst den Ablauf der Befruchtung genau zu analysieren. Auch war es wichtig zu klären, wann bei Reben die Befruchtung stattfindet.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an zwei zwittrigen Sorten und einem weiblichen Klon aus einer interspezifischen Kreuzungsnachkommenschaft durchgeführt:

Vitis vinifera L. cv. Weißer Burgunder (WB)

Vitis vinifera L. cv. Gewürztraminer (GE)

Vitis vinifera L. cv. Müller-Thurgau \times *V. armata* DIELS et GILG (MT \times A)

Um exakte, statistisch gesicherte Angaben über den Verlauf der Befruchtung machen zu können, mußte das Versuchsmaterial, die einzelnen Blüten, von vergleichbarem Alter sein. Hierzu wurden Infloreszenzen ausgewählt, die am 4. Trieb der Bogrebe inseriert waren und am gleichen Tag mit dem Aufblühen begonnen hatten. An diesen Infloreszenzen wurden nur diejenigen Blüten belassen, die an einem bestimmten Tag aufgeblüht waren. Auf diese Weise wurde erreicht, daß nur Blüten mit synchroner Entwicklung zu den Versuchen herangezogen wurden. Als Zeitpunkt der Bestäubung wurde bei den zwittrigen Sorten WB und GE das Öffnen und Abwerfen der Blumenkrone angenommen, obwohl aus anderen Untersuchungen bekannt ist, daß die Bestäubung auch schon vor diesem Zeitpunkt stattfinden kann (STAUDT, unveröffentlicht). Der weibliche Klon MT \times A wurde zu gezielten Bestäubungsexperimenten herangezogen. Durch die Verwendung eines weiblichen Klons konnten der Zeitpunkt der Bestäubung genau festgelegt und eventuelle schädliche Einflüsse des Kastrierens auf die Entwicklung der Fruchtknoten mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Blüten wurden erstmalig am Tag des Aufblühens um 12.00 fixiert. Danach wurde alle 24 h zum selben Zeitpunkt fixiert. Da es nicht möglich ist, für eine Blüte den Tag des Aufblühens im voraus zu bestimmen, können keine exakten Angaben über die Entwicklung der Samenanlagen vor dem Aufblühen gemacht werden. Die Entwicklung der Embryosäcke wurde ab ca. 14 d vor dem Aufblühen untersucht. Da es sich hierbei nicht um synchronisierte Blüten handelt und nach unveröffentlichten Untersuchungen (STAUDT) 95 % der Blüten einer Infloreszenz innerhalb von 7 d aufblühen, verstehen sich im folgenden die Zeitangaben 14 bzw. 7 d stets \pm 6 d.

Das Untersuchungsmaterial wurde in FPA (Formaldehyd : Propionsäure : Äthanol im Verhältnis 5 : 5 : 90) fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Schnittdicke betrug 12—18 μ m, die Färbung erfolgte mit Hämatoxylin nach Delafield.

Die Volumenbestimmung der Zellkerne erfolgte durch Messung der längs (a), quer (b) und senkrecht (c) zur Bildebene stehenden Radien (TSCHERMAK-WOESS 1954). Da die Kerne im allgemeinen die Form eines Ellipsoids besitzen, wurde das Volumen nach der Gleichung $V = \frac{3}{4} \pi a \cdot b \cdot c$ errechnet. Je Sorte und Untersuchungstag wurden die Volumina von 20 Zellkernen bestimmt. Die Mittelwerte wurden mit Hilfe der Varianzanalyse verglichen. Die Signifikanz der Mittelwertsdifferenzen wurde mit dem t-Test geprüft. Es wurden folgende Signifikanzstufen verwendet:

$$P > 0,05 = \text{NS}; P \leq 0,05 = *; P \leq 0,01 = **; P \leq 0,001 = ***.$$

Ergebnisse

Entwicklung des Embryosacks bis zur Befruchtung

Zu Beginn der Untersuchungen, ca. 14 d vor dem Aufblühen, wurde in den Samenanlagen stets eine sich durch ihre Größe auszeichnende Embryosackmutterzelle beobachtet, die von mehreren Archespormutterzellen umgeben war (Abb. 1). In den Embryosackmutterzellen findet ca. 7 d später die Meiose statt. Nach Ablauf der Meiose degenerieren drei Makrosporen, und die chalazale Makrospore ent-

