

Untersuchungen an frühen meiotischen Stadien von *Vitis vinifera* L. *)

von

G. HILPERT

Die Weinrebe, *Vitis vinifera* L., zählt in cytologischer Hinsicht wohl mit zu den am wenigsten bearbeiteten pflanzlichen Objekten. Entscheidend ist hierbei die relativ schlechte Zugänglichkeit der frühen und mittleren Stadien, außerdem die hohe Chromosomenzahl von $2n = 38$. Da die Chromosomen durchweg sehr klein sind und sich, wie die Untersuchungen ergaben, nur durch geringen Anteil an Heterochromatin auszeichnen, wird das Studium des Meiose-Ablaufes zumindest in den frühen Stadien noch zusätzlich erschwert. Die rein cytologischen Befunde haben daher erst ein geringes Ausmaß erreicht. Da die Weinrebe als Kulturpflanze nach genetischen Grundsätzen züchterisch bearbeitet wird, wäre eine gründliche Kenntnis ihrer cytologischen Verhältnisse sehr erwünscht. Außerdem ist der Züchter an Kreuzungsexperimenten zwischen Europäer- und Amerikaner-Reben interessiert, da z. B. eines der Zuchtziele bei der Rebe darin liegt, die wertvollen Resistenzeigenschaften einiger amerikanischer Rebensorten in unsere leistungsfähigen europäischen Sorten einzukreuzen. Es ist daher notwendig, nicht nur das cytologische Verhalten der Europäer-Rebe, sondern auch das der Amerikaner-Rebe zu kennen, und die beiden zueinander in Beziehung zu setzen. Die vorliegende Arbeit will den bereits vorhandenen Kenntnissen über den Meioseablauf bei *Vitis* einige neue Ergebnisse hinzufügen. Eine genauere Klärung der noch offenen Fragen ist weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Material und Methode.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden in der Hauptsache an Riesling Klon 90 durchgeführt, daneben in geringem Umfang an den Sämlingen Gf 31-22-119, Gf 31-25-52 und Gf 31-25-57 (Europäerbastarde). Das Material wurde als Stupfer im Winter 1957/58 im Gewächshaus herangezogen, in Carnoy 3:1 fixiert und nach einigen Tagen in 70%igen Alkohol überführt. Carnoy 3:1 erwies sich als geeigneter als das bisher übliche Alkohol-Eisessig-Gemisch 2:1. Zur Fixierung gelangten ganze Gescheine (Blütenstände), die Antheren wurden erst zur Färbung freigelegt. Eine brauchbare Färbung ließ sich mit Karmin-Essigsäure erzielen (5 g Karmin auf 100 ccm 45%ige Essigsäure etwa eine Stunde lang unter Rückfluß kochen), zum Färben wurde ein geringer Zusatz 1%iger FeCl_3 -Lösung gegeben. Es zeigte sich, daß die Antheren von *Vitis* eine starke Eisenfärbung benötigten. Die Färbedauer betrug bei frischem Material 7—11 Stunden, bei älterem 2—3 Stunden, jedoch ließ dann der

*) Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Herrn Prof. Dr. HUSFELD möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit und das ihr stets entgegengebrachte Interesse danken.

Kontrast zwischen Plasma und Chromatin zu wünschen übrig. Die Verarbeitung der Antheren zu Quetschpräparaten erfolgte in einer schwächer konzentrierten Lösung (1 g Karmin auf 100 ccm 45%ige Essigsäure). Bei Überfärbung kann mit 50%iger Essigsäure differenziert werden.

Die Mikrofotos wurden mit der Leica hergestellt. Da die Chromosomen fast stets in verschiedenen Ebenen lagen, war die Anfertigung von Mikrofotos sehr schwierig.

Der meiotische Stadienablauf.

Der Gesamtablauf der Meiose von *Vitis vinifera* L. wurde bisher noch nie bearbeitet. Die wenigen vorliegenden Arbeiten beschränken sich in erster Linie auf die Metaphase I und lassen wenig Schlußfolgerungen auf die früher und später ablaufenden Stadien zu. So ist es auch bis heute noch nicht klar, ob die Meiose völlig normal und sehr regelmäßig abläuft, und in wie weit Störungen im meiotischen Geschehen die Fertilität beeinflussen. ALLEY (1957) vermutet, daß keine Beziehungen zwischen Pollensterilität und meiotischen Unregelmäßigkeiten bestehen. Auffällig ist der geringe Heterochromasiegrad der Chromosomen, der schon in den prämeiotischen Ruhekernen durch die Kleinheit der Chromozentren zutage tritt.

