

# Der Züchter

## Genetics and Breeding Research

Vol. 36

1966

Nr. 5

### Die Induktion von rezessiven Letalmutationen durch Äthylmethansulfonat bei *Arabidopsis*

#### I. Dosis-Effekt-Beziehungen und deren Beeinflussung durch die Behandlungsbedingungen

ANDREAS J. MÜLLER

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

#### Induction of recessive lethal mutations by ethyl methanesulfonate in *Arabidopsis*

##### I. Dose-effect relationships and the influence of treatment conditions

**Summary.** Seeds of *Arabidopsis thaliana* were treated with ethyl methanesulfonate (EMS). The dependence of the effect on the following factors was studied: EMS concentration, length of treatment, duration of posttreatment soaking, temperature during treatment and during post-treatment soaking, drying of the treated seeds and hydrolysis of treatment solution. The criteria studied included growth rate of primary roots and other somatic effects, fertility of  $M_1$  plants, frequency of recessive lethals (embryonic lethals and chlorophyll mutations). The main results are:

1. With increasing dose the frequency of chlorophyll mutations and the frequency of embryonic lethals increase exponentially ( $n \approx 2$ ). This applies to variation of EMS concentration as well as to variation in treatment time.
2. Mutation frequency, sterility and root length reduction increase with rising treatment temperature. For the range tested ( $18^\circ\text{--}36^\circ\text{C}$ ) a temperature quotient of  $Q_{10} = 2.6$  was found.
3. The increase in mutation frequency is limited only by the decrease in fertility of  $M_1$  plants and not by a decrease in survival. The relationships between mutation frequency, degree of sterility and root length reduction are not influenced by changes in treatment conditions.
4. Mutation frequency, sterility and root length reduction are independent of the duration of soaking the treated seeds in water under partially anaerobic conditions. Delaying the start of germination up to 4 days after treatment does not influence the mutation frequency.
5. By raising the temperature during a period of 6 hrs. after treatment mutation frequency, sterility and root length reduction are increased.
6. The damage caused by drying seeds after EMS treatment is prevented completely by soaking the treated seeds in water for 11 hrs. before drying.
7. The effectiveness of partially hydrolyzed EMS solutions corresponds to the concentration of EMS. Physiological damage caused by the hydrolysis products is without practical significance.
8. The relations between various measures of mutation frequency (frequency of segregating plant progenies, frequency of segregating pod progenies, frequency of  $M_2$  mutants) have been analyzed. Among other things it is shown that there is no direct proportionality between the frequency of  $M_2$  mutants ( $m_e$ ) and the initial mutation frequency.

#### Einleitung

Das monofunktionelle Alkylierungsmittel Äthylmethansulfonat (EMS) hat sich bei allen daraufhin getesteten Organismen als hochwirksames Mutagen erwiesen. Es vermag sowohl Punktmutationen als auch Chromosomenaberrationen auszulösen. Für die Entstehung von Punktmutationen konnten bisher die als Folge der Äthylierung von Guanin in der Desoxyribonucleinsäure (DNA) eintretende Transition GC $\rightarrow$ AT und (in geringerem Maße) die als Folge der Adenin-Äthylierung eintretende Transition AT $\rightarrow$ GC verantwortlich gemacht werden (BAUTZ und FREESE 1960, KRIEG 1963, TESSMAN et al. 1964). Wahrscheinlich erfolgen auch Punkt-Deletionen (KRIEG 1963). Über die zur Entstehung von Chromosomenaberrationen führenden molekularen Mechanismen lassen sich noch keine definitiven Aussagen machen, doch dürfte auch in diesem Fall als Primärvorgang die Alkylierung der DNA anzusehen sein. Die EMS-induzierten Chromosomenaberrationen treten ausschließlich auf chromatidaler Basis auf; sie unterscheiden sich in dieser Hinsicht nicht von den durch andere alkylierende Agenzien induzierten Chromosomenaberrationen (RIEGER und MICHAELIS 1960).

In einer Vielzahl von Arbeiten wird über die Induktion von Chlorophyll- und Vitalmutationen durch EMS bei höheren Pflanzen berichtet, insbesondere für *Hordeum* (Übersicht bei NILAN et al. 1964; weitere Arbeiten: FAVRET 1964, MOES 1964, NAGARAJA RAO und NATARAJAN 1965, NATARAJAN und SHIVASANKAR 1965), *Pisum* (SPECKMANN 1964), *Vicia* (GHATNEKAR 1964) und *Triticum* (D'AMATO et al. 1962, SHAMA RAO und SEARS 1964). Die Relation zwischen genetisch nachweisbaren Mutationen und größeren Chromosomenaberrationen liegt nach Einwirken von EMS wesentlich höher als nach Einwirkung von Röntgenstrahlen (FROESE-GERTZEN et al. 1964). In Untersuchungen bei *Zea mays* konnte gezeigt werden, daß die EMS-induzierten Mutationen (im Gegensatz zu röntgeninduzierten) fast ausschließlich nur einen von drei enggekoppelten Endosperm-Markern betreffen, also vorwiegend kleine Deletionen oder Punktmutationen darstellen (AMANO und SMITH 1965).

Für *Arabidopsis thaliana* liegen bereits Untersuchungen über die Auslösung von Chlorophyllmutationen (RÖBBELEN 1962, 1965a, JACOBS 1965, BHATIA und NARAYANAN 1965, VAN DER VEEN und GERLACH 1965), von Vitalmutationen (MCKELVIE 1963), von quantitativen Mutationen (BROCK 1965), von Plastommutationen (RÖBBELEN 1965b) und von somatischen Mutationen (GICHNER und VELEMSKY 1965, HIRONO und REDEI 1965) durch Behandlung der Samen mit EMS vor. Über den Verlauf der EMS-Aufnahme und den Nachweis der DNA-Alkylierung in *Arabidopsis*-Samen berichten WALLIS und AHNSTRÖM (1965).

Daß bei *Arabidopsis* durch EMS-Behandlung der Samen rezessive Letalmutationen (embryonale Letalmutationen und Chlorophyllmutationen) induziert werden, die im Embryonentest nachgewiesen werden können, wurde erstmalig 1961 gezeigt (MÜLLER 1961). Seitdem haben wir unter Benutzung dieses Testsystems verschiedene Untersuchungen zur Wirkungsweise von EMS durchgeführt, über die in der hier begonnenen Publikationsreihe zusammenfassend berichtet werden soll. Einige Ergebnisse sind an anderer Stelle bereits kurz mitgeteilt worden (MÜLLER 1965b). Weitere Befunde wurden von GICHNER (1965) vorgelegt.

Die vorliegende Veröffentlichung befaßt sich mit den Dosis-Effekt-Beziehungen und den Relationen zwischen Frequenz der Chlorophyllmutationen, Frequenz der embryonalen Letalmutationen, Sterilität und somatischen Effekten. Außerdem wird der Einfluß der Temperatur, des Hydrolyseverlaufs und der Dauer des Rücktrocknens der behandelten Samen auf die Effektivität der EMS-Behandlung untersucht. Die Bestimmung der Mutationsfrequenz erfolgt mit Hilfe verschiedener Methoden, die hinsichtlich ihres Genauigkeitsgrades analysiert werden.

### Material und Methoden

**Samenmaterial:** Zur Behandlung wurden Samen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Linie 'Dijon G') verwendet, die mindestens ein Jahr gelagert hatten und in hohen Prozentsätzen (92–100%) züchtig keimten. Alle Samen stammten von Pflanzen ab, die voll fertil waren und keine rezessiven Letalfaktoren aufwiesen.

**Äthylmethansulfonat:** Das verwendete EMS wurde im Institut für experimentelle Therapie und Mikrobiologie der DAW in Jena synthetisiert. Für die sich über einen Zeitraum von 3 Jahren verteilenden Versuche wurden verschiedene EMS-Chargen verwendet, die zwar im Keimwurzeltest keinen deutlich nachweisbaren Effektivitätsunterschied zeigten, aber doch nicht vorbehaltlos als wirkungsgleich angesehen werden können. Genaue Effektivitätsvergleiche sind daher nur innerhalb des gleichen Versuchs möglich. Alle Behandlungslösungen wurden in Aqua dest. (pH 4,9–5,4) bei Zimmertemperatur angesetzt, und zwar jeweils kurz vor Beginn der Behandlung. Die Konzentrationsangaben erfolgen in mM (1 mM = 124,2 mg/l).

**Behandlung:** Die lufttrockenen Samen wurden entweder direkt in die Behandlungslösung submers eingequollen oder zuerst in Aqua dest. submers vorgequollen und nach Abfiltrieren des Aqua dest. der Behandlungslösung ausgesetzt. (Vgl. die entsprechenden Angaben bei jedem Versuch.) Für jede

Variante, die im Höchstfall 45 mg Samen (2000 Samen) enthielt, wurden 4–6 ml Behandlungslösung verwendet. Die Temperatur während der Behandlungszeit wurde mit Hilfe von Thermostaten im Wasserbad auf  $\pm 0,2^\circ$  konstant gehalten. Nach Abschluß der Behandlung wurden die Samen von der Lösung abfiltriert, kurz mit Wasser gewaschen und dann entweder den angegebenen Nachbehandlungen oder sofort Keimbedingungen (Luftzutritt, Licht,  $24^\circ\text{C}$ ) ausgesetzt.

**Keimwurzeltest:** Zur Bestimmung von Keimungsrate, Keimverzögerung und Wachstumshemmung der Keimwurzeln wurden die behandelten Samen in Petrischalen von 13 cm Durchmesser auf Filterpapier (getränkt mit 0,1%iger  $\text{KNO}_3$ -Lösung) ausgelegt. Jede Petrischale enthielt drei Behandlungsvarianten zu je 40 Samen und eine Kontrollvariante, die während der Behandlungszeit in Aqua dest. eingequollen war. Die Petrischalen standen bei  $24^\circ\text{C}$  unter künstlicher Dauerbeleuchtung in einem Neigungswinkel von  $60^\circ$ . Nach 36–42 h (gerechnet vom Zeitpunkt der Gewährung der Keimbedingungen) hatten in der Kontrollvariante 50% der Samen gekeimt, nach 6 bis 7 Tagen war eine mittlere Wurzellänge von 17 bis 22 mm erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurde in allen Varianten die Länge der Primärwurzel gemessen.

Die Differenz zwischen der mittleren Wurzellänge in der Behandlungsvariante und der mittleren Wurzellänge in der Kontrollvariante (bezogen auf die Länge der Kontrollvariante) ergibt die relative Wurzellängenreduktion ( $r$ ). Die Kennziffer  $r$  stellt also ein Maß für den additiven Effekt von Keimverzögerung und Verringerung der Wachstums geschwindigkeit im Wurzelmeristem dar. Sie kann alle Werte von 0 (keine Hemmung des Wurzelwachstums) bis 1 (vollständige Hemmung des Wurzelwachstums) annehmen. Für jede Behandlungsvariante wurden die  $r$ -Werte in drei Wiederholungen (3 Petrischalen) bestimmt. (Hinsichtlich weiterer Einzelheiten zur Methodik des Keimwurzeltests vgl. MÜLLER 1964b.)

**Anzucht der  $M_1$ -Pflanzen:** Bei allen Versuchen, in denen die Mutationsfrequenz bestimmt werden sollte, wurden die behandelten Samen als wäßrige Suspension auf Erde (in Plastikschaalen) ausgespritzt. Rasche und gleichmäßige Keimung wurde durch Feuchthalten der Erde garantiert. Die Anzucht der  $M_1$ -Pflanzen erfolgte im Gewächshaus ohne Pikieren. Um genügend große Pflanzen mit großen Schoten zu bekommen, wurden die Aussaaten rund 4 Wochen lang im Kurztag gehalten. (Varianten, die infolge starker EMS-Behandlung ein deutlich gehemmtes Wachstum zeigten, blieben entsprechend länger im Kurztag.) Anschließend wurden Langtagsbedingungen (16 h tägliche Beleuchtungsdauer) gewährt. Während der rund 14 Tage nach Beginn der Langtagsbehandlung beginnenden Blüte wurde stets auf ausreichende Beleuchtung (Zusatzlicht an trüben Tagen) geachtet, um einen guten Samenansatz (Selbstbefruchtung!) zu gewährleisten. Unter diesen Bedingungen wiesen die Kontrollpflanzen im basalen Teil der terminalen Infloreszenz Schoten mit 45–65 Samen anlagen und einem Samenansatz von 96–100% auf.

**Embryonentest:** 11–13 Tage nach Blühbeginn konnten die Embryonen in den noch unreifen Schoten

aus dem basalen Teil der terminalen Infloreszenz unter dem Präpariermikroskop untersucht werden. Bei jeder  $M_1$ -Pflanze wurden entweder 5 aufeinanderfolgende Schoten oder eine Schote (in der Regel die dritte von unten) der terminalen Infloreszenz ausgewertet. (Als optimales Verfahren ist die 1-Schoten-Auswertung anzusehen; die 5-Schoten-Auswertung wurde nur vorgenommen, um Aufschluß über die Größe des mutierten Sektors zu erhalten.) Die Klassifizierung der  $M_2$ -Embryonen erfolgte nach dem an anderer Stelle (MÜLLER 1963) angegebenen Schlüssel. Alle aberranten Embryonen, die einem der dort beschriebenen Mutantentypen glichen, wurden als Mutanten bezeichnet. Die Anzahl der geprüften Embryonen pro Schote wurde auf maximal 30 beschränkt. Traten unter den geprüften Embryonen Mutanten auf, so wurde die betreffende Schotennachkommenschaft als „spaltend“ klassifiziert. Es ergaben sich folgende Kennziffern:

$m_c$  = Mutantenfrequenz: Anteil der Mutanten-Embryonen an der Gesamtzahl der geprüften  $M_2$ -Embryonen in allen Schotennachkommenschaften (genauer: ungewogenes Mittel der Mutantenfrequenzen aller Schotennachkommenschaften);

$m_b$  = Frequenz der spaltenden Schotennachkommenschaften (entweder auf der Auswertung von 5 Schoten oder von 1 Schote je  $M_1$ -Pflanze basierend);

$m_a$  = Frequenz der spaltenden Pflanzennachkommenschaften: Anteil der  $M_1$ -Pflanzen, die in 5 aufeinanderfolgenden Schoten aus dem basalen Teil der terminalen Infloreszenz mindestens eine spaltende Schotennachkommenschaft aufwiesen (nur bei 5-Schoten-Auswertung!).

Schotennachkommenschaften, die aus  $< 4$  Embryonen bestanden („sterile“ Schoten), blieben bei der Berechnung dieser Kennziffern unberücksichtigt.

Als Maß der haplophasischen Sterilität wurde der Sterilitätsgrad ( $s$ ) berechnet. (Die Berechnungsweise ist in Versuch 1 erläutert.)

**Statistik:** Jede Variante wurde bei der Auswertung in Teilerien untergliedert, die bei 1-Schoten-Auswertung in der Regel 50  $M_1$ -Pflanzen, bei 5-Schoten-Auswertung ungefähr 25  $M_1$ -Pflanzen umfaßten. Für jede Teilerie wurde  $m_b$  und  $m_c$  ermittelt. Diese Teilerienresultate wurden wie Meßwerte behandelt; die Konfidenzgrenzen für den Mittelwert ergaben sich mit Hilfe der  $t$ -Verteilung. Bei 1-Schoten-Auswertung, bei der die einzelnen Schotennachkommenschaften als unabhängige Ereignisse angesehen werden können, wurde der  $m_b$ -Wert der ungeteilten Variante als Häufigkeitsziffer behandelt und folglich die Konfidenzgrenzen über die Binomialverteilung ermittelt. Die Auswertung in Teilerien diente in diesem Fall nur zur Prüfung der Homogenität. Die Differenzen zwischen den Ergebnissen zweier Varianten wurden stets mit Hilfe des  $U$ -Tests von MANN und WHITNEY (nichtparametrischer Rangtest) auf Grund der Ergebnisse der Teilerien beurteilt.

Hinsichtlich weiterer Einzelheiten der Methodik vgl. MÜLLER (1964a).

## Ergebnisse

Im folgenden wird jede unabhängig angesetzte Versuchsserie gesondert beschrieben und durch eine Nummer bezeichnet. Das Symbol  $W$  kennzeichnet die Versuche, bei denen der Effekt mit Hilfe des Keimwurzeltests, das Symbol  $E$  diejenigen Versuche, bei denen der Effekt mit Hilfe des Embryonentests bestimmt wurde.

### 1 ( $W, E$ ): Abhängigkeit des Effekts von der EMS-Konzentration

Um das Spektrum der verschiedenen EMS-Effekte möglichst vollständig erfassen und genau Dosis-Effekt-Beziehungen ermitteln zu können, wurde der ganze Bereich von fast wirkungslosen Konzentrationen bis zu vollständig letal wirkenden Konzentrationen durchgetestet.

In Form einer Verdopplungsreihe im Konzentrationsbereich von 2,5 bis 320 mM (mit Zwischenwerten bei 15 mM und 25 mM) angesetzte EMS-Lösungen wurden 18 h lang bei 22 °C auf trockene Samen einwirken gelassen. Die Behandlungslösungen wurden während der Behandlungszeit nicht gewechselt. Nach Abspülen der behandelten Samen wurden sofort Keimbedingungen gewährt. Von jeder Behandlungsvariante wurde ein Teil der Samen für den Keimwurzeltest in Petrischalen ausgelegt, der andere Teil zur Anzucht von  $M_1$ -Pflanzen in Erde ausgesät. Ein unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführter Vorversuch (1a) mit den Konzentrationsvarianten 5, 10, 20, 40 und 80 mM wurde nur zum Keimwurzeltest ausgelegt. Die Bestimmung von Sterilitätsgrad und Mutationsfrequenz basiert auf der Prüfung von 5 Schoten je  $M_1$ -Pflanze.

