

# Untersuchungen zur Pollenentwicklung und Pollenschlauchbildung bei höheren Pflanzen

## III. DNS-Replikation bei vegetativen und Sperma-Kernen in reifen Pollenkörnern von Gerste\*

C. U. HESEMANN

Lehrstuhl für Allgemeine Genetik der Universität Hohenheim, Stuttgart (BRD)

### The Development of Pollen Grains and Formation of Pollen Tubes in Higher Plants

#### III. DNA-Replication of Vegetative and Sperm Nuclei in Mature Pollen Grains of Barley

**Summary.** The DNA-content of vegetative and sperm nuclei in mature pollen grains of the barley varieties Amsel and Wisa and the  $F_1$ -plants of crossings of the barley varieties Impala  $\times$  Wisa and Union  $\times$  Wisa was determined by cytophotometry. In addition, the DNA-content of nuclei of root tips of Amsel and Wisa was cytophotometrically measured.

The DNA contents of the nuclei in root tips of Amsel and Wisa differed significantly.

The data obtained from the measurements of the vegetative and sperm nuclei of the four types of barley show that DNA-replication continues in the nuclei of mature pollen grains. The DNA values of vegetative nuclei of Wisa are significantly lower than the values of Amsel and of the  $F_1$  plants. The DNA values of the different nuclei indicate that DNA replication of both types of sperm nuclei is synchronous, whereas it probably is not synchronous in vegetative and sperm nuclei respectively.

In the discussion it is pointed out that a survey of the literature shows that in all of the plant species having binucleate or trinucleate pollen DNA replication of generative and of sperm nuclei has started at the time of pollen grain maturation. Depending on the plant species, replication may or may not be completed in the mature pollen grain. At a given stage of development of the pollen grain the vegetative nucleus may be arrested at the C-stage, may have partially or completely finished its DNA replication or may be partially or completely degenerated without prior replication of DNA.

In the second part of the discussion it is stated that the course of DNA replication is likely to be similar in binucleate and trinucleate pollen grains. Thirdly, the hypothesis is discussed that in order to get haploid plants from pollen grains, changes in the normal development of the pollen grain and in the pattern of DNA replication must occur at a very early stage of pollen grain development.

### Einleitung

Die ersten quantitativen Analysen zur Bestimmung des DNS-Gehalts der Kerne von Pollenkörnern im Verlauf der Mikrosporogenese wurden vor zwanzig Jahren bei *Tradescantia* durchgeführt (Bryan, 1951). In der Folgezeit wurden nur wenige Untersuchungen über derartige quantitative Bestimmungen veröffentlicht. Die DNS-Messungen wurden vornehmlich bei Arten vorgenommen, die wie *Lilium*, *Nicotiana*, *Petunia* oder *Tradescantia* zu Beginn der Anthese zweikernigen Pollen besitzen (D'Amato *et al.*, 1965; Heseemann, 1971; Jalouzot, 1969; Moses and Taylor, 1955; Woodard, 1958). Bei diesen Formen mit zweikernigem Pollen enthalten die reifen Pollenkörner je einen generativen und vegetativen Kern, sofern letzterer nicht bereits degeneriert ist. Die Teilung des generativen Kerns in die beiden Spermkerne findet erst im Pollenschlauch statt. Als Art mit dreikernigem Pollen wurde bisher nur Gerste quantitativ analysiert (D'Amato *et al.*, 1965). Bei diesen drei-

kernigen Arten läuft die Teilung des generativen Kerns in die Spermkerne nicht im Pollenschlauch, sondern bereits im Pollenkorn ab.

Auf Grund der bisher bei nur sehr wenigen Objekten gewonnenen Befunde ist es auch 1972 noch nicht möglich, ein lückenloses und widerspruchsfreies Bild des Verlaufs der DNS-Replikation von vegetativen und generativen Kernen bzw. Spermkernen während der Entwicklung der Pollenkörner und Pollenschläuche zu erhalten. Die hier vorliegenden quantitativen Analysen sollen dazu beitragen, diese Kenntnislücke möglichst rasch schließen zu können.

### Material und Methoden

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden die folgenden vier Sommergerstensorten verwandt: Amsel, Impala, Union und Wisa. Das Material stammt aus den Feld-Kulturen des Instituts für Angewandte Genetik und Pflanzenzüchtung der Universität Hohenheim, Stuttgart-Hohenheim\*. Bei den Sorten Amsel und Wisa wurden

\* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

\* Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Landw. W. Baier, Landeszuchtanstalt, Stuttgart-Hohenheim, für die Überlassung des Pflanzenmaterials.

Pflanzen reiner Linien für die DNS-Bestimmungen verwendet. Die übrigen zwei Sorten, ebenfalls Pflanzen reiner Linien, wurden dadurch in die Untersuchungen einbezogen, daß  $F_1$ -Pflanzen analysiert wurden, die aus den Kreuzungskombinationen Impala  $\times$  Wisa und Union  $\times$  Wisa hervorgegangen sind.

Für die Bestimmung des DNS-Gehalts der Kerne in reifen Pollenkörnern wurden Antheren zu Beginn der Anthese aus dem mittleren Bereich der Ähre gewählt. Bei der Ermittlung des DNS-Gehalts der Spermakerne wurde so vorgegangen, daß zunächst bei einer Stichprobe die DNS-Menge beider in einem reifen Pollenkorn befindlichen Spermakerne bestimmt wurde. Es ergab sich bei diesen Messungen, daß die DNS-Werte der beiden Spermakerne nur geringfügig voneinander abwichen. Auf Grund dieses Befunds wurde der DNS-Gehalt in den vorliegenden Untersuchungen nur bei jeweils einem der beiden Kerne bestimmt. Außerdem wurden bei den Sorten Amsel und Wisa DNS-Mengen von Metaphase-Kernen meristematischer Zellen aus Wurzelspitzen ermittelt. Die Pollenkörner und Wurzelspitzen wurden in 70%igem Isopropanol (iso-Propylalkohol, p.a., Merck, Darmstadt) fixiert und, falls nicht sofort weiterverarbeitet, bei  $+4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Messung der Kern-DNS erfolgte cytophotometrisch, nachdem das Material nach der von Feulgen und Rossenbeck (1924) beschriebenen Methode angefärbt worden war. Einzelheiten, in welcher Weise das Material nach der Fixierung im Rahmen der Färbeprozedur behandelt wurde, sind bereits bei Hesemann (1971) angegeben. Die quantitativen Bestimmungen wurden so-

fort anschließend an die Einbettung vorgenommen. Die Messungen wurden mit einem Universal-Mikro-Spektral-photometer (UMSP I) der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, bei einer Wellenlänge von 550 nm durchgeführt. Es wurde jeweils die Extinktion des Areal mit dem jeweiligen Kern und außerdem bei der gleichen Zelle ein entsprechend großes Areal ohne Kern gemessen. Aus der Differenz beider Einzelbestimmungen wurde der endgültige Extinktionswert ermittelt. Die Kombination der Geräte-Größen wurde so gewählt, daß die mäanderförmige Ab-suchung des Meßfeldes lückenlos erfolgen konnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit finden allein die Werte der Gesamttextinktion Berücksichtigung. Bei den cytophotometrischen Messungen wurden bei UMSP I und Schnellmeßzusatz XD 50 folgende technische Daten verwendet: Objektiv Ultrafluor  $100\times/1,25$  Glyzerin; UV-Projektiv  $100\times$ ; UV-Kondensator achromatisch 0,8; Lichtquelle: Xenonlampe XBO 450 W; Meßblende 5,0; Leuchtfeldblende 2; Zeilenhub  $0,5\ \mu$ ; Dämpfungsstufe 4; Schrittweite  $0,5\ \mu$ . Ein Schwellwert fand bei diesen Untersuchungen keine Berücksichtigung.

