

man statt der Sämlingsbeurteilung eine Sommertriebbeurteilung durchgeführt hat, verschiebt sich die erste Saatguternte um weitere drei Jahre, d. h. die Samenernte beginnt erst im dreizehnten Jahr. In beiden Fällen dauert trotz der Frühteste die Saatguterzeugung noch sehr lange. Dieser lange Weg läßt sich aber beim Spargel abkürzen, wenn man die Saatguterzeugung parallel zur Prüfung der Kombinationseignung laufen läßt. Zu diesem Zweck werden zunächst sämtliche Nachkommenschaften auf Verdacht angebaut, und zwar beim Sämlingstest im fünften Jahr (Abb. 5) und beim Sommertriebtest im achten Jahr. Nach Vorliegen der jeweiligen Prüfungsergebnisse wird das Samenträgerfeld so reguliert, daß nur „gute“ Väter und „gute“ Mütter übrig bleiben und sich befruchten können. Auf diese Weise ist es möglich, bereits im siebenten Jahr (Sämlingstest) bzw. im zehnten Jahr (Sommertriebtest) Verkaufssaatgut zu ernten.

Die Erörterungen zeigen, daß in der Spargelzucht die Frühteste (Sämlings- und Sommertriebbeurteilung) eine überragende Bedeutung haben, um den Zuchtweg entscheidend zu verkürzen. Selbst wenn diese Frühteste beim Spargel nicht alle Abstufungen der idiotypischen Leistungsfähigkeit widerspiegeln, so können sie bei diesem züchterisch fast unbearbeiteten Objekt sowohl die Erhaltungs- als auch die Neuzüchtung intensivieren.

Zusammenfassung

1. Der Spargel ist bisher züchterisch sehr wenig bearbeitet worden. Dafür ist vor allem die lange Dauer der Selektion verantwortlich. Für die Spargelzüchtung sind deshalb Frühteste erforderlich.

2. Sowohl die Beurteilung der dreijährigen Sommertriebe (Sommertriebtest) als auch die Wuchsigkeit der Sämlinge (Sämlingstest) kann man als Frühdiagnose einsetzen. Für beide Testverfahren werden Angaben über ihre Durchführung gemacht.

3. Für die Erhaltungszüchtung werden Verfahren vorgeschlagen, wodurch an Stelle des bisher meistens angewandten unkontrollierten Samenbaues unter Verwendung der Frühdiagnosen wertvolles Saatgut gewonnen werden kann.

4. Für die Neuzüchtung ist ein Verfahren beschrieben, bei welchem sich wertvolle Kombinations-

effekte mit Hilfe der Frühdiagnosen züchterisch ausnutzen lassen.

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. G. BECKER danken wir sehr herzlich für das große Interesse an diesem Problem. Seine kritischen Hinweise haben unsere Arbeit wesentlich gefördert.

Frau BÖLKE danken wir sehr für ihre zuverlässige und stets einsatzfreudige Mitarbeit.

Literatur

1. CURRENCE, T. M.: Progeny tests of Asparagus plants. *J. Agric. Res.* **74**, 65–76 (1947). — 2. CURRENCE, T. M., and A. L. RICHARDSON: Asparagus breeding studies. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **35**, 554–557 (1937). — 3. DOUGLAS, J.: Selecting Asparagus plants for seed. *Agric. Gaz. South Wales* **49**, 73–74 (1938). — 4. ELLISON, J. H., and D. F. SCHEER: Yield related to brush vigor in Asparagus. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **73**, 339–344 (1959). — 5. ELLISON, J. H., D. F. SCHEER, and J. J. WAGNER: Asparagus yield as related to plant vigor, earliness and sex. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **75**, 411–415 (1960). — 6. HANNA, G. C.: Asparagus production in California. *Calif. Agric. Exp. Sta. Ext. Serv. Circ.* **91**, (1935). — 7. HANNA, G. C.: Yield Studies as related to Asparagus breeding. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **26**, 677–679 (1938/39). — 8. HUCHEL, A.: Wieviel Ertrag bringt eine Spargelpflanze? 1. Bericht der Deutschen Spargelzuchtgesellschaft. Sonderheft Obst u. Gemüsebau **3** (1931). — 9. HUYSKES, J. A.: Klauwenselectie bij asperges geeft goede resultaten. *Boer en Tuinder* **10**, 482, 17 (1956). — 10. HUYSKES, J. A., and J. SNEEP: Spargel. In: *Hdb. Pflanzenzüchtung*, 2. Aufl., **6**, 131 bis 148 (1960). — 11. JONES, H. A., and G. C. HANNA: Crown grading experiments with Asparagus. *Univ. of Calif. Coll. of Agric., Agric. Exp. Stat. Bull.* **633** (1940). — 12. NORTON, J. B.: Methods used in breeding Asparagus for rust resistance. *U. S. Dept. Agric. Bur. Plant. Ind. Bull.* **263** (1913). — 13. SCHEER, D. F., and J. H. ELLISON: Asparagus performance as related to seedlings vigor. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **76**, 370–375 (1960). — 14. SCHERMERHORN, L. G.: A summary of the performance records on individual asparagus plants in 1928. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **25**, 35–36 (1929). — 15. SCOTT, L. E., J. H. MITCHELL and R. A. McGINTY: Effects of certain treatments on carbohydrate reserves of Asparagus crowns. *S.C. Agri. Exp. Sta. Bull.* **321** (1939). — 16. SNEEP, J.: Mogelhykeden tet verbetering van de Asperege. *Jahresber. Inst. voor de Veredeling van Tuinbougewassen*, Wageningen 1950. — 17. TIEDJENS, V. A.: Some physiological aspects of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **21**, 129–140 (1925). — 18. VOTHMANN, J. G.: *Gartenkatechismus für Landleute*. Leipzig: Weidemann 1796. — 19. WELLENSIEK, S. J.: De Selectie van Eenjarige Mannelijke Asperegeplanten. Meded. Directeur van de Tuinbouw **12**, 876–889 (1949). — 20. YOUNG, R. E.: Yield growth relations in Asparagus. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **35**, 576–577 (1937).

Aus dem Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Gatersleben, Kr. Aschersleben

Mutationsauslösung durch Nitrosomethylharnstoff bei *Arabidopsis*

Von ANDREAS J. MÜLLER

Mit 6 Abbildungen

I. Einleitung

Zur Bewertung der Wirksamkeit von mutagenen Agenzien bei höheren Pflanzen

Die experimentelle Auslösung von Mutationen hat sich in der Pflanzenzüchtung als Methode zur Vergrößerung der Variabilität des Ausgangsmaterials bewährt. Da heute viele physikalische und chemische

Agenzien als mutagen bekannt sind, ist es erforderlich, eine vergleichende Bewertung dieser Agenzien bzw. der Applikationsmethoden hinsichtlich ihrer Eignung für pflanzenzüchterische Zwecke vorzunehmen. Die folgenden Ausführungen haben das Ziel, einige mit der Wahl geeigneter Bewertungsmaßstäbe in Zusammenhang stehende Fragen zu klären und eine kurze Übersicht über die bisherigen

Untersuchungen zur Wirksamkeit von Mutagenen bei Pflanzen zu vermitteln.

Die Ansprüche, die von der angewandten Mutationsforschung an eine mutagene Behandlung gestellt werden, lassen sich in zwei Grundforderungen zusammenfassen: 1. Es soll die Möglichkeit bestehen, eine sehr hohe Ausbeute an Mutationen zu erzielen. 2. Es sollen bevorzugt oder ausschließlich züchterisch wertvolle Mutationen induziert werden.

Zur ersten Forderung wäre zu bemerken, daß für züchterische Aufgabenstellungen nicht in jedem Fall — wie oft angenommen wird — möglichst hohe Mutationsfrequenzen anzustreben sind. Vielmehr ergeben sich in Abhängigkeit von der zu lösenden Aufgabe jeweils Optimalwerte für die Höhe der Mutationsfrequenz (vgl. SCHOLZ 1964).

Die heute erkennbaren Möglichkeiten zur Erfüllung der zweiten Forderung sind äußerst gering. Als gesichert kann nur gelten, daß Veränderungen in der Relation zwischen Chromosomenaberrationen und Mutationen (hier stets im Sinne von „Faktormutationen“ gebraucht) durch geeignete Wahl des Mutagens möglich sind. Abgesehen von speziellen Aufgaben (Verwendung von Translokationen zur interspezifischen Merkmalsübertragung oder zur Erzeugung von Duplikationen) sind Aberrationen im allgemeinen unerwünscht, da sie in erster Linie Sterilität und Vitalitätsminderungen verursachen.

Möglichkeiten zur bevorzugten oder gar ausschließlichen Induktion züchterisch wertvoller Mutationen sind heute noch nicht erkennbar. Wohl steht auf Grund vieler Untersuchungen an verschiedenen Organismen fest, daß durch einen Wechsel des Mutagens Verschiebungen im Mutationsspektrum bewirkt werden können. (Übersichten über die bei Gerste durchgeföhrten Arbeiten geben GAUL, 1963 und GUSTAFSSON, 1963; umfangreiche Untersuchungen sind auch bei *Arabidopsis* von MCKELVIE, 1963 durchgeföhrte worden.) Eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem verwendeten Mutagen und dem Anteil an gut lebensfähigen oder gar züchterisch wertvollen Mutationen ist aber bisher in keinem Fall gefunden worden. Nur ein solcher Befund wäre in dieser Hinsicht entscheidend. Locusspezifische Unterschiede in der Wirkung von Mutagenen bedeuten eben noch keine phänotypische Spezifität. Eine direkte Anwendung der Locusspezifität ist daher auch nur in dem Sonderfall möglich, wenn an einem bereits in Mutationsexperimenten gut untersuchten Locus erneut Mutationen ausgelöst werden sollen. Eine weitere, indirekte Anwendung ergibt sich, wenn das Ziel der mutagenen Behandlung die Auslösung einer ganz bestimmten Merkmalsänderung ist, von der angenommen werden kann, daß sie nur durch das Mutieren eines oder weniger Loci zustande kommt. In diesem Fall dürfte die Verwendung mehrerer, in ihrem Wirkungsmechanismus möglichst unterschiedlicher Mutagene die Wahrscheinlichkeit des Erfolges erhöhen. Gelten die genannten Einschränkungen nicht — was in der Regel der Fall ist —, dann hat die Verwendung verschiedener Mutagene keinen wesentlichen Vorteil.

Entscheidendes Kriterium für die Eignung eines Mutagens ist also die mögliche Ausbeute an Mutationen. In diesem Zusammenhang ist gleichgültig, welche Dosis zur Erreichung einer bestimmten Mutationsfrequenz appliziert werden muß. Es kommt also nicht auf die Effektivität eines Mutagens an, sondern auf die Höhe der mit dem Mutagen maximal erreichbaren Mutationsfrequenz. Die Fähigkeit eines Mutagens zur Erzeugung einer bestimmten maximalen Mutationsfrequenz wird zweckmäßigerweise als dessen mutagene Effizienz bezeichnet (EHRENBURG, 1960). Sie ergibt sich aus Art und Wirkungsstärke der Faktoren, die die Steigerung der Mutationsfrequenz begrenzen. Wir kennen begrenzende Faktoren zweierlei Art:

1. Faktoren, die darüber entscheiden, ob und in welchem Maße das Agens oder dessen reaktions-

fähiges Sekundärprodukt das genetische Material erreicht und mit diesem reagiert.

2. Schädliche Nebenwirkungen des mutagenen Agens. Diese lassen sich für höhere Pflanzen zweckmäßigerweise wie folgt klassifizieren:

a) Somatische Schädigungen, die das Überleben der behandelten Pflanzen oder behandelten Zellen beeinträchtigen.

b) Fertilitätsminderungen, die die Übertragung der induzierten Mutationen auf die nächste Generation beeinträchtigen.

Die Faktoren erster Art können auf vielfältige Weise die Höhe der Mutationsfrequenz begrenzen. Bei UV-Strahlen verhindert beispielsweise die Absorption durch darüber lagernde Zellschichten eine Mutationsauslösung im Scheitelmeristem des Samens. Bei Chemikalien kann insbesondere die mangelnde Wasserlöslichkeit oder die Inaktivierung des Agens durch Hydrolyse oder durch Reaktion mit anderen Zellbestandteilen begrenzend wirken. Werden andererseits ionisierende Strahlen oder die als starke Mutagene bekannten Chemikalien verwendet, so bleiben die Faktoren erster Art gegenüber den Faktoren zweiter Art unterschwellig.

Somatische Schädigungen können durch eine Vielzahl physiologischer Prozesse, aber auch durch die Auslösung von Chromosomenaberrationen zustande kommen. Fertilitätsminderungen beruhen in erster Linie auf Semisterilität, die durch verschiedene Typen von Chromosomenaberrationen (nicht nur Translokationen) bedingt wird. Andere Sterilitätsursachen können jedoch nicht von vornherein ausgeschlossen werden. Bei entsprechender Bewertung der Fertilität müssen auch die embryonalen Letalfaktoren als „Sterilitätsursache“ angesehen werden. Die Faktoren zweiter Art resultieren im allgemeinen aus der Tatsache, daß die biologische Wirkung eines Agens praktisch nie auf die Mutationsauslösung beschränkt bleibt. In einem weiten Bereich, beginnend mit null (d.h. keine mutagene Wirkung nachweisbar), scheint der Anteil der mutagenen Wirkung an der biologischen Gesamtwirkung beliebige Werte annehmen zu können. Der Annäherung an den oberen Extremwert, bei dem die Wirkung ausschließlich in der Mutationsauslösung bestehen würde und die Mutationsfrequenz unbegrenzte Werte annehmen könnte („ideales“ Mutagen), sind aber naturgemäß Grenzen gesetzt.

Als Maß der Effizienz eines Mutagens gilt die maximal erreichbare Mutationsfrequenz (EHRENBURG, 1960). Dabei ist zu beachten, daß der Wert der Effizienz auch vom untersuchten Objekt und von den Behandlungsbedingungen abhängig ist. Aber auch bei dieser Einschränkung ist die Festlegung eines Effizienzmaßes noch recht problematisch, da die maximale Mutationsfrequenz in den meisten Fällen nicht befriedigend definiert werden kann und daher praktisch nicht bestimmbar ist — ein Tatbestand, der nicht immer klar erkannt wird.

Wirkt z. B. Semisterilität als begrenzender Faktor, so wird sich die Mutationsfrequenz mit steigender Dosis stetig erhöhen, während sich gleichzeitig die Fertilität stetig verringert. Theoretisch könnten Mutationsfrequenzen noch bei beliebig kleinen Fertilitätswerten bestimmt werden, wenn nur das Versuchsmaterial genügend groß gehalten wird. Es gibt also keine natürliche Grenze für die maximale Höhe der Mutationsfrequenz. Allerdings kommt es bei sehr hohen Mutationsfrequenzen zu einer Verringerung der Versuchsgenauigkeit und zu einer enormen Erhöhung des Aufwandes, so daß sich aus praktischen Gründen doch Grenzen abzeichnen. Diesem Tatbestand läßt sich am besten Rechnung tragen durch Festlegung eines maximal zulässigen Sterilitäts-

grades, der eine sichere Bestimmung der Mutationsfrequenz gerade noch ermöglicht.

Ähnliche Überlegungen lassen sich auch für die somatische Schädigung anstellen. Jeder Überlebenswert größer als null ist mit einer Mutationsfrequenz verbunden, die notwendigerweise kleiner ist als der theoretisch zu erwartende Maximalwert; beim Überlebenswert null aber ist keine Bestimmung der Mutationsfrequenz mehr möglich. Die Festlegung einer gerade noch zulässigen Überlebensrate ist also unumgänglich. Allerdings wird die Überlebensrate oft in starkem Maße durch die Umweltbedingungen beeinflußt, so daß sich eine solche Festlegung immer nur auf genau definierte Umweltbedingungen beziehen kann. Diese Komplikation kann u. U. umgangen werden, wenn statt der Überlebensrate ein anderes, weniger umweltlabiles Maß für die somatische Schädigung gewählt wird (vgl. S. 106).

Die maximal zulässigen Werte für die begrenzenden Faktoren zweiter Art sind zwar willkürlich festgelegt, stellen dafür aber einen genau zu definierenden Bezugspunkt für die Bestimmung der maximalen Mutationsfrequenz dar. Sie ermöglichen einen exakten Vergleich der Effizienz verschiedener Mutagene. Echte Maximalwerte der Mutationsfrequenz treten nur dann auf, wenn Faktoren erster Art begrenzend wirken.

Falls nicht Faktoren erster Art die Mutationsfrequenz begrenzen (und das ist bei hochwirksamen Mutagenen praktisch nie der Fall), hängt also die Effizienz eines Mutagens im Endeffekt von der Relation zwischen den verschiedenen Wirkungsarten ab. Diese Relation charakterisiert sowohl das Mutagen als auch das behandelte biologische Material. Obwohl wichtigstes Charakteristikum eines mutagenen Agens, hat sie doch keineswegs bei allen behandelten Objekten und Entwicklungsstadien den gleichen Wert. Beispielsweise ist offensichtlich, daß ein physiologischer Prozeß wie die somatische Schädigung in Abhängigkeit vom betroffenen biologischen Material ein sehr unterschiedliches Ausmaß annehmen kann. Bei Mikroorganismen oder Tieren gewonnene Ergebnisse sagen daher noch nichts über die bei Pflanzen zu erwartende Effizienz aus. Die Effizienz kann verständlicherweise auch durch Veränderung der Applikationsbedingungen oder durch Zusatzbehandlungen beeinflußt werden. In Versuchen mit Pflanzen konnten solche Beeinflussungen sowohl für ionisierende Strahlen (vgl. die Übersicht bei NILAN und KONZAK, 1961) als auch für chemische Agenzen (KONZAK et al., 1963) nachgewiesen werden.