**Beeinflussung der Keimung und des Wurzelwachstums:** Die Keimungsrate wurde durch Kon-

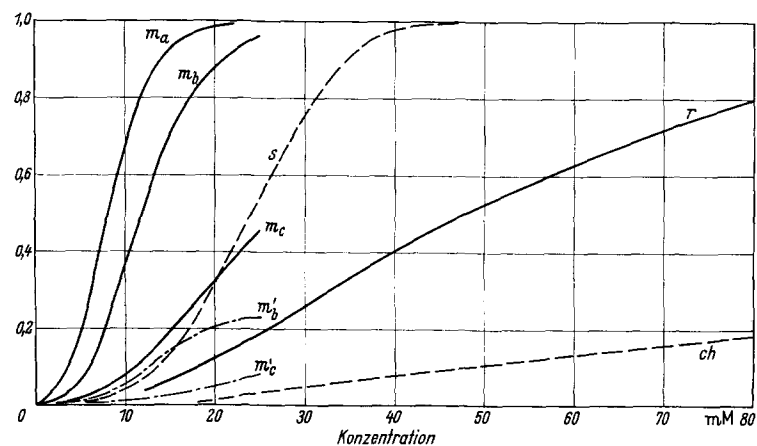


Abb. 1. Quantitative Beziehungen zwischen verschiedenen Effekten der EMS Behandlung in Abhängigkeit von der Konzentration (18 h bei 22 °C). Den Kurven liegen die Ergebnisse der Versuche 1, 1a und 2 zugrunde (vgl. Tab. 1, 2 u. 3).

$m_a$  = Frequenz der spaltenden Pflanzennachkommenschaften;  $m_b$  = Frequenz der spaltenden Schotennachkommenschaften;  $m_c$  = Mutantenfrequenz;  $m'_b$  = Frequenz der für Chlorophyllmutationen spaltenden Schotennachkommenschaften;  $m'_c$  = Frequenz der Chlorophyllmutanten;  $r$  = relative Wurzellängenreduktion;  $ch$  = Anteil der  $M_1$ -Pflanzen mit Scheckungen;  $s$  = Sterilitätsgrad.

Tabelle 1 (Versuche 1 u 1a). Durch Behandlung trockener Samen mit unterschiedlichen EMS-Konzentrationen (18 h Behandlungszeit, 22 °C) bewirkte Verzögerung der Keimung und Hemmung des Wachstums der Primärwurzeln. Jeder Wert stellt das Mittel aus 3 Wiederholungen dar.

Konzentration (mM)	Keimverzögerung (h)		Wurzellängenreduktion (%)	
	1	1a	1	1a
5	0	0	2	-3
10	1	0,5	9	6
20	4	6	19	16
40	13	11	41	42
80	28	32	78	81

zentrationen bis zu 80 mM nicht signifikant beeinflusst. Behandlung der Samen mit 160 mM und 320 mM EMS-Lösungen führte zur vollständigen und irreversiblen Unterbindung der Keimung, also zur Abtötung der Samen. Wie aus Tab. 1 ersichtlich, wiesen die Behandlungsvarianten jedoch von 10 mM an eine mit steigender Konzentration stetig zunehmende Verzögerung der Keimung gegenüber der Kontrolle auf. Dabei gilt als Keimzeitpunkt der Moment, an dem bei 50% der Samen die Radicula deutlich sichtbar aus der Testa herausgewachsen war.

Zunehmende EMS-Konzentrationen führten gleichfalls zu ansteigenden Werten für die relative Wurzellängenreduktion (Tab. 1, Abb. 1). Die Mindestkonzentration, mit der eine sicher nachweisbare Wurzellängenreduktion erzielt werden konnte, betrug 10 mM. Der als Wurzellängenreduktion erfaßte Effekt stellt das Resultat von Keimverzögerung und Hemmung des Wachstums der Primärwurzeln dar, ist also nicht einfach ein anderer Ausdruck für die Keimverzögerung. In den Behandlungsvarianten wuchsen die Wurzeln deutlich langsamer als in der Kontrolle. Wie aus den Versuchen mit vollständig hydrolysierten EMS-Lösungen (Versuch 4) hervorgeht, handelt es sich dabei im wesentlichen um einen EMS-bedingten Effekt und nicht um einen schädigenden Einfluß der Hydrolyseprodukte des EMS.

**Beeinflussung der  $M_1$ -Pflanzen:** Behandlung der Samen mit EMS-Konzentrationen, die bereits sehr hohe Mutationsfrequenzen bedingen, führte zu keiner nachweisbaren Schädigung der  $M_1$ -Pflanzen. Eine Verringerung der Überlebensrate durch relativ kleine EMS-Dosen, wie sie MCKELVIE (1963) beobachtet hat, trat unter den hier angewandten Versuchsbedingungen nicht auf.

Die 20 mM-Variante war im Anfangswachstum (Bildung der ersten Rosettenblätter) um höchstens einen Tag gegenüber der Kontrolle verzögert. Morphologische Anomalien traten nicht auf bzw. waren nicht häufiger als in der Kontrolle. Die 40 mM-Variante war im Anfangs-

wachstum um rund 2 Tage verzögert. Ein Teil der Rosettenblätter wies deutlich erkennbare morphologische Anomalien (Asymmetrien, Torsionen) auf, die jedoch bei den später angelegten Rosettenblättern und bei den Stengelblättern zunehmend seltener wurden. Überlebensrate, Pflanzengröße (Anzahl der Blätter und Stengelhöhe) und Blühbeginn waren nicht von der Kontrolle verschieden.

In der 80 mM-Variante zeigten alle Pflanzen morphologische Anomalien. Die Bildung der ersten Rosettenblätter war im Mittel um 10 Tage gegenüber der Kontrolle verzögert. Obwohl auch hier mit fortschreitender Entwicklung eine gewisse Normalisierung eintrat, ließen sich doch noch an den Stengelblättern und im Infloreszenzaufbau häufig Abweichungen von der Norm nachweisen. Die Blüten wiesen allerdings nur sehr selten deutlich erkennbare Anomalien auf. Die Überlebensrate betrug im Durchschnitt 72% der Kontrolle, schwankte aber zwischen den einzelnen Anzuchtschalen von 42% bis zu 91%. Es zeigt sich also deutlich, daß die Überlebensrate kein brauchbares Maß für die Stärke der EMS-Behandlung darstellt: Alle Pflanzen waren in ihrem Wachstum mehr oder weniger stark gehemmt; ob sie bis zur Blütenbildung überlebten, wurde jedoch in erster Linie durch die Umweltbedingungen (insbesondere in den frühen Entwicklungsstadien) entschieden. Unter besonders günstigen Bedingungen dürfte es prinzipiell möglich sein, auch sehr stark geschädigte Pflanzen am Leben zu erhalten.

**Gescheckte Pflanzen:** Alle  $M_1$ -Pflanzen, die an den Rosettenblättern chlorophylldefekte Sektoren (hellgrün, gelb oder farblos) aufwiesen, wurden als „gescheckt“ klassifiziert. Wie aus Tab. 2 ersichtlich, traten Scheckungen nur nach Behandlung mit höheren EMS-Konzentrationen auf. Ihre Häufigkeit war deutlich konzentrationsabhängig.

Es bleibt aber zu beachten, daß die angegebenen Werte mit einem gewissen Unsicherheitsfaktor behaftet sind, da 1. sicher einige kleine bzw. nur geringfügig aufgehellte Sektoren übersehen wurden und 2. die Unterscheidung zwischen weißen Sektoren und nekrotischen Bereichen nicht immer eindeutig möglich war. Der für die 80 mM-Variante angegebene Wert (23,0%) ist besonders unsicher, da in diesem Fall die Rosettenblätter stark deformiert und oft sehr klein waren. Als Maß der EMS-Wirkung dürfte die Häufigkeit gescheckter Pflanzen angesichts dieser Ungenauigkeiten nur wenig geeignet sein.

Tabelle 2. Fertilität der  $M_1$ -Pflanzen und Anteil gescheckter  $M_1$ -Pflanzen in verschiedenen Versuchsserien.

Versuch Nr.	Behandlung	Anzahl der geprüften		Häufigkeit (in %) der Schoten mit				Steril.- Grad (%)	gescheckte Pflanzen (%)
		$M_1$ -Pflanzen	Schoten	0-3 Sa.	4-16 Sa.	17-29 Sa.	>29 Sa.		
Kontrolle		600	3000	0	0	0,2	99,8	0	0
1	2,5 mM, 18 h	634	3170	0	0	0	100	0	0
	5 mM, 18 h	622	3110	0	0	3,1	96,9	0,8	0
	10 mM, 18 h	675	3375	0,1	2,2	15,2	82,5	5,6	0,4
	15 mM, 18 h	94	470	0	10,7	20,9	68,4	12,9	1,1
	20 mM, 18 h	120	600	2,6	35,5	34,2	27,7	37,7	3,3
	25 mM, 18 h	163	815	9,3	43,8	27,8	19,1	49,3	1,8
	40 mM, 18 h	400	2000	94,4	5,6	0	0	98,6	9,5
	80 mM, 18 h	400	2000	99,6	0,4	0	0	99,9	23,0
2	8 mM, 18 h	122	610	0	3,5	7,0	89,5	4,4	0
	12 mM, 18 h	385	1925	0,1	4,2	21,9	73,8	8,6	0,8
	20 mM, 18 h	323	1615	2,3	32,6	33,6	31,6	35,2	1,2
7	5 mM, 1/2 h	420	2100	0	0	0,1	99,9	0	0
	5 mM, 2 h	518	2590	0	0	0	100	0	0
	5 mM, 6 h	495	2475	0	0	1,1	98,9	0,3	0
	5 mM, 18 h	427	2135	0	0	0,4	99,6	0,1	0
	5 mM, 36 h	292	1460	0,2	4,0	18,3	78,5	7,8	0,3
	5 mM, 54 h	203	1015	2,7	22,1	33,1	42,1	27,4	0,5
9	10 mM, 18 h(0)	337	1685	0	5,7	19,7	74,6	9,1	0
	10 mM, 18 h(1h)	221	1105	0	2,2	9,8	88,0	4,1	0,5
	10 mM, 18 h(18h)	306	1530	0,3	2,5	11,3	85,9	5,6	0,3
11	8 mM, 18 h(21°)	451	2255	0	0,7	5,5	93,8	2,0	0
	8 mM, 18 h(40°)	282	1410	0	2,2	7,0	90,8	3,5	0

Außerdem können einigermaßen brauchbare Werte erst in einem Dosisbereich gewonnen werden, der für die Auslösung von rezessiven Mutationen bereits zu hoch ist. Schließlich ist auch die Heterogenität der zu chlorophylldefekten Sektoren führenden Ereignisse zu beachten. Neben dominanten Gen- und Chromosomenmutationen spielen nach Untersuchungen von RÖBBELEN (1965b) u. a. auch Plasmomutationen bei der Entstehung von EMS-induzierten Scheckungen eine gewisse Rolle.

**Sterilität:** Die Anzahl der Samenanlagen pro Schote betrug in den geprüften Schoten 45 bis 65 und wurde durch EMS-Behandlungen bis zu 40 mM praktisch nicht verringert. Nur in der 80 mM-Variante war parallel zur Verringerung der durchschnittlichen Pflanzengröße auch die Anzahl der Samenanlagen pro Schote auf 25 bis 55 reduziert. Wie aus Tab. 2 ersichtlich, traten jedoch mit zunehmender EMS-Konzentration in steigendem Maße Schoten mit verringertem Samenausatz, d. h. mit einem größeren Anteil an sterilen Samenanlagen, auf. Diese Zunahme der Sterilität war, wie sich durch Anfärben des Pollens einiger wahllos herausgegriffener Blüten mit Karmin-Essigsäure zeigen ließ, von einer Zunahme der Häufigkeit von Blüten mit partiell letalem Pollen begleitet. Es ergaben sich also keine Hinweise dafür, daß die Beziehungen zwischen Sterilität und Pollenletalität in EMS-behandeltem Material grundsätzlich anderer Art sind als im Falle der röntgeninduzierten Sterilität, für die genauere Untersuchungen vorliegen (MÜLLER 1965f). Partielle Sterilität trat in der Regel nicht in allen geprüften Schoten einer  $M_1$ -Pflanze auf, sondern nur in einigen, die häufig einen deutlich erkennbaren Sektor bildeten. Das kann als Hinweis dafür gelten, daß die EMS-induzierte haplophasische Sterilität unter den vorliegenden Versuchsbedingungen im wesentlichen genetisch bedingt ist (vgl. MÜLLER 1965b).

Als zahlenmäßiger Ausdruck für das Ausmaß der haplophasischen Sterilität wurde der Sterilitätsgrad ( $s$ ) eingeführt (MÜLLER 1964a). Er wird aus den Häufigkeitswerten für die einzelnen Fertilitätsklassen nach folgender Formel berechnet:

$$s = p_3 + 0,75 p_{16} + 0,25 p_{29}$$

( $p_3$  = relative Häufigkeit der Schoten mit 0 bis 3 befruchteten Samenanlagen, usw.). Der Sterilitätsgrad kann also theoretisch alle Werte von 0 bis 1 (bzw. 0 bis 100%) annehmen. Wie aus Tab. 2 und Abb. 1 ersichtlich, erhöhten sich die tatsächlich ge-

Tabelle 3. Rezessive Letalmutationen in verschiedenen Versuchsserien.

Versuch Nr.	Behandlung	Anzahl der geprüften				rezessive Letalmutationen (alle Typen)						rezessive Chlorophyllmutationen						$\frac{M'_c}{M_b}$ (%)			
		M <sub>1</sub> - Pflanzen	Schoten- nach- kommensch. <sup>1</sup>	M <sub>2</sub> - Embryonen insges.	nicht-letalen M <sub>2</sub> - Embryonen	m <sub>a</sub> (%)	m <sub>b</sub> (%)	m <sub>c</sub> (%)	M <sub>b</sub> (100)	M <sub>c</sub> (100)	b (%)	c (%)	m' <sub>a</sub> (%)	m' <sub>b</sub> (%)	m' <sub>c</sub> <sup>2</sup> (%)	M' <sub>b</sub> (100)	M' <sub>c</sub> (100)		b' (%)	c' (%)	
Kontrolle		600	3000	89912	89878	0,7	0,2	0,04	0,2	0,2	—	—	0,2	0,03	0,007	0,03	0,03	—	—	—	
	1	2,5mM, 18 h	634	3170	95100	94771	6,3	2,0	0,42	2,0	2,1	31	20,8	0,8	0,3	0,06	0,3	0,3	—	(13,8)	
		5 mM, 18 h	622	3110	93230	92323	15,4	5,1	1,07	5,2	5,3	31	20,6	1,6	0,4	0,10	0,4	0,5	—	(9,5)	
		10 mM, 18 h	675	3370	95910	89459	66,3	34,7	7,84	42,6	40,5	39	19,0	17,9	5,9	1,27	6,1	6,4	27	21,0	
		15 mM, 18 h	94	470	12380	10098	93,6	71,4	21,1	125,2	118,5	46	18,9	35,1	15,3	3,30	16,6	16,5	38	19,9	
2		120	584	11605	8212	100	87,3	32,52	206,4	196,0	—	19,0	51,9	20,7	5,52	23,2	28,0	32	24,3	12,8	
		25 mM, 18 h	158	739	13304	7847	100	96,8	48,71	343,0	333,5	—	19,4	55,7	23,3	8,69	26,5	45,0	33	34,0	13,1
		8 mM, 18 h	122	610	17980	17129	51,6	24,0	5,34	27,4	27,1	34	19,7	9,0	2,8	0,64	2,8	3,2	30	22,8	11,8
		12 mM, 18 h	385	1924	52660	46921	92,2	50,5	12,43	70,3	66,5	28	18,9	26,5	8,0	1,72	8,3	8,6	27	20,7	12,2
		20 mM, 18 h	323	1579	33205	24960	98,4	85,7	29,61	194,5	175,0	47	18,0	47,4	16,6	4,24	18,1	21,5	28	23,8	11,1
7		420	2100	62987	62967	0,7	0,1	0,03	0,1	0,1	—	—	0	0	0	0	0	—	—	—	
		5 mM, 2 h	518	2590	77700	77601	1,7	0,7	0,13	0,7	0,7	40	20,3	0	0	0	0	0	—	—	—
		5 mM, 6 h	495	2475	74130	73880	4,8	1,7	0,34	2,1	1,7	34	20,0	0,2	0,1	0,01	0,1	0,1	—	—	—
		5 mM, 18 h	427	2135	64032	63535	12,6	3,9	0,82	4,0	4,1	30	20,5	1,2	0,3	0,05	0,3	0,3	24	—	—
		5 mM, 36 h	292	1455	41040	36308	82,9	51,1	12,30	71,5	65,5	40	18,3	20,9	5,4	1,16	5,5	5,8	23	21,1	8,2
9		201	988	22900	17145	100	85,6	29,01	193,8	171,0	—	17,7	40,7	15,6	3,77	16,9	19,0	33	22,5	9,8	
		10 mM, 18 h(o)	337	1685	46287	40905	86,1	52,6	13,41	74,7	72,0	38	19,3	30,0	9,7	2,02	10,2	10,1	29	20,0	13,5
		10 mM, 18 h(1 h)	221	1105	31957	28092	90,9	46,2	11,09	62,1	58,5	26	18,9	27,0	9,7	2,03	10,2	10,2	32	20,0	16,4
		10 mM, 18 h(18 h)	306	1526	44174	40060	88,0	45,6	11,31	60,9	60,0	29	19,7	31,0	9,7	2,22	10,2	11,1	27	22,0	18,2
		8 mM, 18 h(21°)	451	2255	66728	64593	47,2	16,8	3,69	18,3	18,5	29	20,4	10,0	2,5	0,51	2,5	2,5	24	20,0	13,5
11		282	1410	41174	38206	76,5	37,2	8,29	46,4	43,0	32	18,6	18,8	5,5	1,15	5,6	5,7	27	20,5	12,3	
		8 mM, 18 h(40°)																			

<sup>1</sup> nur Nachkommenschaften mit ≥ 3 Embryonen (vgl. Tab. 2).  
<sup>2</sup> bezogen auf die nicht-letalen Embryonen.

$m_a$  = Frequenz der spaltenden Pflanzennachkommenschaften  
 $m_b$  = Frequenz der spaltenden Schotennachkommenschaften  
 $m_c$  = Frequenz der M<sub>2</sub>-Mutanten  
 $M_b = -\ln(1 - m_b)$   
 $M_c = -\frac{1}{5} \ln(1 - m_c)$   
 $b = \frac{\ln(1 - m_b)}{\ln(1 - m_c)}$   
 $c = \frac{\ln(1 - m_c)}{\ln(1 - m_b)}$

$m_a$  = Frequenz der spaltenden Pflanzennachkommenschaften  
 $m_b$  = Frequenz der spaltenden Schotennachkommenschaften  
 $m_c$  = Frequenz der  $M_2$ -Mutanten

<sup>1</sup> nur Nachkommenschaften mit  $\geq 3$  Embryonen (vgl. Tab. 2).