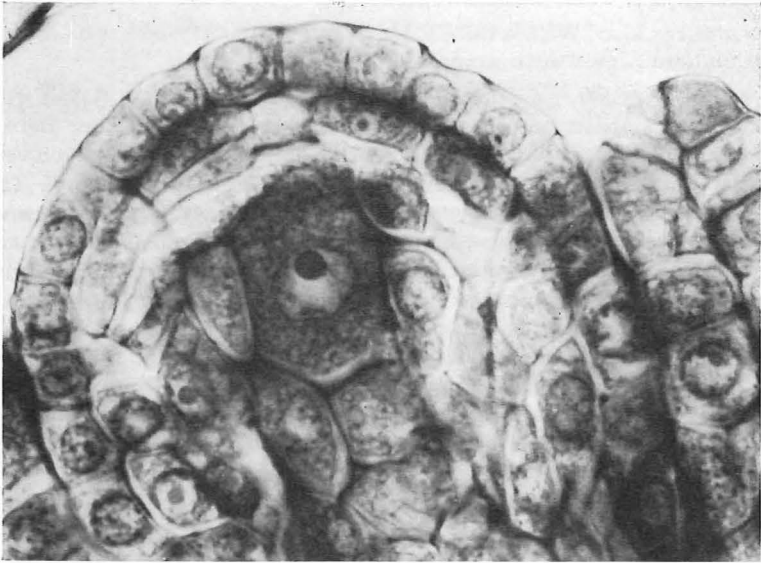


Abb. 1: Längsschnitt durch eine Samenanlage von Gewürztraminer mit Embryosackmutterzelle, 14 ± 6 d vor dem Aufblühen. $1400 \times$.

Longitudinal section of an ovule of Gewürztraminer with chalazal megaspore during mitosis, 7 ± 6 d before opening of the flowers. $\times 1400$.



Abb. 2: Längsschnitt durch eine Samenanlage von Gewürztraminer mit chalazaler Makrospore während der Mitose, 7 ± 6 d vor dem Aufblühen. $1600 \times$.

Longitudinal section of an ovule of Gewürztraminer with chalazal megaspore during mitosis, 7 ± 6 d before opening of the flowers. $\times 1600$.