Untersuchungsergebnisse über methodische Fragestellungen, die sich beim Einsatz des Schnellmeßzusatzes ergeben, wie z. B. die Verwendung von Schwellwerten und/oder die computermäßige Auswertung auf Lochstreifen gespeicherter Einzel-Extinktionswerte, sollen in einer Veröffentlichungsreihe „Methodik cytochemischer Analysen bei pflanzlichen Objekten“ ausführlich dargestellt werden.

Tab. 1. Variation und Verteilung der DNS-Werte der vegetativen und Sperma-Kerne in reifen Pollenkörnern bei vier verschiedenen Gersten-Formen. Je Pollenkorn ist der DNS-Wert eines der beiden Spermakerne angegeben. Die DNS-Werte wurden in AE gemessen

Klassen der Extinktionswerte in AE	Objekt							
	Amsel		Wisa		Impala $\times$ Wisa		Union $\times$ Wisa	
	Sperma-Kern	veget. Kern	Sperma-Kern	veget. Kern	Sperma-Kern	veget. Kern	Sperma-Kern	veget. Kern
24,00—25,99		1		1				
26,00—27,99								
28,00—29,99		1						
30,00—31,99				1				
32,00—33,99	1			1				
34,00—35,99	3	1		1			1	1
36,00—37,99		2		1	1			
38,00—39,99	1		3	3	1	1		
40,00—41,99	1		2	1		2		
42,00—43,99	1	1	2		1	1	1	1
44,00—45,99		1	2	1		2	3	1
46,00—47,99	3	1	1	1	1		4	1
48,00—49,99	3	2	1	1	1		1	3
50,00—51,99				1	2		1	1
52,00—53,99	1		1		1	1		2
54,00—55,99	1	2	1					
56,00—57,99		3			1	1		
58,00—59,99		2						
60,00—61,99	2	1			1	1		
62,00—63,99		1						
64,00—65,99	1							
66,00—67,99								
68,00—69,99	1							
70,00—71,99						1		1
72,00—73,99								
74,00—75,99								
76,00—77,99								
78,00—79,99								
80,00—81,99								
82,00—83,99	1							
84,00—85,99		1						
86,00—87,99								

Tab. 2a. Mittelwerte und mittlere Abweichungen der DNS-Werte von vegetativen und Sperma-Kernen in reifen Pollenkörnern sowie von Metaphase-Kernen aus Wurzelspitzen bei vier verschiedenen Gerstenformen

Objekt	Zahl der analysierten Pollenkörner	DNS-Bestimmungen in AE				Zahl der analysierten Wurzelspitzen-Zellkerne	DNS-Bestimmungen in AE	
		Sperma-Kerne		vegetat. Kerne			Wurzelspitzen-Zellkerne	
		Mittelwert	mittlere Abweichung	Mittelwert	mittlere Abweichung		Mittelwert	mittlere Abweichung
Amsel	20	49,95	12,73	49,97	13,61	9	165,82	9,82
Wisa	13	44,57	4,91	39,28	7,40	12	138,49	6,81
Impala × Wisa	10	48,69	7,49	49,48	10,09	—	—	—
Union × Wisa	11	45,45	4,09	49,40	8,82	—	—	—

Tab. 2b. Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den in Tab. 2a aufgeführten Mittelwerten mit Hilfe von t-Tests

Objekt	Amsel Wurzelspitzen-Zellkerne	Amsel		Wisa		Impala × Wisa		Union × Wisa	
		Sperma-Kerne	vegetat. Kerne	Sperma-Kerne	vegetat. Kerne	Sperma-Kerne	vegetat. Kerne	Sperma-Kerne	vegetat. Kerne
Wisa Wurzelspitzen-Zellkerne	**	×	×	×	×	×	×	×	×
Amsel Sperma-Kerne			—	—	×	—	×	—	×
Amsel vegetat. Kerne				—	*	×	—	×	—
Wisa Sperma-Kerne					—	—	×	—	×
Wisa vegetat. Kerne						×	**	×	**
Impala × Wisa Sperma-Kerne							—	—	×
Impala × Wisa vegetat. Kerne								×	—
Union × Wisa Sperma-Kerne									×
Union × Wisa vegetat. Kerne									

Es bedeuten: — = nicht signifikant. — \* = signifikant bei 2%. — \*\* = signifikant bei 1%. — × = auf signifikanten Unterschied wurde nicht geprüft.

### Ergebnisse

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der DNS-Gehalt von Spermakernen und vegetativen Kernen reifer Pollenkörner der Gerstensorten Amsel und Wisa und von F<sub>1</sub>-Pflanzen der Kreuzungen Impala × Wisa und Union × Wisa cytophotometrisch bestimmt. Außerdem wurde der DNS-Gehalt von Metaphase-Kernen aus Wurzelspitzen von Amsel und Wisa ermittelt.

Tab. 1 enthält die DNS-Werte der Spermakerne und vegetativen Kerne. Die Mehrzahl der Werte liegt zwischen 35,00—70,00 AE. Nur in Ausnahmefällen werden diese Werte über- oder unterschritten. Spermakerne erreichen Extremwerte von 33,95 und 82,18 AE, vegetative Kerne von 25,06 und 84,04 AE. Die DNS-Werte der Spermakerne und vegetativen

Kerne von Amsel haben die größte Variationsbreite. Schließlich fällt auf, daß bei den vegetativen Kernen von Wisa als höchster Wert 50,98 AE auftritt, während entsprechend bei Amsel und den F<sub>1</sub>-Pflanzen Werte bis zu 84,04 AE gefunden werden.