Der Durchmesser einer Pollenmutterzelle (PMZ) beträgt bei *Vitis* etwa 20μ . Bei schlechter Fixierung sind Kern und Chromatinanteil auf kleinstem Raum zusammengedrängt, so daß ein völlig falsches Bild von den Größenverhältnissen entsteht. Eine Analyse solcher Zellen ist unmöglich.

a) frühe meiotische Prophase

Die frühe meiotische Prophase ist bei *Vitis* ein besonders schwer zugängliches Stadium. Auch die von EBERLE (1957) angegebene Simultanfärbung in 0,5%iger Orceinlösung in Carnoy 3:1 und die Verwendung der Phasenkontrasteinrichtung führten nicht zum Ziel. Wann und wo die Paarung der Homologen beginnt, ließ sich nicht genau feststellen. Jedoch liegen die Chromosomen im Pachytän in Form von Bivalenten vor. Die Paarung ist also zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen.

In ganz wenigen Fällen konnte beim Sämling Gf 31 - 25 - 52 und bei Riesling Klon 90 eine räumliche Annäherung zweier heterochromatischer Fäden beobachtet werden. Es ist zu vermuten, daß die Paarung im frühen Zygotän und zwar erst dann einsetzt, wenn die heterochromatischen Fäden bereits im spiralisierten Zustand vorliegen. Ähnliche Verhältnisse fand EBERLE (1957) an *Aloe*.

Im Leptotän und im frühen Pachytän wurden oft 2, mitunter sogar 3 und 4 Nucleolen beobachtet.

b) Pachytän

Das Pachytän zeichnet sich durch eine sehr starke Verknäuelung der Chromosomen aus. Es war bisher nur möglich, das Satellitenchromosom in einigen Fällen in seinem Aufbau zu verfolgen, jedoch nie über die gesamte Länge bis zum Endchromomer. Die Gesamtlänge ist daher noch nicht bekannt.

Das Heterochromatin der Pachytänchromosomen liegt gewöhnlich mehr oder weniger zentral im Chromosom und enthält das im Pachytän lang ausgezogene Centromer. Die heterochromatische Zone ist in sich strukturiert; sie besteht aus einzelnen kugelförmigen Körpern, den Makrochromomeren. Sie variieren bei *Vitis* nicht sehr stark in ihrer Größe. Über die in den euchromatischen Zonen befindlichen Mikrochromomeren lassen sich noch keine Aussagen machen.

Der Satellit haftet bei *Vitis* sehr fest am Nucleolus; daher gelingt es mitunter, einen Teil des Chromosoms mit dem Nucleolus aus dem übrigen Chromosomenverband herauszuquetschen. Das Satellitenchromosom ist partiell heterochromatisch: es lassen sich kräftiger färbbare heterochromatische Regionen von schwächer färbbaren euchromatischen unterscheiden. Das Heterochromatin liegt beiderseits des Centromers und wird auf der einen Seite von einer euchromatischen Zone, auf der anderen Seite von einer achromatischen Zone und dem Satelliten begrenzt. Es ist wahrscheinlich, daß die euchromatischen Enden in mittelgroßen Endchromomeren auslaufen, jedenfalls ließen sich an teilweise herausgequetschten sehr kurzen Chromosomenenden sog. „knobs“ feststellen, wie sie LIMA-DE-FARIA (1952) auch bei Roggen beobachtete. Eine endgültige Aussage darüber kann erst gemacht werden, wenn es gelungen ist, mehrere Pachytänchromosomen in ihrer gesamten Länge zu analysieren.

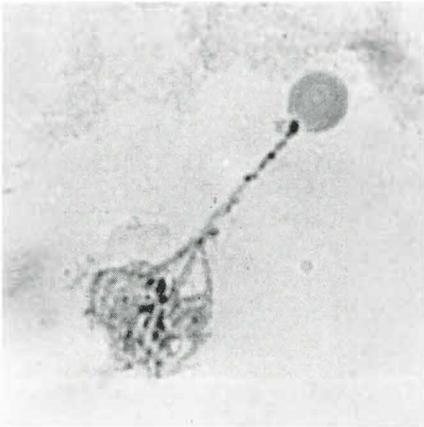


Abb. 1 Spätes Pachytän.
Künstlich sehr stark verzerrtes Satellitenchromosom. Die typische Anordnung der Makrochromomeren ist nicht mehr genau erkennbar.



Abb. 2 Satellitenchromosom.
Zeichnung nach 8 übereinstimmenden Auswertungen. 2 Makrochromomerenpaare beiderseits des Centromers, im langen Schenkel ein mittleres, etwas isoliertes Chromomerenpaar.

Die Länge des Satelliten unterscheidet sich nicht wesentlich von der der Makrochromomeren. Sie war in der Mehrzahl der Fälle gleich, variierte jedoch bis zur doppelten Länge. Auch GOTTSCHALK (1956) erwähnt bei *Lycopersicon esculentum* Längenunterschiede der Satelliten. Im Unterschied zu den kugelförmigen Chromomeren hat der Satellit eine längliche Form. Die Ursachen für die Variation in der Länge des Satelliten und der achromatischen Zone liegen wahrscheinlich in Spiralisationsunterschieden. Der Satellit war sehr häufig

gespreizt, erst die darauffolgenden Makrochromomeren lagen wieder als Homologe vor.