Vergleicht man die bisher an höheren Pflanzen gewonnenen Ergebnisse zur Wirksamkeit verschiedener Mutagene (vgl. die Übersichten bei GUSTAFSSON, 1960 und GÄUL, 1963; sowie MCKELVIE, 1963), so ergibt sich folgendes Bild: Strahlen mit größerer Ionisationsdichte (z. B. Neutronen) haben eine höhere Effizienz als solche mit geringerer Ionisationsdichte (z. B. Röntgenstrahlen), da der relative Wert der somatischen Schädigung kleiner ist (EHRENBURG und NYBOM, 1954, D'AMATO et al., 1962). Chemische Mutagene zeichnen sich gegenüber ionisierenden Strahlen in der Regel dadurch aus, daß bei gleicher Mutationsfrequenz der Sterilitätsgrad geringer ist (vgl. S. 117). Die meisten chemischen Mutagene wirken jedoch stark toxisch und haben daher eine

geringere Effizienz als ionisierende Strahlen. Etwa gleich hohe Effizienzen wurden bei Anwendung von Äthylenoxyd, Äthylenimin und Diäthylsulfat gefunden. Als wesentlich wirkungsvoller erwies sich bei allen bisher geprüften Pflanzenarten Äthylmethansulfonat (ÄMS), das somit heute als Mutagen mit der höchsten Effizienz angesehen werden muß. Erst in letzter Zeit konnte für einige andere Alkan-sulfonsäureester (FROESE-GERTZEN et al., 1963) und für 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin (MÜLLER und GICHNER, 1964) eine etwa gleich hohe Effizienz nachgewiesen werden. Diese hochwirksamen chemischen Agenzen erfüllen zur Zeit in allen Fällen, wo sie leicht zu applizieren sind, am besten die Ansprüche der angewandten Mutationsforschung. Die wegen des höheren Anteils an Chromosomenaberration und der damit verbundenen geringeren Effizienz als weniger günstig anzusehenden ionisierenden Strahlen behalten infolge ihrer oft einfacheren Applizierbarkeit jedoch weiterhin eine gewisse Bedeutung.

Es darf allerdings nicht übersehen werden, daß für die Eignung eines Mutagens zu züchterischen (wie auch zu experimentellen) Zwecken nicht nur dessen Effizienz entscheidend ist, sondern auch Art und Höhe des zur Erreichung einer bestimmten Ausbeute an Mutationen nötigen Aufwandes. Dieser wird sowohl von den Eigenschaften des biologischen Materials als auch von denen des mutagenen Agens bestimmt.

Von Bedeutung sind bereits die Herstellungs- und Bezugsmöglichkeiten für das mutagene Agens. Bestrahlungen setzen das Vorhandensein einer entsprechenden Apparatur voraus. Chemikalien müssen im Handel erhältlich sein bzw. sollte ihre Synthese nicht zu kostspielig werden. Für den Aufwand ist weiterhin von Bedeutung, welche Dosis zur Erzielung einer bestimmten Mutationsfrequenz appliziert werden muß, d. h. wie hoch die mutagene Effektivität der entsprechenden Behandlung ist. Chemische Agenzen können sich auch hinsichtlich der nötigen Applikationsweise unterscheiden. Verschiedene Verbindungen können z. B. durch Hydrolyse oder durch Reaktion mit bestimmten Zellbestandteilen verschieden schnell inaktiviert werden, sie können langsam oder schnell in das biologische Material eindringen u. a. m. Bei Samenbehandlung ist z. B. ein Agens mit schneller Hydrolyse (gleiche Effizienz vorausgesetzt) ungünstiger als eines mit langsamer Hydrolyse, weil im ersten Fall mit sehr hohen Konzentrationen oder mit einem häufigen Wechsel der Behandlungslösung gearbeitet werden muß.

Unter Betonung der angewandten Seite des Problems würde sich also gegenwärtig für vergleichende Untersuchungen von Mutagenen bei höheren Pflanzen folgende Aufgabenstellung ergeben: Es wäre zu prüfen, ob sich andere Agenzen gegenüber dem bisher wirkungsvollsten Mutagen ÄMS entweder durch eine höhere Effizienz oder aber durch einfachere Handhabung und geringeren Aufwand auszeichnen. In diesem Zusammenhang müßte eine möglichst vielseitige Analyse der Eigenschaften der einzelnen Agenzen erfolgen, wodurch wiederum Anhaltspunkte für die Ausarbeitung spezieller Applikationsmethoden gewonnen werden könnten.

Die vorstehend skizzierten Grundsätze dienen als Programm für vergleichende Untersuchungen von Mutagenen, die von uns an *Arabidopsis thaliana* begonnen worden sind. Diese kleine Crucifere wurde als Versuchsstoff gewählt, da sie gegenüber der bisher bevorzugt für derartige Untersuchungen verwendeten Gerste viele methodische Vorteile auf-

weist. Auch liegen für dieses Objekt bereits einige Ergebnisse zur Wirksamkeit verschiedener Mutagene vor. Als Testmutationen dienten dabei entweder die Chlorophyllmutationen (RÖBBELEN, 1962a, b, c) oder die Gesamtheit der sichtbaren Vitalmutationen (MCKELVIE, 1962, 1963). Inzwischen hat die Ausarbeitung des Embryonentests zum Nachweis rezessiver Letalfaktoren (MÜLLER, 1961b, 1963, 1964a) Voraussetzungen für eine einfachere und genauere Bestimmung des genetischen Effekts geschaffen. Bessere Möglichkeiten zur quantitativen Erfassung der somatischen Schädigung sind durch den Keimwurzeltest (MÜLLER, 1964b) erschlossen worden. Da ein exakter Wirkungsvergleich nur im Rahmen eines Testsystems möglich ist, wird angestrebt, einen recht großen Kreis von mutagenen Agenzien in die geplanten Untersuchungen einzubeziehen. Erste Ergebnisse liegen bereits über die Wirkung von 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin vor (MÜLLER und GICHNER, 1964).

In der vorliegenden Arbeit soll über Versuche mit N-Nitroso-N-methylharnstoff (NMH) berichtet werden. Aufgabe dieser Versuche war neben der Charakterisierung der Wirkungsweise und der mutagenen Effizienz des genannten Nitrosamids die Klärung einiger methodischer Fragen.

II. Material und Methoden

Als Versuchsmaterial dienten Samen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Linie 'Dijon G'), die ein Jahr gelagert hatten und in hohen Prozentsätzen (90 bis 100%) sehr gleichmäßig keimten. Die verwendete Linie stammt von einer Mutterpflanze ab und wird in jeder Generation einer Selektion auf rezessive Letalfaktoren unterworfen. Die Vermehrung des Ausgangsmaterials und die Anzucht der M_1 -Pflanzen erfolgt in einem insektenfrei gehaltenen Gewächshaus. Dadurch ist nach unseren Erfahrungen Fremdbestäubung mit genügender Sicherheit ausgeschlossen.

Kristalliner Nitrosomethylharnstoff (NMH) wurde bei 22 °C in Aqua dest. gelöst. Die Lösungen wurden (sofern nicht besonders angegeben) innerhalb von 30 min zur Behandlung verwendet. Die Samen wurden mit einem starken Überschuß an Lösung (4 ml auf 22 mg Samen) submers eingequollen. Die Temperatur wurde während der 18stündigen Behandlungszeit mit Hilfe von Höppler-Thermostaten auf $\pm 0,2$ °C konstant gehalten. Um einem hydrolysebedingten Abfall der Konzentration während der Behandlungszeit entgegenzuwirken, wurden die Lösungen nach 9 Std. durch Lösungen, die aus dem gleichen Ansatz stammten, aber bei + 2 °C aufbewahrt worden waren, ersetzt. Nach 18 Std. wurden die Samen abfiltriert und mit Aqua dest. nachgewaschen.

Für den Keimwurzeltest (vgl. MÜLLER, 1964b) wurden die behandelten Samen in Petrischalen von 13 cm Durchmesser auf Filterpapier (getränkt mit 0,1%iger KNO_3 -Lösung) zum Keimen gebracht. Jede Petrischale enthielt drei Behandlungsvarianten zu je 60 Samen und eine Kontrollvariante, die zur gleichen Zeit wie die Behandlungsvariante bei 24 °C in Aqua dest. submers eingequollen worden war. Die Petrischalen standen bei 24 ± 1 °C unter künstlicher Ganztagsbeleuchtung in einem Winkel von 60°. 36 bis 48 Std. nach Abschluß der Behandlung be-

gannen die Samen zu keimen. 2 Tage nach Keimbeginn in der Kontrolle wurde der Keimungsprozentsatz in jeder Variante bestimmt. Samen, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht gekeimt hatten, wurden aus dem Versuch ausgeschlossen. Rund 5 Tage nach Keimbeginn wurde die Länge der Primärwurzeln gemessen. Für jede Variante wurde die mittlere Wurzellänge berechnet. Der Wert für die relative Wurzellängenreduktion ergab sich aus der Differenz zwischen dem Mittelwert der Behandlungsvariante und dem Mittelwert der Kontrollvariante, bezogen auf den Mittelwert der Kontrollvariante der gleichen Petrischale. Die Versuche wurden in der Regel in zwei Wiederholungen angesetzt.

Zur Bestimmung des Sterilitätsgrades und der Frequenz rezessiver Letalfaktoren wurden die Samen als wässrige Suspension auf Erde (in Plastikschalen) ausgespritzt und die Pflanzen im Gewächshaus angezogen. Um genügend große M_1 -Pflanzen mit großen Schoten zu erhalten, wurden die Aussaaten 4 Wochen lang im Kurztag (8 Std. tägliche Beleuchtungsdauer) gehalten. Anschließend wurden Langtagsbedingungen (16 Std. tägliche Beleuchtungsdauer, Zusatzbeleuchtung) gewährt. Während der Blüte wurde auf ausreichende Beleuchtung (Zusätzlich an trüben Tagen) geachtet, um einen guten Samenansatz zu gewährleisten. 13 bis 15 Tage nach Beginn der Langtagsbehandlung begannen die Pflanzen zu blühen, 11 bis 13 Tage nach Blühbeginn konnten die Embryonen ausgewertet werden. Die methodischen Einzelheiten des hier verwendeten Embryonentests zum Nachweis rezessiver Letalfaktoren sind an anderer Stelle (MÜLLER, 1963) beschrieben. An jeder M_1 -Pflanze wurden die 5 untersten Schoten der Endfloreszenz untersucht; in jeder spaltenden Schoten-nachkommenschaft wurde (sofern möglich) das Spaltungsergebnis für 30 Embryonen ausgezählt. Schoten mit weniger als 4 Samen wurden nicht bewertet („sterile“ Schoten).

III. Ergebnisse

1. Somatische Effekte

Die Behandlung der Samen mit NMH beeinflußte die Entwicklung der M_1 -Pflanzen in mannigfacher Weise. Es wurden insbesondere folgende Effekte beobachtet:

1. Verringerung der Keimungsrate bzw. Verzögerung der Keimung.
2. Schädigung des Chlorophyllapparats in den Kotyledonen.
3. Hemmung des Keimwurzelwachstums.
4. Verringerung der Überlebensrate.
5. Auftreten chlorophylldefekter Sektoren.
6. Anomalien der Morphogenese.

Wurden die Samen einer 18stündigen Behandlung (bei 24 °C) mit Konzentrationen von 2 mM und höher ausgesetzt, so unterblieb die Keimung vollständig. Diese Keimhemmung war irreversibel und beruhte auf einer Abtötung der Embryonen.

Im Konzentrationsbereich von etwa 0,25 bis etwa 2 mM kam es zu einer dosisabhängigen Verminde rung der Keimungsrate gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 1). Die Kotyledonen der gekeimten Pflanzen ergrünten entweder gar nicht oder blieben heller als normal. Diese Schädigung des Chloro-

phyllapparats erwies sich gleichfalls als irreversibel. In der Kontrolle hatten dagegen die Kotyledonen bereits wenige Stunden nach der Keimung eine normale grüne Färbung angenommen. Während Keimpflanzen mit stark ausgebleichten Kotyledonen zu keiner weiteren Entwicklung mehr fähig waren, entwickelten sich aus Keimpflanzen mit nur geringfügig aufgehellten Kotyledonen, wie sie nach Behandlung mit 0,25 mM NMH beobachtet werden konnten, meist normal grüne Pflanzen. Die stark chlorophyllgeschädigten Keimpflanzen wiesen stets eine Anthozyaneinlagerung auf. Kamen Konzentrationen unter 0,25 mM zur Anwendung, so ließ sich weder eine signifikante Verminderung der Keimungsrate noch eine Aufhellung der Kotyledonen nachweisen. Die Keimung konnte allerdings gegenüber der Kontrolle bis zu 3 Std. verzögert sein.

Eine Hemmung des Keimwurzelwachstums ließ sich auch dann noch nachweisen, wenn die Behand-

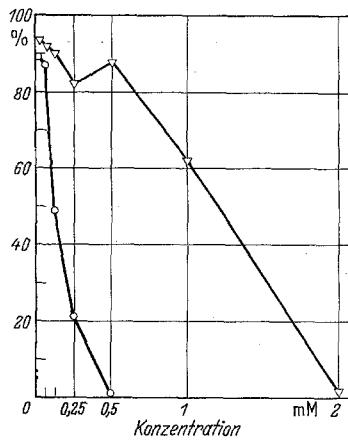


Abb. 1. Einfluß der NMH-Konzentration auf die Keimungsrate (Dreiecke) und auf die Überlebensrate (Kreise).

lung mit so geringen Dosen erfolgte, daß es nicht mehr zu auffälligen Schädigungen des Chlorophyllapparats kam (Abb. 5). Die angewandte Methodik gestattet, den Einfluß verschiedener Umweltfaktoren auf das Wurzelwachstum weitgehend auszuschalten, und ermöglicht daher eine genaue Erfassung der durch die NMH-Behandlung bedingten Wachstumshemmung. Das Ausmaß dieser Hemmung wird durch einen Vergleich der behandelten Varianten mit der Kontrollvariante bestimmt. Aus der Differenz zwischen den mittleren Wurzellängen beider Varianten ergibt sich nach Division durch die mittlere Wurzellänge der Kontrollvariante die relative (bzw. prozentuale) Wurzellängenreduktion.

Die in Abb. 1 angegebenen Werte für die Überlebensrate wurden in dem Material bestimmt, das im Gewächshaus auf Erde angezogen wurde und zur Auswertung auf rezessive Letalfaktoren diente. Die Wachstumsbedingungen waren in diesem Fall recht gut, so daß sich relativ hohe Überlebensraten ergaben. Trotzdem darf nach allen bisherigen Erfahrungen nicht erwartet werden, daß die Ergebnisse genau reproduzierbar sind. Wie auch von MCKELVIE (1963) betont wird, gibt die Überlebensrate bei *Arabidopsis* keinen genauen Maßstab für die Wirkung einer Behandlung ab. Trotz entsprechender Pflegemaßnahmen kann bereits die Überlebensrate der unbehandelten Kontrollen zwischen 70% und 95% schwanken. Das Überleben von Pflanzen, deren

Wachstum durch eine mutagene Behandlung gehemmt ist, ist natürlich in noch stärkerem Maße von den Umweltbedingungen abhängig. *Arabidopsis*-Pflanzen durchlaufen in den ersten zwei Wochen nach der Keimung ein außerordentlich sensibles Stadium, in dem sie leicht schädigenden Umwelteinflüssen zum Opfer fallen können. Erfolgt aber die Anzucht unter aseptischen Bedingungen (auf Agar-Nährböden), so können auch bei einer relativ starken Hemmung des Wurzel- und Sproßwachstums noch hohe Überlebensraten erzielt werden. Das ist erklärlich, da Pflanzen infolge ihres großen Restitutionsvermögens eben Wachstumshemmungen überwinden können, wenn sie keinen schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt sind.

Andererseits ist als primäre Ursache für die Verringerung der Überlebensrate nach NMH-Behandlung die Wachstumshemmung von Sproß und Wurzel anzusehen. Die dadurch bedingte Verlängerung des sensiblen Stadiums erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß die Pflanze schädigenden Umwelteinflüssen erliegt. Somit charakterisiert die relative Wurzellängenreduktion als Maß der Wachstumshemmung der primären Meristeme auch die von der Behandlung abhängige Komponente der Überlebensrate, ist aber nicht, wie jede experimentell bestimmte Überlebensrate, nur für ganz spezielle, meist nicht einmal genau zu definierende Wachstumsbedingungen gültig. Daher erscheint es vorteilhaft, Angaben über die Effizienz eines Mutagens grundsätzlich auf die relative Wurzellängenreduktion zu beziehen. Den Werten für die Wurzellängenreduktion können dann von Fall zu Fall durch zusätzliche Versuche ungefähre Werte für die Überlebensrate zugeordnet werden. Im vorliegenden Material führte eine Wurzellängenreduktion von 80% zu ungefähr 20%igem Überleben, während eine Wurzellängenreduktion von 90% kein Überleben mehr gestattete.

Pflanzen mit chlorophylldefekten Sektoren oder mit morphogenetischen Anomalien (unregelmäßige Blattstellung, deformierte Blätter, unregelmäßige Ausbildung der Infloreszenzen usw.) wurden nach Applikation höherer NMH-Dosen häufig beobachtet. Diese Mißbildungen und Chlorophylldefekte unterscheiden sich qualitativ nicht von den nach Behandlung mit Röntgenstrahlen auftretenden (RÖBBELEN, 1962b, MÜLLER unveröff.). Obwohl keine genauen Zahlenwerte ermittelt wurden, läßt sich doch feststellen, daß morphogenetische Anomalien (relativ zur Mutationsfrequenz und auch zum Sterilitätsgrad) deutlich seltener sind als nach Röntgenbestrahlungen.

