

Genbedingte Störungen der Infloreszenz- und Blütenbildung*

H. D. KLEIN und M. MILUTINOVIC

Institut für Genetik der Universität Bonn (BRD)

Genetically Determined Abnormalities of Inflorescence Development and of Flower Formation

Summary. In a histological study of two sterile mutants of *Pisum sativum* induced by X-rays and neutrons, respectively, the following results were obtained: Individuals of the mutant 2228 are characterized by failure to develop normal sexual organs. In the nucellus as well as in the anthers no sporogenous cells are differentiated. Instead, a homogenous mass of cells can be seen to fill the organs, it degenerates sooner or later. In the mutant 172 A no inflorescences are developed at all, so that the change from the vegetative to the generative phase of the plants is blocked. Instead of normal inflorescences so-called vegetative inflorescences are produced. Comparative histological studies showed that in this mutant there remain no residual generative potentialities in either the shoot tips or the leaves.

I. Einleitung

In einem umfangreichen Sortiment röntgen- und neutroneninduzierter *Pisum*-Mutanten treten u. a. in großer Zahl Formen mit Störungen in der Entwicklung ihrer Infloreszenzen auf. Verschiedene Gene wirken dabei zu verschiedenen Zeiten, beginnend in den frühesten Stadien der Infloreszenzbildung über Fehlentwicklungen verschiedener Blütenteile bis hin zu meiotischen und nachmeiotischen Abnormalitäten (Gottschalk 1964, Klein 1968, Chen 1969). In der vorliegenden Arbeit werden zwei Mutanten behandelt, die in den frühesten und frühen Phasen der Blütenbildung gestört sind. Solche Formen scheinen geeignet, den Ablauf der Blütenbildung in seinen einzelnen genabhängigen Teilschritten zu erfassen, um durch ihre Analyse die für die normale Entwicklung notwendigen Bedingungen kennenzulernen. Als ersten Schritt auf diesem Wege gilt es, den Zeitpunkt der Genwirkung mit Hilfe von Schnittpräparaten möglichst genau zu ermitteln, die Veränderungen gegenüber der Ausgangsform zu bestimmen und den Erbgang aufzuklären.

II. Material und Methode

Untersucht wurden die Mutanten 2228 und 172A. Sie entstanden nach Neutronen- bzw. Röntgenbestrahlung lufttrockener Samen der als Ausgangsform verwendeten Handelssorte 'Dippes gelbe Viktoria'. Wegen der Sterilität der Mutanten erfolgte ihre Erhaltung und Vermehrung über heterozygote M_3 – M_9 -Pflanzen. Zur Untersuchung der histologischen Verhältnisse wurden „vegetative Blüten“ (172A, s. u.) bzw. junge Blütenknospen (2228) in Bouin fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und die Präparate z. T. in einer Kombination von Eisenhämatoxylin, Safranin und Gentianaviolett und z. T. in Safranin, Gentianaviolett und Orange-G mit nachfolgender Differenzierung in Nelkenöl gefärbt (Rozeis 1968).

* Mit Unterstützung des Bundesministers für Wissenschaft und Forschung der Bundesrepublik Deutschland und der Euratom-I.T.A.L.

III. Ergebnisse

Wie die Beobachtung des Spaltungsverhältnisses und die statistische Bearbeitung der Spaltungsergebnisse zeigen, handelt es sich bei den beiden Mutanten jeweils um monofaktoriell vererbte Formen mit Rezessivität des mutierten Gens.

1. Mutante 2228

Bei der Mutante 2228 werden äußerlich zunächst normale Blüten ausgebildet. Gegen Ende der Entwicklung treten jedoch Veränderungen auf, die ausschließlich Teile des Gynäzeums und Andrözeums betreffen.

a) *Andrözeum.* Bei einer näheren makroskopischen Untersuchung entfalteter Blüten zeigt sich, daß die Antheren zu kleinen, vertrockneten Gebilden zusammengeschrumpft sind. Sie stäuben nicht und bleiben wegen fehlender Pigmentbildung ungefärbt. In seltenen Fällen trägt ein Filament zwei unterschiedlich große Antheren, die an verschiedenen Stellen inseriert sind. Daneben ist ihre Form gegenüber den Normalantheren in charakteristischer Weise verändert, wie aus dem Vergleich der Abb. 1 und 2 ersichtlich ist. Dabei tritt die Konnektivregion der Mutanten-Anthere deutlich aus dem Querschnitt hervor, während die Theken bei wesentlich vermindertem Umfang mit verhältnismäßig schmaler Basis an das Konnektiv ansetzen.

