

Die Bestimmung der Frequenz von Punktmutationen bei Pflanzen

Von HORST GAUL

Aus dem Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Erwin-Baur-Institut, Köln-Vogelsang

(Z. Naturforsch. 12 b, 557—559 [1957]; eingegangen am 24. April 1957)

Für die Bestimmung der Frequenz von Punktmutationen werden meist die Bezugssysteme (1) „Anzahl Mutationen je 100 vorhandener X_1 -Ähren-Nachkommenschaften“ oder (2) „Anzahl Mutationen je 100 vorhandener X_1 -Pflanzen-Nachkommenschaften“ benutzt. Werden mit Hilfe dieser Bezugssysteme die Mutations-Häufigkeiten von Versuchsgliedern unterschiedlicher Strahlensterilität miteinander verglichen, so führt dies zu beträchtlichen Verzerrungen. Mit zunehmender Sterilität wird aus Gründen des reinen Zufalls die Mutations-Frequenz in zunehmendem Maße unterschätzt, da die Wahrscheinlichkeit für das Herausspalten einer Mutante geringer wird. Das vorgeschlagene Bezugssystem (3) „Anzahl Mutanten je 100 X_2 -Pflanzen“ ist dagegen geeignet, unverfälschten Aufschluß zu geben. Das Ausmaß der Verzerrung durch die üblichen Bezugssysteme wird an einem Beispiel demonstriert.

Seit der Entdeckung der mutagenen Wirkung von Röntgenstrahlen durch MULLER für *Drosophila* und STADLER für Gerste und Mais in den Jahren 1927 und 1928 werden meist bei Pflanzen Bezugssysteme zur Bestimmung der Punktmutations-Frequenz gebraucht, die von einem statistischen Standpunkt aus oft zu nicht einwandfreien Ergebnissen führen. Dies trifft kaum für Pollen, wohl aber für Samenbestrahlung zu, wobei die Häufigkeit von Punktmutationen in der X_2 (bzw. N_2 usw.) ermittelt wird, da Faktormutationen wegen der fast immer vorhandenen Rezessivität hier zum ersten Mal herauspalten.

Die im allgemeinen verwendeten Bezugssysteme lauten: „Anzahl mutierter X_1 -Ähren-Nachkommenschaften je 100 vorhandener X_1 -Ähren-Nachkommenschaften“ beziehungsweise (1) „Anzahl Mutationen je 100 vorhandener X_1 -Ähren-Nachkommenschaften“¹ oder (2) „Anzahl Mutationen je 100 vorhandener X_1 -Pflanzen-Nachkommenschaften“². Die Mutations-Frequenz wird also durch die beiden Größen „Anzahl Mutationen“ und „Anzahl X_1 -Ähren“ beziehungsweise „Anzahl X_1 -Pflanzen“ bestimmt.

„Mutationen“ sind von „Mutanten“ zu unterscheiden. Erstere bezeichnen das Mutationsereignis, letztere die Anzahl mutierter X_2 -Pflanzen. Unabhängig davon, ob aus einer X_1 -Pflanzen- (bzw. Ähren-) Nachkommenschaft eine oder eine Mehrzahl gleichartiger Mutanten herauspalten, wird dies nur als eine Mutation registriert.

Nach Bestrahlung von Embryonen haben die daraus entstehenden X_1 -Pflanzen, wenn sie eine oder mehrere Mutationen enthalten, Chimärencharakter.

Bei Gerste umfaßte zum Beispiel in einem umfangreichen Experiment die durchschnittliche Größe eines mutierten Ähren-Sektors nur ca. 75–80% der Blüten einer Ähre, wie an anderer Stelle gezeigt werden wird. Ist in diesem mutierten Sektor infolge der Strahlensterilität die Anzahl der ausgebildeten Körner gering, so spalten oft rein zufällig keine Mutanten aus der Ähren-Nachkommenschaft heraus. Sinkt bei Gerste zum Beispiel die Kornzahl je Ähre auf 3, so werden ca. $\frac{2}{3}$ der mutierten X_1 -Ähren als solche nicht erkannt, obwohl sie mutiert sind³.