<sup>2</sup> bezogen auf die nicht-letalen Embryonen.

$b = \frac{\ln(1 - m_b)}{\ln(1 - m_a)}$

$b' = \frac{\ln(1 - m'_b)}{\ln(1 - m'_a)}$

$c = \frac{\ln(1 - m_c)}{\ln(1 - m_a)}$

$c' = \frac{\ln(1 - m'_c)}{\ln(1 - m'_a)}$

fundenen Werte stetig mit steigender Konzentration und erreichten in der 80 mM-Variante praktisch  $s = 1$ . Im letztgenannten Fall wiesen rund 80% der geprüften Schoten ausschließlich unbefruchtete und rund 20% der Schoten bis zu drei befruchtete (aber vorwiegend letale Embryonen ausbildende) Samenanlagen auf.

**Rezessive Letalmutationen:** Die durch Auswertung der unreifen Schoten festgestellten Mutanten-Embryonen konnten den 10 bereits aus Versuchen mit Röntgenstrahlen (MÜLLER 1963) oder anderen chemischen Mutagenen (MÜLLER 1964a) bekannten Mutantentypen zugeordnet werden. Grundsätzlich neue Mutantentypen traten nicht auf. Es wurden also folgende Typen unterschieden (in der Reihenfolge von frühembryonaler Letalität bis Keimlingsletalität): *sicca*, *brevi*, *vana*, *diffusa*, *murca*, *parva*, *fusca*, *albina*, *xantha*, *chlorina* (ausführliche Beschreibung bei MÜLLER 1963).

Die relative Häufigkeit der einzelnen Typen ist aus Tab. 4 ersichtlich. Die zwischen den einzelnen Varianten bestehenden Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Mutantentypen können, sofern sie nicht zufallsbedingt sind, zwei Ursachen haben:

1. Epistasie der frühletalen Mutationen über die spätletalen, was mit zunehmender Häufigkeit von Nachkommenschaften, die für mehrere Mutationen spalten, zu einer scheinbaren Verringerung des Anteils spätletaler Mutanten führt;
2. Variable Manifestierung einiger Mutationen, was zur Folge hat, daß die zu einer solchen Mutation

gehörenden Mutanten verschiedenen Typen zugeordnet werden.

Eine sichere Abgrenzung ist aber zwischen den echten embryonal-letalen Typen (*sicca* bis *parva*) einerseits und den meist keimlingsletalen chlorophylldefekten Typen (*fusca* bis *chlorina*) andererseits möglich. Da die letztgenannten auch noch den Vorteil haben, daß sie praktisch nie als Phänokopien auftreten, sondern stets Ausdruck von rezessiven Mutationen mit meist normalem Spaltungsverhältnis sind, werden sie unter der Bezeichnung „Chlorophyllmutationen“ als besondere Gruppe zusammengefaßt.

Die quantitative Erfassung der Mutanten bzw. spaltenden Nachkommenschaften erfolgte nur bis zu einer Konzentration von 25 mM. Die nach Einwirkung von 40 mM oder 80 mM EMS drastisch verringerte Fertilität läßt es nicht sinnvoll erscheinen, in diesem Fall noch Kennziffern für die Mutationsfrequenz zu bestimmen.

Die für die Gesamtheit der rezessiven Letalmutationen berechneten Kennziffern  $m_a$ ,  $m_b$  und  $m_c$  zeigen, wie aus Tab. 3 und Abb. 1 ersichtlich, jeweils eine Form der Abhängigkeit von der Konzentration, die einem sigmoiden Kurvenverlauf entspricht. (Für  $m_c$  konnte der obere Kurvenabschnitt nicht ermittelt werden, doch läßt eine ungefähre Abschätzung der Mutantenfrequenz in der 40 mM-Variante deutlich erkennen, daß sich  $m_c$  erwartungsgemäß bei einem weiteren Anstieg der Konzentrationen auch weiter erhöht.) Der Sättigungseffekt (asymptotische Annäherung an den Maximalwert 100%) resultiert aus der Tatsache, daß in zunehmendem Maße Nachkommenschaften auftreten, die für mehrere Mutationen spalten, die sich also von mehrfach mutierten Zellen herleiten. Keine der genannten Kennziffern kann also der Anzahl der induzierten Mutationen direkt proportional sein. Unter der mit guter Annäherung als berechtigt geltenden Annahme, daß die Verteilung der Mutationen auf die Zellen einer Poisson-Verteilung folgt (vgl. Diskussion), ergeben sich für die mittlere Anzahl der Mutationen pro Zelle folgende Schätzwerte:

$$M_b = -\ln(1 - m_b)$$

$$M_c = -5 \ln(1 - m_c)$$

Auf die Frage nach der Genauigkeit dieser Schätzwerte ist in der Diskussion noch einzugehen. Hier soll nur auf die Tatsache hingewiesen werden, daß bei kleinen Mutationsfrequenzen zwischen beiden Schätzwerten eine gute Übereinstimmung besteht, während bei höheren Mutationsfrequenzen die Werte für  $M_b$  in der Regel etwas größer sind als die Werte für  $M_c$  (Tab. 3, Abb. 2).

Allerdings zeigt unabhängig davon, welcher Schätzwert benutzt wird, die mittlere Anzahl der Mutationen pro Zelle mit zunehmender Konzentration einen deutlich exponentiellen Anstieg. Es gilt also die Beziehung:

$$M_{b,c} = (k \cdot \text{conc})^n,$$

wobei die Formel den Befunden am besten gerecht wird, wenn die Konstante  $k = 67 \text{ M}^{-1}$  gesetzt wird. Der Exponent  $n$  kann für  $M_c$  Werte von 1,9 bis 2,2 und für  $M_b$  Werte von 2,0 bis 2,3 annehmen.

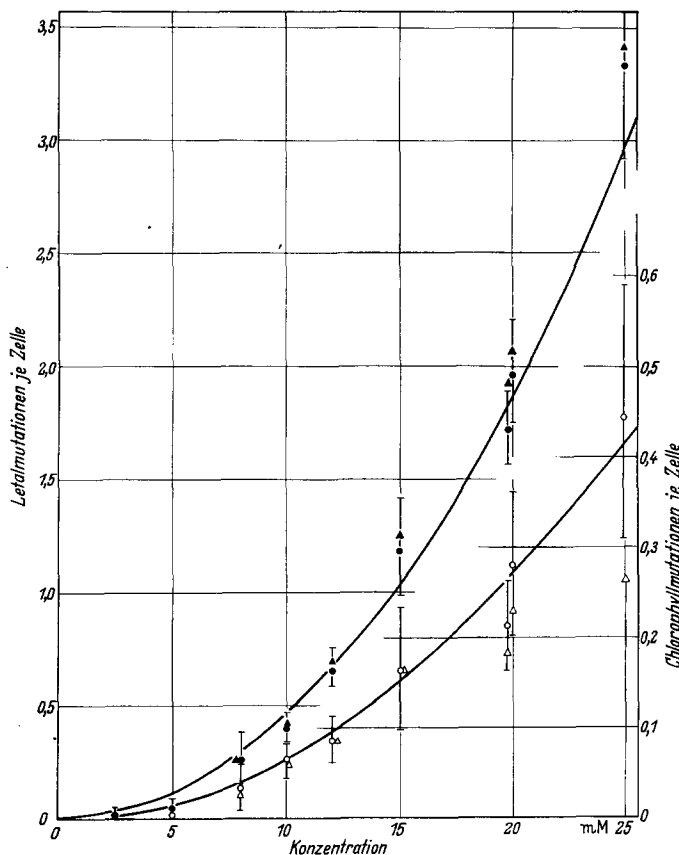


Abb. 2 (Versuche 1 u. 2). Mittlere Anzahl der Mutationen pro Zelle in Abhängigkeit von der EMS-Konzentration (18 h bei 22 °C). Rezessive Letalmutationen (alle Typen): ● —  $M_c$ , ▲ —  $M_b$ . Rezessive Chlorophyllmutationen: ○ —  $M'_c$ , △ —  $M'_b$ . Konfidenzgrenzen für  $P = 0,05$  ( $t$ -Verteilung) zu  $M_c$  und  $M'_c$ . Die obere Kurve stellt die Funktion  $M_c = (67 \cdot \text{conc})^2$ , die untere Kurve die Funktion  $M'_c = (26 \cdot \text{conc})^2$  dar.

**Chlorophyllmutationen:** Wurden nur die Chlorophyllmutationen berücksichtigt, dann ergaben sich für die einzelnen Kennziffern (die in diesem Fall als  $m'_a$ ,  $m'_b$  bzw.  $m'_c$  bezeichnet wurden) erwartungsgemäß geringere Werte (Tab. 3). Dabei ist zu beachten, daß mit steigender Konzentration in zunehmendem Maße Nachkommenschaften auftraten, die außer für eine Chlorophyllmutation auch noch für embryonale Letalmutationen spalteten. Derartige Nachkommenschaften gingen folgerichtig in die Berechnung der Frequenz der für Chlorophyllmutationen spaltenden Nachkommenschaften ( $m'_b$ ) ein. Da die embryonalen Letalmutationen epistatisch über die Chlorophyllmutationen sind, als Nachkommenschaftsgröße also nur die Anzahl der nicht-letalen Embryonen gerechnet werden kann, verringert sich folglich in diesem Fall die effektive Nachkommenschaftsgröße. So bestand z. B. in der 25 mM-Variante die geprüfte Nachkommenschaft im Mittel aus 18,0 Embryonen, von denen aber nur 10,6 nicht-letale Embryonen waren. Das mußte zur Folge haben, daß einige der für Chlorophyllmutationen spaltenden Nachkommenschaften nicht als solche erkannt wurden.  $m'_a$  und  $m'_b$  mußten daher mit steigender Konzentration einer zunehmenden Unterschätzung ausgesetzt sein. Da  $m'_c$  (und folglich auch  $M'_c$ ) von dieser Unterschätzung frei ist, wird somit verständlich, daß  $M'_b$  bei den 20 mM- und 25 mM-Varianten kleiner als  $M'_c$  ist, im unteren Konzentrationsbereich aber mit  $M'_c$  übereinstimmt (Tab. 3, Abb. 2).

$m'_c$  wurde stets als Anteil der Chlorophyllmutationen an der Gesamtzahl der nicht-letalen Embryonen berechnet.

Wie aus Abb. 2 ersichtlich, zeigt  $M'_c$  eine ausgeprägt exponentielle Abhängigkeit von der Konzentration. Genau wie für die Gesamtheit der rezessiven Letalmutationen kann auch für die Chlorophyllmutationen der Exponent als  $n = 2$  angenommen werden ( $k = 27 \text{ M}^{-1}$ ), doch bleiben auch Kurven mit einem Exponenten zwischen 1,7 und 2,4 in den meisten Fällen noch innerhalb des Konfidenzbereiches für  $P = 5\%$  und können daher nicht ausgeschlossen werden.

Beweise für eine konzentrationsabhängige Veränderung der Relation zwischen embryonalen Letalmutationen und Chlorophyllmutationen ergeben sich aus vorliegendem Material nicht (vgl. aber MÜLLER 1965 b); der Anteil der Chlorophyllmutationen an der Gesamtzahl der rezessiven Letalmutationen ( $M'_c/M_b$ ) schwankte zwischen 15,8% und 12,8% (Tab. 3).

## 2 (E): Abhängigkeit des Effekts von der EMS-Konzentration

Zur Überprüfung der im Versuch 1 erzielten Ergebnisse wurde unter sonst gleichen Bedingungen die Effektivität von EMS-Lösungen folgender Konzentration getestet: 8 mM, 12 mM, 20 mM. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2, 3 und 4 sowie in Abb. 2 dargestellt. Im Prinzip konnten die Befunde von Versuch 1 bestätigt werden. Nur die 20 mM-Variante ergab für alle zur Charakterisierung des mutagenen Effekts dienenden Kennziffern etwas geringere Werte als die entsprechende Variante in Versuch 1.

## 3 (W): Abhängigkeit des Effekts von der EMS-Konzentration

Da die Beziehung zwischen EMS-Konzentration und relativer Wurzellängenreduktion eventuell von den Behandlungsbedingungen abhängig sein konnte, wurde in einem weiteren Versuch diese Beziehung für Kurzzeitbehandlung von vorgequollenen Samen bestimmt.

Die Samen wurden 14 h bei 24 °C submers in Aqua dest. vorgequollen und dann EMS-Lösungen von 100, 200, 300 und 400 mM für die Dauer von 1 h bei 36 °C ausgesetzt. Anschließend wurde 3 h lang bei 36 °C in Aqua dest. nachgequollen. Die Samen wurden gemeinsam mit einer 18 h submers in Aqua dest. gequollenen Kontrolle zum Keimwurzeltest ausgelegt. Keimverzögerung und Wurzellängenreduktion wurden bestimmt.

Fünf Tage nach Keimbeginn in der Kontrolle hatten in allen Varianten (mit Ausnahme der 400 mM-Variante) 100% der Samen gekeimt. In der 400 mM-Variante betrug die Keimungsrate 85%. Alle Behandlungsvarianten wiesen eine konzentrationsabhängige Verzögerung des Keimbegins auf (Abb. 3).

Tabelle 4. Häufigkeitsverteilung der Mutanten-Typen in verschiedenen Versuchsserien.

Versuch Nr.	Behandlung	Anzahl Mutanten	Häufigkeit der Mutanten-Typen (in %)							
			<i>sicca + brevis</i>	<i>vana + diffusa</i>	<i>murca</i>	<i>parva</i>	<i>fusca</i>	<i>albina</i>	<i>xantha</i>	<i>chlorina</i>
1	2,5 mM, 18 h	395	19,2	26,1	35,7	5,6	3,8	2,0	0	7,6
	5 mM, 18 h	998	27,0	34,7	20,4	8,8	0,9	0	3,3	4,9
	10 mM, 18 h	7521	23,1	33,2	23,2	6,3	0,4	2,5	3,2	8,1
	15 mM, 18 h	2614	36,7	27,7	21,9	1,5	0	1,1	1,4	10,2
	20 mM, 18 h	3771	33,8	33,1	23,4	1,3	0	0,4	1,4	7,0
	25 mM, 18 h	6123	32,6	30,8	25,1	0,7	0,3	0,3	1,2	9,0
2	8 mM, 18 h	961	36,1	29,1	19,7	3,6	0	0	2,0	9,5
	12 mM, 18 h	6549	30,6	36,6	17,9	2,6	0,3	0,6	2,6	8,8
	20 mM, 18 h	9304	33,4	31,5	22,8	1,0	0,3	0,2	1,2	9,6
7	5 mM, 18 h	528	35,8	40,7	14,8	2,8	0	0	4,0	1,9
	5 mM, 36 h	5051	36,2	29,7	22,6	3,2	0	0,3	1,6	6,4
	5 mM, 45 h	6405	39,4	23,7	25,1	3,2	0,2	0,4	1,7	6,3
9	10 mM, 18 h (o)	6208	30,7	34,6	18,9	2,5	0,4	0,6	1,0	11,3
	10 mM, 18 h (1 h)	3542	28,0	26,6	26,4	2,4	0,8	0,3	1,2	14,3
	10 mM, 18 h (18 h)	4997	30,6	25,5	22,8	3,3	1,0	0	1,2	15,6
11	10 mM, 18 h (21°)	2460	25,5	37,0	21,5	2,6	0,4	0,2	1,9	10,8
	10 mM, 18 h (40°)	3410	32,4	35,4	19,1	0,1	0,7	1,3	1,5	9,4

Die sehr kurze Behandlungszeit erlaubt eine wichtige Schlußfolgerung hinsichtlich des Zeitraumes, in dem die EMS-Wirkung erfolgt. Da die von den Zellen des Wurzelmeristems aufgenommene EMS-Menge innerhalb einer Stunde hineindiffundiert ist, kann angenommen werden, daß nach dreistündigem Nachquellen zumindest der größte Teil des nicht zur Reaktion gelangenden EMS wieder herausdiffundiert ist. Daraus folgt, daß die Keimverzögerung nicht dadurch bedingt sein kann, daß während der Keimung noch EMS in den Zellen vorliegt. Die Keimverzögerung wird also bereits im ruhenden Samen induziert. Gleiches gilt für die Hemmung des Keimwurzelwachstums.

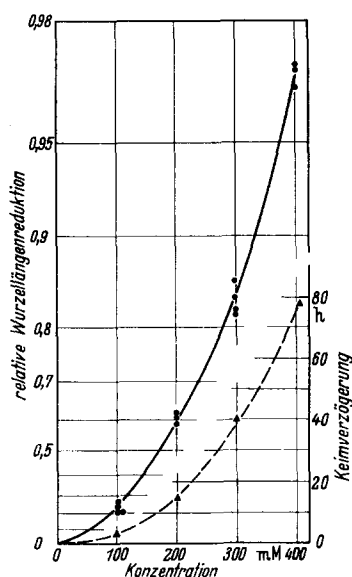


Abb. 3 (Versuch 3). Relative Wurzellängenreduktion und Keimverzögerung in Abhängigkeit von der EMS-Konzentration (Vorquellen: 14 h bei 24 °; Behandlung: 1 h bei 36 °; Nachquellen: 3 h bei 36 °).

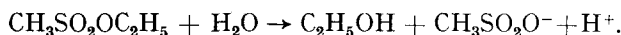
● — relative Wurzellängenreduktion (Ergebnis einer Wiederholung). ▲ — Verzögerung der 50%-Keimung gegenüber der Kontrolle (in h). Ordinate negativ logarithmisch.

Wie aus den in Abb. 3 angegebenen Werten für die relative Wurzellängenreduktion ersichtlich, hat die Dosis-Effekt-Kurve eine sigmoide Form und geht daher bei Verwendung einer negativ logarithmischen Ordinatenskala in eine exponentielle Kurve über. Diese Transformation ist insofern praktisch, als sie bei direkter Abhängigkeit der durch die Konzentrationseinheit induzierten Wurzellängenreduktion von der Wurzellänge zu einer linearen Dosis-Effekt-Kurve führen müßte (MÜLLER 1964 b). Das Vorliegen einer exponentiellen Kurve beweist also, daß die durch einen bestimmten Konzentrationszuwachs bedingte Erhöhung der Wurzellängenreduktion nicht allein von der Wurzellänge, sondern auch von der Höhe der Konzentration abhängig ist.