Tab. 2a enthält die Mittelwerte sowie die mittleren Abweichungen der DNS-Gehalte von Spermakernen und vegetativen Kernen aus reifen Pollenkörnern und Metaphase-Kernen aus Wurzelspitzen-Zellen. Ein Vergleich der Mittelwerte der Wurzelspitzen-Zellen-Kerne und der entsprechenden mittleren Abweichungen zeigt, daß der Mittelwert bei Amsel entschieden größer als bei Wisa ist, während die mittlere Abweichung bei Amsel nur unwesentlich gegenüber derjenigen von Wisa erhöht ist. Beim Vergleich der Mittelwerte von Spermakernen und vegetativen Ker-

nen bei allen vier Gerstenformen ergibt sich, daß die Werte im Bereich von 44,57—49,97 AE liegen. Eine Ausnahme bildet der Mittelwert der vegetativen Kerne von Wisa. Er liegt mit 39,28 AE deutlich niedriger als alle übrigen Mittelwerte von Kernen in Pollenkörnern. Weiterhin kann man aus Tab. 2a ersehen, daß die Mittelwerte von Spermakernen und vegetativen Kernen von Amsel von besonders hohen Werten der mittleren Abweichung begleitet werden.

Wie man aus Tab. 2b erstens entnehmen kann, ergibt die statistische Prüfung, daß sich die Mittelwerte der Kerne von Amsel und Wisa signifikant unterscheiden. Zweitens kann man aus Tab. 2b ersehen, daß zwischen den Mittelwerten von Spermakernen keine signifikanten Unterschiede bestehen. Ebenso lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Spermakerne und vegetativen Kerne innerhalb der verschiedenen vier Gerstenformen nachweisen. Eine statistische Prüfung der Mittelwerte vegetativer Kerne zeigt, daß zwischen den Mittelwerten von Amsel sowie den  $F_1$ -Pflanzen keine signifikanten Unterschiede auftreten. Weiterhin geht aus Tab. 2b hervor, daß sich hingegen der Mittelwert der vegetativen Kerne von Wisa signifikant von den entsprechenden Mittelwerten von Amsel sowie der  $F_1$ -Pflanzen unterscheidet.

Die Bestimmungen des DNS-Gehalts von Metaphase-Kernen aus Wurzelspitzen von Amsel und Wisa wurden vorgenommen, um den DNS-Gehalt dieser Kerne auf dem 4C-Niveau zu ermitteln. Auf Grund dieser DNS-Werte des 4C-Niveaus läßt sich abschätzen, in welchem C-Niveau-Bereich sich die DNS-Werte der Spermakerne und vegetativen Kerne befinden (vgl. Tab. 1). Ein Vergleich der DNS-Werte zeigt, daß bei der überwiegenden Mehrzahl der Spermakerne und vegetativen Kerne die Phase der DNS-Replikation bereits eingesetzt hat, ohne jedoch auf dem Stadium der Pollenreife schon abgeschlossen zu sein. Die meisten Spermakerne und vegetativen Kerne von reifen Pollenkörnern befinden sich folglich auf einem Stadium, das über das C-Niveau hinausgeht, auf dem aber das 2C-Niveau noch nicht erreicht ist. Wie man aus der Häufigkeitsverteilung in Tab. 1 fernerhin entnehmen kann, liegt bei einigen wenigen vegetativen Kernen der DNS-Gehalt unterhalb des C-Niveaus. Es handelt sich um Ausnahmefälle, bei denen die Degeneration des vegetativen Kerns besonders frühzeitig eingesetzt hat.

In Tab. 3 sind beispielhaft die DNS-Werte von Spermakernen und vegetativen Kernen von Amsel und Wisa paarweise aufgeführt, da diese Zuordnung der entsprechenden beiden Werte aus der in Tab. 1 dargestellten Häufigkeitsverteilung nicht entnommen werden kann. In Tab. 3 wurde jeweils nur der DNS-Wert eines der beiden Spermakerne aufgeführt. Wie bereits in Abschnitt 2 erläutert wurde, ergab sich nämlich an Hand von Stichproben der Bestimmung des DNS-Gehalts beider Spermakerne, daß deren DNS-Werte nur geringfügig voneinander abweichen.

Die DNS-Replikation in beiden Spermakernen verläuft folglich synchron. Aus der Darstellung in Tab. 3 der paarweise zusammengehörenden Einzelwerte der Kerne kann man ersehen, daß der Verlauf der DNS-Replikation in Spermakernen und vegetativen Kernen hingegen in den meisten Fällen zeitlich nicht gleichgeschaltet ist. Mit großer Wahrscheinlichkeit besteht also keine positive Korrelation des Verlaufs der DNS-Replikation bei Spermakernen und vegetativen Kernen. Der Umfang des analysierten Materials erlaubt es jedoch nicht, statistisch gesicherte Aussagen über Korrelationen zwischen DNS-Werten von Spermakernen und vegetativen Kernen zu machen.

Tab. 3. DNS-Mittelwerte von vegetativen und Spermakernen in reifen Pollenkörnern von Amsel und Wisa

Lfd. Nr.	Objekt	DNS-Wert in AE der	
		Sperma-Kerne	vegetat. Kerne
1	Amsel	53,54	57,42
2		47,60	57,97
3		82,18	58,21
4		55,76	59,18
5		34,53	25,34
6		60,74	84,04
7		60,50	56,51
8		41,90	48,03
9		35,82	34,90
10		38,69	36,48
11		69,24	62,09
12		64,06	60,32
13		49,26	54,78
14		47,19	54,04
15		49,87	43,40
16		49,99	45,05
17		46,28	36,44
18		34,37	47,50
19		43,60	49,59
20		33,95	28,14
1	Wisa	54,27	38,86
2		47,14	39,22
3		41,66	37,09
4		43,02	30,06
5		52,00	45,44
6		45,61	25,06
7		39,51	40,18
8		42,03	50,98
9		49,46	48,75
10		38,90	39,10
11		41,88	46,57
12		39,27	33,41
13		44,69	35,90

### Diskussion

#### 1. Vergleich der bisher bei Pflanzenarten veröffentlichten Befunde über DNS-Replikation von vegetativen und generativen Kernen bzw. Spermakernen

In der Einleitung wurde bereits darauf hingewiesen, daß bisher nur wenige Untersuchungen über quantitative DNS-Bestimmungen der Kerne von reifen Pollenkörnern höherer Pflanzen bekannt geworden sind. Als erster hat Bryan (1951) derartige quantitative Analysen bei *Tradescantia* durchgeführt. Aus