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Mutante und damit einer Mutation wird also durch die Anzahl der ausgebildeten Körner der X_1 -Ähren beträchtlich verändert. Mit zunehmender durchschnittlicher Sterilität der X_1 -Ähren nimmt ihre Kornzahl und damit die Mutations-Frequenz aus rein statistischen Gründen ab, wenn sie nach den oben dargestellten Bezugssystemen (1) und (2) festgestellt wird. Werden bei Gerste nach Anwendung einer Strahlendosis die X_1 -Ähren in Fertilitäts-Klassen eingeordnet und die Mutationshäufigkeit der einzelnen Klassen miteinander verglichen, so ist z. B. in der Klasse 0–10% Kornansatz die tatsächliche Mutationshäufigkeit nahezu fünf mal so groß, wie es nach dem Bezugssystem (1) den Anschein hat³. Wird die Mutationshäufigkeit mehrerer Strahlendosen miteinander verglichen, so tritt bei den üblichen Bezugssystemen eine ähnliche Verzerrung (bias) auf, da mit zunehmender Dosis die Sterilität zunimmt und die Kornzahl der Ähren abnimmt. Zumindest ein Teil der Krümmungen von

¹ L. J. STADLER, Science [New York] 68, 186 [1928].

² A. GUSTAFSSON, Hereditas 23, 1 [1937].

³ H. GAUL, in Vorbereitung.

Kurven der Dosis-Mutations-Frequenz beruht allein auf dem statistisch nicht einwandfreien Bezugssystem. Die Berücksichtigung der nicht entdeckten Mutationen* führt auch bei Gerste zu einer linearen Dosisabhängigkeit der Mutations-Frequenz, zumindest bis zu relativ hohen Dosen⁴, und damit zur Übereinstimmung mit den seit langem bekannten Ergebnissen von *Drosophila*⁵.

Die Berücksichtigung des statistischen „Mutationsdefizits“ kann am einfachsten durch die Wahl eines anderen Bezugssystems erfolgen. Diese Verhältnisse werden in Kürze an anderer Stelle statistisch eingehend dargestellt und begründet. Das Bezugssystem „Anzahl Mutanten je 100 vorhandener X_2 -Pflanzen“ kann, unabhängig von der Kornzahl je X_1 -Ähre (bzw. der Anzahl X_2 -Pflanzen je X_1 -Ähren-Nachkommenschaft), statistisch einwandfreie Informationen liefern. Diese „prozentuale Häufigkeit von Mutanten“ ist geeignet, bei Experimenten, in denen die einzelnen Versuchsglieder infolge unterschiedlicher Strahlendosis (oder Zusatzbehandlung zur Bestrahlung, z. B. O_2 -Atmosphäre) verschiedene durchschnittliche X_1 -Sterilität und damit eine verschiedene durchschnittliche Kornzahl je Ähre haben, über die Mutations-Häufigkeit dieser Versuchsglieder echten und vergleichbaren Aufschluß zu geben. Das Bezugssystem „Anzahl Mutanten je 100 X_2 -Pflanzen“ führt allerdings seinerseits zu verzerrten Ergebnissen, wenn innerhalb der Versuchsglieder eine Korrelation zwischen dem Sterilitätsgrad der einzelnen X_1 -Ähren und ihrer Punktmutations-Häufigkeit vorhanden ist**. Die Frage ob solch eine Korrelation zwischen den Fertilitäts-Klassen der X_1 -Ähren und ihrer Faktormutations-Frequenz besteht, wurde in zwei umfangreichen Experimenten geprüft. Es zeigte sich eine zumindest sehr weitgehende und zum größten Teil vollständige Unabhängigkeit zwischen dem Sterilitätsgrad der einzelnen X_1 -Ähren und ihrer Punktmutations-Frequenz³. Da das folgende Beispiel aus einem dieser Versuche stammt, erscheint zumindest hier die Anwendung des vorgeschlagenen Bezugssystems auf der Mutantenbasis berechtigt.

* Daneben erfolgte eine Reduzierung der diplontischen Selektion (intra-individuelle Selektion) durch technische Anbaumaßnahmen.

⁴ H. GAUL, Z. Pflanzenzücht. 37, [1957].

⁵ Siehe Literatur-Zusammenfassung bei N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY und K. G. ZIMMER, Verlag Hirzel, Leipzig 1947; D. G. CATCHESIDE, Advances in Genetics 2, 271 [1948].