Die hier gefundene Dosis-Effekt-Beziehung entspricht den Ergebnissen der Versuche 1 und 1a. Auch die Relation zwischen Keimverzögerung und Wurzellängenreduktion stimmt prinzipiell mit den dort gefundenen Werten überein, ist also unabhängig davon, ob eine bestimmte EMS-Dosis in 18 h oder in 1 h appliziert wird und ob die Behandlungstemperatur 24 ° oder 36 ° beträgt.

#### 4 (W, E): Hydrolyse und Effekt der Hydrolyseprodukte

In wäßriger Lösung zersetzt sich EMS zu Äthylalkohol und Methansulfonsäure:



Über die Kinetik dieser Reaktion liegen für den Temperaturbereich von 0 ° bis 50 °C genaue Angaben vor (FROESE-GERTZEN et al. 1963). Demnach handelt es sich um eine Reaktion erster Ordnung; die nach einem Zeitintervall  $t$  vorliegende EMS-Konzentration ergibt sich also als:

$$c_t = c_0 \cdot \exp(-k_T t)$$

wobei  $c_0$  = Anfangskonzentration des EMS

$k_T$  = Reaktionskonstante bei der Temperatur  $T$ . Der Temperaturquotient für die Hydrolyserate verringert sich mit steigender Temperatur von  $Q_{10} = 4,5$  für den Bereich 0 °–10 °C auf  $Q_{10} = 3,0$  für den Bereich 40 °–50 °C. Aus den Ergebnissen von FROESE-GERTZEN et al. (1963) ergeben sich z. B. folgende Reaktionskonstanten:

$$k_{24}^\circ = 0,013/\text{h}$$

$$k_{36}^\circ = 0,056/\text{h}$$

$$k_{50}^\circ = 0,264/\text{h}.$$

Zumindest für den sauren Bereich hat sich die Hydrolyserate als unbeeinflusst vom pH-Wert erwiesen.

Die als Folge der Hydrolyse entstehende Methansulfonsäure kann auf das behandelte biologische Material toxisch wirken. Die Aufnahme der Säure durch Weizen-Samen wurde parallel zur Aufnahme des unhydrolysierten Esters von BELLI und CERVIGNI (1964) bestimmt. FROESE-GERTZEN et al. (1964) fanden, daß Behandlung von Gersten-Samen mit partiell hydrolysierten EMS-Lösungen zu einer stärkeren Wachstumshemmung führt als Behandlung mit unhydrolysierten Lösungen. Dieser toxische Effekt der Hydrolyseprodukte konnte jedoch durch Pufferung verringert werden, was darauf hindeutet, daß der entscheidende Faktor die erhöhte H-Ionenkonzentration ist.

Es war also nur noch zu prüfen, 1. ob auch unter unseren Versuchsbedingungen für die während der Behandlungszeit erfolgende Hydrolyse die oben angeführten Reaktionskonstanten in Rechnung gesetzt werden können, und 2. welchen Einfluß die Hydrolyseprodukte auf Samen von *Arabidopsis* ausüben.

Je 6 ml einer 200 mM EMS-Lösung wurden mit 50 mg Samen versetzt und für die Dauer von 4 h, 8 h, 24 h bzw. 36 h Temperaturen von 24 °, 36 ° bzw. 50 °C ausgesetzt. Nach Bestimmung der H-Ionen-Konzentration durch Titration mit NaOH unter Zusatz von Phenolphthalein wurden die partiell hydrolysierten Lösungen von den Samen abfiltriert und sofort zur Behandlung anderer, 10 h in Wasser vorgequollener Samen verwendet. Zu diesem Zweck wurden alle Lösungen auf 36 °C gebracht und bei dieser Temperatur 1 h auf die Samen einwirken gelassen. Anschließend wurden die behandelten Samen 3 h bei 36 °C in Aqua dest. nachgequollen und für den Keimwurzeltest in Petrischalen ausgelegt. Von der Variante, die mit vollständig hydrolysierten Lösungen behandelt worden war, wurde zusätzlich ein Teil der Samen auf Erde ausgesät und  $M_1$ -Pflanzen zur Ermittlung der Mutationsfrequenz angezogen.

Die Ergebnisse sind in Tab. 5 dargestellt; Die gefundene Zunahme der H-Ionen-Konzentration, die die Konzentration der freigesetzten Methansulfonsäure zum Ausdruck bringt, entspricht recht gut den mit Hilfe der oben angeführten Reaktionskonstan-



ten errechneten Werten. Die Anwesenheit von Samen in der EMS-Lösung beeinflusst also den Hydrolyseverlauf nicht nachweisbar. Einstündige Behandlung von vorgequollenen Samen mit den Hydrolysaten führte in keinem Fall zu einer Verringerung der Keimungsrate gegenüber der Kontrolle. Die von den Hydrolysaten induzierte Wurzellängenreduktion entspricht — wie ein Vergleich mit den Ergebnissen von Versuch 3 beweist — im Rahmen der möglichen Versuchsgenauigkeit den bei der angegebenen EMS-Konzentration zu erwartenden Werten, stellt also im wesentlichen eine Wirkung des EMS dar. Die etwas über der Erwartung liegenden Werte für die Wurzellängenreduktion nach Behandlung mit stark hydrolysierten Lösungen weisen auf einen geringen toxischen Effekt der Hydrolyseprodukte hin. Da Äthylalkohol in Konzentrationen bis zu 200 mM keine schädigende Wirkung auf die Samen ausübt, folgt aus diesem Ergebnis, daß 200 mM Methansulfonsäure (pH 0,7) unter Behandlungsbedingungen, bei denen 200 mM EMS zu 64% Wurzellängenreduktion bzw. 15 h Keimverzögerung führt, nur eine Wurzellängenreduktion von 8% bewirkt (Ergebnisse der Wiederholungen: 2%, 15%, 7%; Keimverzögerung 6 bis 9 h).

Tabelle 5 (Versuch 4). *Abnahme der EMS-Konzentration durch Hydrolyse und die durch Behandlung (1 h bei 36°) von vorgequollenen Samen mit den partiell hydrolysierten Lösungen induzierte Hemmung des Wurzelwachstums.*

Hydrolyse		pH	EMS-Konzentration <sup>1</sup> (mM)	Wurzellängenreduktion (%)	
Temperatur (°C)	Zeit (h)			gefunden	erwartet <sup>2</sup>
—	0	4,8	200	64	64
24	4	2,12	192	58	62
24	8	1,62	177	52	57
24	24	1,31	151	44	46
36	4	1,53	171	53	55
36	8	1,14	128	35	40
36	24	0,82	49	17	10
50	4	0,89	71	17	16
50	8	0,77	30	15	4
50	24	0,70	0	8	0
50	36	0,70	0	9	0

<sup>1</sup> errechnet aus der Zunahme der H-Ionen-Konzentration.

<sup>2</sup> auf Grund der EMS-Konzentration entsprechend den Befunden von Versuch 3.

Es wurde weiterhin geprüft, welchen Einfluß die vollständig hydrolysierte Lösung bei längerer Einwirkung auf die Samen ausübt: Nach 2stündiger Behandlung bei 36 °C (Nachquellen: 3 h bei 36°) waren der Keimbegriff um 18 h und die 50%-Keimung um 30 h gegenüber der Kontrolle verzögert; 30% der Samen keimten gar nicht. Natürlich war infolge der Keimverzögerung die mittlere Wurzellänge deutlich geringer als bei der Kontrolle. Es zeigte sich jedoch, daß nach erfolgter Keimung die Wurzeln praktisch genau so schnell wuchsen wie in der Kontrolle. Samen, die 4 h lang bei 36 °C mit der vollständig hydrolysierten Lösung behandelt worden waren, keimten nur zu 7%. Methansulfonsäure führt also bei *Arabidopsis* zwar zur Verzögerung der Keimung bzw. zur Abtötung der Samen, induziert aber keine nach der Keimung anhaltende Wachstumsverzögerung der Keimwurzeln.

Die vollständig hydrolysierte Lösung wies auch keine nachweisbare mutagene Aktivität auf. Die Auswertung der Embryonen von 300 M<sub>1</sub>-Pflanzen (jeweils eine Schotennachkommenschaft) führte zu Werten für die Mutationsfrequenz ( $m_h = 0,4\%$ ,  $m_e =$

0,09%), die von der Kontrolle nicht signifikant verschieden sind. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem Befund, daß vollständig hydrolysierte EMS-Lösungen in Wurzelspitzen von *Vicia faba* keine Chromosomenaberrationen zu induzieren vermögen (RIEGER und MICHAELIS 1960).

#### 5 (W): Einfluß der Temperatur

Durch Erhöhung der während der Behandlungszeit herrschenden Temperatur könnte die Effektivität einer bestimmten EMS-Behandlung auf folgende Weise beeinflusst werden:

1. durch beschleunigte Hydrolyse in der Behandlungslösung,
2. durch beschleunigte Penetration des EMS in die Zelle,
3. durch beschleunigte Reaktion des EMS mit den Zellbestandteilen, die für das Zustandekommen des Effekts entscheidend sind,
4. durch Beeinflussung von späteren, auf die Alkylierung folgenden Reaktionsschritten.

Da die beiden ersten Faktoren nur die in der Zelle zur Reaktion bereitgestellte EMS-Menge beeinflussen, sollten sie nach Möglichkeit bei der Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der in-vivo-Reaktion des EMS ausgeschaltet werden. Der Einfluß der Hydrolyse kann durch kurzfristiges Erneuern der Behandlungslösung oder durch Verkürzung der Behandlungszeit eliminiert werden. Um die Penetrationsgeschwindigkeit zu kontrollieren, ist die Verwendung von maximal gequollenen Samen angebracht, da in diesem Fall die Aufnahme des EMS als reiner Diffusionsvorgang aufgefaßt werden kann (WALLES und AHNSTRÖM 1965). Werden die Samen im Anschluß an die Behandlung bei genau gleicher Temperatur in Wasser nachgequollen, dann sollte demnach die Abnahme der intrazellulären EMS-Konzentration mit der gleichen Diffusionsrate erfolgen wie die Erhöhung der intrazellulären EMS-Konzentration während der Behandlungszeit. Das hätte zur Folge, daß bei erhöhter Temperatur zwar die intrazelluläre EMS-Konzentration schneller ansteigt, aber nach Behandlungsschluß auch dementsprechend schneller wieder absinkt, so daß allein aus der erhöhten Diffusionsrate keine wesentliche Effektivitätserhöhung resultieren dürfte.

Tabelle 6 (Versuch 5). *Hemmung des Wurzelwachstums in Abhängigkeit von der Behandlungszeit und der Temperatur während der Behandlung und während des Nachquellens (Vorquellen: 12 h bei 24°; Behandlung: 200 mM EMS bei pH 7; Nachquellen: 16 h). Jeder Wert stellt das Mittel aus drei Wiederholungen dar.*

Temperatur (°C)	Behandlungszeit (h)	Wurzellängenreduktion (%)
18	5,2	70
24	3	71
30	1,7	69
36	1	72

Vorversuche hatten ergeben, daß der Effekt ungefähr konstant bleibt, wenn eine Temperaturerhöhung von 24° auf 36 °C durch eine Verkürzung der Behandlungszeit um den Faktor  $\frac{1}{3}$  kompensiert wird. Es sollte nun geprüft werden, ob dieser Temperaturquotient für den Temperaturbereich von 18° bis

36 °C gültig ist. Für jede Temperaturerhöhung um 6 °C wurde daher die Behandlungszeit um den Faktor 0,58 verkürzt (vgl. Tab. 6). Dementsprechend kam eine 200 mM EMS-Lösung z. B. bei 18 °C 5,2 h lang, bei 36 °C 1 h lang zur Einwirkung. Die durch Hydrolyse bedingte Abnahme der Konzentration in der Behandlungslösung betrug bei diesen Behandlungszeiten nur 5,5% (bei 36°) bzw. 3,1% (bei 18°), konnte also vernachlässigt werden. Als Maß für die Effektivität der Behandlung diente die Wurzellängenreduktion.

Wie aus Tab. 6 ersichtlich, entspricht das Ergebnis der Erwartung. Im Rahmen des getesteten Temperaturbereichs ergibt sich also für die Reaktionskonstante ein Temperaturquotient von  $Q_6 = 1,7$  bzw.  $Q_{10} = 2,6$ .

#### 6 (E): Einfluß der Temperatur

Um zu prüfen, ob der für die Induktion der Wachstumshemmung ermittelte Temperaturquotient auch für die Mutationsauslösung gültig ist, kam 50 mM EMS 1 h bei 36 °C bzw. 3 h bei 24 °C auf vorgequollene Samen zur Einwirkung. Die behandelten Samen wurden für die Dauer von 16 h bei 36° bzw. 24 °C in Aqua dest. submers nachgequollen und dann zur Anzucht von  $M_1$ -Pflanzen auf Erde ausgespritzt. Nach Auswertung von jeweils 300  $M_1$ -Pflanzen (eine Schotennachkommenschaft pro  $M_1$ -Pflanze) ergaben sich

für 1 h bei 36 °C:  $m_b = 62,3\%$ ,  $s = 9,4\%$ ,

für 3 h bei 24 °C:  $m_b = 56,7\%$ ,  $s = 9,2\%$ .

Die statistische Beurteilung der Differenz zwischen den Werten für  $m_b$  erfolgte mit Hilfe des *U*-Tests von MANN und WHITNEY: je Variante 6 Teilerien,  $U = 7$ ,  $P = 9,4\%$  (zweiseitiger Test). Die Differenz kann also mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit als zufallsbedingt angesehen werden. Somit ist das vorliegende Ergebnis mit der Annahme von  $Q_{10} = 2,6$  verträglich; geringe Abweichungen von diesem Wert können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

#### 7 (E): Abhängigkeit des Effekts von der Behandlungszeit

5 mM EMS-Lösungen kamen bei 22 °C für die Dauer von 0,5 h, 2 h, 6 h, 18 h, 36 h bzw. 54 h auf lufttrockene Samen zur Einwirkung. Jeweils nach 18 h wurde die Lösung erneuert. Nach Abschluß der Behandlung wurden die Samen gespült, 3 h bei 22 °C in Aqua dest. nachgequollen und dann auf Erde zur Anzucht von  $M_1$ -Pflanzen ausgespritzt. Durch Untersuchung von 5 Schoten je Pflanze wurden Sterilitätsgrad und die Kennziffern der Mutationsfrequenz bestimmt.

Überleben und Größe der  $M_1$ -Pflanzen waren in keiner Behandlungsvariante von der Kontrolle signifikant verschieden. Wie aus Tab. 2 und 3 ersichtlich, nahmen Sterilitätsgrad und Mutationsfrequenz mit steigender Behandlungsdauer stetig zu. Die Relation zwischen dem Sterilitätsgrad und den verschiedenen Kennziffern der Mutationsfrequenz entsprach ungefähr der in Versuch 1 ermittelten Relation. Auch die Beziehungen zwischen den beiden Schätzwerten der mittleren Anzahl der Mutationen pro Zelle,  $M_b$  und  $M_e$ , entsprach den in Versuch 1 gefundenen Verhältnissen.

Bei einer Behandlungsdauer von 0,5 h ergaben sich Werte für  $m_b$  und  $m_e$ , die noch unterhalb der für die Kontrolle ermittelten Werte lagen. Wurde dagegen die Behandlung auf 54 h ausgedehnt, so wiesen alle

201  $M_1$ -Pflanzen in mindestens einer der 5 geprüften Schoten Mutanten auf ( $m_a = 100\%$ ,  $m_b = 85,6\%$ ,  $m_e = 29,0\%$ ).

Zur Beurteilung der tatsächlichen Effektivität muß die während der Behandlungszeit erfolgende Hydrolyse der EMS-Lösung berücksichtigt werden. Nach der bei Versuch 4 angegebenen Formel ist zu erwarten, daß sich bei 22 °C im Verlauf von 18 h 16% des EMS zersetzt haben ( $k_{22} = 0,0096/h$ ), die Konzentration also auf 4,2 mM abgesunken ist. Dann wurde durch Erneuern der Lösung die Konzentration wieder auf 5 mM gebracht, usw. In jedem Zeitintervall von 18 h wirkte also von außen auf die Samen eine Dosis von 0,0836 hM ein (berechnet als Integral der in jedem Zeitmoment auf die Samen einwirkenden Konzentration). Durch diese Außendosis wurden induziert: im ersten 18 h-Intervall 3,8, im zweiten 18 h-Intervall 67,5, im dritten 18 h-Intervall 122,3 Mutationen pro 100 Zellen ( $M_b$ ). Bei Annahme einer linearen Dosis-Effekt-Beziehung wäre aus diesem Ergebnis auf eine über den ganzen Zeitraum von 54 h fortschreitende Sensibilitätssteigerung zu schließen. Nehmen wir jedoch an, daß die Anzahl der Mutationen sich mit dem Quadrat der Dosis erhöht, dann erhalten wir folgende Relation zwischen den in den drei 18 h-Intervallen in den Zellen wirksam gewordenen Dosen: 1:3,1:2,8 (berechnet aus  $M_b$ ) bzw. 1:3,4:3,7 (berechnet aus  $M'_b$ ). Das würde bedeuten, daß im zweiten und dritten Intervall jeweils eine dreimal so hohe Dosis in den Zellen wirksam wird wie im ersten Intervall, was als Folge der verzögerten Aufnahme des EMS durch unvollständig gequollene Samen (WALLES und AHNSTRÖM 1965) erklärt werden kann.

#### 8 (W): Einfluß des submersen Nachquellens und des Rücktrocknens der behandelten Samen

Die Wirkung eines chemischen Agens in der Zelle erstreckt sich über zwei Perioden: 1. die zeitlich umgrenzte Behandlungsperiode, während der sich die intrazelluläre Konzentration des Agens unter Annäherung an die Außenkonzentration fortlaufend erhöht, und 2. die nicht genau abzugrenzende Nachwirkungsperiode, während der durch Reaktion mit den Zellbestandteilen, durch Hydrolyse und durch Herausdiffundieren die intrazelluläre Konzentration fortlaufend verringert wird. Die Effektivität eines Agens sollte daher auch noch während der Nachwirkungsperiode einflußbar sein, und zwar um so stärker, je kürzer die Behandlungsperiode war.