2. Sterilität

Die Applikation von NMH in nicht zu kleinen Dosen bewirkt eine deutliche Verminderung der Fertilität der M_1 -Pflanzen. Die in Tab. 1 dargestellten Ergebnisse wurden durch Auszählen der Anzahl der Samen in jeder Schote gewonnen. Dabei wurden entsprechend den an anderer Stelle (MÜLLER 1963) dargestellten Kriterien zum Erkennen embryonal letaler Embryonen alle Samenanlagen erfaßt, in denen die Zygote zumindest einige Teilungen erfahren hatte. Die beobachtete Fertilitätsminderung ist also im wesentlichen Ausdruck einer haplontischen Sterilität. Diplontische Sterilität wird nur in dem Fall als Fertilitätsminderung angesehen, wenn sie

Tabelle 1. Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von NMH auf die Fertilität der M_1 -Pflanzen.

Konzentration μM	Prozentuale Häufigkeit der Schoten mit				Sterilitätsgrad
	0-3 Samen	4-16 Sa.	17-29 Sa.	>29 Sa.	
0	0	0	0,1	99,9	0
16	0	0	0,4	99,6	0,1
32	0,1	5,7	12,5	81,7	7,5
63	7,8	34,7	26,7	31,8	41,8
125	89,2	8,3	2,1	0,4	95,9
250	99,6	0,4	0	0	99,9

durch eine Entwicklungsunfähigkeit der Zygote bedingt ist. Die embryonale Letalität geht in vollem Umfang in die Erfassung der rezessiven Letalfaktoren ein.

Eine eindeutige Entscheidung über die Ursachen der Sterilität ist auf Grund der vorliegenden Versuchsergebnisse noch nicht möglich, doch ist bereits zu erkennen, daß zumindest als Hauptursache die Induktion von haplophasischen Letalfaktoren anzusehen ist. Physiologisch bedingte Sterilität kann, wenn überhaupt, nur eine sehr untergeordnete Rolle spielen. Dafür sprechen folgende Befunde:

Nach Applikation nicht zu hoher Dosen treten ausschließlich partiell sterile Schoten auf. Wie aus Tab. 1 ersichtlich, bestehen zwischen den aus einer und derselben Behandlungsvariante stammenden M_1 -Pflanzen große Unterschiede in der Fertilität. Auch die verschiedenen Schoten einer M_1 -Pflanze können einen unterschiedlichen Samenansatz aufweisen, wobei sich in vielen Fällen deutlich erkennen läßt, daß die partiell sterilen Schoten (ähnlich wie die Mutanten enthaltenden Schoten) in zusammenhängenden Infloreszenzsektoren angeordnet sind. Untersuchungen des Pollens ergaben, daß bei M_1 -Pflanzen mit verminderter Fertilität meist die Hälfte der Pollenkörper letal ist. Das legt die Annahme nahe, daß es sich in der Mehrzahl der Fälle um Semisterilität handelt. Mit dieser Annahme wäre auch die Tatsache zu vereinbaren, daß nach Applikation sehr hoher Dosen (z. B. 250 μM NMH) eine fast vollständige Sterilität zu beobachten ist. Mit ansteigender Dosis muß nämlich erwartet werden, daß in zunehmendem Maße je Zelle zwei oder mehr haplophasische Letalfaktoren gleichzeitig induziert werden. Dadurch würde sich der Anteil letaler Gonen in den betroffenen Blüten so stark erhöhen, daß befruchtete Samenanlagen nur noch in sehr seltenen Fällen zustande kämen. Tatsächlich nimmt die Sterilität — wie auf Grund dieser Annahme zu erwarten wäre — mit ansteigender Dosis stetig zu (Abb. 6).

Es ist nicht einfach, ein befriedigendes Maß für die Sterilität zu finden. Den größten Aussagewert hätte natürlich die Frequenz der haploontischen Letalfaktoren. Die Schwierigkeiten, die mit der direkten Erfassung der haploontischen Letalfaktoren verbunden sind, schließen aber ein solches Verfahren von vornherein für einen Routinetest aus. Auch der Anteil unbefruchteter Samenanlagen läßt keinen genauen Rückschluß auf die Frequenz der haploontischen Letalfaktoren zu, da einerseits das Überangebot an Pollen zu einer weitgehenden Kompensation der Pollenletalität führt und andererseits ungünstige Umwelteinflüsse während der Blüte den Befruchtungserfolg des normalen Pollens vermindern können (MÜLLER 1961a).

Bei dieser Sachlage schien es angebracht, das am wenigsten aufwendige Verfahren, die Erfassung der Anzahl der befruchteten Samenanlagen je Schote, anzuwenden

und durch Einhalten bestimmter Umweltbedingungen dafür zu sorgen, daß die Ergebnisse verschiedener Versuchsserien vergleichbar bleiben. Die Anzuchtbedingungen werden so gestaltet, daß stets große Schoten mit durchschnittlich 50 Samenanlagen gebildet werden. Durch ausreichende Beleuchtung während der Blüte wird ein hoher Samenansatz in der Kontrolle garantiert. Unter diesen Umständen können alle Schoten, die weniger als 30 Samen enthalten, mit genügender Sicherheit als partiell steril angesehen werden. Die mehr als 29 Samen enthaltenden Schoten werden als voll fertil gerechnet. Durch diese Festlegung dürften zwar einige haploontische Letalfaktoren unerfaßt bleiben, doch wird auf diese Weise erreicht, daß sowohl Schwankungen in der Anzahl der Samenanlagen je Schote als auch im Befruchtungserfolg nicht in vollem Umfang in den Sterilitätswert eingehen.

Alle untersuchten Schoten wurden entsprechend der Anzahl der in ihnen enthaltenen Samen (einschließlich der embryonal letalen Samen) einer bestimmten Fertilitätsklasse zugeordnet (Tab. 1). Die prozentualen Häufigkeitswerte für jede Klasse wurden mit folgenden Faktoren multipliziert:

Klasse	Faktor
0-3	1
4-16	0,75
17-29	0,25
>29	0

Durch Addition der auf diese Weise gewonnenen Werte ergab sich eine Kennziffer, die alle Werte von 0 bis 100 annehmen kann. Sie wird als Sterilitätsgrad bezeichnet. Die Art der Berechnung des Sterilitätsgrades bringt es mit sich, daß einerseits geringe Fertilitätsminderungen (die die Anzahl der Samen je Schote nicht unter 30 senken) in diesen Wert nicht eingehen, andererseits sehr starke Fertilitätsminderungen (weniger als 4 Samen je Schote) etwas überschätzt werden. Unter der Annahme einer linearen Beziehung zwischen Dosis und Frequenz der haplophasischen Letalfaktoren wäre für den Sterilitätsgrad somit eine Dosis-Effekt-Kurve zu erwarten, die im niederen Dosisbereich zuerst nur wenig ansteigt und bei einem entsprechend hohen, aber noch endlichen Dosiswert den Sterilitätsgrad 100 erreicht. Da keine Möglichkeit besteht, diese Abweichung genau abzuschätzen, können also aus der Form einer empirischen Dosis-Effekt-Kurve direkt keine Schlüsse gezogen werden. Eine Interpretation ist nur durch Vergleich mit entsprechenden Kurven für andere Mutagene möglich. Dabei wird zweckmäßigerweise von den Beziehungen zwischen Sterilitätsgrad und Mutationsfrequenz ausgegangen. Diese Beziehungen sind für die aus den Konzentrations- und Temperaturversuchen mit NMH gewonnenen Ergebnisse in Abb. 6 dargestellt. Zu beachten ist außerdem, daß Veränderungen in den Anzuchtbedingungen, die die Samenzahl in den Schoten der Kontrolle beeinflussen, auch die Höhe des Sterilitätsgrades verändern können.

3. Rezessive Letalfaktoren

Die nach Einwirkung von NMH auftretenden rezessiven Letalfaktoren wurden durch die Erfassung der aberranten M_2 -Embryonen in den Schoten der M_1 -Pflanzen nachgewiesen (Embryontest). Dabei konnten die gleichen Phänotypen beobachtet werden wie bei Versuchen mit Röntgenstrahlen und anderen alkylierenden Agenzien (vgl. Abschn. III. 7 und

Diskussion). Eine Beschreibung dieser Phänotypen ist bereits an anderer Stelle erfolgt (MÜLLER 1963).

Auch hinsichtlich der Verteilung der Schoten mit spaltenden bzw. nichtspaltenden Nachkommenschaften an den M_1 -Pflanzen ließen sich keine prinzipiellen Unterschiede gegenüber den nach Einwirkung von Röntgenstrahlen (MÜLLER 1964a) oder anderen alkylierenden Agenzien gefundenen Verhältnissen feststellen. In der Regel wiesen nicht alle fünf untersuchten Schoten der Endfloreszenz spaltende Nachkommenschaften auf, so daß die M_1 -Pflanzen hinsichtlich des mutierten Locus als Meriklinalchimären anzusehen sind. Die sich aus dieser chimärischen Struktur ergebenden Konsequenzen für die Bestimmung der Mutationsfrequenz wurden bereits an anderer Stelle dargelegt (MÜLLER 1964a). Hier sollen nur die Methoden mitgeteilt werden, die bei der rechnerischen Auswertung der im folgenden mitgeteilten Ergebnisse zur Anwendung kamen.

Die Frequenz spaltender M_1 -Pflanzen-Nachkommenschaften hat sich als unkorrektes Maß der Mutationsfrequenz erwiesen. Durch die Berechnung auf 5-Schoten-Basis (m_a in Tab. 3) gewinnt dieses Maß zwar an Genauigkeit, doch bleibt es — wie aus den in Tab. 3 angeführten Werten leicht zu erkennen ist — zur Erfassung hoher Mutationsfrequenzen weiterhin ungeeignet. Daher werden nur die Kennziffern „Frequenz spaltender Schotennachkommenschaften“ (m_b) und „Mutantenfrequenz“ (Anteil der Mutanten an der Gesamtzahl der untersuchten Embryonen — m_c) zur Beurteilung des mutagenen Effektes benutzt. Da jeweils nur die fünf ersten Schoten aus der Endfloreszenz bewertet werden, können diese Kennziffern frei von Verzerrungen durch die von Pflanze zu Pflanze und außerdem innerhalb einer Pflanze im Verlauf der Entwicklung wechselnde Größe des mutierten Sektors bestimmt werden.

In jeder Schote werden (sofern vorhanden) 30 Embryonen untersucht und Zahl und Typ der Mutanten bestimmt. Schotennachkommenschaften, die nur einen aberranten Embryo auf 30 Embryonen enthalten, werden als normal bewertet, da es sich in diesem Fall mit großer Wahrscheinlichkeit um eine nicht-genetisch bedingte Embryonenletalität handelt. Diese Embryonenletalität beträgt unter den hier verwendeten Aufzuchtbedingungen rund 0,05% und kann durch Ausschluß der Nachkommenschaften mit nur einem aberranten Embryo um mindestens 0,02% gesenkt werden. Der nicht zu eliminierende Restwert von rund 0,03% ist auch in den Werten

für die unbehandelten Kontrollen enthalten (Tab. 3). Schoten, die weniger als 4 Embryonen enthalten („sterile“ Schoten), werden nicht bewertet. Zur Berechnung der Mutantenfrequenz werden bei allen Schoten, die 4 bis 29 Embryonen enthalten, die Mutantenzahlen auf den erwarteten Wert für 30 Embryonen umgerechnet. Somit ergibt sich die Mutantenfrequenz einer Versuchsserie als gewogenes Mittel der Mutanten-(Rezessiven)-frequenzen aller bewerteten Schotennachkommenschaften. Dabei ist:

$$\begin{aligned} \text{Anzahl der bewerteten Schotennachkommenschaften} \\ = 5 \times \text{Anzahl der } M_1\text{-Pflanzen} \\ - \text{Anzahl der „sterilen“ Schoten.} \end{aligned}$$

Zur Veranschaulichung des Auswertungsverfahrens dient ein Auszug aus der Urliste (Tab. 2). In dieser Liste werden die Auswertungsergebnisse aller M_1 -Pflanzen aufgeführt, deren Nachkommenschaften Mutanten enthalten. Die übrigen M_1 -Pflanzen werden nur der Anzahl nach notiert; bei der Verrechnung des Versuchs werden sie jeweils mit 5 Schoten bzw. 150 Embryonen in Anrechnung gebracht.

Das in Tab. 2 mitgeteilte Auswertungsergebnis von 8 M_1 -Pflanzen kann als Beispiel dienen, um die Berechnung der verschiedenen Kennziffern zu erläutern: 5 M_1 -Pflanzen enthielten Mutanten, 2 M_1 -Pflanzen enthielten keine Mutanten, eine M_1 -Pflanze konnte nicht bewertet werden, weil alle Schoten „steril“ waren. Also: $m_a = 5/7 = 71\%$. Bei den „mutierten“ M_1 -Pflanzen konnten von 25 Schoten 22 bewertet werden. Zuzüglich der 10 bewerteten Schoten aus den 2 „normalen“ M_1 -Pflanzen ergeben sich 32 bewertete Schoten. Da 15 „mutierte“ Schoten gefunden wurden, ist $m_b = 15/32 = 47\%$. Aus der Anzahl der bewerteten Schoten ergibt sich auch die Anzahl der bewerteten Embryonen: $32 \cdot 30 = 960$. Davon gelten 117 als Mutanten. Also: $m_c = 117/960 = 12,2\%$. Die Größe des mutierten Sektors ergibt sich als Anteil der „mutierten“ Schoten; bei M_1 -Pflanze Nr. 1 ist also $b = 60\%$, bei M_1 -Pflanze Nr. 4 ist $b = 100\%$; Die mittlere Sektorgroße (bezogen auf die „mutierten“ M_1 -Pflanzen) ist $\bar{b} = 15/22 = 68\%$. Die Rezessivenfrequenz der spaltenden Schotennachkommenschaften beträgt bei der M_1 -Pflanze Nr. 1 $f' = 20/(3 \cdot 30) = 22,1\%$, bei der dihybrid spaltenden M_1 -Pflanze Nr. 3 $f' = 25/(2 \cdot 30) = 41,7\%$. Die mittlere Rezessivenfrequenz ergibt sich als $\bar{f}' = 117/(15 \cdot 30) = 26,0\%$.

Die Kennziffer m_b stellt bei genügend großen Versuchsserien einen guten Schätzwert für die gesuchte Mutationsfrequenz dar. Sie kann aber durch zwei Faktoren beeinflußt werden:

1. Das Auftreten von nicht-genetisch bedingter Embryonenletalität kann dazu führen, daß einzelne nichtspaltende Schotennachkommenschaften fälsch-

Tabelle 2. Auszug aus der Urliste.

M_1 -Pflanze Nr.	1. Schote			2. Schote			3. Schote			4. Schote			5. Schote			mutierte Schoten	sterile Schoten	Mutanten (alle Typen)
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c			
1	30	7	xa	30	5	xa	30	0		30	10	xa	30	0		3		22
2	21	4(6)	va	13	2(5)	va	3	2—	va	25	9(11)	va	17	3(5)	va	4	1	27
3	30	5	ab	30	1—	sc	30	6	ab	30	0		30	0		2		25
		6	sc					8	sc									
4	30	6	pv	30	8	pv	30	5	pv	30	10	pv	30	5	pv	5		34
5	10	3(9)	mr	30	0		2	2—	mr	30	0		3	2—	mr	1	2	9
															insges.	15	3	117

a = Anzahl der untersuchten Embryonen
b = Anzahl der Mutanten
c = Mutantentyp

Anzahl der „normalen“ M_1 -Pflanzen: 2
Anzahl der „sterilen“ M_1 -Pflanzen: 1

Tabelle 3. Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von NMH und unterschiedlicher Temperaturen während der 18stündigen Behandlungszeit auf die Frequenz rezessiver Letalfaktoren.

Konzentration μM	Temperatur $^{\circ}\text{C}$	M_1 -Pflanzen	Anzahl der bewerteten Schoten	sterile Schoten	m_a	m_b	\bar{m}_e	n	$\Sigma(m_e - \bar{m}_e)^2$	$m(\bar{m}_e)$	$m(\bar{m}_e) - m_b$	\bar{f}
0 (tr)	—	1873	9365	0	0,6	0,48	0,13	6	0,08	0,61	+ 0,13	27,1
0 (qu)	24	1546	7730	0	0,6	0,42	0,10	4	0,00	0,48	+ 0,06	23,8
16	24	375	1875	0	16,0	5,22	1,20	4	0,16	5,55	+ 0,33	22,31
32	24	348	1738	2	81,3	43,38	11,17	4	9,53	43,09	- 0,71	20,80
32	30	230	1132	18	88,7	65,01	19,80	4	11,62	65,03	+ 0,02	21,02
63	24	332	1532	128	98,5	86,42	33,95	4	7,53	86,12	- 0,30	20,77
125	24	696	368	3480	100	98,33	63,33	4	18,74	99,16	+ 0,29	22,37
250	24	283	5	1410	—	—	—	—	—	—	—	—

 m_a = Frequenz spaltender Pflanzennachkommenschaften (in %) m_b = Frequenz spaltender Schotennachkommenschaften (in %) m_e = Mutantenfrequenz (Mittelwert aus n Wiederholungen, in %) $m(\bar{m}_e)$ = Schätzwert von m auf Grund von \bar{m}_e (für $\bar{f} = 21\%$) \bar{f} = mittlere Rezessivenfrequenz (in %)

lich als spaltend angesehen werden, wodurch m_b eine Überschätzung erfährt. Diese Überschätzung dürfte aber nur bei kleinen Werten ins Gewicht fallen. Sie kann auch leicht erkannt werden, weil sie die mittlere Rezessivenfrequenz der spaltenden Schotennachkommenschaften (\bar{f}) unter den Wert der mittleren Rezessivenfrequenz der M_3 -Nachkommenschaften (\bar{f}) senken würde. \bar{f} hat für die im Embryonentest erfaßten rezessiven Letalfaktoren einen Wert von 21% (MÜLLER, 1963). Wie aus Abb. 2 ersichtlich, sinken bei den vorliegenden Versuchsergebnissen die \bar{f} -Werte in keinem Fall unter den Wert von 21%; es liegt also keine Überschätzung von m_b vor.