Der Heterochromasiegrad ist gering. Nach dem Satelliten und der achromatischen Zone wurden 2 Makrochromomeren im kurzen Schenkel gezählt. Es folgte das Centromer, dann der lange Schenkel, der ebenfalls 2, im Höchstfall 3 Makrochromomeren aufwies. Ein mittleres, etwas isoliert liegendes Chromomerenpaar wurde außerdem gefunden. Die Länge des euchromatischen langen Schenkels konnte nicht bestimmt werden (Abb. 1 und 2).

c) Diplotän und Diakinese

Auch das Diplotän ist bei *Vitis vinifera* L. ein recht unübersichtliches und schwierig zu bearbeitendes Stadium, dagegen ist die Diakinese einem Studium recht gut zugänglich. Bei pflanzlichen Objekten findet man in der Diakinese im Normalfall die der haploiden Zahl entsprechende Anzahl von Bivalenten. Gelegentlich fanden sich Tetravalente in Form von Viererringen (OHLENDORF 1944 bei *Solanum lycopersicum*). Im Gegensatz dazu zeigten die an Riesling Klon 90 für *Vitis* durchgeführten Untersuchungen ein vollständig anormales Verhalten in der Diakinese. Der weitaus größte Teil der Chromosomen lag als Univalente und nur einige wenige lagen in gepaartem Zustand vor. Es konnten ± 32 Chromosomenkörper gezählt werden, woraus zu schließen wäre, daß 3—7 Bivalente vorhanden wären und die übrigen Chromosomen als Univalente auftreten. In der Tat ließen sich auch stets etwa 5 wesentlich größere Chromosomenkörper feststellen, die als Bivalente anzusehen wären. Eine genaue Auszählung war nicht möglich.

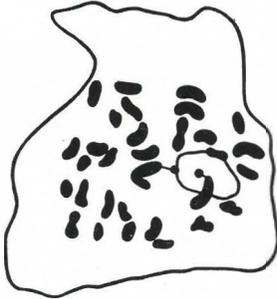


Abb. 3 Diakinese mit 2 Satellitenchromosomen. Chromosomenzahl zwischen n und $2n$. Zeichnung kombiniert aus 2 Mikrofotos in verschiedenen Ebenen.

Zu welchem Zeitpunkt die Trennung der Homologen erfolgte, konnte nicht festgestellt werden und soll die Aufgabe weiterer Untersuchungen sein. Besonders deutlich wurde die Trennung der Chromosomen in einer PMZ, in der die Satellitenchromosomen ganz deutlich zu erkennen waren (Abb. 3). Die Satelliten waren gestielt und lagen dem Nucleolus an.

In der Prometaphase zeigen die Chromosomen wieder eine räumliche paarweise Annäherung (Abb. 4 und 5), und in M I ist die Paarung wieder abgeschlossen.



Abb. 4 Prometaphase.
Die Chromosomen liegen noch weitestgehend als Univalente vor.

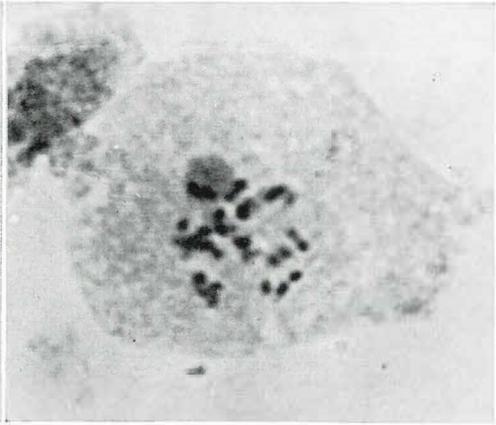


Abb. 5 Prometaphase.
Chromosomen in räumlicher paarweiser Annäherung.

Es muß besonders betont werden, daß sämtliche PMZ, die bei Riesling Klon 90 im Diakinese-Stadium gefunden wurden, dieses anormale Erscheinungsbild zeigten. Störungen an nur einigen wenigen Zellen sind dadurch ausgeschlossen. Es bleibt weiteren Untersuchungen überlassen, zu ergründen, wodurch diese Abnormitäten im Teilungsgeschehen bei Riesling Klon 90 hervorgerufen werden und festzustellen, ob sie auch in anderen Sorten und Jahrgängen vorkommen und somit typisch für die Gattung *Vitis* sind. Bei den ebenfalls untersuchten Sämlingen konnte das Diakinesestadium leider nicht erfaßt werden.