Daß die Verzerrung der Ergebnisse bei den üblichen Bezugssystemen (1) und (2) erheblich sein kann, zeigt Tab. 2. Aus einem Mutations-Experiment, das an anderer Stelle ausführlich dargestellt wird, wurden zwei Versuchsglieder herausgegriffen, nämlich einmal eine Serie mit geringerer Strahlensterilität in X_1 (5000 r nach 4-stdg. Vorquellung der Samen in Wasser) und zum anderen diejenige mit der stärksten Sterilität (fraktionierte Dosis in Verbindung mit Quellung und Rücktrocknung der Samen, 5 · 2000 r). Die durchschnittliche Fertilität (% Kornansatz) war bei A 62%, bei B 42% (Tab. 1). Entsprechend verminderte sich die als X_2 ausgelegte Anzahl Körner je X_1 -Ähren-Nachkommenschaft von 13,2 auf 10,4 (Tab. 2).

Versuchsglied	Anzahl unter-suchter Pflanzen	Anzahl unter-suchter Ähren	mittlere Fertilität (Kornansatz)	mittlere Anzahl ausgebildeter Körner je Ähre ¹
A	319	1993	62.04	13.9
B	328	1779	41.78	11.1

¹ Ohne Berücksichtigung der Ähren mit 0 Korn.

Tab. 1. Fertilität in X_1 .

Versuchsglied	Anzahl ausgelegter X_1 -Pflanzen-Nachkommenschaften	Anzahl ausgelegter X_1 -Ähren-Nachkommenschaften	Anzahl als X_2 ausgelegter Körner	mittlere Anzahl ausgelegter Körner je X_1 -Ähren-Nachkommenschaft	Anzahl Mutationen je 100 X_1 -Pflanzen-Nachkommenschaften	Anzahl Mutationen je 100 X_1 -Ähren-Nachkommenschaften	Anzahl Mutanten je 100 X_2 -Pflanzen ¹
A	315	1900	25096	13.2	21.6	4.47	1.04
B	300	1540	16082	10.4	27.3	7.92	2.67

¹ Die Anzahl vorhandener X_2 -Pflanzen wurde aus Gründen der Arbeitsersparnis nicht vollständig ausgezählt. Vielmehr wurde die Anzahl ausgelegter Körner zugrunde gelegt und die Keimfähigkeit (= vorhandene X_2 -Pflanzen) durch Stichproben ermittelt. Die Stichprobengröße bei A war 1299, die von B 1683 ausgelegte Körner, die Keimfähigkeit entsprechend 87,61% und 79,14 Prozent. Mit Hilfe dieser Keimfähigkeit wurde die „Anzahl Mutanten je 100 als X_2 ausgelegte Körner“ von 0,91 und 2,11 auf 1,04 und 2,67 korrigiert.

Tab. 2. Mutations-Frequenz und Mutanten-Frequenz in X_2 (Chlorophyll-Mutationen).

** Diese Einschränkung für das vorgeschlagene Bezugssystem gilt nur bei einem Vergleich der Mutations-Frequenz zwischen verschiedenen Versuchsgliedern. Sie gilt nicht, wenn innerhalb eines (gleich behandelten) Versuchsgliedes die Mutations-Häufigkeit unterschiedlicher Fertilitäts-Klassen verglichen werden soll.

Wird das Bezugssystem (1) angewendet (Tab. 2), so ist die Mutations-Häufigkeit des Versuchsgliedes B 1,8-mal größer als die von A (7,92 : 4,47). Beim Bezugssystem (2) erscheint sie nur 1,3-mal größer. Das vorgeschlagene Bezugssystem auf der Mutantenbasis zeigt dagegen, daß die Frequenz tatsächlich 2,6-mal größer ist (2,67 : 1,04). Die verringerte mittlere Anzahl der X_2 -Pflanzen in den X_1 -Ähren- (bzw. Pflanzen-) Nachkommenschaften hat also beim Versuchsglied B gegenüber A, unter Anwendung des Bezugssystem (1), eine Unterschätzung der Mutationshäufigkeit um über 30%, beim Bezugssystem (2) um über 50% zur Folge.