2. Mit zunehmender Verringerung der Nachkommenschaftsgröße (als Folge der zunehmenden Sterilität) ist eine Unterschätzung von m_b zu erwarten. Die Ursachen dieser Erscheinung sind von GAUL (1957, 1960) für die analogen Verhältnisse bei der Gerste eingehend erläutert worden (vgl. S. 115).

Die genannten Faktoren werden bei der Bestimmung von m_e nicht wirksam. Die nicht-genetisch bedingte Embryonenletalität geht in die Mutantenfrequenz nur mit außerordentlich geringen Werten (0,03%) ein. Gegenüber der Nachkommenschaftsgröße ist m_e invariant. Daher kann m_e als bester Schätzwert der Mutationsfrequenz betrachtet werden.

Die Beziehungen zwischen den drei Kennziffern, die zur Charakterisierung des mutagenen Effekts dienen, lassen sich ziemlich einfach darstellen. Es ist¹

$$m_b = \bar{b} \cdot m_a \quad (1)$$

und

$$m_b = 1/\bar{f} \cdot m_e. \quad (2)$$

\bar{b} und \bar{f} sind allerdings keine Konstanten, sondern — wie aus Abb. 2 zu erkennen — Variablen. Die Kennziffern m_a , m_b und m_e dienen als Schätzwerte für die gesuchte Mutationsfrequenz m , d. h. für den Anteil mutierter Initialzellen an der Gesamtzahl der Initialzellen im Sproßscheitel der M_1 -Pflanzen (MÜLLER, 1964a). Im Idealfall (d. h., wenn die Kennziffern weder unter- noch überschätzt sind) ist

$$m = m_b. \quad (3)$$

Somit gilt auch: $m = 1/\bar{f} \cdot m_e$ und $m = \bar{b} \cdot m_a$. Diese Beziehungen sind jedoch wertlos, wenn geprüft

¹ Die Ableitung dieser wie auch der folgenden Formeln kann aus Platzgründen hier nicht mitgeteilt werden. Das soll an anderer Stelle nachgeholt werden.

werden soll, ob die verschiedenen Schätzmethoden zu gleichen Werten für m führen. Beispielsweise basiert \bar{f} auf der gleichen Bestimmung der Anzahl der spaltenden Schotennachkommenschaften wie m_b und unterliegt daher auch den gleichen Fehlschätzungen wie m_b . Daher gilt nach (2): $\bar{f} = m_e \cdot m_b$. Nun läßt sich aber unter Annahme von Idealbedingungen \bar{f} mit Hilfe von \bar{f} als Funktion von m ausdrücken. \bar{f} stellt eine Konstante dar und konnte in einem großen Material von M_3 - und M_4 -Nachkommenschaften als 21% bestimmt werden.) Die in Abb. 2 erkennbare Dosisabhängigkeit von \bar{f} (die genau genommen eine Abhängigkeit von der Mutationsfrequenz ist) erklärt sich durch die Zunahme der Häufigkeit von Mehrfachmutationen, die zu polyhybriden Spaltungen führen. Dagegen gibt \bar{f} den Erwartungswert bei reinen Einfachmutationen an. Unter Zugrundelegung einer Poisson-Verteilung ergibt sich

$$\bar{f} = \frac{1 - (1 - m)\bar{f}}{m} \quad (4)$$

oder

$$\bar{f} = \frac{\ln(1 - \bar{f}m)}{\ln(1 - m)} \quad \text{bzw.} \quad \bar{f} = \frac{\ln(1 - m_e)}{\ln(1 - m_b)}. \quad (5)$$

Damit ist eine Prüfmöglichkeit für die Übereinstimmung von m_e und m_b gewonnen. Ergeben sich aus einem Versuchsergebnis nach (5) abweichende Werte für \bar{f} , so liegt eine Fehlschätzung vor. Formel (5) kann auch nach m aufgelöst werden:

$$m = 1 - (1 - m_e)^{1/\bar{f}}. \quad (6)$$

Auf diese Weise kann m aus m_e berechnet werden. Für kleine Werte von m gilt $m \approx 1/\bar{f} \cdot m$. Diese angenäherte Beziehung wird auch von GAUL (1960) angegeben. Eine weitere Prüfmöglichkeit für die Übereinstimmung von m_e und m_b ergibt sich nun dadurch, daß der nach (6) berechnete Wert für m gleich dem nach (3) berechneten sein muß. Die Anwendung dieser Formeln auf die vorliegenden Versuchsergebnisse erfolgt in Abschn. III. 5.

Die statistische Beurteilung von m_b und m_e ist recht problematisch und setzt einige grundsätzliche Überlegungen voraus:

Die Werte für m_b sind Häufigkeitsziffern; die Anzahl der unabhängigen Ereignisse (n) ist aber unbekannt. Die Anzahl der bewerteten Schotennachkommenschaften ist mit Sicherheit größer als n , da in der Regel mehrere Schotennachkommenschaften für die gleiche Mutation spalten. n muß vielmehr gleich der Anzahl geprüfter

Initialzellen bzw. gleich der Anzahl geprüfter Infloreszenzsektoren sein. Diese genau zu bestimmen, ist jedoch nicht möglich. Wir umgehen die Schwierigkeit, indem wir annehmen, daß die M_1 -Pflanzen durchschnittlich 1,66 Sektoren enthalten. Erfahrungsgemäß dürfte der Wert stets höher liegen, so daß auf diese Weise sich eher zu geringe als zu hohe Sicherungen ergeben. Es wird also angenommen, daß die Anzahl unabhängiger Ereignisse gleich der Anzahl der bewerteten Schotennachkommenschaften dividiert durch 3 sei. Davon ausgehend, werden die Konfidenzgrenzen für $P = 5\%$ (Abb. 4) mit Hilfe der Tafeln von KOLLER (1953) bestimmt. Da in der vorliegenden Arbeit die m_b -Werte nur zum Vergleich mit den m_c -Werten dienen, erfolgt keine statistische Beurteilung der Differenzen. Bei Bedarf könnte natürlich auch mit den korrigierten Werten ein χ^2 -Test durchgeführt werden.

Der Versuch, auch die Mutantenfrequenzen (m_c) als Häufigkeitsziffer zu behandeln, stößt auf größere Schwierigkeiten, wie bereits GAUL (1957) und FRYDENBERG (1963) gezeigt haben. Die einzelnen Mutanten können auf keinen Fall als unabhängige Ereignisse angesehen werden. Da das von FRYDENBERG (l. c.) vorgeschlagene Verfahren zur Schätzung der zusätzlichen Variabilitätsursachen bei größeren Werten von m_c nicht als befriedigend gelten kann, benutzen wir den t -Test. Jeder Versuch wird in mehreren Wiederholungen angesetzt. Die Ergebnisse der einzelnen Wiederholungen werden nicht als Häufigkeitsziffer, sondern als Meßwerte behandelt. Beim vorliegenden Material wurde jede Behandlungsvariante in vier etwa gleich große Teilserien untergliedert und für jede dieser Wiederholungen der m_c -Wert ermittelt. Daraus

konnte für jede Variante der Mittelwert (\bar{m}_c) und die Summe der Abweichungsquadrate berechnet werden (Tab. 3). Unter Benutzung der t -Werte für $FG = 3$ ließen sich nun sowohl die Konfidenzgrenzen für $P = 5\%$ (Abb. 4) berechnen als auch die Differenzen zwischen den einzelnen Mittelwerten beurteilen (vgl. S. 111).

4. Hydrolyseversuch

Die Untersuchungen über den Einfluß der Hydrolyse auf die Aktivität des NMH sollten Grundlagen für die Beurteilung der Konzentrations- und Temperaturversuche liefern und Aussagen darüber machen, ob radiomimetisch wirksame Hydrolyseprodukte bzw. relativ langlebige Hydrolysezwischenprodukte entstehen.

Nach JANČÍK et al. (1958) ist NMH in wässriger Lösung relativ stabil. Auf Grund volumetrischer Bestimmungen des Gehalts an NMH konnte für 20 °C eine Hydrolyse-Halbwertszeit von rund 65 Std. ermittelt werden. (Nach 27 Std. waren nur 6% zersetzt.) Die Hydrolyse wird mit steigender Temperatur und steigendem pH-Wert beschleunigt. Nach einstündiger Hydrolyse wurden folgende Verluste gemessen: 25° – 0%, 35° – 1,05%, 55° – 67%, 75° – 100%; bzw. pH = 5,0 – 0%, pH = 7,0 – 20%, pH = 8,0 – 85%.

Um die Abnahme der radiomimetischen Aktivität in ungepufferten wässrigen Lösungen (pH = 5,5) zu ermitteln, wurden 500 μM NMH-Lösungen für

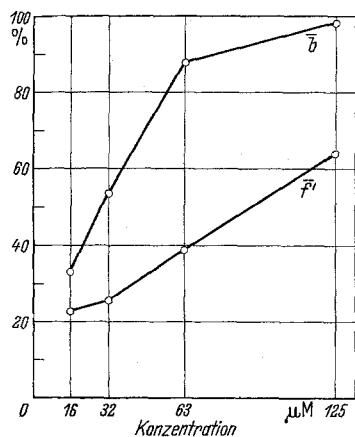


Abb. 2. Einfluß der NMH-Konzentration auf die mittlere Sektorgroße (\bar{b}) und auf die mittlere Rezessivenfrequenz (\bar{f}').

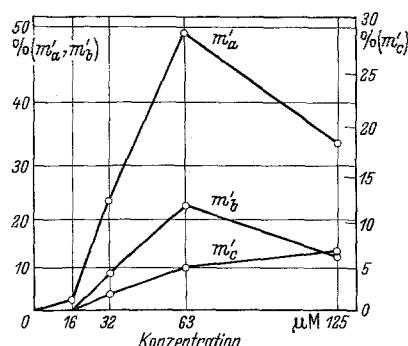


Abb. 3. Einfluß der NMH-Konzentration auf die Frequenz der Chlorophyllmutationen (fc-ch). m'_a = Frequenz spaltender Pflanzennachkommenschaften, m'_b = Frequenz spaltender Schotennachkommenschaften, m'_c = Mutantenfrequenz. Ordinate in negativ logarithmischem Maßstab. (Der Maßstab für m'_c ist um den Faktor 2 vergrößert.) Bei m'_b und m'_c sind die Konfidenzgrenzen für $P = 5\%$ angegeben. Vgl. Tab. 4.

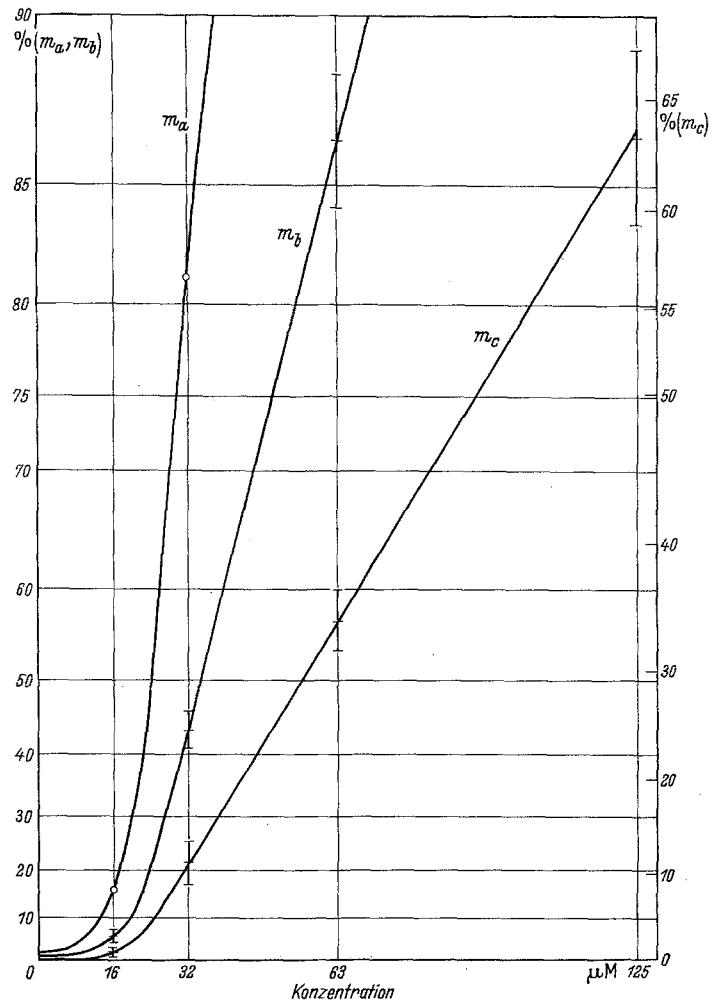


Abb. 4. Einfluß der NMH-Konzentration auf die Frequenz der rezessiven Letalfaktoren. m_a = Frequenz spaltender Pflanzennachkommenschaften, m_b = Frequenz spaltender Schotennachkommenschaften, m_c = Mutantenfrequenz. Ordinate in negativ logarithmischem Maßstab. (Der Maßstab für m_c ist um den Faktor 2 vergrößert.) Bei m_b und m_c sind die Konfidenzgrenzen für $P = 5\%$ angegeben. Vgl. Tab. 3.

24 Std. bei 2° bzw. 24° bzw. 36° C gehalten. Anschließend wurden Samen für 18 Std. bei 24° C mit diesen Lösungen eingequollen und dann unter den üblichen Bedingungen zur Bestimmung des Wachstums der Keimwurzeln angesetzt. (Nach neunstündiger Behandlungsdauer wurden die Lösungen gewechselt.) Die gemessene Wurzellängenreduktion (Abb. 5c) zeigt, daß bei 2° C noch keine erfaßbare Aktivitätsminderung gegenüber der Kontrolle (500 μ M, frischer Ansatz) eintritt. Bei 24° C wurde die Aktivität auf die einer Lösung von rund 100 μ M gesenkt. Nach Hydrolyse bei 36° C ließ sich keine Wirkung der Lösung mehr feststellen, was einer Konzentration von weniger als 32 μ M entspricht.

In einem zweiten Versuch wurde eine 250 μ M NMH-Lösung für 30 bzw. 60 Minuten auf 75° C erhitzt, dann schnell auf 2° C zurückgekühlt. Anschließend wurden Samen für 18 Std. bei 24° C mit diesen Lösungen eingequollen und schließlich auf Wurzellängenreduktion geprüft. Bereits nach 30 Minuten langem Erhitzen hatte sich die Aktivität so stark vermindert, daß keine Wirkung auf das Keimwurzelwachstum mehr nachgewiesen werden konnte.

Relativ langlebige Hydrolyseprodukte von nachweisbarer radiomimetischer Wirksamkeit entstanden somit nicht. Die hydrolysebedingte Aktivitätsminderung war sogar deutlich stärker, als nach der von JANČÍK et al. (1958) angegebenen Verringerung des NMH-Gehalts der Lösung zu erwarten gewesen wäre. Die Ursachen dieses abweichenden Verhaltens sind noch unklar.

5. Konzentrationsversuch

Aufgabe des Konzentrationsversuchs war, Angaben über die Dosisabhängigkeit von Mutationsfrequenz, Sterilitätsgrad und Wurzellängenreduktion zu liefern und die Relationen zwischen diesen drei Wirkungsarten in einem möglichst weiten Bereich zu ermitteln. Die Behandlungstemperatur war in jedem Fall 24° C; die Behandlungszeit betrug 18 Std. Nach 9 Std. wurde jeweils die Behandlungslösung durch eine unhydrolysierte Lösung aus dem gleichen Ansatz ersetzt. Auf Grund der Ergebnisse des Hydrolyseversuchs kann angenommen werden, daß sich die Konzentration während der Behandlungszeit nur um maximal 30% verminderte. Alle Konzentrationsvarianten wurden am gleichen Tag aus der gleichen Stammlösung angesetzt. Die zur Bestimmung der Wurzellänge und die zur Auswertung der Schoten benötigten Samen wurden für jede Konzentration gemeinsam behandelt.

Wie aus Abb. 5a ersichtlich, läßt sich erst mit Konzentrationen höher als 32 μ M eine nachweisbare Wurzellängenreduktion erzielen. Da ein solcher Schwellenwert der Wirkung auch bei Wurzellängenversuchen mit Röntgenstrahlen (MÜLLER, 1964b) auftritt, kann angenommen werden, daß es sich hierbei um eine für das Wurzelwachstum typische Reaktionsweise und nicht um einen für NMH spezifischen Effekt handelt. Im Konzentrationsbereich von 63 bis 250 μ M nimmt die Wurzellängenreduktion dann angenähert linear zu. Der nach Einwirkung von 500 μ M NMH ermittelte Wert ist etwas geringer, als bei einem linearen Kurvenverlauf zu erwarten wäre. Nach Behandlung mit 1 mM Lösung konnte kein

Wurzelwachstum mehr nachgewiesen werden. Noch höhere Konzentrationen ließen keine Keimung mehr zu.