Bei Voruntersuchungen an einer großen Anzahl von Quetschpräparaten konnte festgestellt werden, daß ein entscheidendes Merkmal dieser Mutante die fehlende Ausdifferenzierung von PMZ darstellt. Mit Hilfe von Mikrotomschnitten ergeben sich Einzelheiten dieser Fehlentwicklung, die wie folgt zu charakterisieren sind. Die frühesten Unterschiede zwischen Mutante und Normalform (NF) werden in der Übergangsphase zwischen der aus wenigen Zellen bestehenden, rundlichen bis rechteckig gestalteten

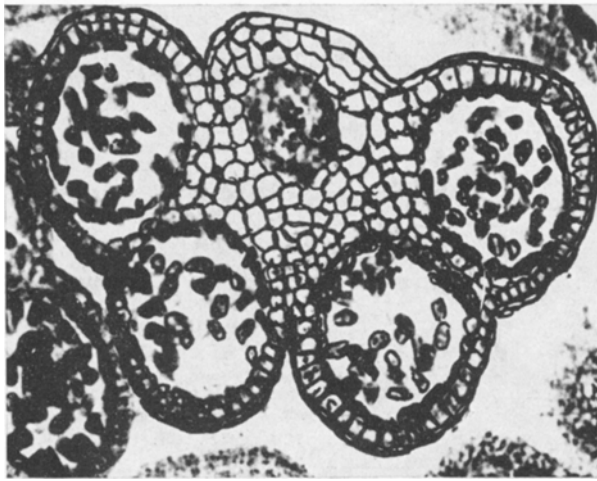


Abb. 1. Querschnitt durch eine reife Anthere der Normalform

Antherenanlage und der durch Einbuchtungen sich gerade andeutenden Ausbildung der Pollensäcke sichtbar. Während bei der NF zu dieser Zeit die Ausdifferenzierung der verschiedenen Antherengewebe — Archespor, Tapetum, Zwischenschicht(en) und Endothecium — erfolgt, bleibt bei der Mutante das Gewebe mit Ausnahme der Epidermis zunächst undifferenziert homogen. Es besteht aus einer Art Füllgewebe mit einheitlichen, relativ großen, abgerundeten und verhältnismäßig plasmaarmen Zellen (Abb. 2). Etwas später erfolgt jedoch unterhalb der Epidermis die Anlage von Zellen, die in radialer Richtung gestreckt und als Vorläufer der Endothecium-Zellen zu deuten sind (Abb. 2). Für diese Annahme spricht neben ihrer Lage und Form auch die Tatsache, daß sie ausschließlich in den Bereichen auftreten, in denen bei der NF die Pollensäcke anzutreffen sind, ferner die Feststellung, daß — wenn auch nur in einem geringen Prozentsatz aller untersuchten Schnitte — ein normal ausgebildetes Endothecium mit den typischen, spangenförmigen Wandverdickungen sichtbar ist. Ohne pathologische Veränderungen bleibt auch das Konnektiv, sowohl im Hinblick auf seine Lage als auch hinsichtlich der Ausbildung der Leitbündel (Abb. 2). Gegen Ende der Antherenentwicklung setzen degenerative Prozesse ein, die sich durch eine lebhafte Vakuolisierung ankündigen und schließlich zur Auflösung der Zellen führen. Dieser Prozeß beginnt meist im Bereich zwischen zwei „präsumptiven Pollensäcken“ und dehnt sich schließlich auf die übrigen Regionen aus (Abb. 3).

b) *Gynäzeum*. Neben einem normal gestalteten Fruchtknoten zeigen auch die Samenanlagen zunächst keine Abweichung von den Verhältnissen in der NF. Bei entfalteten Blüten schrumpfen sie jedoch zusammen, und es läßt sich auch bei Fremdbestäubung kein Samenansatz erzielen. Diese Tatsache weist bereits auf die Funktionsunfähigkeit des Gynäzeums hin, was durch die mikroskopische Unter-