technischen Gründen konnte er nur den DNS-Gehalt des vegetativen, nicht aber des generativen Kerns ermitteln. Der Autor stellte einen Anstieg des DNS-Gehalts über das C-Niveau hinaus im reifen Pollenkorn fest. Derartige quantitative DNS-Bestimmungen wurden in der Folgezeit von Moses and Taylor (1955) am gleichen Objekt fortgeführt. Nach den Befunden der letzteren Autoren ist im reifen Pollenkorn die DNS-Replikation im generativen Kern abgeschlossen, das 2C-Niveau also erreicht, während für den vegetativen Kern DNS-Werte ermittelt wurden, die oberhalb des C-Niveaus, aber unterhalb des 2C-Niveaus liegen. Im Gegensatz zu den soeben genannten Befunden bei *Tradescantia* stehen die beim gleichen Objekt gewonnenen Ergebnisse von Woodard (1958). Dieser Autor fand bei seinen quantitativen Untersuchungen, daß beim generativen Kern zu Beginn der Anthese die DNS-Replikation beendet ist, der vegetative Kern jedoch zu diesem Zeitpunkt der Pollenkornentwicklung auf dem C-Niveau verharret. Auf Grund begonnener eigener Untersuchungen über den DNS- und Histon-Gehalt vegetativer und generativer Kerne sowie Spermakerne im Pollenkorn und Pollenschlauch von *Tradescantia* konnten die Ergebnisse von Moses and Taylor (1955) bestätigt werden (Hesemann, unveröffentlicht). Von D'Amato et al. (1965) wurden Befunde über den DNS-Gehalt der Kerne in reifen Pollenkörnern von *Nicotiana tabacum* veröffentlicht. Diese Autorengruppe gibt an, daß in Pollenkörnern zum Zeitpunkt der Ausschüttung aus der Anthere in beiden Kernen das 2C-Niveau erreicht sei. Bei kritischer Betrachtung dieser DNS-Mittelwerte generativer und vegetativer Kerne kommen jedoch Zweifel auf, ob tatsächlich die Mehrzahl der Kerne zum Zeitpunkt der Pollenreife die DNS-Replikation abgeschlossen hat. Erstens ist die Beurteilung der Mittelwerte dadurch erschwert, daß die entsprechenden mittleren Abweichungen nicht angegeben wurden. Zweitens fällt an diesen Daten vor allem auf, daß auf Grund der Bestimmungen des DNS-Gehalts von Kernen einkerniger Pollenkörner, die unmittelbar vor der ersten Pollenkornmitose standen und bei deren Kernen mit großer Wahrscheinlichkeit die DNS-Replikationsphase bereits beendet war, als DNS-Mittelwert 27,87 AE gefunden wurde, der Mittelwert generativer oder vegetativer Kerne aus reifen Pollenkörnern jedoch nur 22,34 bzw. 22,80 AE beträgt. Auf Grund dieser Befunde erscheint die Aussage dieser Autorengruppe nicht gerechtfertigt, in der Veröffentlichung anzugeben, daß zum Zeitpunkt der Pollenreife bei *Nicotiana* generative und vegetative Kerne die DNS-Replikation bereits vollzogen haben. Als weiteres Objekt für derartige quantitative Analysen des DNS-Gehalts der Kerne in reifen Pollenkörnern wurde *Lilium candidum* herangezogen. Die Untersuchungen von Jalouzot (1969) ergaben, daß in reifen Pollenkörnern bei den generativen Kernen das 2C-Niveau erreicht, bei den vegetativen Kernen dagegen das C-Niveau nicht überschritten wird. Hese-

mann (1971) führte derartige quantitative Bestimmungen bei vier *Petunia-hybrida*-Mutanten durch. Die DNS-Bestimmungen bei generativen Kernen führten zu dem Ergebnis, daß die DNS-Replikation in den reifen Pollenkörnern noch nicht abgeschlossen ist. Besonders aufschlußreich sind die Befunde bei vegetativen Kernen, weil mit *Petunia* zum ersten Mal ein Objekt quantitativ analysiert wurde, bei dem reife Pollenkörner mit teilweise oder völlig degeneriertem vegetativem Kern auftreten. Bei diesem Objekt wurden bezüglich der Ausprägung des vegetativen Kerns zu Beginn der Anthese vier Typen von Pollenkörnern gefunden:

a. DNS-Gehalt entspricht C-Niveau; b. DNS-Gehalt liegt unterhalb C-Niveau, vegetativer Kern beginnt zu degenerieren; c. DNS-Gehalt mit Feulgenfärbung nicht mehr nachweisbar, vegetativer Kern ist vollständig degeneriert; d. DNS-Gehalt über das C-Niveau angehoben, eine partielle DNS-Replikation wird angenommen.

Auf diesem Gebiet quantitativer DNS-Bestimmungen von Kernen in reifen Pollenkörnern wurde als Vertreter zum Zeitpunkt der Anthese dreikernigen Pollens bisher nur Gerste untersucht. D'Amato et al. (1965) kommen auf Grund ihrer Befunde zu dem Schluß, daß in reifen Pollenkörnern bei Spermakernen und vegetativen Kernen die DNS-Replikation abgeschlossen, das 2C-Niveau folglich erreicht ist. Bei einer kritischen Analyse dieser Daten der zuletzt genannten Forscher treten jedoch einige Unklarheiten zutage, so daß Zweifel entstehen, ob die Befunde die von den Autoren gezogenen Schlüsse ohne Einschränkung zulassen. Erstens sind die Angaben über die Mittelwerte des DNS-Gehalts von Spermakernen und vegetativen Kernen insofern unvollständig, als die entsprechenden mittleren Abweichungen nicht angegeben sind und deshalb die Streuungen der jeweiligen Mittelwerte nicht beurteilt werden können. Zweitens erscheinen die Ausführungen der Autoren deshalb anfechtbar, weil sie angeben, daß man keine unmittelbaren Vergleiche zwischen Meßreihen ziehen könne, die aus quantitativen DNS-Analysen von Kernen stammen, die sich auf verschiedenen Objektträgern befanden. Ein Vergleich der Meßdaten von Kernen, die von verschiedenen Objektträgern stammen, ist bei diesen Untersuchungen nämlich unumgänglich. Nur durch einen derartigen Vergleich der DNS-Meßwerte von einkernigen Pollenkörnern, deren Kerne sich kurz vor der ersten Pollenkornmitose befinden, mit DNS-Meßdaten von Kernen aus zwei- und dreikernigen Pollenkörnern kann auf das C-Niveau letzterer Kerne geschlossen werden und wurde entgegen ihren eigenen Ausführungen auch von den oben genannten Autoren geschlossen. Stellt man entsprechende vergleichende Betrachtungen bei den Daten der Tabelle II aus der Veröffentlichung von D'Amato et al. (1965) an, so kann man feststellen, daß die Mittelwerte von Kernen, die sich zum Zeitpunkt der Teilung auf dem 2C-Niveau befinden, mit