Sterilität ist praktisch erst nach Einwirkung von mindestens 32 μ M Lösungen nachweisbar. Mit weiterer Zunahme der Konzentration steigt der Sterilitätsgrad stetig an und erreicht bei 125 μ M einen Wert von 95,9 (vgl. Tab. 1.). Nach Einwirkung von 250 μ M NMH sind alle M₁-Pflanzen fast vollständig steril (Sterilitätsgrad 99,1).

Die Beziehungen zwischen Mutationsfrequenz und Konzentration der Behandlungslösung sind in Tab. 3 und Abb. 4 dargestellt. Beide Kennziffern (m_b und m_c) zeigen ein im wesentlichen gleiches Verhalten: Bei niederen Konzentrationen steigt die Mutationsfrequenz zuerst nur sehr gering an, doch erhöht sich der Wert des Zuwachses je Konzentrationseinheit stetig (exponentielle Beziehung). Ungefähr von 25 μ M an aufwärts nimmt die Dosis-Effekt-Kurve eine lineare Form an. Die nach Einwirkung von 16 μ M NMH festgestellte Mutantenfrequenz ist mit $\bar{m}_c = 1,20\%$ sehr niedrig. Der Unterschied zur Kontrolle ist jedoch hochsignifikant (*t*-Test: $P \ll 0,1\%$). Die Unterschiede zwischen den Mutantenfrequenzen der höheren Konzentrationsvarianten sind — wie bereits aus den Konfidenzgrenzen für $P = 5\%$ (Abb. 4) zu erkennen ist — in jedem Fall gut gesichert. Nach Einwirkung von 125 μ M NMH war der mutagene Effekt so hoch, daß sämtliche M₁-Pflanzen in ihren Schoten Mutanten aufwiesen. Aus der dabei festgestellten Mutantenfrequenz von $\bar{m}_c = 63,33\%$ kann geschlossen werden, daß im Durchschnitt jede Initialzelle des Sproßscheitels 4,8 Mutationen enthielt (mittlere Anzahl der Mutationen je Zelle

$$M = -\ln(1 - \bar{m}_c) \cdot 1/\bar{f}.$$

Die Anwendung des logarithmischen Ordinatenmaßstabes in Abb. 4 beruht auf folgender Überlegung: Sowohl m_c als auch m_b (und m_a) unterliegen einem Sättigungseffekt, da mit steigender Mutationsfrequenz in zunehmendem Maße Mehrfachmutationen auftreten. Unter der Annahme, daß die Anzahl der Mutationen der Dosis (D) direkt proportional ist (lineare Dosis-Effekt-Beziehung), muß demnach erwartet werden, daß

$$m = 1 - \exp(-kD)$$

ist. Daraus ergibt sich nach Formel (3) bzw. Formel (6)

$$m_b = 1 - \exp(-\bar{k}D)$$

$$m_c = 1 - \exp(-\bar{f}\bar{k}D).$$

Der Exponent ist also bei m_c um den Faktor $\bar{f} = 0,21$ kleiner als bei m_b . Daher muß für m_b ein größerer Sättigungseffekt erwartet werden, was mit den Befunden übereinstimmt. Werden nun neue Ordinatenmaßstäbe von folgender Art eingeführt

$$m_b^* = -\ln(1 - m_b)$$

$$m_c^* = -\ln(1 - m_c),$$

dann ergeben sich lineare Dosis-Effekt-Kurven: $m_b^* = \bar{k}D$ $m_c^* = \bar{f}\bar{k}D$. Der Vorteil des logarithmischen Ordinatenmaßstabes besteht also darin, daß auf diese Weise Abweichungen von der linearen Dosis-Effekt-Beziehung leicht erkannt werden können. Anhand von Sättigungscurven wären solche Abweichungen nur schwer zu beurteilen.

Außer der Kontrolle mit völlig unbehandelten, trocken ausgesäten Samen (tr) wurde noch eine zweite Kontrollvariante mit 18 Std. in Aqua dest. submers eingequollenen Samen (qu) angesetzt. Auf Grund der Befunde von RIEGER und MICHAELIS (1958) hätte erwartet werden können, daß bereits durch die Unterwasser-Quellung der Samen Mutationen ausgelöst werden. Die Ergebnisse (Tabelle 3) zeigen jedoch für die

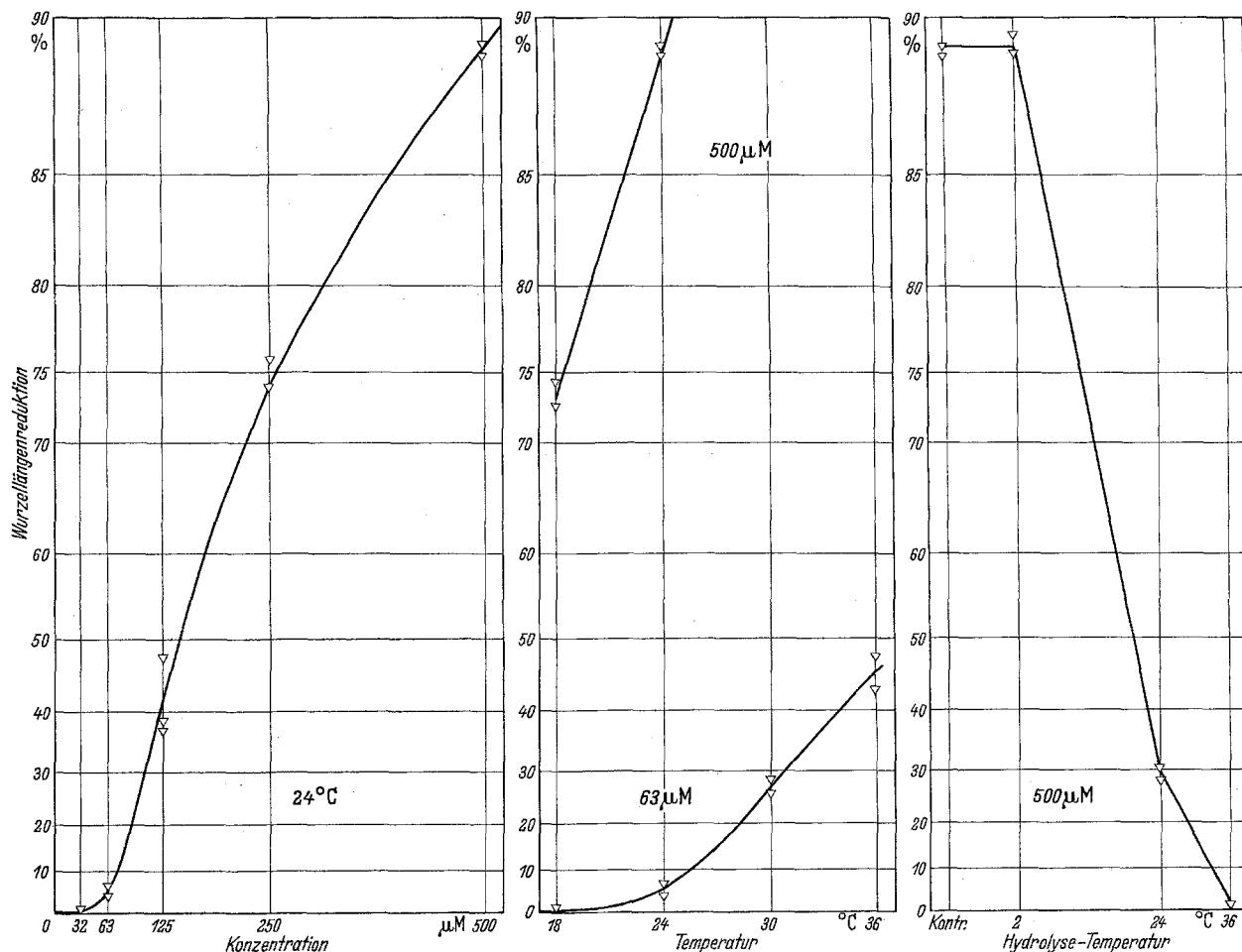


Abb. 5. Wurzellängenreduktion nach 18stündiger Samenbehandlung mit NMH (in % der Kontrolle). — a) in Abhängigkeit von der Konzentration (bei 24 °C Behandlungstemperatur); b) in Abhängigkeit von der Behandlungstemperatur (obere Kurve für 500 μM , untere Kurve für 63 μM); c) in Abhängigkeit von der Temperatur, der die Lösung (Anfangskonzentration: 500 μM) im Verlauf von 24 Std. vor der Behandlung ausgesetzt war (Behandlungstemperatur: 24 °C). Ordinate in negativ logarithmischem Maßstab.

qu-Variante einen etwas geringeren Wert als für die tr-Variante. Der Unterschied ist allerdings nicht signifikant (*t*-Test: $P > 50\%$). Eine Erhöhung der Mutationsfrequenz als Folge des submersen Einquellens ist somit nicht festzustellen.

Die Versuchsergebnisse geben die Möglichkeit zu prüfen, inwieweit die nach verschiedenen Methoden bestimmten Kennziffern m_b und m_o als Schätzwerte von m übereinstimmen und ob eventuell auftretende Differenzen von der Höhe der Mutationsfrequenz bzw. des Sterilitätsgrades abhängen. Insbesondere sollte geprüft werden, ob die mit abnehmender Nachkommenschaftsgröße zu erwartende Unterschätzung von m_b tatsächlich eintritt. Nach Formel (6) wurden aus den Werten für m_b die Schätzwerte von m berechnet (Tab. 3). Die Unterschiede gegenüber den entsprechenden Werten für m_b waren in keinem Fall größer als 1% und zeigten keine deutliche Abhängigkeit von der Höhe des Sterilitätsgrades. Sie lagen stets innerhalb der Konfidenzgrenzen für $P = 5\%$ und können daher nicht als signifikant angesehen werden. Da sowohl positive als auch negative Werte für die Differenz auftreten, kann auch nicht angenommen werden, daß der Umrechnungsfaktor mit $\bar{f} = 0,21$ falsch gewählt worden war. Das wird besonders deutlich, wenn \bar{f} aus den vorliegenden Versuchsergebnissen nach der Formel (5) berechnet wird (Tab. 3). Die \bar{f} -Werte für die beiden Kon-

trollen und für die 16 μM -Variante basieren nur auf einer ziemlich kleinen Anzahl spaltender Nachkommenschaften und sind daher mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Die \bar{f} -Werte für die folgenden Behandlungsvarianten, die jeweils auf 700 bis 1000 spaltenden Schotennachkommenschaften basieren und daher recht genau sein dürfen, schwanken tatsächlich nur in sehr engen Grenzen um den Wert 21%. Es kann also davon ausgegangen werden, daß die NMH-induzierten Letalmutationen im Mittel mit der gleichen Rezessivenfrequenz spalten wie die röntgen-induzierten Letalmutationen, aus deren M_3 - und M_4 -Nachkommenschaften der Wert $\bar{f} = 21\%$ bestimmt worden war (MÜLLER 1963). Der abweichende Wert für die 125 μM -Variante ($\bar{f} = 22,37\%$) deutet darauf hin, daß in diesem Fall der m_b -Wert etwas unterschätzt ist. Hinsichtlich der Beziehungen zwischen m_b und m_o kann also festgestellt werden, daß beide Schätzmethoden nicht zu signifikant verschiedenen Ergebnissen geführt haben. Sogar bei einem Sterilitätsgrad von 95 zeigt m_b nur eine leichte Tendenz zur Unterschätzung, die sich aber nicht statistisch sichern läßt.

Wie aus Abb. 2 ersichtlich, erhöht sich die mittlere Rezessivenfrequenz der spaltenden Schotennachkommenschaften \bar{f} mit zunehmender Konzentration. Ein solches Ergebnis konnte entsprechend Formel (4) als Folge der ansteigenden Mutationsfrequenz erwar-

tet werden. Es ist Ausdruck für die Zunahme von Mehrfachmutationen.

Auch die mittlere Größe des mutierten Sektors \bar{b} nimmt parallel zum Anstieg der Mutationsfrequenz mit der Dosis zu (Abb. 2). Es kann aus dem vorliegenden Material allerdings nicht entschieden werden, welchen Anteil an dieser Zunahme die tatsächliche Vergrößerung der Sektoren hat. Mit steigender Mutationsfrequenz muß nämlich erwartet werden, daß in zunehmendem Maße in einer M_1 -Pflanze zwei und mehr Infloreszenzsektoren mutiert sind. Wegen des relativ häufigen Auftretens ähnlicher Phänotypen ist eine Entscheidung darüber, ob es sich um zwei verschiedene mutierte Sektoren oder um einen großen Sektor handelt, in den meisten Fällen nicht möglich, zumindest nicht, wenn nur fünf Schoten ausgewertet werden. Für den in der $16 \mu\text{M}$ -Variante gefundenen Wert ($\bar{b} = 32,7\%$) kann aber angenommen werden, daß er die tatsächliche mittlere Sektorgröße repräsentiert.

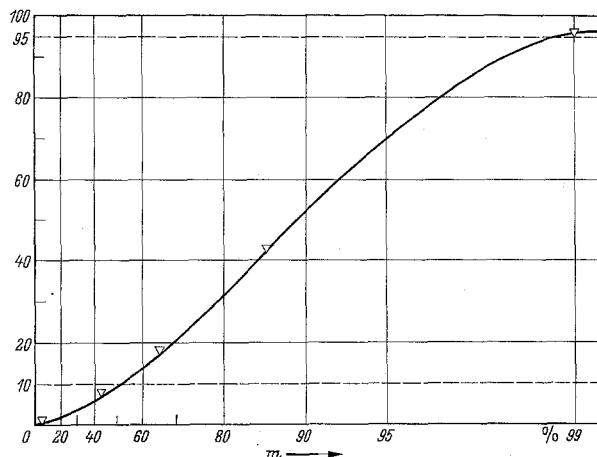


Abb. 6. Beziehung zwischen Mutationsfrequenz (Abszisse) und Sterilitätsgrad (Ordinate). Vgl. Tab. 1 und 3.

sentiert, weil in diesem Fall wegen der geringen Mutationsfrequenz zwei mutierte Sektoren in einer M_1 -Pflanze nur sehr selten zu erwarten sind. Demnach kann für diese Variante im Durchschnitt mit 3 Sektoren je Endfloreszenz gerechnet werden. Allerdings handelt es sich bei dieser Angabe nur um einen Durchschnittswert; die Sektorgrößen der einzelnen M_1 -Pflanzen schwanken in einem weiten Bereich.

Die Ergebnisse des Konzentrationsversuches gestatten, Aussagen über die mutagene Effizienz des NMH bei Samenbehandlung und über die Relationen zwischen somatischer Schädigung, Sterilität und Mutationsfrequenz zu machen. Zur Charakterisierung dieser Relationen hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die Beziehungen zwischen einigen Kardinalwerten anzugeben. Auf diese Weise ist ein einfacher Wirkungsvergleich zwischen verschiedenen Mutagenen möglich. Es ergibt sich somit:

1. Mutationsfrequenz
bei Sterilitätsgrad 95: $99,1\%$
2. Mutationsfrequenz
bei Sterilitätsgrad 10: 50%
3. Mutationsfrequenz
bei 80% Wurzellängenreduktion: $>99,1\%$
4. Sterilitätsgrad
bei 80% Wurzellängenreduktion 100
5. Wurzellängenreduktion
bei Sterilitätsgrad 95: 40%

Die Relation zwischen Mutationsfrequenz und Sterilitätsgrad wird also durch die Werte 1) und 2) charakterisiert, die Relation zwischen Mutationsfrequenz und somatischer Schädigung durch den Wert 3) und die Relation zwischen somatischer Schädigung und Sterilitätsgrad durch die Werte 4) und 5). Aus den Werten 1) und 5) ist ferner ersichtlich, daß einer Mutationsfrequenz von 99,1% eine Wurzellängenreduktion von 40% entspricht. Die Beziehung zwischen Mutationsfrequenz und Sterilitätsgrad ist in Abb. 6 dargestellt.

Als Maß der Effizienz ist die Mutationsfrequenz von 99,1% anzusehen, da es sich als zweckmäßig erwiesen hat, einen Sterilitätsgrad von 95 als maximal zulässigen Wert zu betrachten. (Wäre nicht die Sterilität, sondern die somatische Schädigung der begrenzende Faktor, dann würde die Mutationsfrequenz bei 80% Wurzellängenreduktion als Maß der Effizienz angesehen werden.)

6. Temperaturversuch

Dieser Versuch hatte den Zweck, die Wirksamkeit von NMH bei verschiedenen Temperaturen (18, 24, 30 und 36 °C) während der 18stündigen Behandlungszeit zu prüfen. Die Behandlungslösungen wurden in jedem Fall nach 9 Std. gewechselt. Da auf Grund der Ergebnisse des Hydrolyseversuchs bei den höheren Temperaturen bereits innerhalb von 9 Std. mit einer zunehmenden Minderung der Aktivität des NMH zu rechnen war, mußte von vornherein eine gewisse Unterschätzung der Werte für 30 und 36 °C erwartet werden.