Wir prüften daher, inwieweit die Effektivität einer EMS-Behandlung davon abhängt, ob

1. während der Nachwirkungsperiode Keimbedingungen oder die Keimung verhindernde, partiell anaerobe Bedingungen herrschen,
2. die Samen in dieser Periode erhöhten Temperaturen ausgesetzt sind und
3. die Samen ohne Verringerung ihres Quellungsgrades oder erst nach Rücktrocknung und erneutem Quellen zum Keimen kommen.

Samen von *Arabidopsis* können mehrere Tage gequollen unter partiell anaeroben Bedingungen gehalten werden, ohne Schaden zu erleiden. Dabei gelangen sie nicht zum Keimen und können auch unter Aufrechterhaltung der Keimfähigkeit zurückgetrocknet werden (MÜLLER 1965d).

14 h bei 24 °C submers in Aqua dest. vorgequollene Samen wurden 1 h bei 36 °C mit 200 mM EMS behandelt. Anschließend wurden die behandelten Samen kurz abgespült und in mehrere Varianten unterteilt, die für die Dauer von 0 h, 1 h, 6 h, 11 h bzw. 24 h jeweils bei 24 °C bzw. 36 °C in Aqua dest. submers nachgequollen wurden. Nach Beendigung der Nachquellperiode erfolgte nochmals eine Unterteilung jeder Variante: Ein Teil der Samen wurde sofort Keimbedingungen (24 °C, Luftzutritt) ausgesetzt und in Petrischalen zum Keimwurzeltest ausgelegt, der andere Teil wurde zuerst bei 24 °C und 50% Luftfeuchtigkeit getrocknet, 6 Tage aufbewahrt und dann erst Keimbedingungen ausgesetzt. Als Kontrolle dienten jeweils Samen, die den gleichen Vor- und Nachbehandlungen wie die mit EMS behandelten Varianten ausgesetzt waren und zum gleichen Zeitpunkt unter Keimbedingungen kamen. Bestimmt wurden Keimungsrate, Keimungsverzögerung und relative Wurzellängenreduktion.

Tabelle 7 (Versuch 8). *Hemmung des Wurzelwachstums in Abhängigkeit vom submersen Nachquellen und vom Rücktrocknen der mit EMS behandelten Samen (Vorquellen: 14 h bei 24 °C; Behandlung: 1 h bei 36 °C mit 200 mM EMS). Jeder Wert stellt das Mittel aus 3 Wiederholungen dar.*

Nachquelldauer und -temperatur	Wurzellängenreduktion (%)	
	ohne Rücktrocknung	6 Tage Rücktrocknung
0 h	51	letal
1 h, 24 °C	48	letal
6 h, 24 °C	47	68
11 h, 24 °C	48	47
24 h, 24 °C	47	48
1 h, 36 °C	56	letal
6 h, 36 °C	49	69
11 h, 36 °C	60	60
24 h, 36 °C	59	60

Die Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengestellt. Die Keimungsrate betrug in allen Varianten, bei denen Zahlen für die Wurzellängenreduktion angegeben sind, 97 bis 100% und war in keinem Fall von der Kontrolle signifikant verschieden. Die Keimverzögerung entsprach sowohl bei den sofort zum Keimen gebrachten Varianten als auch bei den rückgetrockneten Varianten den Werten für die relative Wurzellängenreduktion. (Zum Beispiel war bei 69% Wurzellängenreduktion die Keimung um rund 21 h gegenüber der Kontrolle verzögert; vgl. Abb. 3.).

Hinsichtlich des Einflusses des Nachquellens (ohne Rücktrocknung) führte der Versuch zu folgendem Ergebnis: Wurden die behandelten Samen nicht unter Luftzutritt auf feuchtes Filterpapier gegeben, sondern bei gleicher Temperatur (24 °C) 1 h oder länger submers in Wasser gehalten, so verringerte sich der Effekt um einen sehr geringen Betrag. Durch Verlängerung der submersen Nachquellperiode bis zu 24 h und die dadurch bedingte Verzögerung des Keimbeginns um 24 h wurde der Effekt nicht beeinflusst. Erfolgte das submerse Nachquellen jedoch bei einer höheren Temperatur (36 °C), so war der Effekt sowohl gegenüber der sofort (bei 24 °C) zum Keimen gebrachten Variante als auch gegenüber den bei 24 °C nachgequollenen Varianten erhöht. Dieser Temperatureinfluss war in der ersten Stunde nach Behandlungsschluß am ausgeprägtesten und verringerte sich dann allmählich. Durch Verlängern des Nachquellens bei 36 °C über 6 h hinaus konnte keine weitere Erhöhung des Effekts erzielt werden.

Durch das Rücktrocknen wurden die Samen auf folgende Weise beeinflusst: Erfolgte die Rücktrocknung sofort nach Behandlungsschluß oder nach ein-

stündigem submersen Quellen (bei 24 °C oder 36 °C), so verloren die Samen ihre Keimfähigkeit. Lag jedoch zwischen Behandlungsschluß und Rücktrocknung eine Nachquellperiode von 6 h oder länger, dann war die Keimungsrate normal. Nach 6stündigem Nachquellen ergab sich zwar noch eine stärkere Wurzellängenreduktion als ohne Rücktrocknung, nach 11stündigem oder längerem Nachquellen wurde jedoch die EMS-induzierte Wurzellängenreduktion durch das Rücktrocknen nicht mehr beeinflusst. Der bei der Rücktrocknung wirksam werdende Faktor verringerte sich also im Verlauf der Nachquellperiode, und zwar bei 36 °C offensichtlich etwas schneller als bei 24 °C.

Außerdem hat sich gezeigt, daß die schädigende Wirkung des Rücktrocknens auch von der Dauer der Trocknung abhängt. Wurden die Samen nicht 6 Tage, sondern nur einen Tag lang getrocknet, so ergab sich nach 6stündigem Quellen bei 24 °C anstelle von 68% Wurzellängenreduktion nur 55% (ohne Rücktrocknung: 47%).

Bei unbehandelten Samen beeinflusst 24stündiges submerses Quellen bei 36 °C und anschließendes Rücktrocknen weder die Keimung noch das Wurzelwachstum signifikant. Die in Tab. 7 angegebenen Werte für die relative Wurzellängenreduktion sind also ausschließlich durch die EMS-Behandlung bedingt.

#### 9 (E): Einfluß des submersen Nachquellens

In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob die Mutationsfrequenz in gleicher Weise wie die Wurzellängenreduktion (vgl. Versuch 8) von der Dauer des submersen Nachquellens abhängig ist.

Trockene Samen wurden 18 h lang bei 24 °C mit 10 mM EMS behandelt. Anschließend wurden die behandelten Samen in drei Varianten geteilt: Die erste Variante wurde nur gespült und dann sofort an Erde ausgespritzt und zum Keimen gebracht. Die beiden anderen Varianten wurden vor Gewährung der Keimbedingungen noch 1 h bzw. 18 h lang bei 24 °C submers in Aqua dest. nachgequollen. Nach Anzucht der  $M_1$ -Pflanzen wurden durch Prüfung von 5 Schoten je Pflanze der Sterilitätsgrad und die Kennziffern der Mutationsfrequenz bestimmt.

Wie aus den in den Tabellen 2, 3 und 4 dargestellten Ergebnissen ersichtlich, entsprachen bei jeder Variante die Relationen zwischen den verschiedenen Kennziffern für den genetischen Effekt recht gut den im Konzentrationsversuch (1 u. 2) gefundenen Relationen. Der Effekt war unabhängig davon, ob nur 1 h oder 18 h nachgequollen wurde. Die sofort Keimbedingungen ausgesetzte Variante wies etwas höhere Werte für die mittlere Anzahl der rezessiven Letalmutationen pro Zelle ( $m_b$  und  $m_c$ ) auf. Allerdings ist die Differenz sowohl gegenüber der 18 h-Variante als auch gegenüber der 1 h-Variante nach dem U-Test (zweiseitige Fragestellung) nur bei  $P = 2\%$  signifikant. Hinsichtlich der mittleren Anzahl der Chlorophyllmutationen pro Zelle bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Varianten. Durch das submerse Nachquellen und die dadurch gegebenen partiell anaeroben Bedingungen wird also die Effektivität der EMS-Behandlung nicht beeinflusst.

#### 10 (E): Einfluß des submersen Nachquellens

Die im Versuch 9 festgestellte Unabhängigkeit der Mutationsfrequenz von der Dauer des submersen

Nachquellens wurde unter noch extremeren Bedingungen überprüft. 16 h bei 36 °C vorgequollene Samen wurden 1 h lang bei 36 °C mit 50 mM EMS behandelt und anschließend 2 h bei 36 °C in Aqua dest. submers nachgequollen. Dann wurden die Samen in zwei Varianten geteilt: Die erste Variante wurde sofort auf Erde ausgespritzt und begann unter den gegebenen Bedingungen (Luftzutritt, hohe Feuchtigkeit, 24 °C, Licht) nach 40 h zu keimen. Die zweite Variante blieb noch 46 h bei 24° submers in Aqua dest. und wurde erst dann auf Erde ausgespritzt. Sie begann dementsprechend erst 90 h nach Abschluß der EMS-Behandlung zu keimen. In beiden Varianten wurde nach Anzucht der  $M_1$ -Pflanzen durch Prüfung von einer Schote je Pflanze Sterilitätsgrad,  $m_b$  und  $m'_b$  bestimmt.

Tabelle 8 (Versuch 10). Die durch Behandlung vorgequollener Samen mit 50 mM EMS (1 h bei 36 °) induzierte Mutationsfrequenz in Abhängigkeit von der Dauer des submersen Nachquellens.

Nachquellen (h)	geprüfte Nachkommen-schaften	Steril.-Grad (%)	rez. Letalmutationen insgesamt		rez. Chlorophyll-mutationen	
			$m_b$ (%)	$M_b$ (.100)	$m'_b$ (%)	$M'_b$ (.100)
2	500	8,0	64,8	104,4	14,6	15,7
48	234	7,3	62,8	98,9	12,9	13,8

U-Test (zweiseitig):  $m_b - U = 22$ ,  $P > 10\%$ ;  $m'_b - U = 21$ ,  $P > 10\%$ .

Wie aus den in Tab. 8 dargestellten Ergebnissen ersichtlich, bestehen weder hinsichtlich des Sterilitätsgrades noch hinsichtlich der mittleren Anzahl der rezessiven Letalmutationen bzw. Chlorophyllmutationen pro Zelle signifikante Unterschiede zwischen beiden Varianten. Somit wird selbst durch sehr langes Nachquellen unter partiell anaeroben Bedingungen die Frequenz der EMS-induzierten Mutationen nicht nachweisbar beeinflusst.

#### 11 (E): Einfluß der Temperatur während der Nachquellperiode

In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob die Mutationsfrequenz in gleicher Weise wie die Wurzellängenreduktion (vgl. Versuch 8) durch erhöhte Temperatur während der Nachquellperiode beeinflusst wird.

Trockene Samen wurden 18 h lang bei 22 °C mit 8 mM EMS behandelt, dann abgespült und 1 h lang bei 22 °C in Aqua dest. nachgequollen. Anschließend wurden die behandelten Samen in 2 Varianten geteilt und jeweils noch 24 h submers nachgequollen. Bei der ersten Variante betrug die Temperatur während dieser Nachquellperiode 22°, bei der zweiten Variante 40 °C. Nach Anzucht der  $M_1$ -Pflanzen wurden durch Prüfung von 5 Schoten je Pflanze der Sterilitätsgrad und die Kennziffern der Mutationsfrequenz bestimmt.

Wie aus den in Tabellen 2, 3 und 4 dargestellten Ergebnissen ersichtlich, entsprachen bei jeder Variante die Relationen zwischen den verschiedenen Kennziffern für den genetischen Effekt recht gut den im Konzentrationsversuch (1, 2) gefundenen Relationen. Die Differenzen zwischen den Ergebnissen der beiden Varianten sind statistisch gut gesichert: sowohl für die Werte von  $m_b$  bzw.  $m'_b$  als auch für die Werte von  $M_b$  bzw.  $M'_b$  ergibt sich nach dem U-Test (zweiseitige Fragestellung)  $P < 0,2\%$ . Durch Erhöhung der Temperatur während der Nachquellperiode von 22° auf 40 °C erhöhte sich also die mittlere Anzahl der rezessiven Letalmutationen pro Zelle um den Faktor 2,2.

Bei der Beurteilung dieses Befundes ist zu beachten, daß die Temperaturerhöhung erst 1 h nach Beendigung der EMS-Einwirkung erfolgte. Der Temperatureinfluß kann also nur Prozesse betreffen, die nach diesem Zeitpunkt noch ablaufen, also entweder die Umsetzung des noch in der Zelle verbliebenen EMS oder einen weiteren Reaktionsschritt in der zur stabilen Mutation führenden Reaktionskette.

## Diskussion

### Quantitative Beziehungen zwischen verschiedenen EMS-Effekten

Die Ergebnisse der Konzentrationsversuche (1, 2 und 3) vermitteln für alle untersuchten Effekte eine vollständige Übersicht über den konzentrationsabhängigen Anstieg bis zu den gerade noch erfaßbaren Maximalwerten. Die quantitativen Beziehungen zwischen den wichtigsten Effekten sind in Abb. 1 zusammenfassend dargestellt. Durch Vergleich der Ergebnisse aller Versuche wird deutlich, daß die Relationen zwischen den einzelnen Effekten von Änderungen der Behandlungsbedingungen praktisch unbeeinflusst bleiben. Das gilt zumindest für folgende Bedingungen:

1. Quellungszustand der Samen,
2. Dauer der EMS-Behandlung,
3. Dauer der submersen Nachquellperiode,
4. Behandlungstemperatur,
5. Nachquelltemperatur.

Eine bestimmte Chlorophyllmutationsfrequenz wird also bei beliebiger Variation dieser Bedingungen stets von einer bestimmten Frequenz der embryonalen Letalmutationen, einem bestimmten Sterilitätsgrad und einer bestimmten Keimverzögerung und Wachstumshemmung der Primärwurzeln begleitet.

Natürlich wäre gerade der Nachweis einer differentiellen Beeinflussung verschiedener EMS-Effekte von besonderem Interesse, weil dadurch Aufschlüsse über den Entstehungsmechanismus der einzelnen Effekte gewonnen werden könnten. Wäre z. B. bei sehr kurzer Behandlungsdauer die Mutationsfrequenz relativ zur Wurzellängenreduktion geringer gewesen als bei langer Behandlungsdauer, so hätte daraus auf ein Konzentrationsgefälle im Samen geschlossen werden können. Derartige Unterschiede treten beispielsweise bei Behandlung von Gersten-Samen mit Diäthylsulfat auf (NILAN et al. 1964). (Faktoren, die allein bereits toxisch wirken, wie z. B. hohe Konzentrationen an Methansulfonsäure oder sehr lange submerse Nachquellperioden, sind natürlich in diesem Zusammenhang ohne Bedeutung.)

Die hier für EMS ermittelten Relationen zwischen den verschiedenen Kennziffern für die Letalmutationsfrequenz gelten im Rahmen der möglichen Zufallsschwankungen auch für alle bisher genügend genau untersuchten chemischen Mutagene, z. B. für N-Nitrose-N-methylharnstoff (MÜLLER 1964a), verschiedene andere Nitrosamide (MÜLLER 1965b und unveröffentlicht) oder Tri-2-chloräthylamin (MÜLLER 1966a). Nach Einwirkung von Röntgenstrahlen werden abweichende Relationen gefunden, weil in diesem Fall mit steigender Dosis 1. sich die mittlere Sektorengroße erhöht und 2. es zu einer relativ stär-

keren Zunahme der Sterilität und damit verbunden auch zu einer Erhöhung des relativen Anteils von frühembryonal letalen Mutationen kommt (MÜLLER 1965b).

Hinsichtlich der Beziehungen zwischen Mutationsfrequenz und Hemmung des Wurzelwachstums unterscheidet sich EMS nicht nur von Röntgenstrahlen, sondern auch von anderen chemischen Agenzien (s. Abschnitt „Hemmung des Wurzelwachstums“). Von praktischer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, daß nach Einwirkung von EMS auf *Arabidopsis*-Samen die somatische Schädigung der  $M_1$ -Pflanzen so gering ist, daß sie in keinem Fall der Steigerung der Mutationsfrequenz Grenzen setzt. Begrenzender Faktor ist allein die Sterilität (haplophasische Letalität). Die mutagene Effizienz von EMS wird also durch die Relation „Mutationsfrequenz zu Sterilität“ bestimmt und könnte daher nur durch Faktoren, die diese Relation zu beeinflussen vermögen, weiter erhöht werden.

#### *Analyse der Genauigkeit der Schätzwerte für die Anzahl der rezessiven Letalmutationen*

Dosis-Effekt-Beziehungen können nur dann Aufschluß über den Wirkungsmechanismus eines mutagenen Agens geben, wenn einerseits die tatsächlich in den Zellen des Sproßmeristems zur Wirkung kommende Dosis und andererseits die tatsächlich entstehende Anzahl von Mutationen bestimmbar sind. Da bei chemischen Agenzien die effektive Dosis von sehr vielen Faktoren abhängt und nur sehr bedingt aus der von außen applizierten Dosis erschlossen werden kann, besteht in diesem Fall eine besondere Notwendigkeit für die genaue Definition des Effekts. Die Beurteilung der vorliegenden Versuchsergebnisse hat daher mit der Analyse der den „Effekt“ beschreibenden Kennziffern zu beginnen. Es ist zu klären, inwieweit aus diesen Kennziffern die Anzahl der Mutationen, die nach Abschluß der zur Entstehung stabiler Mutationen führenden Prozesse im Sproßmeristem vorliegen, erschlossen werden kann.