28,00 bzw. 30,50 AE deutlich niedriger liegen als die Mittelwerte von vegetativen bzw. Sperma-Kernen mit 32,30 bzw. 32,50 AE. Ein exakter Vergleich dieser Mittelwerte ist für den Leser der Veröffentlichung dieser Autorengruppe nicht möglich, weil die jeweiligen mittleren Abweichungen nicht bekannt sind. Gerade weil keine exakte vergleichende Überprüfung der Mittelwerte vorgenommen werden kann, verwundert es um so mehr, wenn die Autoren für diese auffällige Diskrepanz, die sich beim Vergleich der DNS-Mittelwerte ergibt, weder eine Erklärung geben noch diese Diskrepanz bei den Schlußfolgerungen, die aus den Untersuchungen gezogen wurden, berücksichtigen. Vielmehr halten die Autoren auf Grund dieser DNS-Werte den Beweis für erbracht, daß die vegetativen und Sperma-Kerne zum Zeitpunkt der Anthese das 2C-Niveau erreicht haben. Wie in dem Abschnitt 'Ergebnisse' ausführlich dargestellt wurde, haben die hier vorliegenden eigenen Untersuchungen das Ergebnis erbracht, daß zum Zeitpunkt der Pollenreife sowohl bei den Spermakernen als auch bei den vegetativen Kernen die DNS-Replikation keineswegs abgeschlossen, sondern noch in vollem Gange ist. Diese Befunde sind nicht in Einklang mit den Ergebnissen von D'Amato et al. (1965) zu bringen. Möglicherweise lassen sich die unterschiedlichen Befunde außer auf die bereits oben genannten Gründe auf spezifische Eigenschaften einzelner Sorten bezüglich des Verlaufs der DNS-Replikation der Kerne zurückführen. Eine schlüssige Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse kann zur Zeit noch nicht gegeben werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, wengleich bisher nur eine sehr begrenzte Zahl von pflanzlichen Objekten untersucht wurde und bei einigen der von verschiedenen Autoren näher analysierten Pflanzenarten wie *Tradescantia* oder *Hordeum* unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden, daß die wenigen bisherigen Befunde der verschiedenen Autoren es bereits ermöglichen, eine verbindliche Aussage über den Ablauf der DNS-Replikation von vegetativen und generativen Kernen bzw. Spermakernen in Pollenkörnern höherer Pflanzen machen zu können. Es wurde bisher kein Objekt analysiert, bei dessen generativen Kernen bzw. Spermakernen die DNS-Replikation zum Zeitpunkt der Pollenreife nicht schon eingesetzt hat. Das Ausmaß dieser DNS-Replikation im reifen Pollenkorn ist jedoch je nach Objekt unterschiedlich. Auf diesem Entwicklungsstadium der Pollenkörner kann die DNS-Replikation bei den generativen Kernen noch in vollem Gange sein oder bei anderen Objekten bereits ihren Abschluß gefunden haben. Bei den vegetativen Kernen findet man bezüglich des Ausmaßes der DNS-Replikation bei Pollenreife je nach Objekt mannigfaltige Varianten. Erstens kann der vegetative Kern zu diesem Zeitpunkt der Pollenkornentwicklung bereits völlig oder teilweise degeneriert sein, ohne zuvor eine DNS-Replikation erfahren zu haben. Die zweite Möglich-

keit ist in der Weise verwirklicht, daß der vegetative Kern auf dem C-Niveau verharrt, jedoch zu diesem Zeitpunkt noch kein Abbau stattfindet. Weiterhin wurden Pflanzenarten analysiert, deren vegetative Kerne bei Pollenreife DNS-Werte aufwiesen, die über das C-Niveau hinausgingen, ohne das 2C-Niveau erreicht zu haben. Schließlich liegen Befunde vor, denen zufolge der vegetative Kern die DNS-Replikation im reifen Pollenkorn beendet hat.

## 2. Prüfung auf Unterschiede bezüglich der DNS-Replikation der Kerne in reifen zwei- und dreikernigen Pollenkörnern

Zunächst soll kurz erläutert werden, in welchem phylogenetischen Zusammenhang Pflanzenarten mit zwei- bzw. dreikernigem Pollenkorn-Typ stehen. Zweikernige Formen gelten als phylogenetisch primitiv. Mehrfach im Verlauf der Evolution der Angiospermen sind bei voneinander unabhängigen Ereignissen dreikernige Pollenkorn-Typen entstanden. Dieser letztere wird als stammesgeschichtlich abgeleiteter Typ angesehen. Es sind keine zweikernigen Formen bekannt, die sich aus dreikernigen entwickelt haben. Bisher sind keine Pflanzenarten gefunden worden, die zugleich zwei- und dreikernige Pollenkörner produzieren (Brewbaker, 1967; Cronquist, 1970).

Außer der Frage der phylogenetischen Beziehungen zwischen zwei- und dreikernigen Pollenkorn-Typen ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, in welcher Weise sich die primitiven zweikernigen von den abgeleiteten dreikernigen Typen unterscheiden. Die Zahl der Kerne im reifen Pollenkorn ist, um sich der Ausdrucksweise von Cronquist (1970) zu bedienen, „with a syndrome of physiological features“ verbunden. Im allgemeinen hat zweikerniger Pollen eine lange Lagerfähigkeit, er kann in vitro auch in flüssigen Nährmedien leicht zum Keimen gebracht werden; Selbstinkompatibilitätsreaktionen treten erst nach Keimung und Pollenschlauchbildung im Griffelgewebe auf. Hingegen weist dreikerniger Pollen eine kurze Lagerfähigkeit auf, er kann in vitro nur schwer, auf flüssigen Nährmedien meist gar nicht zum Auskeimen gebracht werden, bei Selbstinkompatibilitätsreaktionen wird bereits auf der Narbe das Auskeimen des Pollenkorns verhindert. Um eine Beurteilung dieser physiologischen Unterschiede zwischen beiden Pollenkorn-Typen vornehmen zu können, erscheint es notwendig, die Kenntnisse über Pollenkornentwicklung und Pollenschlauchbildung kurz zu skizzieren. Es besteht kein Zweifel darüber, daß die vegetative Zelle eine bedeutende Rolle bei der Pollenkeimung und Pollenschlauchbildung spielt (vgl. z. B. Hesemann, 1971). An Hand von cytologischen, cyto- und biochemischen sowie elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Entwicklung des Pollens konnte bei zweikernigen Typen gezeigt werden, daß im Anschluß an die erste Pollenkornmitose im weiteren Verlauf der Pollenreifung die