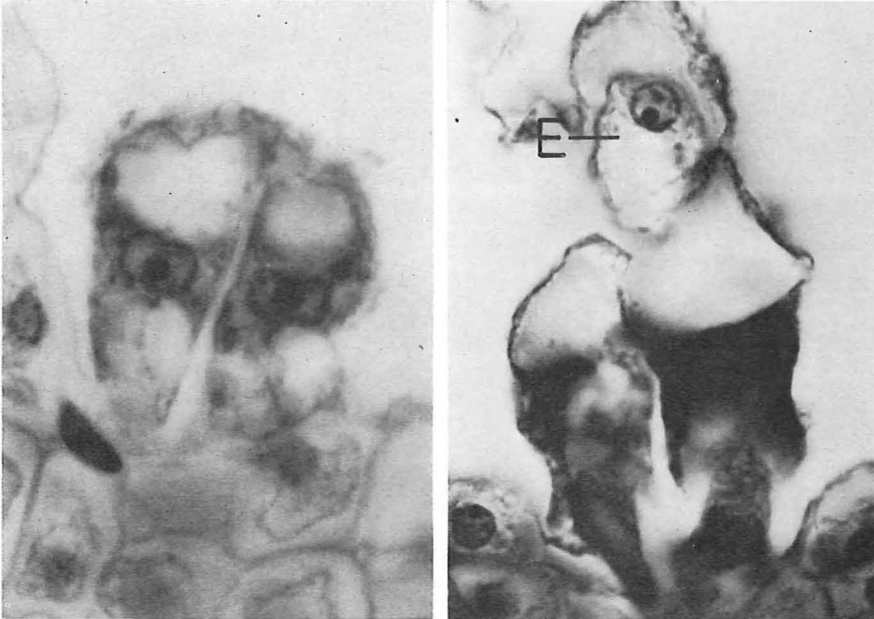


Abb. 3 (links): Längsschnitt durch einen Embryosack von Weißem Burgunder; Synergiden am Tag des Aufblühens. 1400 \times .

Abb. 4 (rechts): Längsschnitt durch einen Embryosack von Weißem Burgunder; Eizelle (E) und Synergiden. 1400 \times .

Fig. 3 (left): Longitudinal section of an embryo sac of Weisser Burgunder; synergids at the day of opening of the flowers. \times 1400.

Fig. 4 (right): Longitudinal section of an embryo sac of Weisser Burgunder; egg cell and synergids. \times 1400.

wickelt sich zur Embryosackzelle (Abb. 2). In drei Kernteilungsschritten geht daraus ein achtkerniger Embryosack hervor.

Zum Zeitpunkt des Aufblühens besteht der Embryosack aus der Eizelle, den beiden Synergiden und dem sekundären Embryosackkern. Die Entwicklung entspricht dem *Polygonum*-Typ nach MAHESHWARI (1950). Die Antipoden degenerieren, wie dies von KIM (1962) und PRATT (1971) beschrieben wurde, bereits vor der Anthese und werden resorbiert.

Die Synergidenzellen sind mit ihrer spindelförmigen Basis an der Nucelluskalotte inseriert, ihr chalazaler Pol ist keulenförmig verdickt. Die Zellkerne, deren Nucleoli sehr groß sind, liegen in der Mitte der Zelle zwischen zwei großen Vakuolen (Abb. 3). Die Eizelle liegt den Synergiden seitlich an und ist ebenfalls an der Nucelluskalotte inseriert. Sie überragt mit ihrem chalazalen Scheitel die Synergiden. Der größte Teil des Zellumens wird von einer großen Vakuole eingenommen. Im wandständigen Cytoplasmabelag des chalazalen Pols liegt der Zellkern (Abb. 4).

Nach der Verschmelzung der beiden Polkerne, die in der Mitte des Embryosacks erfolgt (Abb. 5), wandert der sekundäre Embryosackkern zum Eiapparat. Dieser Vorgang findet ca. 1 d vor dem Aufblühen statt. Zum Zeitpunkt des Aufblühens liegt der sekundäre Embryosackkern, der durch seine Größe und seinen großen Nucleolus auffällt, in einem Cytoplasmastrang unmittelbar über dem Eiapparat (Abb. 6).