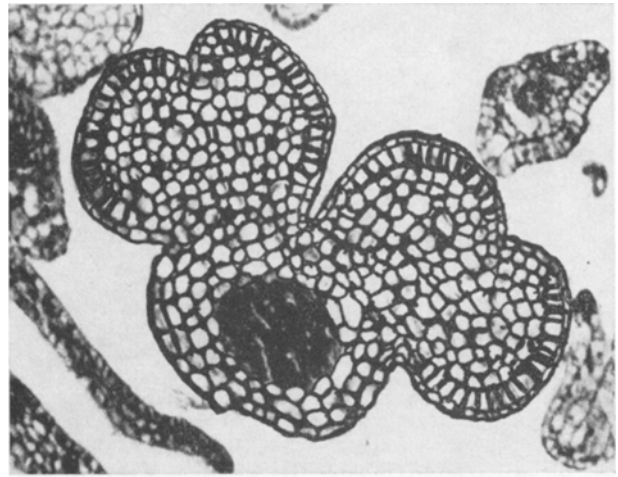


Abb. 2. Querschnitt durch eine Anthere der Mutante 2228 mit nicht vollständig ausdifferenziertem Endothecium und einem homogenen „Füllgewebe“ ohne Archespor, Tapetum und Zwischenschichten

suchung von Schnittpräparaten bestätigt wird. Danach zeigen die Samenanlagen zunächst einen normalen Aufbau, bestehend aus dem Nucellus, einem 2—3schichtigen Inneren Integument und einem aus 4—5 Schichten gebildeten Äußeren Integument. Ein Embryosack ist jedoch in keinem Falle aufzufinden. Seine Stelle nehmen vielmehr etwas größere, plasmaarme Zellen ein, die sich später degenerativ verändern und zunehmend größere Lücken zwischen sich entstehen lassen. Die Entwicklung wird schließlich durch die Auflösung des Zellmaterials in diesem Bereich beendet (Abb. 4).

2. Mutante 172A

Die Morphologie der Mutante 172A ist ausführlich bereits in einer früheren Publikation beschrieben worden (Gottschalk 1964). Ihr wesentliches Merkmal besteht darin, daß anstelle der Infloreszenzen vegetative Kurzsprosse ausgebildet werden („vegetative Blüten“, Harder 1948). Es handelt sich dabei um extrem gestauchte Sprosse mit einer dichten Folge von kleinen Blättern, welche prinzipiell die gleiche Aufgliederung wie die Hauptsproß-Blätter erfahren. In Ergänzung zu diesen Feststellungen sollte nun mit Hilfe von Mikrotomschnitten ermittelt werden, ob eventuell im histologischen Aufbau der Blätter und der Vegetationskegel der Kurzsprosse „generative Restpotenzen“ in Richtung auf die Ausdifferenzierung von Blüten wirksam werden. Die Untersuchungen bestätigen diese Vermutungen nicht:

Der histologische Aufbau der Kurzsproßblätter zeigt keinerlei Unterschiede von der normalen Struktur der Hauptsproßblätter. Die vermuteten Übergänge in Richtung auf die histologischen Verhältnisse bei den Blütenblättern sind nicht festzustellen. Auch vergleichende Untersuchungen an Schnitten durch die Haupt- und Kurzsproßspitzen ergeben eine völlige Identität im Aufbau dieser Gewebe. In beiden Fällen