Die Werte für die Wurzellängenreduktion nach Einwirkung von $500 \mu\text{M}$ bzw. $63 \mu\text{M}$ NMH bei verschiedenen Temperaturen sind in Abb. 5b dargestellt. Für beide Konzentrationen ergibt sich mit steigender Temperatur eine stetige und verhältnismäßig starke Zunahme der Wirkung. Nach Einwirkung von $500 \mu\text{M}$ NMH bei 30 ° und 36 °C wurde eine derartig starke Schädigung der Keimlinge gefunden, daß die Reduktionswerte über 95% lagen und daher nicht mehr genau zu bestimmen waren. Bei 36 °C war die Keimungsrate vermindert, das Chlorophyll der Kotyledonen bis zur völligen Ausbleichung geschädigt und ein Wachstum der Keimwurzel nicht mehr nachweisbar. Damit entspricht die Wirkung ungefähr der von 1 mM bei 24 °C. Der sich bei 18 °C für $500 \mu\text{M}$ ergebende Wert ist annähernd gleich dem, der sich bei 24 °C nach Einwirkung von $250 \mu\text{M}$ ergibt. Eine Temperaturerhöhung von 18 auf 36 °C bewirkt also ungefähr den gleichen Wirkungsanstieg wie eine Vierfachung der Konzentration. Ein ähnliches Ergebnis erbrachte der Versuch mit $63 \mu\text{M}$ NMH: Bei 18 °C ist keine Wirkung mehr festzustellen, bei 36 °C konnte eine Wurzellängenreduktion gemessen werden, die etwas über der lag, die nach Einwirkung von $125 \mu\text{M}$ NMH bei 24 °C festgestellt wurde.

In einem weiteren Versuch sollte geprüft werden, ob sich auch für die Mutationsfrequenz ein temperaturabhängiger Wirkungsanstieg ergibt. $32 \mu\text{M}$ NMH kamen bei 24 bzw. 36 °C zur Einwirkung. Durch die Temperaturerhöhung wurde die Mutantenfrequenz (wie auch der Sterilitätsgrad) fast verdoppelt (Tab. 3). Der Unterschied zwischen beiden Mutantenfrequenzen ist nach dem *t*-Test gut gesichert ($P > 0,1\%$). Temperaturerhöhungen bewirken also in gleichem

Maße eine Verstärkung der Wurzellängenreduktion und einen Anstieg der Mutationsfrequenz.

Die Relationen zwischen den verschiedenen Wirkungen waren die gleichen wie im Konzentrationsversuch. Die mutagene Effizienz von NMH ist also unabhängig davon, ob höhere Konzentrationen bei tiefen Temperaturen oder entsprechend geringere Konzentrationen bei höheren Temperaturen appliziert werden.

7. Mutantenspektrum

Die Mutanten können auf Grund ihres Phänotyps zu Gruppen zusammengefaßt werden, die durch bestimmte effektive Letalphasen charakterisiert sind (MÜLLER, 1963). Es werden folgende Typen unterschieden: *sicca* (*sc*), *brevis* (*br*), *vana* (*vn*), *diffusa* (*di*), *murca* (*mr*), *parva* (*pv*), *fusca* (*fc*), *albina* (*ab*), *xantha* (*xa*), *chlorina* (*ch*). Die Reihenfolge entspricht der Aufeinanderfolge der Letalphasen (z. B. *sicca* = frühembryonal letal, *xantha* = Keimlingsletal). In Tab. 4 ist für die auf rezessive Letalfaktoren ausgewerteten Varianten angegeben, welchen Anteil die einzelnen Mutantentypen an der Gesamtzahl der Mutanten haben. Da bei der Routineuntersuchung die Typen *sicca* und *brevis* bzw. *vana* und *diffusa* oft nicht eindeutig unterschieden werden können, wurden sie zu einer Gruppe vereinigt.

Es sollte nun untersucht werden, ob mit ansteigender Dosis (bzw. mit ansteigender Mutationsfrequenz) eine Verschiebung des Mutantenspektrums erfolgt und ob nach NMH-Behandlung ein anderes Mutantenspektrum zu beobachten ist als nach Einwirkung anderer mutagener Agenzien. Aus den in Tab. 4 dargestellten Werten läßt sich keine echte dosisabhängige Verschiebung des Mutantenspektrums erkennen. Die bei den Mutanten mit späten Letalphasen durchweg zu beobachtende Verminderung der Häufigkeitswerte mit steigender Mutationsfrequenz erklärt sich aus der Tatsache, daß im zunehmenden Maße Doppelmutationen auftreten. So werden sich beispielsweise bei einer dihybriden Spaltung mit einem *vana*- und einem *chlorina*-Faktor die *vn vn ch ch*-Genotypen stets als *vana*-Phänotypen manifestieren. Mit ansteigender Mutationsfrequenz kommt es somit zu einem Defizit an Chlorophyllmutanten. Daß die Zunahme der Doppelmutationen tatsächlich die Ursache des Defizits ist, läßt sich auf folgende Weise zeigen: Es wird die Frequenz der Chlorophyllmutanten (*fc*, *ab*, *xa*, *ch*) berechnet:

$$m'_c =$$

Anzahl der *fc-ch*-Mutanten

Anz. d. bewertet. Embryonen-Anzahl d. *sc-pv*-Mutanten

Tabelle 4. Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von NMH und unterschiedlicher Temperaturen während der Behandlungszeit auf das Mutantenspektrum und auf die Frequenz der Chlorophyllmutationen.

Konzentration μM	Temperatur °C	Anzahl der Mutanten	davon je Mutantentyp (in %)								Anteil <i>fc-ch</i>	$\frac{m'_c}{m_c}$	m'_a	m'_b	m'_e
			<i>sc + br</i>	<i>vn + di</i>	<i>mr</i>	<i>pv</i>	<i>fc</i>	<i>ab</i>	<i>xa</i>	<i>ch</i>					
16	24	676	34,3	19,7	24,3	5,3	0	0	1,5	14,8	16,4	16,6	2,7	0,80	0,20
32	24	5332	25,1	35,8	22,6	3,0	0,5	0,4	2,5	10,1	13,5	15,0	23,8	8,80	1,67
32	30	5723	25,1	32,6	27,2	2,5	0,7	0,9	1,0	10,0	12,6	15,6	35,2	14,47	3,09
63	24	9603	26,4	37,0	24,2	1,2	0,4	0,4	1,4	9,0	11,2	16,0	49,1	22,13	5,43
125	24	1221	38,4	31,0	25,4	0,7	0	0,1	1,0	3,4	4,5	10,7	33,3	13,04	6,78

m'_a = Frequenz der für Chlorophyllmutationen (*fc-ch*) spaltenden Pflanzennachkommenschaften (in %)

m'_b = Frequenz der für Chlorophyllmutationen spaltenden Schotennachkommenschaften (in %)

m'_e = Frequenz der Chlorophyllmutanten (in %)

Dabei wird die Anzahl der Chlorophyllmutanten nicht auf die Gesamtzahl der Embryonen bezogen, sondern nur auf die Anzahl der nicht embryonal letalen Embryonen, also auf jene, in denen sich die Chlorophyllmutationen tatsächlich manifestieren können. Es wird somit in gleicher Weise vorgegangen wie bei der Bestimmung der Frequenz der Chlorophyllmutanten auf Grund einer Auswertung im Keimlingsstadium. Auf diese Weise bleiben die m'_e -Werte frei von dem oben erwähnten Defizit. Mit Hilfe von m'_e läßt sich nun ein gleichfalls defizitfreier Wert für den Anteil der *fc-ch*-Mutanten an der Gesamtzahl der Mutanten berechnen, und zwar als m'_c/m_e .

Wie aus Tab. 4 ersichtlich, sind die auf diese Weise berechneten Werte tatsächlich invariant gegenüber der Höhe der Mutationsfrequenz. Es ergibt sich ziemlich einheitlich ein Wert von 16% für den Anteil der Chlorophyllmutanten. Nur in der 125 μM-Variante tritt ein stark abweichender Wert auf. Da dieser aber auf einem sehr geringen Material basiert, kann die Abweichung als zufallsbedingt angesehen werden.

Der Anteil der Chlorophyllmutanten an der Gesamtzahl der Mutanten ist zur Beurteilung von möglichen Verschiebungen im Mutantenspektrum sehr gut geeignet, und zwar aus folgenden Gründen: Die Anzahl der zu dieser Gruppe gehörenden Mutanten ist relativ hoch, so daß Zufallsabweichungen eine geringere Rolle spielen. (Kleinere Gruppen, wie z. B. die *xantha*-Mutanten, würden im stärkeren Maße Zufallsschwankungen unterliegen.) Die Chlorophyllmutanten sind von den anderen Mutantentypen deutlich abgegrenzt; Fehlklassifizierungen sind praktisch ausgeschlossen. Und schließlich wären solche Änderungen des Mutantenspektrums, die die Relation zwischen Faktoren mit früher Letalphase und Faktoren mit später Letalphase verschieben, noch am ehesten zu erwarten. Wenn daher — wie im vorliegenden Fall — der Anteil der Chlorophyllmutanten nicht verändert wird, so kann mit ziemlicher Sicherheit eine dosisabhängige Verschiebung des Mutantenspektrums ausgeschlossen werden.

Auch bei Beschränkung auf die Chlorophyllmutationen lassen sich zusätzlich zu der bereits erwähnten Mutationsfrequenz (m'_e) die Frequenz spaltender Pflanzennachkommenschaften (m'_a) und die Frequenz spaltender Schotennachkommenschaften (m'_b) berechnen (Tab. 4, Abb. 3). Als Berechnungsgrundlage dient in diesem Fall natürlich die Gesamtzahl der bewerteten Pflanzennachkommenschaften bzw. Schotennachkommenschaften. Auffällig ist bei den Werten für m'_a und m'_b ein mit ansteigender Dosis zunehmendes

Defizit gegenüber den bei linearen Dosis-Effekt-Beziehungen zu erwartenden Werten. Auf die Ursachen dieser Erscheinung soll in der Diskussion noch eingegangen werden.

IV. Diskussion

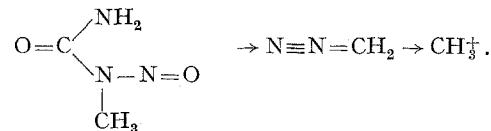
Eine der Aufgaben der dargestellten Versuche war, die Methoden zur Bestimmung der Mutationsfrequenz, die auf Grund von Untersuchungen der chimaerischen Struktur der M_1 -Pflanzen vorgeschlagen worden waren (MÜLLER, 1964a), in einem weiten Dosisbereich zu überprüfen. Dabei ergab sich eine außerordentlich gute Übereinstimmung zwischen den beiden, auf verschiedenen Auswertungsverfahren basierenden Schätzwerten der Mutationsfrequenz (Frequenz spaltender Schotennachkommenschaften und Mutantenfrequenz). Selbst bei einem Sterilitätsgrad von 95 ließ sich noch keine deutliche Unterschätzung der Mutationsfrequenz durch die Frequenz spaltender Nachkommenschaften nachweisen. Für diese gute Übereinstimmung ist in erster Linie die Tatsache entscheidend, daß nur Schoten mit mehr als 3 Samen ausgewertet wurden, im letztgenannten Fall also nur 10% aller untersuchten Schoten. Diese Maßnahme hat sich somit als ausreichend erwiesen, um auch bei hohen Sterilitätsgraden ein genaues Ergebnis zu garantieren.

Ganz andere Beziehungen ergaben sich, wenn nur die Chlorophyllmutationen erfaßt wurden (Abb. 3). Da in diesem Fall die embryonal letalen Samen (die im Extremfall fast 60% aller Samen ausmachten) aus der Berechnung ausgeschlossen werden müssen, ergeben sich viel geringere Werte für die Größe der Schotennachkommenschaften. Damit ist die Wahrscheinlichkeit, daß eine Mutation nicht durch Mutanten in der Nachkommenschaft repräsentiert wird, wesentlich erhöht, und es zeigt sich sehr deutlich der von GAUL (1957, 1960, 1963) bereits bei der Gerste für die Chlorophyllmutationenfrequenz nachgewiesene Effekt, daß die Werte für die Frequenz spaltender Nachkommenschaften mit zunehmender Sterilität in steigendem Maße unterschätzt werden. Daß dieses Phänomen tatsächlich nur durch die Auswertungsmethodik bedingt ist, ergibt sich aus dem Vergleich mit der Dosis-Effekt-Kurve für die Mutantenfrequenz, die gegenüber der Nachkommenschaftsgröße invariant ist und daher keine derartige Unterschätzung erfährt. Da die gut übereinstimmenden Ergebnisse für die Letalmutationsfrequenz aus dem gleichen Material gewonnen wurden, demonstriert der Versuch besonders deutlich den Einfluß der Nachkommenschaftsgröße auf die verschiedenen Schätzwerte der Mutationsfrequenz. Solange dieser Einfluß nicht durch eine entsprechende Auswertungsmethode eliminiert wird, können sich also völlig falsche Werte für die Mutationsfrequenz ergeben. Das gilt ganz besonders, wenn als Berechnungsgrundlage die Nachkommenschaften ganzer Pflanzen oder Infloreszenzen gewählt werden. In diesem Fall sind sogar noch zusätzliche Fehlerquellen wirksam (vgl. MÜLLER, 1964a). Die bisher publizierten Ergebnisse über Frequenzen von Chlorophyll- und Vitalmutationen bei *Arabidopsis* müssen daher entsprechend interpretiert werden. Auf Grund unserer Versuchsergebnisse kann auch erwartet werden, daß die für die Dosis-Effekt-Beziehungen mancher chemischer Mutagene gefundenen

Optimumkurven nur durch eine ungeeignete Auswertungsmethodik zustande gekommen sind, in Wirklichkeit aber lineare (bzw. exponentielle) Beziehungen bestehen. Derartige Kurven ergaben sich beispielsweise für Äthylenoxyd, Äthylenimin und Diäthylsulfat (EHRENBERG, 1960). Beachtenswert ist auch, daß das Absinken der Dosis-Effekt-Kurven für die Frequenz spaltender Nachkommenschaften nach Einwirkung hoher NMH-Konzentrationen (Abb. 3) so ausgeprägt ist, daß der Unterschied zwischen Endwert und Maximalwert als statistisch sehr gut gesichert erscheint: Bei $63 \mu\text{M}$ wurden $328 M_1$ -Pflanzen bewertet, es ergab sich $m_a = 49,1\%$. Bei $125 \mu\text{M}$ wurden 48 M_1 -Pflanzen bewertet, es ergab sich $m_a = 33,3\%$. Der χ^2 -Test würde den Unterschied mit $P \ll 0,1\%$ als hochsignifikant ausweisen.

Ein Vergleich zwischen den Werten für die Letalmutationsfrequenz und denen für die Chlorophyllmutationsfrequenz zeigt sehr deutlich, daß die erstgenannte den mutagenen Effekt viel genauer zu erfassen imstande ist. Ferner ist ersichtlich, daß die Letalmutationsfrequenz bei Werten bis zu etwa 90% auch durch die Frequenz spaltender Schotennachkommenschaften (m_b) genügend genau geschätzt werden kann. In vielen Fällen könnte also auf die Bestimmung der Mutantenfrequenz verzichtet werden, wodurch sich eine weitere Vereinfachung der Methodik ergäbe. Allerdings muß dann vorausgesetzt werden, daß die nicht-genetisch bedingte Embryonenletalität kein größeres Ausmaß annimmt als in den vorliegenden Versuchen. Insbesondere bei ungünstigen Umweltbedingungen kurz nach der Blüte und bei allgemein schlechter Entwicklung der Pflanzen kann die Anzahl der letalen Embryonen erhöht sein. Solange gleichzeitig die Mutantenfrequenz bestimmt wird, läßt sich das Ausmaß der nicht-genetischen Letalität leicht aus der Verringerung der \bar{f} -Werte und des Anteils der Chlorophyllmutationen schätzen.

Zur Erklärung des Wirkungsmechanismus von NMH kann die Tatsache dienen, daß NMH sich in wässriger Lösung unter Abgabe von Diazomethan relativ leicht zersetzt. Das entstehende Diazomethan ist in wässriger Lösung äußerst instabil. Bei seinem Zerfall entsteht unter Abgabe von N_2 ein Carbeniumion, das zu Methylierungen im genetischen Material führen kann:



Die Befunde von MARQUARDT et al. (1963) bei *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, daß sowohl Diazomethan als auch NMH und andere Diazomethan freisetzende Nitrosamide mutagen wirken. NMH führt auch bei *Drosophila* zur Induktion rezessiver Letalfaktoren (PASTERNAK, 1963, RAPOPORT, 1963). Obwohl die mutagene Wirkung des Diazomethans bereits seit langem bekannt ist (RAPOPORT, 1948, JENSEN et al., 1949), hat doch erst die Entdeckung der carcinogenen Wirkung von Nitrosaminen (MAGEE und BARNES, 1956) und von Diazomethan (SCHOENTHAL, 1960) zu einer systematischen Prüfung der zur Freisetzung von Diazomethan befähigten Verbindungen geführt. Nach DRUCKREY et al. (1961) hat sich auch NMH in Versuchen mit Ratten als starkes Carcinogen erwiesen.

Auf Grund aller bisherigen Befunde wird deutlich, daß in der Gruppe der Nitrosamide und Nitrosamine eine Parallelität zwischen carcinogener und mutagener Wirkung besteht, die für beide Prozesse das Diazomethan als eigentliche Wirkform anzusehen gestattet. Diazomethan selbst führt nach den vorliegenden Ergebnissen nur zu geringen Mutationsraten. Die wesentlich höhere mutagene Wirksamkeit von NMH würde verständlich, wenn man NMH als zwar leicht aktivierbare, aber selbst unwirksame Transportform betrachtet, die leicht in die Zellen eindringen kann und erst dort die Wirkform, das Diazomethan, freisetzt. NMH müßte dann, genau wie Diazomethan, als monofunktionelles Methylierungsmittel angesehen werden.

Der vollständige Aktivitätsverlust von NMH-Lösungen nach Hydrolysezeiten, die in keinem Fall länger waren als die zur Zersetzung des NMH nötigen Zeiten (Abb. 5c), schließt das Entstehen relativ langlebiger Hydrolyseprodukte von radiomimetischer Wirksamkeit aus. Dieser Befund ist im Lichte des vorstehend erwähnten Wirkungsmechanismus völlig verständlich: Die hydrolytische Zersetzung des NMH führt zu Diazomethan, das in wäßriger Lösung sehr schnell inaktiviert wird.