**Definition der rezessiven Letalmutationen:** Durch das angewandte Untersuchungsverfahren (Embryonentest) wird aus der Gesamtheit der entstehenden Mutationen eine bestimmte Fraktion ausgewählt. Diese Fraktion ist auf folgende Weise definiert (MÜLLER 1963):

Es handelt sich um Mutationen, die rezessiv sind, d. h., die die  $M_1$ -Diplophase im heterozygoten Zustand ohne auffällige oder gar letale Wirkung passieren können, in der anschließenden Haplophase zumindest nicht vollständig letal wirken und nach Selbstbefruchtung zum Auftreten von solchen  $M_2$ -Individuen (Mutanten) führen, die im Embryonenstadium einen deutlich von der Norm abweichenden Phänotyp zeigen. Derartige Individuen haben sich fast ausschließlich als im Embryonal- oder Keimlingsstadium absterbend erwiesen; die erfaßbaren Mutationen stellen also rezessive Letalmutationen dar. Sie zeigen teilweise normale 3:1-Spaltung, teilweise aber abweichende Spaltungsverhältnisse (vorwiegend Rezessivendefizit). Daß es sich zumindest teilweise um Chromosomenaberrationen (insbesondere kleinere Deletionen) handelt, kann als sicher gelten. Welchen Anteil echte Punktmutationen (intragenische Veränderungen) an den induzierten rezessiven Letalmutationen bei *Arabidopsis* haben, ist unbekannt.

Die erfaßbare Fraktion ist also auf zweifache Weise abgegrenzt: Einerseits durch phänotypische Kriterien, andererseits durch die Fähigkeit der Mutationen,

$M_1$ -Diplophase und  $M_1$ -Haplophase passieren zu können.

**Mutationsfrequenz in den Sporenmutterzellen:** Mutationen, die sich im heterozygoten Zustand für die betroffene Meristemzelle nachteilig auswirken, werden im Verlauf der Entwicklung der  $M_1$ -Pflanzen aus dem Sproßmeristem herausgefiltert. Dieser Prozeß ist unter den angewandten Aufzuchtbedingungen (späte Blühinduktion!) offensichtlich bereits vor der Bildung der Infloreszenzprimordien abgeschlossen. Es konnte gezeigt werden, daß die in der  $M_2$ -Generation nachweisbaren Mutationen in der Regel keiner intrasomatischen (diplontischen) Selektion unterliegen (MÜLLER 1965a). Zellen, die heterozygot rezessive Letalmutationen enthalten, haben also keine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit als nicht-mutierte Zellen.

Diese Feststellung braucht allerdings nicht mehr streng gültig zu sein, wenn die Mutationsfrequenz sehr hohe Werte erreicht, da in diesem Fall möglicherweise auch solche Mutationen, die normalerweise der intrasomatischen Selektion unterliegen, infolge mangelnder Konkurrenz die  $M_1$ -Diplophase und eventuell auch die anschließende Haplophase passieren können und dann gleichfalls als rezessive Letalmutationen in Erscheinung treten. Diese Erweiterung der erfaßbaren Fraktion sollte aber zu einer Erhöhung des relativen Anteils an frühletalen Mutationen führen und dürfte sich kaum auf die Frequenz der Chlorophyllmutationen auswirken. Da eine Zunahme des relativen Anteils an frühletalen Mutationen im vorliegenden Material nicht nachzuweisen ist, erscheint eine Erweiterung der erfaßbaren Fraktion unwahrscheinlich.

Für eine genügend große Population von  $M_1$ -Pflanzen ist also die relative Häufigkeit von mutierten (d. h. rezessive Letalmutationen enthaltenden) Sporenmutterzellen ( $m$ ) gleich der relativen Häufigkeit der mutierten Zellen im Sproßmeristem nach Abschluß der Mutagenese Prozesse. Da mit steigenden Werten für  $m$  in zunehmendem Maße zwei und mehr Mutationen pro Zelle auftreten, bringt  $m$  allerdings nicht die Anzahl der Mutationen zum Ausdruck. Bei zufälliger Verteilung der Mutationen auf die Zellen (Poisson-Verteilung) ist die mittlere Anzahl der rezessiven Letalmutationen pro Sporenmutterzelle vielmehr

$$M = -\ln(1 - m).$$

**Frequenz spaltender Schotennachkommenschaften:** Das Auftreten von Mutanten in der  $M_1$ -Nachkommenschaft einer selbstbefruchteten Blüte läßt den Schluß zu, daß die Sporenmutterzellen dieser Blüte mutiert sind, also von einer mutierten Meristemzelle abstammen. Unter der Voraussetzung, daß innerhalb einer Blüte alle Sporenmutterzellen (PMZ und EMZ) genetisch homogen sind (d. h. entweder alle die gleiche Mutation oder alle keine Mutation enthalten), muß also für eine genügend große Population von  $M_1$ -Pflanzen die „relative Häufigkeit der spaltenden Schotennachkommenschaften“ ( $m_b$ ) gleich der „relativen Häufigkeit der mutierten Sporenmutterzellen“ ( $m$ ) sein. Dementsprechend ist  $M_b = -\ln(1 - m_b)$  gleich der mittleren Anzahl der Mutation pro Zelle.

Die Gleichung  $m = m_b$  bzw.  $M = M_b$  gilt aber nur, solange die Schotennachkommenschaften sehr groß sind: Je kleiner die Nachkommenschaften, um so größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß sie trotz mutierter Sporenmutterzellen keine Mutanten aufweisen, also als „nicht spaltend“ klassifiziert werden.

Die für einen bestimmten Wert von  $m$  zu erwartenden Werte für  $m_b$  können bei bekannter Nachkommenschaftsgröße und bekannter spezifischer Rezessivenfrequenz  $f$  berechnet werden (MÜLLER 1967). Beispielsweise ist für  $m = 0,5$  bei  $f = 0,2$  und 30 Embryonen je Nachkommenschaft  $m_b = 0,498$ , bei 10 Embryonen je Nachkommenschaft  $m_b = 0,461$  zu erwarten. Solange also jede Schotennachkommenschaft aus 30 Embryonen besteht, kann  $m$  praktisch gleich  $m_b$  gesetzt werden; mit zunehmender Sterilität wird  $m$  (bzw.  $M$ ) in steigendem Maße durch  $m_b$  (bzw.  $M_b$ ) unterschätzt.

**Frequenz der  $M_2$ -Mutanten:** Von der Nachkommenschaftsgröße unbeeinflusst ist dagegen die Mutantenfrequenz  $m_c$ , wie zuerst von GAUL (1957) gezeigt wurde. Diese kann auf Grund der folgenden Formeln zur Schätzung von  $m$  bzw.  $M$  verwendet werden (MÜLLER 1967):

$$\begin{aligned} m_c &= 1 - (1 - m)^f \\ m_c &= 1 - \exp(-fM) \\ M &= -\ln(1 - m_c)/f. \end{aligned}$$

Als Voraussetzungen für die Gültigkeit dieser Formeln sind insbesondere zu nennen:

1. Die Sporenmutterzellen jeder Blüte müssen genetisch homogen sein.
2. Die Verteilung der Mutationen auf die Meristemzellen muß einer Poisson-Verteilung folgen.
3. Zwischen den in einer Zelle auftretenden Mutationen darf keine Kopplung bestehen.

Welche Abweichungen infolge Nichterfüllung dieser Voraussetzungen auftreten, ist im folgenden zu untersuchen.

Die Anwendbarkeit der genannten Formeln hängt außerdem davon ab, ob  $f$ , also das Mittel der spezifischen Rezessivenfrequenzen aller Mutationen, bekannt ist. Das ist a priori nicht der Fall. In einer repräsentativen Stichprobe von 60 röntgeninduzierten Mutationen wurde zwar  $f = 0,21$  bestimmt (MÜLLER 1963), doch handelt es sich hierbei um einen Wert, der 1. ein notwendigerweise ungenaues Stichprobenergebnis darstellt und 2. bei Anwendung anderer Mutagene nicht unbedingt gültig zu sein braucht. Wir setzen daher willkürlich  $f = 0,2$  und haben zu prüfen, inwieweit  $m$  durch den sich auf diese Weise ergebenden Ausdruck  $M_c = 5 \ln(1 - m_c)$  richtig geschätzt wird.

**Ausschaltung des Einflusses der Nachkommenschaftsgröße:** Um zu klären, durch welche Faktoren die aus Tab. 3 ersichtliche Nichtübereinstimmung zwischen  $M_b$  und  $M_c$  (bzw.  $M'_b$  und  $M'_c$ ) bedingt ist, wurde zuerst der durch die abnehmende Nachkommenschaftsgröße verursachte Fehler bei  $M_b$  ausgeschaltet. Für alle in Tab. 3 aufgeführten Versuchsserien wurde zu diesem Zweck eine Neuberechnung von  $m_b$  und  $m_c$  unter ausschließlicher Berücksichtigung der 30 Embryonen enthaltenden Nachkommenschaften vorgenommen. Aus den dabei ermittelten Werten wurden die Quotienten

$$\frac{m_c}{m_b} \quad \text{und} \quad c = \frac{\ln(1 - m_c)}{\ln(1 - m_b)}$$

gebildet, die in Abb. 4 und Abb. 5 dargestellt sind. Da  $M_b = M_c$  ist, wenn sich für  $c$  der Wert 0,2 und für  $m_c/m_b$  der Wert

$$\frac{m_c}{1 - (1 - m_c)^5}$$

ergibt, kann aus Abb. 4 und Abb. 5 unmittelbar abgelesen werden, inwieweit  $M_b$  und  $M_c$  übereinstimmen.

Daß sich die Werte für  $m_c/m_b$  mit steigenden Werten für  $m_c$  (bzw.  $m_b$ ) erhöhen, ist durch die Zunahme von multifaktoriell spaltenden Nachkommenschaften bedingt: Die Befunde stimmen in dieser Hinsicht recht gut mit den bei Vorliegen einer Poisson-Verteilung zu erwartenden Werten überein. Eine durch Inhomogenität des behandelten Materials bedingte Abweichung von der Poisson-Verteilung hätte dazu führen müssen, daß die gefundenen Werte für  $m_c/m_b$  mit steigender Mutationsfrequenz zunehmend größer werden als die in Abb. 4 und Abb. 5 eingetragenen theoretischen Werte für  $m_c/m_b$  (MÜLLER 1967). Das ist jedoch nicht der Fall. Eine durch Inhomogenität bedingte Abweichung von der Poisson-Verteilung kann also für die vorliegenden Ergebnisse als generelles Phänomen ausgeschlossen werden. Ob in Einzelfällen eine gewisse Inhomogenität vorliegt, kann auf diesem Wege allerdings nicht entschieden werden.

Schließlich wurden in die Abbildungen 4 und 5 auch noch die Werte für  $m_c/m_b$  und für  $c$  eingetragen, die durch Auswertung der vollständigen Versuchsserie (mit partiell sterilen Schoten) gewonnen wurden (vgl. Tab. 3). Man erkennt, daß diese Werte erwartungsgemäß um so stärker von den bei Beschränkung auf große Nachkommenschaften ermittelten Werten abweichen, je höher der Sterilitätsgrad ist.

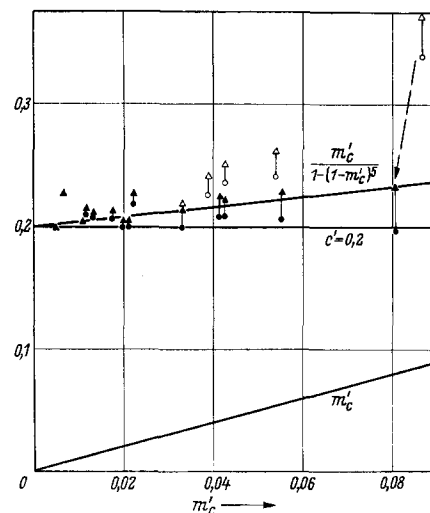


Abb. 4. Beziehung zwischen der relativen Häufigkeit der Chlorophyllmutanten in den spaltenden Schotennachkommenschaften ( $m'_c/m'_b$ ) und der relativen Häufigkeit der Chlorophyllmutanten in allen geprüften Schotennachkommenschaften ( $m'_c$ ), (vgl. Tab. 3).

$$\Delta = \frac{m'_c}{m'_b}; \quad \bullet - c' = \frac{\ln(1 - m'_c)}{\ln(1 - m'_b)} \quad (\text{sofern von } m'_c/m'_b \text{ abweichend})$$

$\Delta$  und  $\bullet$  — die entsprechenden Werte für den Fall, daß alle (also auch kleine) Schotennachkommenschaften berücksichtigt werden. (Nur angegeben, wenn von den Werten für große Nachkommenschaften abweichend.)

#### Schätzgenauigkeit für die Chlorophyllmutationen:

Aus den in Abb. 4 dargestellten Daten ergibt sich folgendes: Die Beziehung zwischen  $M'_b$  und  $M'_c$  wird nach Ausschaltung des Einflusses der Nachkommenschaftsgröße auf  $m'_b$  (bzw.  $M'_b$ ) von der Höhe der Mutationsfrequenz nicht mehr nachweisbar beeinflusst. Im Mittel ist  $M'_c = 1,04 \cdot M'_b$ . Folglich ist  $M'_c$  auch dem gesuchten Wert  $M'$  proportional, stellt also einen guten Schätzwert für die mittlere Anzahl

der Chlorophyllmutationen pro Zelle dar.  $M_b$  ergibt dagegen nur dann zu  $M'$  proportionale Werte, wenn der Effekt der Nachkommenschaftsgröße vernachlässigt werden kann (also ungefähr bis zu einem Sterilitätsgrad von 15%).

Der absolute Wert der Relation  $M'/M'_c$  hängt davon ab, mit welcher Häufigkeit genetisch heterogene Blüten auftreten. Obwohl genaue Zahlenwerte nicht ermittelt werden können, läßt sich doch zeigen, daß wir mit einem gewissen Prozentsatz derartiger Blüten rechnen müssen (MÜLLER, in Vorbereitung). Folglich muß  $c' < f'$  und  $M'_b > M'$  sein. Somit ist auch  $M'_c > M'$ . Das Ausmaß dieser Überschätzung von  $M'$  durch  $M'_c$  dürfte allerdings nur gering sein, weil  $f'$  nicht wesentlich größer sein kann als die hier für  $c'$  ermittelten Werte. Außerdem ist es von der Höhe der Mutationsfrequenz praktisch unabhängig, da die Häufigkeit genetisch heterogener Blüten eine Funktion der mittleren Größe der mutierten Sektoren ist, die wiederum bei Anwendung chemischer Mutagene von der Höhe der Mutationsfrequenz weitgehend unbeeinflusst bleibt (MÜLLER 1965b). Eine Verzerrung der Dosis-Effekt-Beziehungen ist somit infolge dieser Art der Fehlschätzung nicht zu erwarten.

**Schätzgenauigkeit für die Gesamtheit der rezessiven Letalmutationen:** Da die Frequenz der rezessiven Letalmutationen wesentlich höhere Werte erreichen kann als die Frequenz der Chlorophyllmutationen und folglich die Verteilung der Mutationen auf die Zellen zu einem entscheidenden Faktor wird, ist in diesem Fall die Situation wesentlich komplizierter. Aus den in Abb. 5 dargestellten Daten ergibt sich folgendes:

Bei kleinen Mutationsfrequenzen ist praktisch  $M_b = M_c$ . In dem Maße, wie sich die Mutationsfrequenz und folglich auch die Häufigkeit multifaktoriell spaltender Nachkommenschaften erhöht, wird in zunehmendem Maße  $M_b > M_c$  (z. B.  $M_b = 1,69$  und  $M_c = 1,44$ ). Diese Tendenz besteht unabhängig davon, ob der Einfluß der Nachkommenschaftsgröße auf  $m_b$  (bzw.  $M_b$ ) ausgeschaltet wird oder nicht, ist aber erwartungsgemäß nach Ausschaltung dieses Einflusses (also bei korrekter Bestimmung von  $m_b$ ) stärker ausgeprägt. Korrekte Bestimmung von  $m_b$  vorausgesetzt, kann dieser Tatbestand zwei alternative Konsequenzen haben (MÜLLER 1967):

a) Er kann bedeuten, daß  $M$  durch  $M_b$  richtig geschätzt und folglich durch  $M_c$  unterschätzt wird. Das wäre dann der Fall, wenn zwar die Verteilung der Mutationen einer Poisson-Verteilung streng folgt, aber Kopplung zwischen den in einer Zelle auftretenden Mutationen und/oder eine mit steigender Mutationsfrequenz erfolgende Verringerung von  $f$  zur Abnahme von  $c$  führt.

b) Er kann auch bedeuten, daß  $M$  durch  $M_b$  überschätzt wird. Das wäre dann der Fall, wenn multifaktoriell spaltende Nachkommenschaften seltener sind als bei Annahme einer Poisson-Verteilung zu erwarten.

Eine eindeutige Entscheidung zwischen beiden Alternativen ist — wie im folgenden gezeigt wird — nicht möglich. Wir können aber versuchen, den Unsicherheitsbereich möglichst genau abzugrenzen.

Kann  $M < M_c$  sein? Das wäre prinzipiell möglich, 1. wenn mit steigender Mutationsfrequenz  $f$

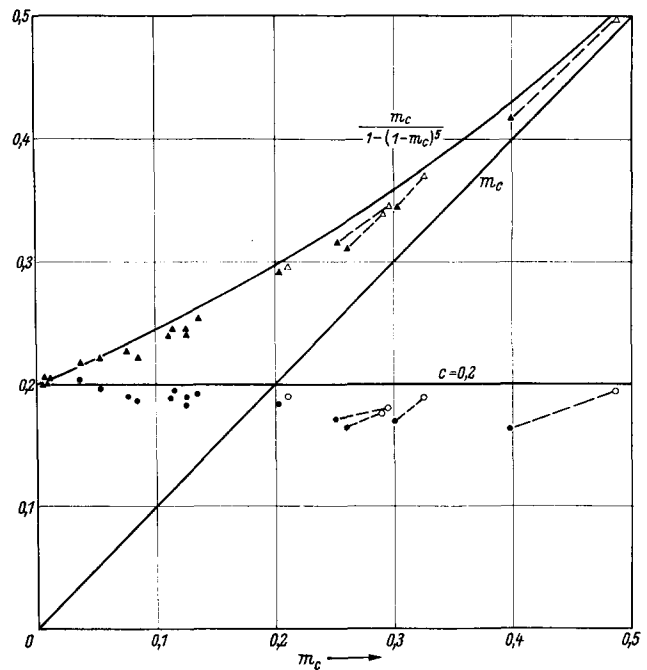


Abb. 5. Beziehung zwischen der relativen Häufigkeit der Mutanten in den spaltenden Schotennachkommenschaften ( $m_c/m_b$ ) und der relativen Häufigkeit der Mutanten in allen geprüften Schotennachkommenschaften ( $m_c$ ) (vgl. Tab. 3).