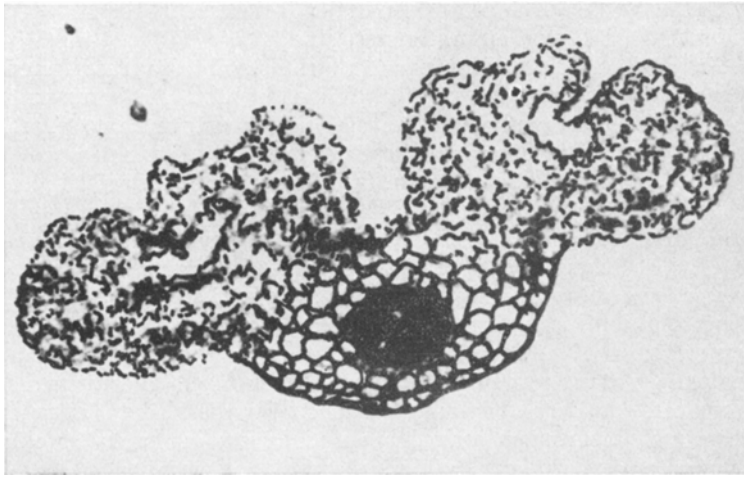


Abb. 3. Querschnitt durch eine Anthere der Mutante 2228 mit weitgehender Auflösung des Gewebes. Auftreten von Lücken zwischen jeweils 2 „Pollensäcken“

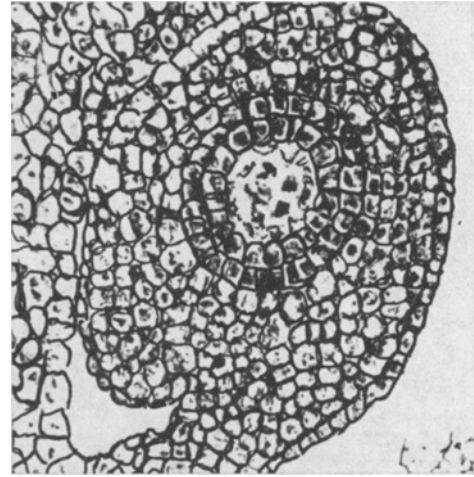


Abb. 4. Längsschnitt durch eine Samenanlage der Mutante 2228 mit degenerativer Veränderung der Zellen im Nucellus

zeigen die Präparate das typische Aussehen des vegetativen Vegetationskegels, wie es u. a. von Lang (1965) sowie Gifford und Tepper (1961) näher charakterisiert wurde. Anzeichen für eine Umstimmung des Kurzsproß-Vegetationskegels in einen Infloreszenz-Vegetationskegel mit seinen bekannten Merkmalen sind nicht aufzufinden.

IV. Diskussion

Der Übergang von der vegetativen Phase in die generative Phase stellt einen wichtigen Einschnitt in der Ontogenese einer Pflanze dar und hat bereits frühzeitig die Aufmerksamkeit vieler Autoren erregt. Neben der Bedeutung dieses Differenzierungsvorganges für die Grundlagenforschung spielen die Erkenntnisse bei der Bearbeitung dieses Prozesses insbesondere für die praktische Nutzenanwendung in Landwirtschaft und Gartenbau eine entscheidende Rolle. Ungezählte Publikationen an vielen Objekten haben sich deshalb mit diesem Problem befaßt und nahezu alle Phasen dieses Vorganges — angefangen von den ersten Differenzierungsschritten über die funktionsgerechte Ausbildung der Blüten bis hin zur Fruchtentwicklung — in allen Einzelheiten beleuchtet (zusammenfassende Darstellung u. a. bei Lang 1965). Die Untersuchungen richteten sich dabei in der überwiegenden Mehrzahl

— auf die Abhängigkeit dieses Prozesses von bestimmten Umweltfaktoren, wie Belichtungsverhältnisse (Photoperiode), Nährstoffangebot, Temperatur, Feuchtigkeit usw.,

— auf den modifizierenden Einfluß beispielsweise von Pflanzengeweben oder von Pflanzenextrakten und

— auf die Wirkung der verschiedensten Chemikalien, wie z. B. Wachstumsregulatoren (B_9 , CCC, MH, Thomas und Schwabe 1969); Herbizide (DCMU, Kandeler 1969); Kationen (Li^+ , K^+ , NH_4^+ , Kandeler 1970); Antimetabolite und

Hemmstoffe der Nukleinsäure- und Proteinsynthese (TU, Eichhoff und Rau 1969) u. v. a.

So lassen sich z. B. bei *Kalanchoe* durch geeignete Veränderung der Umweltbedingungen ziemlich genau die Verhältnisse phänotypisch kopieren, wie sie bei unserer Mutante 172A verwirklicht sind. In diesem Falle wird nämlich die Bildung von Infloreszenzen unter dem Einfluß einer unterschwelligen Photoperiode unterdrückt und an ihre Stelle treten beblätterte Sprosse, die allerdings nicht gestauht sind.