Die mutagene Wirkung von NMH konnte durch eine Erhöhung der Temperatur während der Behandlungszeit wesentlich gesteigert werden (Abb. 5b). Die gleiche Temperaturabhängigkeit zeigten auch die rein toxischen Wirkungen (Verhinderung der Keimung, Chlorophyllschädigung). Zur Erklärung dieses Phänomens bietet sich in erster Linie die Tatsache an, daß die postulierte Wirkform Diazomethan erst aus NMH freigesetzt werden muß, dieser Prozeß aber, wie aus dem Hydrolyseversuch deutlich wird, stark temperaturabhängig ist. Ob die Zersetzung des NMH in der Zelle mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgt wie in einer reinen Lösung oder ob sie, eventuell durch das Wirken von Enzymen, wesentlich beschleunigt wird, kann natürlich nicht entschieden werden. Auch ist nicht auszuschließen, daß der Reaktionsschritt vom Diazomethan zum methylierten Endprodukt einen gewissen Anteil am Zustandekommen der Temperaturabhängigkeit hat. Die Beschleunigung der Permeation durch erhöhte Temperaturen spielt dagegen sicher nur eine untergeordnete Rolle, da nach unseren Erfahrungen die Samen von *Arabidopsis* bereits nach 4 Std. (bei 24 °C) maximale Mengen der Behandlungslösung aufgenommen haben, so daß im weiteren Verlauf der 18stündigen Behandlungszeit die NMH-Konzentration in der Zelle ungefähr konstant bleiben dürfte.

Die gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden Schätzverfahren für die Mutationsfrequenz gibt uns das Recht, die gefundene Abhängigkeit der Letalmutationsfrequenz von der Konzentration (Abb. 4) als real zu betrachten. Demnach steigt die Dosis-Effekt-Kurve im unteren Konzentrationsbereich exponentiell an und geht bei 30 μM zu einem linearen Anstieg über. Ähnliche Dosis-Effekt-Kurven wurden auch für 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin (NG) (MÜLLER und GICHNER, 1964) und für Äthylmethansulfonat (AMS) (MÜLLER, unveröff.) gefunden. Bei Anwendung von Röntgenstrahlen konnte dagegen im niederen Konzentrationsbereich keine Abweichung von der Linearität festgestellt werden (MÜLLER,

unveröff.). Dieser Wirkungsunterschied legt es nahe, die Erklärung für die unterproportionale Effektivität geringer Konzentrationen bei Vorgängen zu suchen, die mit dem Transport des mutagenen Agens zum genetischen Material im Zusammenhang stehen. Demnach bestehen zur Erklärung des Phänomens zwei Möglichkeiten:

1. Die Hydrolyserate in der Behandlungslösung hat bei geringen Konzentrationen wesentlich höhere Werte als bei hohen Konzentrationen. Während der 18stündigen Einwirkung auf die Samen würden sich also schwache Lösungen schneller zersetzen, so daß die mittlere effektive Konzentration weit unter der Anfangskonzentration liegt.

2. Die nach Eindringen in die Zelle stattfindende Zersetzung des NMH ist konzentrationsabhängig. Demzufolge müßte sich das inaktivierende Prinzip mit zunehmender Anreicherung von NMH in der Zelle allmählich erschöpfen, so daß einem weiteren Anstieg der NMH-Konzentration nicht mehr entgegengewirkt werden kann.

Eine Entscheidung zwischen den beiden Möglichkeiten ist auf Grund der vorliegenden Ergebnisse noch nicht möglich.

Sieht man von der unterproportionalen Effektivität geringer Konzentrationen ab, so lassen sich keine deutlichen Abweichungen von einer linearen Dosis-Effekt-Beziehung feststellen. NMH wirkt also — genau wie andere alkylierende Agensien — als typisches Treffergift; die hier erfaßten Letalmutationen müssen in der überwiegenden Mehrzahl als Eintrefferereignisse angesehen werden. Ein gewisser Anteil von Mehrtrefferereignissen kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, weil die dadurch bedingte Abweichung von der Linearität so klein wäre, daß sie noch in den Rahmen möglicher Versuchsfehler fallen würde. (Vgl. die in Abb. 4 eingetragenen Konfidenzgrenzen.)

Nach 18stündiger Behandlung mit 125 μM NMH konnte eine Letalmutationsfrequenz von 99,16% (Mutantenfrequenz 63,33%) ermittelt werden. Dieser Befund würde also bedeuten, daß in 99,16% aller Initialzellen des Sproßscheitels mindestens eine rezessive Letalmutation induziert worden ist. Unter der Annahme, daß die Verteilung der Mutationen auf die Zellen der Poisson-Verteilung folgt, müssen demnach je Initialzelle durchschnittlich 4,8 rezessive Letalmutationen entstanden sein. Daß die Annahme zu Recht besteht, geht aus der Tatsache hervor, daß die Werte für die Frequenz spaltender Schotennachkommenschaften mit den entsprechenden Werten für die Mutantenfrequenz übereinstimmen. Eine Übereinstimmung kann nämlich nur dann erwartet werden, wenn die Verteilung der Mutationen der Poisson-Verteilung folgt. Natürlich stellt die Mutationsfrequenz von 99,16% keinen absoluten Maximalwert dar. Bei entsprechender Vergrößerung des Versuchsumfangs hätten auch die nach Einwirkung höherer Konzentrationen zu erwartenden höheren Mutationsfrequenzen bestimmt werden können, allerdings kaum mit genügender Genauigkeit.

Die Ergebnisse über die Abhängigkeit des Sterilitätsgrades von der Konzentration beanspruchen besonderes Interesse, da die Sterilität (wie auf S. 107 bereits genauer ausgeführt) im wesentlichen als genetisch bedingt angesehen werden muß. Wie aus Abb. 6 ersichtlich, erfolgt die Zunahme der Sterilität parallel

zur Zunahme der Mutationsfrequenz. Der Sterilitätsgrad steigt zwar ausgeprägt exponentiell an, da aber seine Berechnungsweise keinen Schluß auf die Frequenz der haplophasischen Letalfaktoren zuläßt, kann der Kurvenverlauf nicht für treffertheoretische Überlegungen benutzt werden. Entscheidend ist jedoch, daß eine ganz eindeutige Abhängigkeit zwischen Sterilitätsgrad und Mutationsfrequenz besteht und damit die oft geäußerte Vermutung, die nach Behandlung von Pflanzen mit chemischen Mutagenen auftretende Sterilität sei vornehmlich physiologisch bedingt, zumindest in diesem Fall nicht zutreffen kann. Auch in den unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchen mit 1-Methyl-3-nitro-1-nitroso-guanidin (NG) und Äthylmethansulfonat (ÄMS) konnten ganz ähnliche Beziehungen gefunden werden. Versuche mit Röntgenstrahlen (MÜLLER, unveröff.) ergaben gleichfalls eine klare Abhängigkeit zwischen Sterilitätsgrad und Mutationsfrequenz, allerdings bei wesentlich geringeren Werten für die Mutationsfrequenz. Ein Sterilitätsgrad von 10 ist bei den genannten chemischen Mutagenen mit einer Mutationsfrequenz von 50%, bei Röntgenstrahlen mit einer Mutationsfrequenz von 15% verbunden. Einem Sterilitätsgrad von 95 entspricht bei den chemischen Mutagenen eine Mutationsfrequenz von 99%. In Versuchen mit Röntgenstrahlen lassen sich wegen der stärkeren somatischen Schädigung derartig hohe Sterilitätsgrade nicht mehr bestimmen, durch Extrapolation kann aber einem Sterilitätsgrad von 95 eine Mutationsfrequenz von rund 54% zugeordnet werden. NMH, ÄMS und NG induzieren also im Vergleich mit Röntgenstrahlen bei gleichem Sterilitätsgrad 4 bis 6 mal mehr rezessive Letalmutationen. Dieser Wirkungsunterschied zwischen den genannten alkylierenden Agenzien und Röntgenstrahlen weist auf unterschiedliche Aberrationsspektren bzw. auf einen Unterschied in der Relation zwischen Chromosomenaberrationen und Punktmutationen hin.

Ein weiterer Unterschied zwischen der Wirkung von Röntgenstrahlen und der von NMH konnte hinsichtlich der relativen Höhe der Wurzellängenreduktion gefunden werden. Eine Wurzellängenreduktion von 40% ist bei NMH mit einem Sterilitätsgrad von 95 und einer Mutationsfrequenz von 99,1% verbunden, bei Röntgenstrahlen mit einem Sterilitätsgrad von 10 und einer Mutationsfrequenz von rund 15%. Nach Einwirkung von NMH entstehen also bei gleicher Wurzellängenreduktion rund 30 mal mehr rezessive Letalmutationen als nach Einwirkung von Röntgenstrahlen. ÄMS und NG verhalten sich auch in dieser Hinsicht ganz ähnlich wie NMH. Da insbesondere die umfangreichen Untersuchungen an Keimwurzeln von *Vicia faba* (READ, 1959) gezeigt haben, daß die strahlenbedingte Hemmung des Keimwurzelwachstums im wesentlichen auf der Induktion von Chromosomenaberrationen beruht, ist aus diesem Befund abzuleiten, daß NMH wesentlich weniger Aberrationen auslöst als Röntgenstrahlen. Da keineswegs feststeht, daß auch die durch NMH bewirkte Wachstumshemmung praktisch ausschließlich durch Aberrationen bedingt ist, wäre es sogar möglich, daß die Aberrationsfrequenz nach Einwirkung von NMH noch geringer ist als $1/30$ der strahlenbedingten Aberrationsfrequenz. NMH führt nachweisbar in stärkerem Maße als Röntgenstrahlen zu extrachromosomal-

len Schädigungen. Als rein extrachromosomale Effekte können insbesondere die nach Einwirkung höherer NMH-Konzentrationen beobachtete Abtötung der behandelten Samen und die Chlorophyllschädigung in den Kotyledonen angesehen werden. Derartige Effekte lassen sich mit Röntgenstrahlen auch bei Anwendung von sehr hohen Dosen, die das Keimwurzelwachstum völlig unterbinden, nicht erzielen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß an der Hemmung des Keimwurzelwachstums durch NMH-Behandlung der Samen auch rein toxische (extrachromosomale) Wirkungen beteiligt sind.

Schließlich hätte erwartet werden können, daß auch die Relationen zwischen den einzelnen Typen von rezessiven Letalmutationen (Mutantenspektrum) von der Art des verwendeten Mutagens abhängig sind. Das scheint aber für die bisher untersuchten Mutagene nicht der Fall zu sein. Beschränken wir uns auf die klar umgrenzten und hinsichtlich der effektiven Letalphasen deutlich unterschiedenen Haupttypen, die embryonalen Letalmutationen und die letalwirkenden Chlorophyllmutationen, so verhalten sich deren Häufigkeit wie 84 : 16 (Mutantenfrequenzen). Genau die gleiche Relation wurde nach Einwirkung von ÄMS und NG gefunden. Auch bei röntgeninduzierten Letalmutationen liegen die relativen Häufigkeiten der beiden Haupttypen in der gleichen Größenordnung. Da erwartet werden kann, daß Chlorophyllmutationen wegen der späteren Letalphase häufiger auf Punktmutationen beruhen als embryonale Letalmutationen, hätten sich Verschiebungen im Anteil der Punktmutationen als Verschiebungen im Anteil der Chlorophyllmutationen bemerkbar machen müssen. Aus den Versuchsergebnissen kann somit gefolgt werden, daß zwischen NMH, ÄMS, NG und Röntgenstrahlen keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Beteiligung von Punktmutationen an den rezessiven Letalmutationen bestehen. Wie hoch der Anteil von Punktmutationen (bzw. der von kleinen Defizienzen und Duplikationen) tatsächlich ist, läßt sich nicht sagen, insbesondere da auch für andere Pflanzen darüber keine Versuchsergebnisse vorliegen.

Versucht man, von den verschiedenen makroskopischen Effekten auf die diesen zu Grunde liegenden mikroskopischen Effekte zurückzuschließen, so gelangt man zu folgenden Ergebnissen: NMH induziert Punktmutationen und die verschiedenen Typen von Chromosomenaberrationen ungefähr in der gleichen relativen Häufigkeit wie ÄMS und NG. Im anderen Fall wäre die gute quantitative Übereinstimmung in allen makroskopischen Effekten kaum zu erklären. Sowohl für ÄMS (RIEGER und MICHAELIS, 1960) als auch für NG (GICHNER et al., 1963) ist bekannt, daß sie größere, d. h. bei *Vicia faba* in der Metaphase erkennbare Aberrationen induzieren. Mit NMH konnten zwar bei *Vicia faba* keine Aberrationen ausgelöst werden (KIHLMAN, 1960), doch entstehen nach Einwirkung von NMH auf Ascites-Zellen der Maus Aberrationen in großer Zahl (SCHÖNEICH, persönl. Mitteilung).

Die Wirkungsunterschiede zwischen NMH und Röntgenstrahlen sind nur zu erklären, wenn man unterschiedliche Aberrationsspektren und eventuell auch unterschiedliche Relationen zwischen Aberra-

tionen und Punktmutationen zu Grunde legt. Aus den Versuchsergebnissen folgt:

1. Sowohl die wachstumshemmend wirkenden als auch die Sterilität bedingenden Aberrationen treten mit geringerer Häufigkeit auf als nach Röntgenbestrahlungen.

2. Diese Verminderung betrifft die wachstums- hemmend wirkenden Aberrationen in wesentlich stärkerem Maße als die Sterilität bedingenden Aberrationen.

An der Wachstumshemmung der Scheitelmeristeme können nur Aberrationen beteiligt sein, die groß genug sind, um bereits im heterozygoten Zustand die betroffenen Zellen abzutöten oder deren Teilungsrate zu vermindern. Es handelt sich also in erster Linie um größere Defizienzen. Dieser Aberrationstyp muß somit nach Röntgenbestrahlung mindestens 30 mal häufiger sein als nach NMH-Einwirkung.

In den Sporenmutterzellen der M_1 -Pflanzen können wegen der interzellulären Konkurrenz im Sproßmeristem nur noch solche Aberrationen vorliegen, die heterozygot nicht schädigend auf die Meristemzellen wirken, also Translokationen, Inversionen, Duplikationen und kleine Defizienzen. Zwar kann keiner dieser Aberrationstypen den haplophasischen bzw. den rezessiven Letalfaktoren generell zugeordnet werden, doch dürfte feststehen, daß die größeren der noch vorhandenen Defizienzen vorwiegend in der Haplophase wirken, während die kleineren Defizienzen und die meisten Duplikationen erst in der folgenden Diplophase im homozygoten Zustand wirksam werden, also entweder als rezessive Letalmutationen oder als rezessive Vitalmutationen in Erscheinung treten. Aus Translokationen und Inversionen können im Verlauf der Meiose größere Defizienzen entstehen, die dann in der Regel zu haplophasischer Letalität führen. Wenn daher die Sterilität um das 4 bis 6fache vermindert ist, so kann das bedeuten, daß sich entweder die Häufigkeit der Translokationen und Inversionen oder die Häufigkeit der „mittelgroßen“ Defizienzen entsprechend verringert hat oder daß alle diese Aberrationstypen eine Verminderung erfahren haben. Eine Entscheidung zwischen diesen Möglichkeiten kann nur mit Hilfe cytologischer Untersuchungen getroffen werden. Solche Untersuchungen liegen für die Wirkung anderer chemischer Mutagene für andere Objekte vor.

Bei *Drosophila* (vgl. die Übersichten bei AUERBACH, 1958, 1960, FAHMY und FAHMY, 1958; sowie SLIZYNSKA, 1963) ist im Vergleich mit Röntgenstrahlen (bei gleichen Frequenzen von geschlechtsgekoppelten Letalfaktoren) die Häufigkeit von Translokationen und Inversionen stark vermindert, die Häufigkeit von kleinen Defizienzen aber ungefähr verdoppelt. Allerdings bestehen zwischen verschiedenen chemischen Mutagenen Unterschiede insbesondere hinsichtlich der relativen Höhe der Häufigkeit von größeren Aberrationen. In Versuchen mit Gerste (KONZAK et al., 1961) hat sich gezeigt, daß nach Behandlung mit Diäthylsulfat und ÄMS bei gleicher Chlorophyllmutationsfrequenz sowohl wesentlich weniger Anaphasenbrücken und Fragmente (in den Mitosen des Wurzelmeristems) als auch wesentlich weniger Translokationen (in der Meiose) nachzuweisen sind als nach Gammabestrahlung. Ganz

allgemein scheint die Verminderung der Translokations- und Inversionsfrequenz ein zumindest gleich hohes Ausmaß zu haben wie die Verminderung der Häufigkeit von größeren Defizienzen. Das würde bedeuten, daß nach NMH-Behandlung sehr viel weniger ($\frac{1}{30}$ oder weniger) Translokationen und Inversionen auftreten als nach Röntgenbestrahlung und folglich die Unterschiede in der Höhe des Sterilitätsgrades bereits durch diesen Effekt vollständig erklärt werden können. Eine Verminderung der Häufigkeit von „mittelgroßen“ Defizienzen wäre angesichts der bei *Drosophila* gefundenen Verhältnisse ziemlich unwahrscheinlich. Es kann daher erwartet werden, daß die nach Einwirkung von NMH zu beobachtende Sterilität vorwiegend auf kleineren Defizienzen (und möglicherweise auch auf Punktmutationen) beruht.