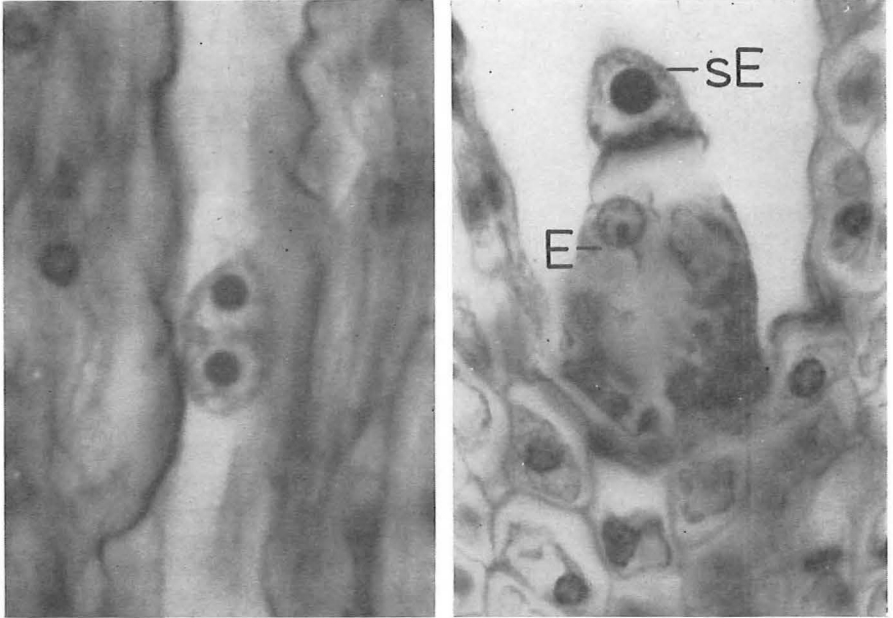


Abb. 5 (links): Längsschnitt durch einen Embryosack von Gewürztraminer; Verschmelzung der Polkerne ca. 1 d vor dem Aufblühen. 1400 \times .

Abb. 6 (rechts): Längsschnitt durch einen Embryosack von Gewürztraminer; Eiapparat, sekundärer Embryosackkern (sE), Eizelle (E) am Tag des Aufblühens. 1400 \times .

Fig. 5 (left): Longitudinal section of an embryo sac of Gewürztraminer; fusion of the polar nuclei ca. 1 d before opening of the flowers. \times 1400.

Fig. 6 (right): Longitudinal section of an embryo sac of Gewürztraminer; egg apparatus, secondary embryo sac nucleus (sE), egg cell (E) at the day of opening of the flowers. \times 1400.

Befruchtung

In 95 % der untersuchten Samenanlagen konnten 1 d nach dem Aufblühen im Embryosack ein oder zwei Pollenschläuche beobachtet werden. Sie dringen an der Basis der Synergiden in den Embryosack ein und legen sich den Synergiden an. Die Spitzen der Pollenschläuche schwellen keulenförmig an und platzen auf (Abb. 7). Spermakerne konnten in keinem Fall identifiziert werden. Die Kerne der Synergiden, denen ein geplatzter Pollenschlauch anliegt, degenerieren ungefähr 1 d nach dem Eindringen der Pollenschläuche in den Embryosack. In den Synergiden, an denen die Pollenschläuche nicht aufgeplatzt sind, bleiben die Zellkerne bis zum 8. d morphologisch unverändert.

Alle Versuche, durch unterschiedliche Reaktionen auf verschiedene Anfärbungen die unbefruchteten oder befruchteten Eizellen selektiv anzufärben, um dadurch den Zeitpunkt der Befruchtung bestimmen zu können, sind fehlgeschlagen. Daher wurden Messungen des Volumens der Eizellkerne vorgenommen. Diese Messungen ergaben, daß die Volumina am Tag vor dem Aufblühen und am Tag des Aufblühens übereinstimmten ($P > 0,05$). In den folgenden 24 h nahm das Volumen der Eizellkerne in den Embryosäcken, in die Pollenschläuche gewachsen waren, auf das 1,53fache zu ($P < 0,001$). Von diesem Zeitpunkt an bis zum 4. d nach dem Aufblühen veränderten sich die Volumina der Eikerne nicht (Tabelle 1).



Abb. 7: Längsschnitt durch einen Embryosack von Weißem Burgunder, 1 d nach dem Aufblühen. Aufgeplatzter Pollenschlauch. 1600 \times .

Longitudinal section of an embryo sac of Weisser Burgunder, 1 d after opening of the flowers. Discharged pollen tube. $\times 1600$.