Der Fülle der Arbeiten dieser Art steht jedoch nur eine geringe Anzahl von Veröffentlichungen gegenüber, die über genetisch fixierte Störungen insbesondere in den frühen Entwicklungsstadien der Infloreszenz- und Blütenbildung berichten.

So sind beispielsweise keine Formen bekannt, welche die gleichen Entwicklungsstörungen aufweisen wie die Mutante 2228. Als Vergleichsmaterial können hier lediglich einige männlich-sterile Formen angeführt werden, über die Jain (1959) in einem Sammelreferat berichtet. Bei verschiedenen Objekten erfolgt beispielsweise eine sehr frühzeitige Degeneration der Antheren, vielfach noch bevor sich die einzelnen Gewebetypen herausdifferenzieren haben. In anderen Fällen wirken die Gene etwas später und beeinflussen zunächst entweder das Archispor, das Tapetum oder eine der Wandschichten, bevor die degenerativen Veränderungen dann auf die ganze Anthere übergreifen. Schließlich sei eine männlich-sterile Mutante der Tomate erwähnt, bei der sich das sporogene Gewebe auf Kosten der Wandschichten bis zur Epidermis hin ausdehnt (Rick 1948).

Was schließlich die genbedingte Veränderung früherer Stadien der Infloreszenzbildung angeht, so ist insbesondere eine Form von *Bryophyllum daigremontianum* von Interesse, die von Resende (1967) beschrieben wird. Sie zeigt zwar noch einen Pedunculus und Racemus, ist jedoch nicht mehr in der Lage,

Brakteen und Blüten auszubilden. Bei einer *Aloe*-Mutante liegt der genetische Block zwischen der Anlage der Infloreszenz und der Parasexual- und Sexualorgane (Linskens 1960). Bei unserer Mutante 172A verhindert das mutierte Gen bereits den Übertritt in die generative Phase; es wird also noch früher wirksam.

Als Ursache für die fehlende Ausbildung der Infloreszenzen sind die beiden folgenden Möglichkeiten denkbar:

— Das mutierte Gen unterbindet die Bildung oder den Transport eines Stoffes, der direkt oder indirekt für die Blüteninduktion erforderlich ist. Ferner ist daran zu denken, daß ein Hemmstoff entsteht, der das blühhördernde Agens in seiner Wirkung ausschaltet. Pfropfversuche oder Versorgung mit Extrakten aus induzierten Pflanzen u. a. könnten Aufschluß über die Richtigkeit dieser Vermutung geben.

— Als zweite Möglichkeit muß erwogen werden, daß sich durch die Mutation die Reaktionsnorm der Mutante so verschoben hat, daß nur unter veränderten Umweltbedingungen der Eintritt in die generative Phase erfolgen kann. Es sind einige Fälle bekannt, in denen sich diese Annahme bestätigt hat. So erfolgt — um nur ein Beispiel anzuführen — bei *Lathyrus odoratus* als Folge einer rezessiven Mutation die Blütenbildung nicht wie bei der dominanten Ausgangsform im Langtag, sondern nur unter Kurztagbedingungen (Little und Kantor 1944). Auch diese Möglichkeit ließe sich durch Änderung der Aufzuchtbedingungen unserer Mutante überprüfen, was im Augenblick jedoch wegen der fehlenden Einrichtungen noch nicht möglich ist.

Die beiden in dieser Arbeit behandelten Genotypen liefern nach unserer Vorstellung günstige Voraussetzungen für die Analyse von Teilschritten im Ablauf der Blütenbildung, die durch den Zeitpunkt der Genwirkung bestimmt sind: bei der Mutante 172A ergibt sich die Möglichkeit, die gesteuerten Mechanismen beim Übergang von der vegetativen zur generativen Phase näher zu erforschen, während bei der Mutante 2228 weitergehende Untersuchungen über die notwendigen Voraussetzungen für die funktionsgerechte Ausdifferenzierung des Gynäzeums und Androezeums Aufschluß geben können.