vegetative im Gegensatz zur generativen Zelle eine starke physiologische Aktivität entwickelt (vgl. z. B. Jalouzot, 1969; Mephram and Lane, 1970). Der Autor der vorliegenden Untersuchungen ist der Auffassung, daß diese bisher nur bei einigen speziellen Objekten gewonnenen Befunde zweikerniger Typen mit großer Wahrscheinlichkeit allgemein bei der Pollenkornentwicklung angetroffen werden, sich folglich auch bei zukünftigen Untersuchungen von dreikernigen Typen ergeben werden. Wie weiter oben ausgeführt wurde, ist im Verlauf der Evolution der Angiospermen der Übergang von zwei- zu dreikernigen Pollenkorn-Typen mehrfach erfolgt. Man kann deshalb die Ansicht vertreten, daß diese abgeleiteten Typen mit ihrem ‚Syndrom physiologischer Eigenschaften‘ sich evolutionistisch nur entwickeln konnten, weil sie Selektionsvorteile mit sich brachten. Wenn man diesen Gesichtspunkt eines Selektionsvorteils dreikerniger Typen in die Überlegungen einbezieht, kann man den Schluß ziehen, daß bei den abgeleiteten Formen eine starke physiologische Spezialisierung, eine besonders enge Anpassung des auskeimbereiten Pollens an die Eigenschaften des Empfängers eingetreten ist. Bei in-vitro-Versuchen gelingt es nur dann, die Pollenkörner zu optimalen Reaktionen beim Auskeimen und bei der Pollenschlauchbildung zu bringen, wenn die sehr speziellen physiologischen Bedingungen, wie sie vom Empfänger vorgegeben werden, geschaffen werden können. Mit dieser Eigenschaft einer hohen Spezifität der dreikernigen Pollenkörner, nur bei Auftreffen auf den richtigen Empfänger auszukeimen und einen Pollenschlauch zu bilden, ist die hohe Empfindlichkeit eines derartigen hochspezialisierten und physiologisch komplizierten Systems gegenüber Einflüssen der Umwelt verbunden. Diese hohe Empfindlichkeit äußert sich z. B. in der schlechten Lagerfähigkeit dreikerniger Pollenkörner. Die hohe Spezialisierung dreikerniger Typen auf ganz bestimmte physiologische Bedingungen wird bei Wasserpflanzen besonders deutlich, deren Blüten unter Wasser zur Entfaltung kommen. Derartige Arten gehören nahezu alle dem dreikernigen Typ an. Bei diesen Wasserpflanzen ist ein Selektionsvorteil besonders klar zu erkennen, wenn die entsprechenden Pollenkörner in wäßrigen Medien nicht auszukeimen vermögen. Als weiteren Selektionsgewinn kann man bei dreikernigen Typen die Tatsache ansehen, daß die Teilung des generativen Kerns nicht erst im Pollenschlauch, sondern bereits im Pollenkorn stattfindet. Durch die Vorverlegung dieser Teilung wird das dreikernige Pollenkorn, wenn es unter den spezifischen, physiologisch optimalen Bedingungen des Empfängers auskeimt und einen Pollenschlauch bildet, frühzeitiger als der zweikernige Typ in die Lage versetzt, den Vorgang der Befruchtung einleiten zu können.

Wie im vorangegangenen Teil dieses Abschnitts ausführlich dargestellt wurde, ist die Bildung dreikerniger Pollenkorn-Typen aus zweikernigen im Verlauf der Evolution polyphyletisch erfolgt. Die zwei-

kernigen unterscheiden sich von den dreikernigen Pollenkorn-Formen durch ein Syndrom physiologischer Eigenschaften und den Zeitpunkt der Teilung des generativen Kerns in die beiden Spermkerne im Verlauf der Pollenentwicklung. Die Eigenschaften, in welchen die beiden Pollenkorn-Typen des weiteren voneinander abweichen, betreffen insbesondere Pollenkeimung, Pollenschlauchwachstum und Selbstinkompatibilitätsreaktionen. Es besteht jedoch kein hinreichender Grund dafür, daß bei der wiederholten Herausbildung der dreikernigen Form innerhalb der Evolution der Angiospermen auch der Ablauf der DNS-Replikation der Kerne dieses Typs abgeändert sein muß. Vielmehr kann man erwarten, daß am gleichen Verlauf dieses Prozesses bei beiden Typen festgehalten wird, denn die DNS-Replikation der Kerne ist nicht unmittelbar mit den physiologischen Vorgängen verknüpft, die für Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum verantwortlich sind.

Ein Vergleich der auf Grund der zuvor angestellten Überlegungen theoretisch zu erwartenden Ergebnisse mit den tatsächlichen Befunden ergibt, daß der Verlauf der DNS-Replikation für beide Pollenkorn-Typen den erwarteten Vorstellungen entspricht. Die Befunde über den Ablauf der DNS-Replikation bei generativen Kernen bzw. Spermkernen zeigen, daß bei beiden Pollenkorn-Typen Formen gefunden wurden, deren Kerne zum Zeitpunkt der Pollenreife eine partielle oder bereits vollständige DNS-Replikation vollzogen haben. Allerdings muß in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, daß die Zellen, welche die generativen Kerne bzw. die Spermkerne enthalten, bei den Vorgängen der Pollenkeimung und des Pollenschlauchwachstums nur eine untergeordnete Rolle spielen. Eine Schlüsselstellung bei den Vorgängen der Pollenentwicklung nehmen dagegen die vegetativen Zellen ein. Wenn man die bisher von verschiedener Seite veröffentlichten Ergebnisse über die DNS-Replikation vegetativer Kerne bei Gerste als Vertreter dreikernigen Pollens mit den Befunden von Pflanzenarten mit zweikernigem Pollen vergleicht, zeigt sich, daß bei allen untersuchten Pflanzenarten, gleichgültig, ob zwei- oder dreikernig, zum Zeitpunkt der Pollenreife die DNS-Replikation der vegetativen Kerne eingesetzt hat. Sofern die Ergebnisse von D'Amato et al. (1965) nicht einer Korrektur unterzogen werden müssen (vgl. Abschnitt 1), ergibt sich fernerhin, daß bereits Pflanzenarten sowohl mit zwei- als auch mit dreikernigem Pollen analysiert wurden, deren vegetative Kerne bei Pollenreife die DNS-Replikation abgeschlossen haben. Pflanzenarten mit Pollenkörnern, deren vegetative Kerne bei Pollenreife partiell oder vollständig degeneriert sind, wurden bei zweikernigen Formen qualitativ und quantitativ, bei dreikernigen Formen dagegen bisher nur qualitativ analysiert. Nach den Befunden von Brewbaker (1967) fanden sich unter 210 dreikernigen Arten zu 34,3% Formen, bei denen zum Zeitpunkt der Pollenreife der vegetative Kern vollständig de-

generiert ist. Brewbaker führte die cytologischen Untersuchungen nach Anfärbung der Kerne mit Karminessigsäure durch. Es soll dahingestellt bleiben, ob bei dieser Färbetechnik in allen Fällen zuverlässige Angaben über das Vorhandensein von vegetativen Kernen zu erwarten sind, wenn man bedenkt, daß bei einer Mit-Anfärbung des Plasmas schwach gefärbte vegetative Kerne nur schwer zu erkennen sind. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, bei dreikernigen Pflanzenarten, bei denen sich der vegetative Kern in der Degenerationsphase befindet, den DNS-Gehalt dieser Kerne zu bestimmen. Soweit auf Grund der geringen Zahl von analysierten Pflanzenarten bereits eine verbindliche Aussage möglich ist, scheinen im Ablauf der DNS-Replikation der Kerne bei beiden Pollenkorn-Typen bis zur Pollenreife keine wesentlichen Unterschiede zu bestehen.