Tabelle 1

Volumina der Kerne der Eizellen (μm^3) am Tag vor dem Aufblühen (V), am Aufblühtag (A) und am 1.—4. d nach dem Aufblühen · WB = Weißer Burgunder, GE = Gewürztraminer, MT \times A + = Müller-Thurgau \times *V. armata*, bestäubt, MT \times A — = Müller-Thurgau \times *V. armata*, unbestäubt · Die Signifikanzstufen beziehen sich auf die Differenz zum Vortag (\bar{x} von 40 Einzelwerten der Jahre 1977 und 1978)

Volumes of the nuclei of the egg cells (μm^3) 1 d before flowering (V), at the day of opening of the flowers (A) and at the 1st—4th d after opening of the flowers · WB = Weisser Burgunder, GE = Gewürztraminer, MT \times A + = Müller-Thurgau \times *V. armata* pollinated, MT \times A — = Müller-Thurgau \times *V. armata* not pollinated · The levels of significance are given for the difference to the preceding day (\bar{x} of 40 datas of 1977 and 1978)

	WB		GE		MT \times A +		MT \times A —	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
V	61,7	7,8	62,9	6,3	62,4	4,7	62,6	5,3
A	62,2 NS	9,7	63,2 NS	9,0	60,9 NS	8,9	60,8 NS	8,9
1. d	91,8***	8,1	90,4***	6,6	91,7***	2,6	60,1 NS	4,6
2. d	89,3	6,4	93,5	8,1	96,5	8,9	61,7	6,3
3. d	95,1	7,1	90,1	6,7	94,3	7,7	59,8	4,2
4. d	93,1	5,9	93,9	4,8	92,7	8,2	58,1	7,8

Tabelle 2

Volumina der sekundären Embryosackkerne (μm^3) am Tag des Aufblühens (A) und am 1. d nach dem Aufblühen · Abkürzungen der Rebsorten s. Tabelle 1 · Die Signifikanzstufen beziehen sich auf die Differenz zum Vortag (\bar{x} von 40 Einzelwerten der Jahre 1977 und 1978)

Volumes of the secondary embryo sac nuclei (μm^3) at the day of opening of the flowers (A) and at the 1st d thereafter · Abbreviations for the cvs. see Table 1 · The levels of significance are given for the difference to the preceding day (\bar{x} of 40 datas of 1977 and 1978)

	WB		GE		MT × A +		MT × A -	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
A	501,2	26,6	508,3	17,9	499,3	14,1	506,7	21,3
1. d	908,4***	47,8	897,4***	37,5	911,4***	61,3	563,6	45,1

Zwischen den untersuchten Sorten WB und GE und den beiden Untersuchungs-jahren konnten keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) festgestellt werden.

In den beiden Varianten des Klons MT × A zeigten die Kerne der Eizellen am Tag des Aufblühens die gleichen Volumina wie bei den Sorten WB und GE. Am 1. d nach dem Aufblühen war bei der bestäubten Variante eine signifikante ($P < 0,001$) Vergrößerung der Volumina der Eizellkerne zu verzeichnen. Die Kerne der unbestäubten Variante zeigten dagegen keine Vergrößerung, die Volumina vom Tag des Aufblühens und vom 1. d stimmten überein (Tabelle 1). Vom 3. d nach dem Aufblühen an wurde eine Abnahme des Volumens der Eizellkerne festgestellt. Möglicherweise waren die Eizellen bis zu diesem Termin befruchtungsfähig und begannen, nachdem keine Befruchtung erfolgt war, zu degenerieren.

In den Embryosäcken mit signifikanter Vergrößerung der Eizellkerne wurde gleichzeitig eine Vergrößerung der Volumina der sekundären Embryosackkerne beobachtet (Tabelle 2).

Diese Zunahme des Volumens auf das 1,76fache, die während der ersten 24 h nach dem Aufblühen auftrat, war mit $P < 0,001$ signifikant. In der unbestäubten Variante vergrößert sich der sekundäre Embryosackkern nach dem Aufblühen nur wenig.