▲ —  $\frac{m_c}{m_b}$ ; ● —  $c = \frac{\ln(1-m_c)}{\ln(1-m_b)}$  (sofern von  $m_c/m_b$  abweichend)

△ und ○ — die entsprechenden Werte für den Fall, daß alle (also auch kleine) Schotennachkommenschaften berücksichtigt wurden. (Nur angegeben, wenn von den Werten für große Nachkommenschaften abweichend.)

größer würde, d. h., wenn sich der Anteil von Mutationen mit überdurchschnittlicher Rezessivenfrequenz erhöhte, oder 2. wenn multifaktoriell spaltende Nachkommenschaften seltener sind als bei Annahme einer Poisson-Verteilung zu erwarten. Eine Vergrößerung von  $f$  müßte sich durch eine Verschiebung in der Häufigkeitsverteilung der Mutantentypen zu erkennen geben, da eine gewisse Korrelation zwischen Phänotyp und spezifischer Rezessivenfrequenz besteht (MÜLLER 1963). Wir hätten eine Zunahme des Anteils von *murca*-Typen und/oder Chlorophyllmutationen zu erwarten. Wie aus Tab. 4 ersichtlich, ist das jedoch nicht der Fall. Eine Erhöhung der mittleren Rezessivenfrequenz  $f$  braucht also nicht in Betracht gezogen zu werden. Das Ausmaß der möglichen Abweichungen von der Poisson-Verteilung kann aus der Relation zwischen  $m_c$  und  $m_c/m_b$  (= relative Häufigkeit der Mutanten in den spaltenden Schotennachkommenschaften) geschätzt werden (Abb. 5). Dabei zeigt sich, daß selbst bei Annahme eines konstanten Wertes für  $c$  ( $c = 0,2$ ) die bei Vorliegen einer Poisson-Verteilung zu erwartenden Werte nur um einen relativ geringen Betrag größer sind als die tatsächlich gefundenen Werte. Das bedeutet, daß die im Extremfall möglichen Abweichungen von der Poisson-Verteilung zwar groß genug sind, um eine mit steigender Mutationsfrequenz zunehmende Unterschätzung von  $M$  durch  $M_b$  zu bedingen, aber nicht ausreichen, um (zumindest für Werte von  $m_c < 0,30$  bzw.  $M_c < 1,75$ ) zu einer Unterschätzung von  $M$  durch  $M_c$  zu führen. Daraus folgt, daß in einem relativ weiten Bereich (etwa bis zu  $M_c = 1,75$ ) mit Sicherheit ausgeschlossen ist, daß  $M < M_c$  ist.

Kann  $M > M_c$  sein? Das liegt im Bereich der Möglichkeiten, da mit steigender Mutationsfrequenz der Anteil multifaktoriell spaltender Nachkommen-



schaften ständig größer wird und somit der Einfluß der Kopplung zwischen einzelnen Mutationen in zunehmendem Maße an Bedeutung gewinnt. Demzufolge ist zu erwarten, daß mit steigender Mutationsfrequenz (bei konstantem  $f$ ) die Werte für  $c$  kleiner werden (MÜLLER 1967). Da allerdings das Ausmaß dieses Kopplungseffekts nicht genau berechnet werden kann, läßt sich nicht entscheiden, ob die Differenz zwischen den bei Annahme von  $c = 0,2$  und Poisson-Verteilung zu erwartenden und den tatsächlich gefundenen Werten für  $m_c/m_b$  ausschließlich durch Verringerung von  $c$  oder auch durch die oben diskutierte Abweichung von der Poisson-Verteilung bedingt ist. Somit ist zwar wahrscheinlich, daß mit steigender Mutationsfrequenz  $M > M_c$  wird, aber doch nicht eindeutig beweisbar.

Kann  $M < M_b$  sein? Sofern  $m_b$  keiner Fehlschätzung durch verringerte Nachkommenschaftsgröße unterliegt, wäre das praktisch nur dann möglich, wenn infolge Inhomogenität des Materials der Anteil multifaktoriell spaltender Nachkommenschaften größer ist als bei Annahme einer Poisson-Verteilung zu erwarten. Das ist in vorliegendem Material offensichtlich nicht der Fall (s. o.), kann aber bei sehr hohen Werten für  $m_b$  bzw.  $M_b$  (etwa für  $m_b > 0,9$ ) leicht Bedeutung erlangen. Problematisch ist allerdings die Ausschaltung des Einflusses der Nachkommenschaftsgröße. Wie aus Abb. 5 ersichtlich, führt die Beschränkung auf große Nachkommenschaften mit zunehmender Sterilität dazu, daß sich für  $m_c$  (bzw. für  $M_c$ ) kleinere Werte ergeben als bei Auswertung der vollständigen Versuchsserie. Das erklärt sich aus der Tatsache, daß ein Teil der embryonalen Letalmutationen gleichzeitig auch einen verringerten Samenansatz bedingt, also auch haplophasisch letal wirkt (MÜLLER 1965f). Durch Beschränkung auf große Nachkommenschaften erfolgt also eine Selektion zuungunsten dieses Mutationstyps und folglich eine Unterschätzung der tatsächlichen Mutationsfrequenz. Soll also bei verminderter Nachkommenschaftsgröße ein korrekter Wert für  $m_b$  bestimmt werden, so muß das Material in Fertilitätsklassen gegliedert, für jede Klasse  $m_b$  berechnet und die Fehlschätzung rechnerisch ausgeglichen werden.

Wenn Sterilität und embryonale Letalität nicht unabhängig voneinander sind, dann ist es offensichtlich auch nicht gleichgültig, ob  $m_c$  das gewogene oder das ungewogene Mittel der Mutantenfrequenzen aller Schotennachkommenschaften darstellt. Um diesen Effekt der Nachkommenschaftsgröße auszuschalten, wird daher  $m_c$  stets als ungewogenes Mittel berechnet. Die Berechnung als gewogenes Mittel würde mit zunehmender Sterilität zu kleineren Werten für  $m_c$  und folglich zu einer Unterschätzung von  $M$  durch  $M_c$  führen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen:  $M$  wird bei kleinen Mutationsfrequenzen durch  $M_c$  bzw. durch  $M_b$  korrekt geschätzt. Mit steigender Mutationsfrequenz läßt sich infolge der Zunahme von multifaktoriell spaltenden Nachkommenschaften und der Verringerung der Fertilität die Schätzgenauigkeit nicht mehr mit gleicher Sicherheit beurteilen. Sicher ist nur, daß  $M$  nicht kleiner als  $M_c$  und nicht größer als  $M_b$  (korrigierter Wert) ist. Bei sehr hohen Mutationsfrequenzen (etwa  $m_b > 0,90$  bzw.  $M_b > 2,30$ ) bzw. bei hohem Sterilitätsgrad (etwa  $s > 40\%$ ) gilt auch diese Abgrenzung nur noch näherungsweise.

Beispiel: Bei Versuch 2, 20 mM-Variante, wurde gefunden (Tab. 3):  $m_c = 0,30$ , somit  $M_c = -5 \cdot \ln(1 - 0,30) = 1,75$ ;  $m_b = 0,86$ ;  $s = 35\%$ . Durch rechnerische Korrektur der Fehlschätzung infolge verminderter Nachkommenschaftsgröße ergibt sich  $m_b = 0,87$ , somit  $M_b = -\ln(1 - 0,87) = 2,04$ . Der gesuchte Wert  $M$  liegt also zwischen 1,75 und 2,04.

Bei den vorstehenden Überlegungen wurde das Auftreten genetisch heterogener Blüten der Einfachheit halber außer Betracht gelassen. Da derartige Blüten stets auftreten, muß damit gerechnet werden, daß  $c < f$  ist und daß  $M_b$  und  $M_c$  generell den tatsächlichen Wert von  $M$  etwas überrepräsentieren. Da diese Abweichung unabhängig von der Höhe der Mutationsfrequenz ist und Chlorophyllmutationen und embryonale Letalmutationen im gleichen Maße betrifft, braucht sie jedoch bei der Beurteilung von Dosis-Effekt-Kurven nicht berücksichtigt zu werden.

**Frequenz der spaltenden Pflanzennachkommenschaften ( $m_a$ ):** Dieses Maß des Effekts wird von der Größe der mutierten Sektoren beeinflusst und kann daher keinen direkten Aufschluß über die Anzahl der Mutationen geben. Der Ausdruck  $-\ln(1 - m_a)$  sollte zwar  $M$  ungefähr proportional sein (MÜLLER 1967), doch zeigen die in Tab. 3 angegebenen Werte für den Quotienten  $b$ , daß der Proportionalitätsfaktor in relativ weiten Grenzen schwankt, was wiederum Ausdruck für die Variabilität der mittleren Größe der mutierten Sektoren ist. Das getrennte Auswerten der Schotennachkommenschaften führt also stets zu korrekteren Ergebnissen als die Zusammenfassung mehrerer Schotennachkommenschaften zu einer „Pflanzennachkommenschaft“.

#### *Mechanismus der Mutationsauslösung*

**Beziehungen zwischen EMS-Behandlung und Keimbeginn:** Submers quellende Samen von *Arabidopsis* verbleiben nach Erreichen des maximalen Quellungsgrades in einem Zustand begrenzter Stoffwechselsaktivität und kommen erst nach  $O_2$ -Zutritt zum Keimen (MÜLLER 1965c). Die Mutationsauslösung wird also unter den hier angewandten Behandlungsbedingungen durch Einwirkung des EMS auf nicht-replizierende Chromosomen eingeleitet. Daß unter diesen Bedingungen tatsächlich eine Alkylierung der DNA erfolgt, ist durch Versuche mit tritiummarkiertem EMS bewiesen (WALLES und AHNSTRÖM 1965). Da die DNA-Replikation bzw. Chromosomenreduplikation Voraussetzung für die Stabilisierung der Mutationen ist, ergibt sich die Frage, ob die Mutationsfrequenz von der Länge der Periode zwischen EMS-Behandlung und Keimung bzw. von den während dieser Periode herrschenden Bedingungen abhängig ist.

Die vorliegenden Ergebnisse (Versuche 9 und 10) beweisen, daß ein Hinauszögern des Keimbegins und damit auch der DNA-Replikation um 2 Tage weder auf die Frequenz der Chlorophyllmutationen noch auf die Frequenz der embryonalen Letalmutationen oder auf die Sterilität einen nachweisbaren Einfluß ausübt. EMS verhält sich in dieser Hinsicht also nicht anders als N-Nitroso-N-methylharnstoff (MÜLLER 1965d).

Die Parallelisierung dieser Befunde mit molekularen Mechanismen ist insofern schwierig, als rezessive und haplophasische Letalmutationen sowohl Punktmutationen als auch Chromosomenaberrationen darstellen können, wobei eigentlich nur soviel sicher ist, daß Chromosomenaberrationen unbedingt beteiligt



sein müssen (vgl. MÜLLER 1964a). Der Mechanismus der Aberrationsauslösung durch alkylierende Agenzien ist aber noch weitgehend unklar. Unter diesem Aspekt können die vorliegenden Ergebnisse zumindest als Hinweis dafür gewertet werden, daß die erst nach der Chromosomenreduplikation auf chromatidaler Basis eintretenden Aberrationen (RIEGER und MICHAELIS 1960) die Folge von Alkylierungen in nicht-replizierenden Chromosomen darstellen und daß die durch diesen Vorgang gesetzten Primärläsionen bei Ausbleiben der Replikation zumindest mehrere Tage lang existenzfähig sind und von partiell anaeroben Bedingungen nicht beeinflußt werden.

Inwieweit der in Versuch 11 festgestellte Anstieg der Mutationsfrequenz und des Sterilitätsgrades durch Erhöhung der Temperatur während der 24stündigen Nachquellperiode eine echte Beeinflussung der auf die Alkylierung der DNA folgenden Prozesse darstellt oder nur Ausdruck der erhöhten Reaktivität der in der Zelle verbliebenen Restmenge an EMS ist, kann vorläufig noch nicht entschieden werden.

**Dosis-Effekt-Beziehungen:** Die vorliegenden Ergebnisse (Versuch 1 u. 2) zeigen, daß sowohl die mittlere Anzahl der Chlorophyllmutationen pro Zelle als auch die mittlere Anzahl der embryonalen Letalmutationen pro Zelle in exponentieller Abhängigkeit von der EMS-Konzentration ansteigt. Nach eingehender Analyse der Genauigkeit der verwendeten Schätzwerte ergibt sich, daß der Exponent für die Chlorophyllmutationen einen zwischen  $n = 1,9$  und  $n = 2,3$  liegenden Wert und für die embryonalen Letalmutationen einen sicher nicht kleineren, möglicherweise aber etwas größeren Wert hat. Eine ausgeprägt exponentielle Abhängigkeit von der EMS-Konzentration folgt auch aus den Ergebnissen von GICHNER (1965), obwohl sie vom Autor irrtümlich als Ausdruck einer linearen Abhängigkeit gedeutet werden. Die von uns gefundene Abhängigkeit der Mutationsfrequenz von der Behandlungszeit (Versuch 7) muß gleichfalls im Sinne einer exponentiellen Dosis-Effekt-Beziehung ( $n \approx 2$ ) interpretiert werden, da sich die Sensibilität der Samen gegenüber EMS nach Erreichen des maximalen Quellungsgrades, also nach ca. 8stündiger Quelldauer, nicht weiter erhöht (MÜLLER, unveröff.).

Die einfachste Deutung der exponentiellen Dosis-Effekt-Beziehungen wäre die Annahme eines Zweitreffers-Mechanismus für alle oder zumindest für den größten Teil der rezessiven Letalmutationen. D. h., jede Mutation würde die Folge von zwei unabhängig eintretenden Alkylierungen darstellen. Andere Deutungsmöglichkeiten lassen sich jedoch nicht von vornherein ausschließen. Trotz Vorliegen eines Eintreffers-Mechanismus könnten nämlich „Zweitreffers-Kurven“ auch auf folgende Weise vorgetäuscht werden:

1. dadurch, daß zwischen der Außendosis und der tatsächlich in den Meristem-Zellen wirksam werden Dosis eine Differenz besteht, die sich nicht proportional zur Dosis erhöht (woraus eine Schulterkurve für die Beziehung zwischen Außendosis und Effekt resultieren würde);

2. dadurch, daß die auf die Alkylierung folgenden Reaktionen von der applizierten EMS-Dosis abhängig sind, und zwar in dem Sinne, daß bei niedrigen

Dosen ein größerer Teil der alkylierten Stellen repariert wird als bei höheren Dosen.

Eine endgültige Entscheidung kann daher erst durch weitere Versuche herbeigeführt werden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß die Annahme eines Zweitreffers-Mechanismus weitreichende Konsequenzen nach sich zöge: In diesem Fall wäre es praktisch ausgeschlossen, daß ein spürbarer Anteil der rezessiven Letalmutationen Punktmutationen darstellt. Da außerdem nach Röntgenbestrahlung die mittlere Anzahl der rezessiven Letalmutationen mit einem deutlich kleineren, nahezu bei  $n = 1$  liegenden Exponenten ansteigt (MÜLLER 1966b), wäre auch gezeigt, daß Mutationstypen, die bei Röntgenbestrahlung einer Eintreffers-Kinetik folgen (wie z. B. kleine Deletionen), nach Einwirkungen von alkylierenden Agenzien die Kooperation von mindestens zwei unabhängig alkylierten Stellen erfordern.

#### *Wachstumshemmung der Primärwurzeln*

Die Behandlung von Samen mit EMS führte mit steigender Konzentration in zunehmendem Maße zur Verzögerung des Keimbegins und zur Hemmung des Wachstums der Primärwurzeln (Versuche 1 u. 3). Dieser Effekt der EMS-Behandlung konnte weder durch 24stündiges Nachquellen noch durch Rücktrocknen der behandelten und nachgequollenen Samen oder durch Einwirken von Respirationsinhibitoren beeinflußt werden (Versuch 8). Das zeigt, daß es sich hierbei nicht um eine direkte Einwirkung des EMS auf die Keimung bzw. auf die DNA-Replikation handelt, sondern um eine Folge der bereits vorher erfolgten Reaktion des EMS mit wichtigen Zellbestandteilen, von der sich die Zelle unter partiell anaeroben Bedingungen nicht erholen kann.

Ein Vergleich mit anderen Mutagenen erfolgt zweckmäßigerweise mit Hilfe der Relation zwischen der Dosis, die eine Mutationsfrequenz von  $m_b = 50\%$  bedingt, und der Dosis, die eine Wurzellängenreduktion von  $r = 50\%$  bedingt. Für EMS wurde gefunden (Versuch 1):

$$D_{m50} : D_{r50} = 1 : 3,8,$$

Keimverzögerung bei  $D_{r50} : 10$  h.

Nach Einwirkung von N-Nitroso-N-methylharnstoff ergab sich (MÜLLER 1964a):

$$D_{m50} : D_{r50} = 1 : 4,2.$$

Die Wurzellängenreduktion war also bei gleicher Mutationsfrequenz etwas geringer als nach EMS-Einwirkung. Da die Keimung bei  $D_{r50}$  aber nur um rund 2 h verzögert war, ist dieser Unterschied im wesentlichen durch die Verringerung der Keimverzögerung als Komponente der Wurzellängenreduktion bedingt.

Für Röntgenstrahlen wurde gefunden (MÜLLER 1966c):

$$D_{m50} : D_{r50} = 1 : 0,6.$$

Obwohl nach Röntgenbestrahlung die Keimverzögerung bei  $D_{r50}$  unerheblich ist, wird das Wurzelwachstum relativ zur Mutationsfrequenz wesentlich stärker gehemmt als nach Einwirkung der genannten chemischen Mutagene. Das dürfte im wesentlichen eine Folge der höheren Frequenz an größeren Chromosomenaberrationen sein.

Es wird also deutlich, daß die Hemmung des Wurzelwachstums in Abhängigkeit von der Art des Mutagens aus recht verschiedenartigen Prozessen resultieren kann und daß sie nicht zwangsläufig mit der Mutationsauslösung verbunden ist. Wenn trotzdem für EMS bei allen hier angewandten Behandlungsbedingungen Wurzellängenreduktion und Mutationsfrequenz eng korreliert sind, dann dürfte das darauf zurückzuführen sein, daß beide Effekte ihre gemeinsame Grundlage in der Alkylierungsreaktion haben, wobei für jeden dieser Effekte durchaus unterschiedliche Rezeptoren in der Zelle verantwortlich sein können. Das gibt die Möglichkeit, im Rahmen eines bestimmten stoffwechselphysiologischen Zustands der Zelle und bei Ausschluß anderer Schadursachen die Wurzellängenreduktion als relatives Maß für die mutagen wirksame EMS-Dosis zu benutzen.