### 3. Erörterung der Beziehungen zwischen dem Verlauf der DNS-Replikation bei vegetativen und generativen Kernen bzw. Spermakernen während der Mikrosporangese und der Erzeugung von haploiden Pflanzen aus Pollenkörnern

In jüngster Zeit werden Untersuchungen über die Bildung haploider Pflanzen aus Pollenkörnern in immer größerer Zahl durchgeführt (Kameya and Hinata, 1970; Nitsch, Nitsch et Hamon, 1969; Nitsch, Nitsch and Pereau-Leroy, 1969; Tanaka and Nakata, 1969). Die Erzeugung von haploiden Pflanzen in großem Maßstab würde insbesondere für die Pflanzenzüchtung bei der frühzeitigen Selektion von Mutanten und der Herstellung homozygoter Linien von großer Bedeutung sein. Eine erfolgreiche Anzucht haploider Pflanzen aus Pollenkörnern scheint nach den bisherigen Befunden nur möglich zu sein, wenn sich die Pollenkörner in einem ganz bestimmten Stadium ihrer Entwicklung befinden (Nitsch, 1972; Sunderland and Wicks, 1971). Im folgenden sollen die bisher erzielten Ergebnisse über die Erzeugung haploider Pflanzen aus Pollenkörnern exemplarisch an einem der am besten analysierten Objekte, dem Tabak, erläutert werden. Bis auf wenige Ausnahmen scheinen die Befunde der bisher durchgeführten, noch sehr lückenhaften Untersuchungen über die Entstehung haploider Pflanzen bei anderen Pflanzenarten wie z. B. *Datura innoxia* nicht von denjenigen, die beim Tabak gewonnen wurden, abzuweichen. Wenn man die Befunde von Kameya and Hinata (1970) als Ausnahmefall betrachtet, daß bei *Brassica oleracea* kleine Kalli aus nahezu reifen Pollenkörnern erzielt werden konnten, so wurden bei allen übrigen Objekten haploide Pflanzen nur aus Pollenkörnern erhalten, die sich noch auf einer frühen Entwicklungsstufe befanden. Die für die Produktion von haploiden Pflanzen geeigneten Entwicklungsstadien reichen von Pollenkörnern, bei denen die erste Pollenkornmitose noch nicht abgelaufen ist, bis zu solchen, die kurz zuvor die Teilung in zwei Zellen erfahren

haben. Wie man den cytologischen Untersuchungen von Sunderland and Wicks (1971) bei Tabak entnehmen kann, bestehen verschiedene Möglichkeiten, auf welche Zellen des Pollenkorns nach dessen Entwicklungszustand die haploiden Individuen zurückzuführen sind. Erstens können die haploiden Pflanzen aus einkernigen Pollenkörnern entstehen, deren Kerne die erste Pollenkornmitose noch nicht vollzogen haben. Zweitens kann der Fall beobachtet werden, daß die Pollenkornmitose keinen normalen Verlauf nimmt, sondern zu zwei gleichwertigen Tochterzellen führt, die die Ausgangszellen für die haploide Pflanze darstellen. Die dritte Möglichkeit für die Entstehung haploider Pflanzen aus Pollenkörnern besteht darin, daß die Pollenkornmitose normal verläuft, generative und vegetative Zellen gebildet werden und sich die haploide Pflanze von beiden oder einer der beiden Zellen herleitet. Weitaus am häufigsten wurde bei Tabak der Fall analysiert, daß die Heranbildung einer haploiden Pflanze von einer teilungsfähigen vegetativen Zelle ausgeht.

Die Befunde über die Entstehung haploider Pflanzen aus Pollenkörnern, die sich auf ganz bestimmten, frühen Stadien der Entwicklung befinden, lassen nur den Schluß zu, daß in diesen Fällen vom normalen Verlauf der Pollenkornbildung deutlich abgewichen wird. Wie im Abschnitt 1 des Diskussionsteils ausführlich dargestellt wurde, verläuft die Pollenkornentwicklung normalerweise so, daß in reifen Pollenkörnern bei gewissen Pflanzenarten die DNS-Replikation der generativen Kerne bzw. Spermakerne abgeschlossen, bei anderen Arten dagegen noch in vollem Gange ist. Je nach Objekt können die vegetativen Kerne zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung des Pollenkorns auf dem C-Niveau verharren, eine partielle DNS-Replikation vorgenommen oder bereits die DNS-Replikation abgeschlossen haben. Im Mittelpunkt der weiteren Überlegungen soll der Fall stehen, daß die haploiden Pflanzen aus vegetativen Zellen entstehen. Diese Entstehungsmöglichkeit haploider Pflanzen ist beim Tabak erwiesenermaßen am häufigsten verwirklicht. Man kann annehmen, daß dieser Fall auch bei anderen Objekten besonders häufig vertreten ist. Wie bereits oben ausführlich dargestellt, wurden beim Tabak quantitative DNS-Bestimmungen bei vegetativen Kernen im Verlauf der normalen Pollenkornentwicklung vorgenommen. Nach den Befunden von D'Amato et al. (1965) ist die DNS-Replikation bei den vegetativen Kernen zum Zeitpunkt der Pollenreife abgeschlossen. Ob die Befunde der zuvor genannten Autoren die eindeutige Aussage zulassen, daß die Mehrzahl der vegetativen Kerne zu diesem Zeitpunkt der Pollenentwicklung tatsächlich das 2C-Niveau schon erreicht hat, konnte allerdings noch nicht abgeklärt werden (vgl. Abschnitt 1). Im Gegensatz zum normalen Verlauf der Pollenkornbildung muß bei den vegetativen Zellen, die die Ausgangszellen für die Bildung haploider Pflanzen darstellen, die DNS-Replikation in den Ker-

nen sehr frühzeitig begonnen haben und bereits auf diesem frühen Entwicklungsstadium des Pollenkorns abgeschlossen sein. Sunderland and Wicks (1971) konnten im cytologischen Bild Unterschiede zwischen vegetativen Zellen, die eine normale Entwicklung bei der Pollenkornbildung durchlaufen, und solchen, die die Ausgangszellen für haploide Pflanzen darstellen, beobachten. Die Untersuchungen auf diesem Gebiet sind aber noch ganz in den Anfängen begriffen. Konkrete Aussagen darüber, welche Prozesse dieser Umwandlung der Funktion vegetativer Zellen einschließlich der frühzeitigen, vollständigen DNS-Replikation zugrunde liegen, lassen sich im gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht geben.

Besonderes Interesse verdient die Frage, ob Pflanzenarten, deren vegetative Kerne bei normaler Pollenkornentwicklung zum Zeitpunkt der Pollenreife partiell oder bereits vollständig degeneriert sind, im gleichen Umfange aus vegetativen Zellen haploide Pflanzen zu bilden vermögen wie solche Arten, deren vegetative Kerne bei Pollenreife auf dem C-Niveau verharren oder aber eine partielle oder vollständige DNS-Replikation erfahren haben. Entsprechende Untersuchungen bei verschiedenen Pflanzenarten wurden begonnen.