V. Zusammenfassung

Mit Hilfe von Mikrotomschnitten werden die histologischen Verhältnisse in 2 Mutanten von *Pisum sativum* im Vergleich zur Normalform beschrieben,

die durch Störungen in der Infloreszenz- bzw. Blütenbildung charakterisiert sind.

Bei der Mutante 2228 unterbleibt die Ausdifferenzierung sporogener Zellen in den Antheren und Samenanlagen, während bei der Mutante 172A anstelle normaler Infloreszenzen vegetative Kurzspresse ausgebildet werden. Vergleichende histologische Untersuchungen von Kurzspresse-, Hauptsproß- und Blütenblättern einerseits und von Kurzspresse- und Hauptsproß-Vegetationskegeln andererseits ergeben keine Anhaltspunkte für „generative Restpotenzen“ in dieser Mutante.

Zum Schluß werden die Ergebnisse im Zusammenhang mit vergleichbaren Fällen in der Literatur diskutiert, mögliche Ursachen für die Entstehung der Störungen aufgeführt und kurze Hinweise für eine experimentelle Weiterbearbeitung gegeben.

Literatur

1. Chen, R.: Die Auswertung neutronen- und röntgen-induzierter Mutanten von *Pisum sativum*. Diss. Math.-Nat. Fak., Univ. Bonn, 1969. — 2. Eichhoff, E., Rau, W.: Auslösung der Blütenbildung bei der Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* im Kurztag durch 2-Thiouracil. *Planta* **87**, 290–303 (1969). — 3. Gifford, E. G., Tepper, H. B.: Ontogeny of the inflorescence in *Chenopodium album*. *Amer. J. Bot.* **48**, 657–667 (1961). — 4. Gottschalk, W.: Die Wirkung mutierter Gene auf die Morphologie und Funktion pflanzlicher Organe. *Bot. Studien*, Heft 14, Jena 1964. — 5. Harder, R.: Vegetative and reproductive development of *Kalanchoe blofeldiana* as influenced by photoperiodism. *Symp. Soc. exp. Biol.* **2**, 117–138 (1948). — 6. Jain, S. K.: Male sterility in flowering plants. *Bibliographia Genetica* **18**, 101–166 (1959). — 7. Kandeler, R.: Förderung der Blütenbildung von *Lemna gibba* durch DCMU und ADP. *Z. Pflanzenphysiol.* **61**, 20–28 (1969). — 8. Kandeler, R.: Die Wirkung von Lithium und ADP auf die Phytochromsteuerung der Blütenbildung. *Planta* **90**, 203–207 (1970). — 9. Klein, H. D.: Die Beeinflussung der Meiosis durch mutierte Gene. Diss. Math.-Nat. Fak., Univ. Bonn, 1968. — 10. Lang, A.: Physiology of flower initiation. In: *Hdb. Pflanzenphysiol.* XV/1, 1380–1536, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965. — 11. Linskens, H. F.: Beitrag zur biochemischen Charakterisierung einer *Aloe*-Mutante mit blütenloser Infloreszenz. *Portug. Acta Biol., Série A*, **6**, 125–130 (1960). — 12. Little, T. M., Kantor, J. H.: Inheritance of earliness of flowering in the sweet pea. *J. Hered.* **32**, 379–383 (1941). — 13. Resende, F.: General principles of sexual and asexual reproduction and life cycles. In: *Hdb. Pflanzenphysiologie*, Bd. 18, 257 bis 281, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967. — 14. Rick, C. M.: Genetics and development of nine male-sterile tomato mutants. *Hilgardia* **18**, 599–633 (1948). — 15. Romeis, B.: Mikroskopische Technik. München-Wien 1968. — 16. Thomas, G. G., Schwabe, W. W.: Factors controlling flowering in the hop (*Humulus lupulus* L.). *Ann. Bot.* **33**, 781–793 (1969).

Eingegangen am 5. Februar 1971

Angenommen durch H. F. Linskens

H. D. Klein
Institut für Genetik
der Universität
Kurfürstenstr. 74
53 Bonn
(Germany, BRD)

M. Milutinović
Landwirtschaftliche Fakultät
der Universität
Belgrad (Jugoslawien)
z. Z. als Humboldt-Stipendiat
am Institut für Genetik
der Universität Bonn.