Von grundsätzlicher Bedeutung für die praktische Ausnutzung von NMH ist die Frage, ob den hohen Letalmutationsfrequenzen auch hohe Frequenzen an Vitalmutationen entsprechen. Ergebnisse über die Auslösung von Vitalmutationen liegen für NMH bisher noch nicht vor. Vergleicht man jedoch die sich nach Einwirkung von Röntgenstrahlen bzw. ÄMS ergebenden Letalmutationsfrequenzen (MÜLLER, unveröff.) mit den ebenfalls bei *Arabidopsis* unter Verwendung der gleichen Agenzien gefundenen Vitalmutationsfrequenzen (McKELVIE, 1963), so zeigt sich, daß die Relation zwischen beiden Mutationsarten von der Art des verwendeten Agens nicht wesentlich beeinflußt wird. Es kann daher angenommen werden, daß nach Einwirkung von NMH auch sehr hohe Vitalmutationsfrequenzen auftreten.

Die mutagene Effizienz von NMH wird durch eine maximale Mutationsfrequenz von 99,1% charakterisiert. Diesem Wert entspricht ein Sterilitätsgrad von 95 und eine Wurzellängenreduktion von 40%. Eine Beeinflussung der Effizienz durch die Behandlungstemperatur konnte im Bereich von 18 bis 36 °C nicht festgestellt werden.

Sowohl der Wert für die Effizienz als auch die Angaben über die Relationen zwischen Mutationsfrequenz, Sterilität und somatischer Schädigung entsprechen ziemlich genau den Ergebnissen für Äthylmethansulfonat. NMH gehört somit zu der bisher noch recht kleinen Gruppe von chemischen Mutagenen, die auf Pflanzen nur in sehr geringem Maße toxisch wirken und daher eine wesentlich höhere Effizienz erreichen als ionisierende Strahlen. Die maximale Letalmutationsfrequenz nach Anwendung von Röntgenstrahlen liegt nach unseren bisherigen Befunden bei 50% (was einer durchschnittlichen Anzahl der Mutationen je Zelle von 0,7 entspricht). Bei Anwendung der hochwirksamen alkylierenden Agenzien können somit rund 7mal mehr Mutationen induziert werden als nach Anwendung von Röntgenstrahlen. Da als begrenzender Faktor für die Mutationsfrequenz von NMH nicht die somatische Schädigung, sondern die Sterilität wirkt, wäre eine weitere Steigerung der Effizienz nur dann möglich, wenn Mutagene gefunden würden, die zu einer noch günstigeren Relation zwischen Sterilitätsgrad und Mutationsfrequenz führen.

Für die Verwendung in der Pflanzenzüchtung bietet Nitrosomethylharnstoff viele Vorteile: Genau wie ÄMS zeichnet er sich durch sehr hohe Effizienz

und (im Vergleich zu ionisierenden Strahlen) stark verminderte Sterilität aus. Hinsichtlich seiner molaaren Effektivität ist NMH wesentlich günstiger als ÄMS. Unter gleichen Behandlungsbedingungen ergeben $6,5 \cdot 10^{-5} M$ NMH den gleichen mutagenen Effekt wie $2 \cdot 10^{-2} M$ ÄMS. Diese 300mal höhere Effektivität, die auch theoretisch von Interesse ist, läßt die Kosten für das mutagene Agens auch bei Großversuchen äußerst gering bleiben. Hinzu kommt, daß NMH nach Standardvorschriften¹ einfach und schnell synthetisiert werden kann. NMH ist eine kristalline, in dem benötigten Konzentrationsbereich gut wasserlösliche Substanz, die bei Temperaturen unter $+10^\circ C$ lange Zeit unverändert haltbar ist. Hautreizungen werden bei Arbeiten mit NMH nicht beobachtet. Bedenklich ist allerdings die starke carcinogene Wirkung (vgl. DRUCKREY et al., 1961). Die allgemein bei Arbeiten mit chemischen Mutagenen gebotenen Vorsichtsmaßregeln sind in diesem Fall also ganz besonders zu beachten. Andauernde Verunreinigungen von Geräten usw. durch NMH sind nicht zu befürchten, da sich die Substanz in wäßrigen Lösungen relativ schnell zersetzt. Diese hydrolytische Inaktivierung erfolgt allerdings nicht so schnell, daß eine Behandlung von großen Samen Schwierigkeiten bereiten würde.

Summary

1. Seeds of *Arabidopsis thaliana* were treated for 18 hr with various concentrations of nitrosomethylurea at different temperatures. The following effects have been evaluated: (a) somatic damage (especially killing of treated seeds, inhibition of the growth of primary roots, reduction of survival of M_1 plants), (b) sterility of M_1 plants, (c) frequency of recessive lethals (embryonic lethals and chlorophyll mutations).

2. The procedure for the determination of mutation frequencies proposed on the basis of investigations in the chimerical structure of M_1 plants (MÜLLER, 1964a) has proved a success. The estimations of lethal mutation frequencies on the basis of the frequencies of segregating pod progenies and on the basis of mutant frequencies gave identical results even at high degrees of sterility. Only the frequency of chlorophyll mutations was significantly underestimated at higher degrees of sterility by the frequency of segregating pod progenies. This is to be looked at as a consequence of the reduced size of progenies. Methods for recognizing wrong estimations have been worked out. The mean frequency of recessives was found to have a value of $\bar{f} = 21$ per cent.

3. The frequency of lethal mutations was already increased from 0.5 per cent (control value) to 5.5 per cent by treatment with $16 \mu M$ nitrosomethylurea at $24^\circ C$. After treatment with $125 \mu M$ the mutation frequency was 99.1 per cent (frequency of mutants: 63.3 per cent; average number of mutations per cell: 4.8). Thus the molar effectivity of nitrosomethylurea is 300 times the effectivity of ethyl methanesulphonate. The relationship between concentration and lethal mutation frequency was found to be linear, provided the concentration was not too low. An

underproportional effectivity was characteristic for lower concentrations and is explained by the loss of activity of the agent before reaching the genetic material.

4. The effectivity of nitrosomethylurea was found to be fourfold after increasing treatment temperature from 18° to $36^\circ C$. Mutation frequency, sterility and somatic effects showed the same temperature dependence.

5. By hydrolysis (24 hr at $36^\circ C$, or 30 min at $75^\circ C$) nitrosomethylurea is completely inactivated.

6. Haplophasic lethals are mainly responsible for the sterility of M_1 plants after treatment with nitrosomethylurea. With increasing mutation frequency the degree of sterility becomes steadily increased. The relation between degree of sterility and mutation frequency is identical after treatment with nitrosomethylurea or ethyl methanesulphonate, but after X-raying 4 to 6 times less mutations occurred for the same degree of sterility.

7. The mutation frequency of 99.1 per cent after treatment with $125 \mu M$ nitrosomethylurea was found to be associated with a reduction of root growth of 40 per cent and with nearly complete survival of M_1 plants. After X-raying about 30 times less mutations occurred for the same reduction of root growth. Chlorophyll defects in the cotyledons and increasing killing of treated seeds have been found only with concentrations higher than $250 \mu M$.

8. There were no clearcut differences between the mutant spectra induced by nitrosomethylurea or other alkylating agents and X-rays. The proportion of chlorophyll mutants in the overall number of mutants is 16 per cent.

9. Submersion of seeds in distilled water for 18 hr do not increase the mutation frequency.

10. With a mutation frequency of 99.1 per cent at a degree of sterility of 95 the mutagenic efficiency of nitrosomethylurea is as high as that of ethyl methanesulphonate and 7 times higher than that of X-rays (compared on the basis of average number of mutations per cell). Since furthermore the compound is relatively stable in solution and is easily synthesized nitrosomethylurea is recommendable for use in plant breeding.

Herrn Dr. R. RIEGER und Herrn Dr. F. SCHOLZ danke ich für anregende Diskussionen der Ergebnisse. Der verwendete Nitrosomethylharnstoff wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. T. GICHNER (Prag) zur Verfügung gestellt.

Literatur

1. AUERBACH, C.: Mutagenic effects of alkylating agents. Ann. New York Acad. Sci. **68**, 731–736 (1958).
2. AUERBACH, C.: Chemical mutagenesis in animals. Abh. Dt. Akad. Wiss. Berlin, Kl. f. Med. 1960, Nr. 1, 1–13 (1960).
3. D'AMATO, F., G. T. SCARASCIA, L. M. MONTI and A. BOZZINI: Types and frequencies of chlorophyll mutations in durum wheat induced by radiations and chemicals. Radiation Bot. **2**, 217–239 (1962).
4. DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, D. SCHMÄHL und M. MÜLLER: Erzeugung von Magenkrebs durch Nitrosamide an Ratten. Naturwiss. **48**, 165 (1961).
5. EHRENBURG, L.: Chemical mutagenesis: Biochemical and chemical points of view on mechanisms of action. Abh. Dt. Akad. Wiss. Berlin, Kl. f. Med. 1960, Nr. 1, 124–136 (1960).
6. EHRENBURG, L., and N. NYBOM: Ion density and biological effectiveness of radiations. Acta Agric. Scand. **4**, 396–418 (1954).
7. FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Discussion of „Mutagenic effects of

¹ Org. Syntheses **15**, 3, 48 (1935); oder auch: GATTERMANN-WIELAND, Die Praxis des organischen Chemikers. Berlin: De Gruyter (versch. neuere Auflagen).

- alkylating agents" by C. AUERBACH. Ann. New York Acad. Sci. **68**, 736–748 (1958). — 8. FROESE-GERTZEN, E. E., R. A. NILAN, C. F. KONZAK and R. R. LEGAULT: Effects of n-butyl methanesulphonate and related mutagens on barley. Nature **200**, 714 (1963). — 9. FRYDENBERG, O.: Some theoretical aspects of the scoring of mutation frequencies after mutagenic treatment of barley seeds. Radiation Bot. **3**, 135–143 (1963). — 10. GAUL, H.: Die verschiedenen Bezugssysteme der Mutationshäufigkeit bei Pflanzen angewendet auf Dosis-Effektkurven. Z. Pflanzenzüchtg. **38**, 63–76 (1957). — 11. GAUL, H.: Critical analysis of the methods for determining the mutation frequency after seed treatment with mutagens. Genetica Agraria **12**, 297–318 (1960). — 12. GAUL, H.: Ungewöhnlich hohe Mutationsraten bei Gerste nach Anwendung von Äthylmethansulfonat und Röntgenstrahlen. Naturwissenschaften **49**, 431 (1962). — 13. GAUL, H.: Mutationen in der Pflanzenzüchtung. Z. Pflanzenzüchtg. **50**, 194–307 (1963). — 14. GICHNER, T., A. MICHAELIS and R. RIEGER: Radiomimetic effects of 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine in *Vicia faba*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **11**, 120–124 (1963). — 15. GUSTAFSSON, A.: Chemical mutagenesis in higher plants. Abh. Dt. Akad. Wiss. Berlin, Kl. f. Med. 1960, Nr. 1, 14–29 (1960). — 16. GUSTAFSSON, A.: Productive mutations induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens. Hereditas **50**, 211–263 (1963). — 17. JANČÍK, F., B. KAKAČ, V. VANIČEK und M. VRUBLOVSKA: Chem. Listy **52**, 909–914 (1958); zitiert nach Chem. Zbl. **130**, 3925 (1959). — 18. JENSEN, K. A., G. KÖLMLÄK and M. WESTERGAARD: Back-mutations in *Neurospora crassa* induced by diazomethane. Hereditas **35**, 521 (1949). — 19. KIHLMAN, B. A.: The radiomimetic effect of N-nitroso-N-methylurethan in *Vicia faba*. Exper. Cell Res. **20**, 657–658 (1960). — 20. KOLLER, S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. 3. Aufl. Darmstadt 1953. — 21. KONZAK, C. F., R. A. NILAN, J. R. HARLE and R. E. HEINER: Control of factors affecting the response of plants to mutagens. Brookhaven Symp. Biol. **14**, 128–157 (1961). — 22. KONZAK, C. F., R. A. NILAN, R. E. HEINER and E. E. FROESE-GERTZEN: Some factors affecting the action of chemical mutagens. Genetics Today, I, 93. The Hague 1963. — 23. MAGEE, P. N., and J. M. BARNES: Brit. J. Cancer **10**, 114 (1956). — 24. MARQUARDT, H., F. K. ZIMMERMANN und R. SCHWAIER: Nitrosamide als mutagene Agentien. Naturwissenschaften **50**, 625 (1963). — 25. MCKELVIE, A. D.: Differential response to mutagens in *Arabidopsis thaliana*. Nature **195**, 409–410 (1962). — 26. MCKELVIE, A. D.: Studies in the induction of mutations in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Radiation Bot. **3**, 105–123 (1963). — 27. MÜLLER, A. J.: Zur Charakterisierung der Blüten und Infloreszenzen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Kulturpflanze **9**, 364–393 (1961a). — 28. MÜLLER, A. J.: Mutationen mit embryonaler Manifestation bei *Arabidopsis thaliana*. Naturwissenschaften **48**, 579 (1961b). — 29. MÜLLER, A. J.: Embryonentest zum Nachweis rezessiver Letalfaktoren bei *Arabidopsis thaliana*. Biol. Zbl. **82**, 133–163 (1963). — 30. MÜLLER, A. J.: The chimerical structure of M_1 plants and its bearing on the determination of mutation frequencies in *Arabidopsis*. Proc. Symp. Induction of Mutations and Mutation Process, Praha (1964a). — 31. MÜLLER, A. J.: Keimwurzeltest zur Bewertung des somatischen Strahlenschadens bei *Arabidopsis*. Kulturpflanze **12** (im Druck) (1964b). — 32. MÜLLER, A. J., and T. GICHNER: Mutagenic activity of 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine on *Arabidopsis*. Nature **201**, 1149–1150 (1964). — 33. NILAN, R. A., and C. F. KONZAK: Increasing the efficiency of mutation induction. In: Mutation and plant breeding. NAS-NRC 891, 437–460 (1961). — 34. PASTERNAK, L.: Untersuchungen über die mutagene Wirkung von Nitrosaminen und Nitrosomethylharnstoff. Acta biol. med. germ. **10**, 436–438 (1963). — 35. RAPOPORT, I. A.: Die Alkylierung des Genmoleküls (russ.). Dokl. Akad. Nauk SSSR **59**, 1183 (1948). — 36. RAPOPORT, I. A.: Die Überwindung der universellen Mutationsbarriere, mit Mutationen des X-Chromosoms mehr als 100% (russ.). Dokl. Akad. Nauk SSSR **148**, 696–699 (1963). — 37. READ, J.: Radiation biology of *Vicia faba* in relation to the general problem. Oxford 1959. — 38. RIEGER, R., and A. MICHAELIS: Cytologische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem der Wurzelspitze von *Vicia faba* L. I. Der Einfluß der Unterwasser-Quellung der Samen auf die chromosomale Aberrationsrate. Chromosoma (Berlin) **9**, 238–257 (1958). — 39. RIEGER, R., and A. MICHAELIS: Chromatidenaberrationen nach Einwirkung von Äthylmethansulfonat (Methansulfonsäureäthylester) auf Primärwurzeln von *Vicia faba* L. Kulturpflanze **8**, 230–243 (1960). — 40. RÖBBELEN, G.: Wirkungsvergleich zwischen Äthylmethansulfonat und Röntgenstrahlen im Mutationsversuch mit *Arabidopsis thaliana*. Naturwissenschaften **49**, 65 (1962a). — 41. RÖBBELEN, G.: Über Unterschiede in den genetischen Folgen einer Röntgenbestrahlung verschiedenartiger Pflanzenzellen. Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Z. Vererbungsl. **93**, 127–153 (1962b). — 42. RÖBBELEN, G.: Zur Mutagenität von Urethanen. Z. Vererbungsl. **93**, 256–263 (1962c). — 43. SCHOENTHAL, R.: Carcinogenic action of diazomethane and of N-nitroso-N-methylurethane. Nature **188**, 420 (1960). — 44. SCHOLZ, F.: Experiments on the use of induced mutants to hybridization breeding in barley. Proc. Symp. Induction of Mutations and Mutation Process, Praha 1964. — 45. SLIZYNSKA, H.: Mutagenic effects of X-rays and formaldehyde food in spermatogenesis of *Drosophila melanogaster*. Genet. Res. **4**, 248–257 (1963).

Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung Dornburg/Saale der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Gefrierversuche mit der Torsomethode und einem Spezial-Thermostaten

Von GERHARD KRETSCHMER

Mit 6 Abbildungen

Einleitung

Im Institut für Pflanzenzüchtung in Dornburg/Saale wurde die Torsomethode als ein Verfahren entwickelt, das bei Untersuchungen von Getreidepflanzen auch kleine Unterschiede der Reaktion auf Kältebelastung zuverlässig nachweisen sollte. Solche Unterschiede können auf erblichen Eigenschaften oder dem Entwicklungsstadium der Pflanzen beruhen oder auch auf der Temperatur der belastenden Kälte.

Die Torsomethode hat im Verlauf einiger Winter sowohl Reaktionen auf künstliche Kältebelastung

(KRETSCHMER, 1959, 1960, 1962) wie auf winterliche Witterung (TELLHELM, 1964) mit einer zunächst befriedigenden Sicherheit nachgewiesen.

Die Gefrierversuche wurden in Dornburg anfangs mit einer behelfsmäßigen Apparatur durchgeführt, deren Hauptbestandteile eine etwa 6 Kubikmeter große Kühlzelle, 20 Pappschachteln im Format 12:12:36 cm und 18 Minimum-Thermometer mit Alkoholfüllung waren. Damit konnte die Belastungstemperatur nur mit einer Unsicherheit von $\pm 1^{\circ}\text{C}$ oder noch mehr gemessen und mit noch weiter rei-