Diskussion

Nach TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA (1953), VAN'T HOF und SPARROW (1963) sowie NAGL und EHRENDORFER (1973, 1974) kann das Volumen von Zellkernen zur Bestimmung der Polyploidiestufe herangezogen werden. Die Untersuchungen von HOWARD und PELC (1953) haben gezeigt, daß zwischen den Mitosen Phasen unterschiedlicher DNA-Synthese-Aktivität auftreten: G_1 -Phase, DNA-Synthese und G_2 -Phase. TSCHERMAK-WOESS und DOLEZAL (1956) und NAGL (1967, 1968) stellten zwischen den Kernen der G_1 - und G_2 -Phase Unterschiede in den Volumina fest, die auf die DNA-Replikation zurückzuführen sind. Bei *Vicia faba* waren die Volumina der G_2 -Kerne 1,82mal, bei *Pinus sp.* 1,61mal, bei *Allium carinatum* 1,64mal und bei *Vitis vinifera* (STAUDT, unveröffentlicht) 1,65mal so groß wie die der G_1 -Kerne.

Da es bei der Befruchtung zu einer Verdoppelung der DNA kommt, kann eine Volumenvergrößerung der Eikerne als Beweis für die erfolgte Befruchtung herange-

zogen werden. In den Kernen der Eizellen bestäubter Fruchtknoten wurde 24 h nach dem Aufblühen eine Vergrößerung des Volumens um das 1,53fache festgestellt. Diese Vergrößerung stimmt mit den oben genannten Werten weitgehend überein. Gleichzeitig mit der Befruchtung der Eikerne wurde in allen Embryosäcken eine Vergrößerung der Volumina der sekundären Embryosackkerne beobachtet. Es fand also stets eine doppelte Befruchtung statt.

Nach den Untersuchungen über die Abhängigkeit des Pollenschlauchwachstums von der Temperatur *in vivo* (STAUDT, in Vorbereitung) hatten bei den am Tag des Aufblühens herrschenden Temperaturen die Pollenschläuche nach 12 h die Samenanlagen erreicht. Somit muß die Befruchtung 12—24 h nach dem Öffnen der Blüten stattgefunden haben. In den nicht bestäubten Fruchtknoten trat niemals eine Vergrößerung des Kernvolumens der Eizellen auf. Die geringe Volumenzunahme der nicht befruchteten sekundären Embryosackkerne kann auf einer abnormen Vakuolenbildung beruhen, wie sie von STEFFEN (1951) für *Impatiens glanduligera* beschrieben worden ist.

Zusammenfassung

Die Entwicklung der Embryosäcke wurde beschrieben. Zum Zeitpunkt des Aufblühens bestehen sie aus den Synergiden, der Eizelle und dem sekundären Embryosackkern. Bei den untersuchten Sorten Gewürztraminer, Weißer Burgunder und einem Bastard Müller-Thurgau \times *V. armata* wurden übereinstimmende Werte für das Volumen der Kerne der Eizellen zum Zeitpunkt des Aufblühens festgestellt. Innerhalb von 24 h nach dem Aufblühen trat in den bestäubten Fruchtknoten eine Vergrößerung des Volumens der Eizellkerne auf das 1,53fache auf. Diese Vergrößerung wird mit einer Verdoppelung des DNA-Gehaltes infolge der Befruchtung erklärt. Auch bei den sekundären Embryosackkernen wurde in den bestäubten Fruchtknoten eine Zunahme des Volumens (1,76fach) beobachtet. In unbestäubten Fruchtknoten traten keine Volumenvergrößerungen der Eizellkerne und der sekundären Embryosackkerne auf. 4 d nach dem Aufblühen begannen die unbefruchteten Eizellen zu degenerieren. Unter Berücksichtigung der am Tag des Aufblühens herrschenden Temperaturen hat die Befruchtung 12—24 h nach dem Öffnen der Blüten stattgefunden.