d) Metaphase I und Anaphase I

In der Metaphase I liegen die Chromosomen wieder paarweise in Form von Bivalenten vor. Dies ist der Normalfall und wird auch von PATEL und OLMO (1955) für *Vitis* beschrieben. Sie fanden sogar in 2 Fällen Tetravalente. Die Chromosomen sind sehr klein und zum größten Teil kugelförmig. Gelegentlich treten als Abnormitäten auch pygnotische Erscheinungen auf. So waren in einigen PMZ die Chromosomen zu wenigen Ballen verklumpt. Dies war besonders häufig bei dem Sämling Gf 31 - 25 - 52 zu beobachten. Die Länge der Metaphasechromosomen beträgt nach ALLEY (1957) 1μ . Er fand auch neben Bivalenten gelegentlich Tri- und Tetravalente in diploiden Sorten.

Die Anaphasewanderung erfolgte regelmäßig. Laggards — nachhinkende Chromosomen — wurden nur sehr selten und Brückenbildung nie beobachtet. Ein Vorseilen von Chromosomen trat in den untersuchten Zellen nie auf. Die beiden Anaphaseplatten stehen nicht parallel zueinander, sondern bilden einen Winkel, was auch WAGNER (1951) bei seinen Untersuchungen an weiblichen Rebensorten beschreibt.

e) die zweite meiotische Teilung

Die zweite meiotische Teilung verlief im allgemeinen normal. Die beiden Spindeln stehen, von seltenen Ausnahmen abgesehen, senkrecht aufeinander.

In einem Fall trat bei Riesling Klon 90 Tripolbildung auf, in einer anderen Zelle wurde ein zeitlicher Unterschied im Teilungsgeschehen beobachtet. Während die Chromosomen des einen Tochterkerns noch als M II in der Teilungsebene lagen, hatten sich die anderen bereits geteilt und waren zu den Polen gewandert. Die M II-Platte wies jedoch starke Verklumpungen auf, so daß die Möglichkeit besteht, daß die Teilung in diesem Falle ganz unterblieb.

In einer A II waren mehrere Chromosomen als laggards vorhanden. Da jedoch die Spindel noch nicht aufgelöst war, liegt die Annahme nahe, daß die Einzelchromosomen den Anschluß an die zugehörige Platte noch gefunden haben.

Zusammenfassung

1. Bei Untersuchungen über das meiotische Teilungsgeschehen bei *Vitis vinifera* L. konnten über die frühen prophatischen Stadien keine genauen Aussagen gemacht werden. Die Vermutung liegt nahe, daß die Paarung erst nach der Spiralisierung einsetzt.
2. Im Pachytän konnte das Satellitenchromosom z.T. analysiert werden. Es zeigte einen geringen Heterochromasiegrad von nur 2 Makrochromomeren beiderseits des Centromers und eines mittleren Chromomers im langen Schenkel. Der Satellit ist klein und oftmals gespreizt.
3. Die Diakinese zeigte im Vergleich zu anderen pflanzlichen Objekten ein abnormes Verhalten. Die Chromosomen kamen in der Mehrzahl als Univalente vor, nur wenige waren größer und werden als Bivalente angesehen. Es wurden ± 32 Chromosomenkörper gezählt. In der Prometaphase erfolgt wieder eine paarweise räumliche Annäherung der Univalente.
4. Die Chromosomen der Metaphase treten wieder als Bivalente auf. Die Länge beträgt 1μ . A I und die zweite meiotische Teilung verliefen im allgemeinen normal.

Literaturverzeichnis

- ALLEY C. J.: Cytogenetics of *Vitis*. II. Chromosome behavior and the fertility of some autotetraploid derivatives of *Vitis vinifera* L. *Heredity* 48, 195—202 (1957).
- EBERLE P.: Spiralen und Chromomeren in der frühen Prophase der Meiosis von *Aloe eru* Berger. *Chromosoma* 8, 573—584 (1957).
- GOTTSCHALK W.: Die Cytologie der Kulturtomate und ihrer wildwachsenden Verwandten. *Bibliogr. Genetica* 17, 1—109 (1956).
- LIMA-DE-FARIA A.: Chromomere analysis of the chromosome complement of rye. *Chromosoma* 5, 1—68 (1952).
- OHLENDORF A.: Untersuchungen zur Zytologie und Physiologie der Meiosis an *Solanum lycopersicum* und *S. tuberosum*. Diss. Naturw. Math. Fakultät Freiburg/Br. (1944).
- PATEL G. J. and H. P. OLMO: Cytogenetics of *Vitis*. I. The hybrid *V. vinifera* x *V. rotundifolia*. *Amer. J. Bot.* 42, 141—159 (1955).
- WAGNER E.: Cytologische Untersuchungen über Meiose und Pollenentwicklung weiblicher Rebensorten. *Chromosoma* 4, 439—455 (1951).