Es wird die Ansicht vertreten, daß die in diesem Abschnitt erörterten Befunde zum Problem der Erzeugung haploider Pflanzen aus Pollenkörnern klar für die Annahme sprechen, daß die Pollenkornentwicklung nur während eines kurzen, sehr frühen Abschnitts so beeinflußt werden kann, daß sie einen ganz anderen Verlauf als im Normalfall nimmt. Bestimmte Zellen des Pollenkorns vermögen sich dann wiederholt zu teilen. Die Teilungsfähigkeit ist bei diesen Zellen daran geknüpft, daß die DNS-Replikation der Kerne bereits auf diesem Frühstadium der Pollenkornbildung abgeschlossen ist. Wenn die normale Pollenkornentwicklung diese kurze, einflußbare Phase überschritten hat, scheint es nach dem heutigen Stand der Kenntnisse nicht oder nur in Ausnahmefällen möglich zu sein, in den normalen Ablauf dieses Prozesses noch eingreifen zu können.

### Zusammenfassung

In reifen Pollenkörnern der beiden Sommergerstensorten Amsel und Wisa sowie der  $F_1$ -Pflanzen, die aus den Sorten-Kreuzungen Impala  $\times$  Wisa und Union  $\times$  Wisa hervorgegangen sind, wurde die DNS-Menge der Kerne cytophotometrisch bestimmt. Die Messungen wurden zugleich bei Spermakernen und vegetativen Kernen eines Pollenkorns vorgenommen. Außerdem wurde der DNS-Gehalt von Kernen von Wurzelspitzen-Zellen der Sorten Amsel und Wisa ermittelt.

Amsel und Wisa unterscheiden sich signifikant im DNS-Gehalt der Kerne von Wurzelspitzen-Zellen.

Die Befunde der Messungen des DNS-Gehalts von vegetativen und Sperma-Kernen bei vier Gerstenformen zeigen, daß zum Zeitpunkt der Anthese die

DNS-Replikationsphase bei vegetativen und Spermakernen noch nicht abgeschlossen ist. Der DNS-Gehalt vegetativer Kerne von Wisa ist signifikant niedriger als die entsprechenden Werte der übrigen drei Gerstenformen. Der Verlauf der DNS-Replikation erfolgt bei beiden Spermakernen synchron. Hingegen verläuft die DNS-Replikation bei vegetativen und Sperma-Kernen mit großer Wahrscheinlichkeit nicht gleichsinnig.

Im Diskussionsteil wird erstens erläutert, daß bei allen bisher analysierten Pflanzenarten des zwei- oder dreikernigen Pollenkorn-Typs zum Zeitpunkt der Pollenreife die DNS-Replikation der generativen bzw. Sperma-Kerne eingesetzt hat, aber je nach Pflanzenart noch nicht beendet sein muß. Zum gleichen Zeitpunkt der Pollenkornentwicklung kann der vegetative Kern in Abhängigkeit von der Pflanzenart auf dem C-Niveau verharren, eine teilweise oder bereits abgeschlossene DNS-Replikation erfahren haben oder schon teilweise oder ganz degeneriert sein, ohne zuvor eine DNS-Replikation vollzogen zu haben. Zweitens wird in diesem Abschnitt diskutiert, daß mit großer Wahrscheinlichkeit im Ablauf der DNS-Replikation zwischen zwei- und dreikernigen Pollenkorn-Typen keine Unterschiede bestehen. Drittens wird die Hypothese vertreten, daß nur auf einem sehr frühen Stadium die normale Pollenkornentwicklung einschließlich des Ablaufs der DNS-Replikation insbesondere des vegetativen Kerns so abgewandelt werden kann, daß aus Pollenkörnern haploide Pflanzen erzeugt werden können.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Mechelke für die Anregung zu diesen Untersuchungen sowie für die Unterstützung und die kritischen Diskussionen während ihres Verlaufs und Fräulein H. Nagel für zuverlässige technische Hilfe.

### Literatur

1. Brewbaker, J. L.: The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the Angiosperms. *Amer. J. Bot.* **54**, 1069–1083 (1967).
2. Bryan, J. H. D.: DNA-protein relations during microsporogenesis of *Tradescantia*. *Chromosoma* **4**, 369–392 (1951).
3. Cronquist, A.: The evolution and classification of flowering plants. London: Thomas Nelson 1970.
4. D'Amato, F., Devreux, M., Scarascia Mugnozza, G. T.: The DNA content of the nuclei of the pollen grains in tobacco and barley. *Caryologia* **18**, 377 bis 381 (1965).
5. Feulgen, R., Rossenbeck, H.: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z. Physiol. Chem.* **135**, 203–248 (1924).
6. Hesemann, C. U.: Untersuchungen zur Pollenentwicklung und Pollenschlauchbildung bei höheren Pflanzen. I. Quantitative Bestimmungen des DNS-Gehalts generativer und vegetativer Kerne in Pollenkörnern und Pollenschläuchen von *Petunia-hybrida*-Mutanten. *Theoret. Appl. Genetics* **41**, 338–351 (1971).
7. Jalouzot, R.: Differentiation nucléaire et cytoplasmique du grain de pollen de *Lilium candidum*. *Exptl. Cell Res.* **55**, 1–8 (1969).
8. Kameya, T., Hinata, K.: Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. *Jap. J. Breed.* **20**, 82–87 (1970).
9. Mephram, R. H., Lane,

- G. R.: Observations on the fine structure of developing microspores of *Tradescantia bracteata*. *Protoplasma* **70**, 1–20 (1970). — 10. Moses, M. J., Taylor, J. H.: Deoxy-pentose nucleic acid synthesis in *Tradescantia*. *Exptl. Cell Res.* **9**, 474–488 (1955). — 11. Nitsch, J. P.: Haploid Plants from Pollen. *Z. Pflanzenzüchtg.* **67**, 3–18 (1972). — 12. Nitsch, J. P., Nitsch, C.: Haploid plants from pollen grains. *Science* **163**, 85–87 (1969). — 13. Nitsch, J. P., Nitsch, C.: Embryogénèse expérimentale. I. Production d'embryons à partir de grains de pollen. *Bull. Soc. bot. Fr.* **117**, 19–29 (1970). — 14. Nitsch, J. P., Nitsch, C., Hamon, S.: Production de *Nicotiana* diploïdes à partir de calcs haploïdes cultivés in vitro. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **269 (D)**, 1275–1278 (1969). — 15. Nitsch, J. P., Nitsch, C., Péreau-Leroy, P.: Obtention de mutants à partir de *Nicotiana* haploïdes issues de grains de pollen. *C.R. Acad. Sci., Paris* **269 (D)**, 1650–1652 (1969). — 16. Sunderland, N., Wicks, F. M.: Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*. *J. Exptl. Bot.* **22**, 213–226 (1971). — 17. Tanaka, M., Nakata, K.: Tobacco plants obtained by anther culture and the experiment to get diploid seeds from haploids. *Jap. J. Genet.* **44**, 47–54 (1969). — 18. Woodard, J. W.: Intracellular amounts of nucleic acids and protein during pollen grain growth in *Tradescantia*. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* **4**, 383–390 (1958).

Eingegangen am 23. Dezember 1971

Angenommen durch F. Mechelke

Dr. C. U. Hesemann  
Lehrstuhl für Allgemeine Genetik  
der Universität Hohenheim  
Kirchnerstr. 7  
D-7 Stuttgart 70 (Germany/BRD)