Wir danken Frau Wiesmann-Piening für ihre gewissenhafte Mitarbeit.

Literatur

- HOWARD, A. and PELC, S. R., 1953: Synthesis of DNA in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity*, Suppl. 6, 261—273.
- HUGLIN, P. und BALTHAZARD, J., 1963: Vorläufige Beobachtungen über das Verrieseln des Muskat Ottonels. *Rebe u. Wein* 16, 126.
- KIM, K. S., 1967: A contribution to embryological studies on *Vitis (labrusca \times vinifera)* Fredonia variety. Ph. D. Univ. Thesis, New Brunswick, New Jersey.
- KOBLET, W., 1961: Ursachen des Durchrieselns an Reben. *Schweiz. Z. Obst- Weinbau* 70, 415—417.
- — 1966: Der Fruchtansatz bei Reben in Abhängigkeit von Triebbehandlung und Klimafaktoren. *Wein-Wiss.* 21, 297—323; 345—397.
- MAHESHWARI, P., 1950: An introduction to the embryology of Angiosperms. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- MÜLLER-THURGAU, H., 1883: Über das Abfallen der Rebenblüten und die Entstehung kernloser Traubenbeeren. *Weinbau* 9, 87—89; 95—96.

- NAGL, W., 1967: Mikrophotometrische DNS-Messungen an Interphase- und Ruhekernen sowie Mitosen in der Samenanlage von *Pinus silvestris*. Z. Pflanzenphysiol. 56, 40—56.
- — 1968: Der mitotische und endomitotische Kernzyklus bei *Allium carinatum*. I. Österr. Bot. Z. 115, 322—353.
- — und EHRENDORFER, F., 1973: Chromosomengröße und DNS-Gehalt bei drei Anthemideen (Asteraceae, Anthemideae). Österr. Bot. Z. 121, 165—169.
- — und — —, 1974: DNA content, heterochromatin, mitotic index, and growth in perennial and annual Anthemideae (Asteraceae). Plant Syst. Evol. 123, 35—54.
- PRATT, C., 1971: Reproductive anatomy in cultivated grapes. A review. Amer. J. Enol. Viticult. 22, 92—109.
- SARTORIUS, O., 1926: Zur Entwicklung und Physiologie der Reblüte. Angew. Bot. 8, 29—62; 65—89.
- STAUDT, G.: Die Abhängigkeit der Pollenkeimung und des Pollenschlauchwachstums von der Temperatur bei *Vitis rupestris in vivo*. (In Vorbereitung).
- STEFFEN, K., 1951: Zur Kenntnis des Befruchtungsvorgangs bei *Impatiens glanduligera*. Planta 39, 175—244.
- TSCHERMAK-WOESS, E., 1954: Über die Phasen der Endomitose. Herkunft und Verhalten der "nuclealen Körper" und Beobachtungen zur karyologischen Anatomie von *Sauromatum guttatum*. Planta 44, 509—531.
- — und HASITSCHKA, G., 1953: Veränderungen der Kernstruktur während der Endomitose, rhythmisches Kernwachstum und verschiedenes Heterochromatin bei Angiospermen. Chromosoma 5, 574—614.
- — und DOLEZAL, R., 1956: Der Formwechsel des Heterochromatins im Verlauf der Mitose von *Vicia faba*. Österr. Bot. Z. 103, 457—468.
- VAN'T HOF, J. and SPARROW, A. H., 1963: A relationship between DNA content, nuclear volume, and minimum mitotic cycle time. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 49, 897—902.
- WILHELM, A. F., 1963: Über das Verrieseln der Rebe. Rebe u. Wein 16, 93—98.

Eingegangen am 5. 6. 1981

Prof. Dr. G. STAUDT
 Staatliches Weinbauinstitut
 Merzhauser Str. 119
 D 7800 Freiburg