Viele Folgerungen aus Mutationsversuchen auf der Basis der üblichen Bezugssysteme verlieren daher an Bedeutung, da z. T. andersartige Ergebnisse vorgetäuscht werden. Mit zunehmender X_1 -Sterilität wird die Mutationsrate zunehmend unterschätzt. Die Unterschiede in der Fertilität der Glieder eines Versuches sind oft noch größer als im Beispiel der Tab. 1 und 2. Besonders nach Neutronen-Bestra-

hlung ist es wegen der geringeren Tötungsrate gegenüber Röntgenstrahlen möglich, größere Sterilität zu induzieren⁶. Entsprechend kann in solchen Fällen die Häufigkeit nicht entdeckter Mutationen noch wesentlich größer sein. Auch hier sind auf der vorgeschlagenen „Mutantenbasis“ statistisch richtigere Informationen zu erwarten.

Das vorgeschlagene Bezugssystem bedeutet keinen erheblichen Mehraufwand an Arbeit. Verzichtet man auf das Prinzip des individuellen Nachbaus von X_1 -Ähren, was oft bei Experimenten möglich ist, und verwendet statt dessen eine Ramschtechnik, so kann es sogar Arbeitersparnis bedeuten.

Was hier vorwiegend für Gerste demonstriert wurde, gilt analog für andere Pflanzen, worauf an anderer Stelle noch etwas eingehender eingegangen wird⁴.

⁶ Zum Beispiel J. MacKEY, Hereditas **37**, 421 [1951]; R. S. CALDECOTT, B. H. BEARD u. C. O. GARDNER, Genetics **39**, 240 [1954]; L. EHRENBURG u. N. NYBOM, Acta Agric. scand. **4**, 396 [1954].

Die Wirkung von Trypaflavin auf Kern und Cytoplasma von *Acetabularia mediterranea*

Von GÜNTHER WERZ *

Aus dem Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Abt. Prof. Dr. J. HÄMMERLING, Wilhelmshaven **
(Z. Naturforsch. **12 b**, 559—563 [1957]; eingegangen am 7. Februar 1957)

Durch die mitgeteilten Untersuchungen sollte geprüft werden, aus welchen Gründen bei *Acetabularia* das Zellwachstum, nicht aber das Kern- und Nukleolenwachstum durch Trypaflavin (Tryp.) sistiert wird. 1. Fluoreszenz-mikroskopisch konnte gezeigt werden, daß *in vivo* weder im Zellkern noch im Nukleolus Tryp. gespeichert wird, sei es, daß Tryp. nicht in den Kern eindringt, sei es, daß keine feste Bindung an die RNS des Kernes erfolgt. Aus methodischen Gründen blieb unklar, ob eine *in vivo*-Speicherung in der cytoplasmatischen RNS erfolgt. Eine *in vivo*-Speicherung von Tryp. in den im Cytoplasma lokalisierten, energiereichen Polyphosphatgrana tritt nicht ein. 2. In trypaflavin-behandelten Systemen erfolgt Sistierung der Eiweißvermehrung, jedoch im Gegensatz zu unbehandelten, im Dunkeln gehaltenen Zellen kein oder nur geringer Abbau von Cytoplasma-Eiweißkörpern. 3. Trypaflavin-behandelte Zellen weisen eine starke Reduktion der oxydativen Prozesse auf, jedoch wird Energie produziert. Es wird diskutiert, welche Möglichkeiten zur Erklärung der unter 1 und 2 dargestellten Befunde sich aus energetischen Betrachtungen ergeben. 4. Der Interphasekern ist wahrscheinlich am Entstehen der cytostatischen Wirkung des Tryp. primär unbeteiligt.

Senkung der Energieproduktion im Cytoplasma durch Dunkelheit^{1, 2, 3}, 2,4-Dinitrophenol^{3, 4} oder Monojodessigsäure-Behandlung³ sowie extreme Zellverkleinerung unter sonst normalen Bedingungen⁵

bewirken bei der einzelligen und einkernigen Grünalge *Acetabularia*⁶ Blockierung — bei Zellverkleinerung starke Senkung — des Zellwachstums, eine Verringerung des Volumens maximaler Kerne und

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

** Herrn Professor HÄMMERLING danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit.

¹ H. STICH, Z. Naturforsch. **6 b**, 319 [1951].

² H. STICH, Z. Naturforsch. **8 b**, 36 [1953].

³ H. STICH, Chromosoma **7**, 693 [1956].

⁴ J. BRACHET, Experientia [Basel] **7**, 347 [1952].

⁵ J. HÄMMERLING, Rapp. Commun. 8^{me} Congr. Internat. de Bot., Paris 1954.

⁶ J. HÄMMERLING, Biol. Zbl. **51**, 633 [1931].