#### *Faktoren, die die Effektivität der EMS-Behandlung beeinflussen*

Hinsichtlich der Beeinflussbarkeit der Effektivität ergeben sich aus den vorliegenden Untersuchungen folgende Schlußfolgerungen:

**1. Hydrolyse:** Die Befunde von FROESE-GERTZEN et al. (1963) über den Hydrolyseverlauf im sauren Bereich und dessen Abhängigkeit von der Temperatur werden bestätigt (Versuch 4). Die Hydrolyseprodukte weisen keine mutagene Wirksamkeit auf und führen in Konzentrationen, die den zur Erzielung maximaler Mutationsfrequenzen notwendigen EMS-Konzentrationen äquimolar sind, zu keiner nennenswerten Schädigung der behandelten Samen. *Arabidopsis*-Samen sind also gegenüber der hohen H-Ionen-Konzentration des Hydrolysats wesentlich weniger empfindlich als Gersten-Samen, die durch das Hydrolysat sogar stärker geschädigt werden als durch die unhydrolysierte EMS-Lösung (FROESE-GERTZEN et al. 1964). Die Hydrolyse beeinflusst somit die mutagene Effektivität von EMS nur insofern, als sie zu einem fortschreitenden Aktivitätsverlust der Behandlungslösung führt, dem natürlich durch Verkürzen der Behandlungszeit oder durch Wechsel der Behandlungslösung entgegengewirkt werden kann.

**2. Temperatur:** Durch Erhöhung der Temperatur während und nach der Behandlungszeit wird die Effektivität der EMS-Behandlung gesteigert, wobei sich — zumindest für den getesteten Temperaturbereich (18° bis 36 °C) — ein Temperaturquotient von  $Q_{10} = 2,6$  ergibt (Versuche 5 u. 6). Da die entsprechenden Versuche unter Bedingungen durchgeführt wurden, bei denen die Beeinflussung der Diffusionsrate und der Hydrolyserate durch die Temperatur sich nicht oder nur unwesentlich auf die Effektivität auswirken kann, ist der Temperatureffekt als Ausdruck der Beeinflussung der Reaktionsrate für die Alkylierung oder für weitere, zur Mutation führende Reaktionsschritte zu werten.

Der Temperaturquotient  $Q_{10} = 2,6$ , der im Rahmen der Versuchsgenauigkeit gleichermaßen für die Induktion der Wurzellängenreduktion und für die Mutationsauslösung gilt, kommt dem von FROESE-GERTZEN et al. (1963) nach Behandlung von Gersten-Samen mit EMS gefundenen Temperaturquotienten für die Induktion der Wachstumshemmung ( $Q_{10} = 2,7$ ) sehr nahe. Diese recht gute Übereinstimmung hätte insofern nicht erwartet zu werden brauchen,

als die Bedingungen, unter denen die Versuche mit Gersten-Samen durchgeführt wurden, in zwei Punkten von unserem Versuchsansatz abweichen: a) Es wurden trockene Samen behandelt: die Aufnahme des EMS war also nicht allein von der jeweiligen Diffusionsrate, sondern auch von der Zunahme des Quellungsgrades abhängig. b) Die Temperatur wurde nur während der Behandlungszeit kontrolliert, nicht aber im Anschluß daran, so daß die Reaktion des nach Abschluß der Behandlung noch in der Zelle vorliegenden EMS nicht mit der gleichen Reaktionsrate abließ wie die Reaktion während der Behandlungszeit.

**3. Nachbehandlungen:** Durch Nachquellen der behandelten Samen in Wasser wird die Effektivität der EMS-Behandlung gegenüber sofortiger Aussaat (in Erde oder Filterpapier) nicht oder höchstens geringfügig beeinflusst, sofern das Nachquellen bei der gleichen Temperatur erfolgt wie das Keimen (Versuche 8, 9 u. 10). Die geringe und statistisch nicht zu sichernde Effektivitätsminderung durch kurzes Nachquellen könnte dadurch erklärt werden, daß unter Nachquellbedingungen das Herausdiffundieren des EMS etwas schneller erfolgt als bei Halten der Samen auf feuchtem Filterpapier. Fortsetzen des Nachquellens über 1 h hinaus hat keinen Einfluß, weder auf die Wurzellängenreduktion noch auf die Mutationsfrequenz. Daß durch Nachquellen die EMS-induzierte Wachstumshemmung nicht beeinflusst wird, wurde auch bei EMS-Behandlung von Gersten-Samen festgestellt (FROESE-GERTZEN et al. 1964). Die dabei als Folge des Nachquellens eingetretene Erhöhung der Überlebensrate und der Fertilität findet allerdings in vorliegenden Versuchen (9, 10) keine Parallele. Möglicherweise erfolgt bei Aussaat von Gerstensamen unter Feldbedingungen eine partielle Rücktrocknung (s.u.), die in unseren Versuchen vermieden wurde.

Erhöhung der Nachquelltemperatur führt zu einer deutlichen Erhöhung sowohl der Wurzellängenreduktion als auch der Mutationsfrequenz (Versuche 8 u. 11). Diese Effektivitätssteigerung ist von der Dauer des Temperatureinflusses abhängig. Der Einfluß der Temperaturerhöhung ist in der ersten Stunde nach Behandlungsschluß am stärksten und klingt dann allmählich ab. 6 h nach Behandlungsschluß kann die Effektivität durch Verringerung der Temperatur von 36° auf 24 °C nicht mehr beeinflusst werden.

Die Temperaturerhöhung könnte auf folgende Weise wirksam werden:

a) durch Beeinflussung der Reaktion des EMS mit den für den jeweiligen Effekt (Mutation oder Wachstumshemmung der Primärwurzeln) entscheidenden Zellbestandteilen, und zwar in der Weise, daß die Erhöhung der Reaktionsrate die gleichzeitig erfolgende Erhöhung der Diffusions- und der Hydrolyserate überwiegt, so daß im Endeffekt bei erhöhter Temperatur ein größerer Teil des in der Zelle noch verbliebenen EMS zur Reaktion gelangt;

b) durch Beeinflussung von späteren, auf die primäre Alkylierung folgenden Reaktionsschritten. Die vorliegenden Ergebnisse gestatten noch keine sichere Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten. Auf jeden Fall wird aber deutlich, daß die nach Behandlungsschluß herrschenden Bedingungen die Ef-

ektivität der EMS-Behandlung beeinflussen und daher zu kontrollieren sind.

**4. Rücktrocknung der behandelten Samen:** Rücktrocknung der Samen sofort nach Behandlungsschluß führt zur Abtötung der Samen. Der Schaden verringert sich jedoch, wenn die Samen zwischen Behandlungsschluß und Rücktrocknung in Wasser gequollen werden; nach 11stündigem Quellen (bei 24° oder 36 °C) ist kein schädigender Einfluß des Rücktrocknens mehr feststellbar (Versuch 8). *Arabidopsis*-Samen reagieren somit auf Rücktrocknung nach EMS-Behandlung in prinzipiell gleicher Weise wie Gerstensen Samen (FROESE-GERTZEN et al. 1964).

Der bei der Rücktrocknung wirksam werdende Faktor wird während des Nachquellens entweder durch Umsetzung inaktiviert oder durch Diffusion aus dem Samen entfernt. Somit kann es sich dabei entweder um EMS selbst oder um ein Hydrolyseprodukt (Methansulfonsäure) oder um ein instabiles bzw. diffusibles Reaktionsprodukt des EMS handeln. Daß der Rücktrocknungsschaden an die Anwesenheit von EMS gebunden ist, liegt im Bereich der Möglichkeiten, da auf Grund der von WALLEES und AHNSTRÖM (1965) angegebenen Diffusionsrate nach 6 h noch kleinere Mengen von EMS im Samen vorhanden sein können. Eine plausible Erklärung wäre, daß die im Samen vorhandene EMS-Menge durch die Rücktrocknung am Herausdiffundieren gehindert wird und somit in vollem Umfang zur Reaktion gelangen kann. Daß es sich hierbei nicht um eine für alkylierende Agenzien typische Wirkung, sondern um eine spezielle Eigenschaft des EMS handelt, geht daraus hervor, daß bei Verwendung schnell reagierender Agenzien, wie z. B. N-Nitroso-N-methylharnstoff (MÜLLER 1965e), die Rücktrocknung der behandelten Samen keine schädigende Wirkung ausübt.

### Zusammenfassung

Samen von *Arabidopsis thaliana* wurden mit Äthylmethansulfonat (EMS) behandelt. Es wurde die Abhängigkeit des Effekts von folgenden Faktoren untersucht: EMS-Konzentration, Behandlungszeit, Dauer der Nachquellperiode, Temperatur während der Behandlung und während des Nachquellens, Rücktrocknung der behandelten Samen, und Hydrolyse der Behandlungslösung. Die untersuchten Kriterien waren: Wachstumsrate der Primärwurzeln und andere somatische Effekte, Fertilität der  $M_1$ -Pflanzen, Frequenz der rezessiven Letalmutationen (embryonale Letalmutationen und Chlorophyllmutationen). Die wichtigsten Ergebnisse sind:

1. Sowohl die Frequenz der Chlorophyllmutationen als auch die Frequenz der embryonalen Letalmutationen erhöht sich in exponentieller Abhängigkeit von der Dosis ( $n \approx 2$ ). Das gilt unabhängig davon, ob die EMS-Konzentration oder die Behandlungszeit variiert wird.

2. Mutationsfrequenz, Sterilität und Wurzellängenreduktion erhöhen sich mit steigender Behandlungstemperatur. Für den geprüften Bereich (18° bis 36 °C) wurde ein Temperaturquotient von  $Q_{10} = 2,6$  gefunden.

3. Die Steigerung der Mutationsfrequenz wird nur durch die Verringerung der Fertilität der  $M_1$ -Pflanzen und nicht durch eine Verringerung des Überlebens

begrenzt. Die Relationen zwischen Mutationsfrequenz, Sterilitätsgrad und Wurzellängenreduktion werden von Änderungen der Behandlungsbedingungen nicht beeinflusst.

4. Mutationsfrequenz, Sterilität und Wurzellängenreduktion sind unabhängig von der Dauer des Quellens der behandelten Samen in Wasser unter partiell anaeroben Bedingungen. Eine Verzögerung des Keimbeginns bis zu 4 Tagen nach der Behandlung hat keinen Einfluß auf die Mutationsfrequenz.

5. Durch Erhöhung der Temperatur während einer Periode von 6 h nach Behandlungsschluß werden Mutationsfrequenz, Sterilität und Wurzellängenreduktion gesteigert.

6. Der durch Trocknung der behandelten Samen verursachte Schaden wird durch 11stündiges Quellen der Samen in Wasser vor der Trocknung vollständig aufgehoben.

7. Die Effektivität von partiell hydrolysierten EMS-Lösungen entspricht der Konzentration des EMS. Der durch die Hydrolyseprodukte verursachte physiologische Schaden ist ohne praktische Bedeutung.

8. Die Beziehungen zwischen verschiedenen Maßen der Mutationsfrequenz (Frequenz der spaltenden Pflanzennachkommenschaften, Frequenz der spaltenden Schotennachkommenschaften, Frequenz der  $M_2$ -Mutanten) wurden analysiert. U. a. wird gezeigt, daß zwischen der Frequenz der  $M_2$ -Mutanten ( $m_c$ ) und der ursprünglichen Mutationsfrequenz keine direkte Proportionalität besteht.

### Literatur

1. AMANO, E., and H. H. SMITH: Mutations induced by ethyl methanesulfonate in maize. *Mutation Res.* **2**, 344–351 (1965). — 2. BAUTZ, E., and E. FREESE: On the mutagenic effect of alkylating agents. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **46**, 1585–1594 (1960). — 3. BELL, M. L., and T. CERVIGNI: Treatment of seeds with ethylmethanesulfonate and diethylsulphate. *Nature* **204**, 1199–1200 (1964). — 4. BHATIA, C. R., and K. R. NARAYANAN: Genetic effects of ethyl methanesulfonate in combination with copper and zinc ions on *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **52**, 577–581 (1965). — 4a. BROCK, R. D.: Induced quantitative mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Inform. Serv.* **2**, 6 (1965). — 5. D'AMATO, F., G. T. SCARASCIA, L. M. MONTI und A. BOZZINI: Types and frequencies of chlorophyll mutations in durum wheat induced by radiations and chemicals. *Radiation Bot.* **2**, 217–239 (1962). — 6. FAVRET, E. A.: Genetic effects of single and combined treatment of ionizing radiations and ethyl methanesulfonate on barley seeds. In: *Barley Genetics I*. Wageningen, pp. 68–81 (1964). — 7. FROESE-GERTZEN, E. E., C. F. KONZAK, R. FOSTER und R. A. NILAN: Correlation between some chemical and biological reactions of ethyl methanesulfonate. *Nature* **198**, 447–448 (1963). — 8. FROESE-GERTZEN, E. E., C. F. KONZAK, R. A. NILAN und R. E. HEINER: The effect of ethyl methanesulfonate on the growth response, chromosome structure and mutation rate in barley. *Radiation Bot.* **4**, 61–69 (1964). — 9. GAUL, H.: Die verschiedenen Bezugssysteme der Mutationshäufigkeit bei Pflanzen angewendet auf Dosis-Effektkurven. *Z. Pflanzenzücht.* **38**, 63–76 (1957). — 10. GHATNEKAR, M. V.: Primary effects of different mutagens and the disturbances induced in the meiosis of  $X_1$  and  $X_2$  of *Vicia faba*. *Caryologia* **17**, 219–244 (1964). — 11. GICHNER, T.: The mutagenic activity of nitrosamides with methyl and ethyl groups. In: G. RÖBBELEN (Ed.), *Arabidopsis Research*, pp. 200–203. Göttingen 1965. — 12. GICHNER, T., and J. VELEMSKY: Induction of chlorophyll chimeras by X-rays and ethyl methanesulfonate (EMS) in different heterozygous strains of *Arabidopsis thaliana*. In: J. VELEMSKY and T. GICHNER (Ed.), *Induction of mutations and the mutation process*, pp. 54

to 56. Prague (1965). — 12a. HIRONO, Y., and G. P. REDEI: Somatic sectoring after X-irradiation and ethyl methanesulfonate treatment. *Arabidopsis Inform. Serv.* **2**, 15 (1965). — 13. JACOBS, M.: Mutagenicity of some monofunctional alkylating agents. In: G. RÖBBELEN (Ed.), *Arabidopsis Research*, pp. 184–190. Göttingen 1965. — 14. KRIEG, D. R.: Ethyl methanesulfonate-induced reversion of bacteriophage T4rII mutants. *Genetics* **48**, 561–580 (1963). — 15. MCKELVIE, A. D.: Studies in the induction of mutations in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Radiation Bot.* **3**, 105–123 (1963). — 16. MOES, A.: Comparison of the effects of X-rays and of ethyl methanesulfonate in barley. In: *Barley Genetics I*, pp. 82 bis 91. Wageningen 1964. — 17. MÜLLER, A. J.: Mutationen mit embryonaler Manifestation bei *Arabidopsis thaliana*. *Naturwissenschaften* **48**, 579 (1961). — 17a. MÜLLER, A. J.: Embryontest zum Nachweis rezessiver Letalfaktoren bei *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Zbl.* **82**, 133–163 (1963). — 18. MÜLLER, A. J.: Mutationsauslösung durch Nitrosomethylharnstoff bei *Arabidopsis*. *Der Züchter* **34**, 102 bis 120 (1964a). — 19. MÜLLER, A. J.: Keimwurzeltest zur Bewertung des somatischen Strahlenschadens bei *Arabidopsis*. *Kulturpflanze* **12**, 237–255 (1964b). — 20. MÜLLER, A. J.: The chimerical structure of  $M_1$ -plants and its bearing on the determination of mutation frequencies in *Arabidopsis*. In: J. VELEMSKY and T. GICHNER (Ed.), *Induction of mutations and the mutation process*, pp. 46–52. Prague 1965a. — 21. MÜLLER, A. J.: Comparative studies on the induction of recessive lethals by various mutagens. In: G. RÖBBELEN (Ed.), *Arabidopsis Research*, pp. 192–199. Göttingen 1965b. — 22. MÜLLER, A. J.: Beeinflussung der radiomimetischen Wirksamkeit von Nitrosamiden durch Stoffwechselinhibitoren. *Naturwissenschaften* **52**, 213 (1965c). — 23. MÜLLER, A. J.: Über den Zeitpunkt der Mutationsauslösung nach Einwirkung von N-Nitroso-N-methylharnstoff auf quellende Samen von *Arabidopsis*. *Mutation Res.* **2**, 426–437 (1965d). — 24. MÜLLER, A. J.: Reparation chemisch induzierter prämutativer Läsionen durch Rücktrocknung der behandelten Samen? *Biol. Zbl.* **84**, 759 bis 762 (1965e). — 25. MÜLLER, A. J.: Durch Röntgenbestrahlung des Pollens von *Arabidopsis* induzierte diplophasische und haplophasische Letalmutationen. *Kulturpflanze* **13**, 163–171 (1965f). — 26. MÜLLER, A. J.: Die Bestimmung von Mutationsfrequenzen nach mutagener

Behandlung von autogamen Pflanzen (1967, in Vorbereitung). — 27. MÜLLER, A. J.: Mutagenic activity of tri-2-chloroethylamine. *Arabidopsis Inform. Serv.* **3**, 24 (1966a). — 28. MÜLLER, A. J.: Induction of recessive lethals by X-rays. *Arabidopsis Inform. Serv.* **3**, 22 (1966b). — 29. NAGARAJA RAO, R., and A. T. NATARAJAN: Mutagenicity of some alkyl alkanesulfonates in barley. *Mutation Res.* **2**, 132–148 (1965). — 30. NATARAJAN, A. T., and G. SHIVASANKAR: Studies on modification of mutation response of barley seeds to ethyl methanesulfonate. *Z. Vererbungsl.* **96**, 13–21 (1965). — 31. NILAN, R. A., C. F. KONZAK, R. E. HEINER and E. E. FROESE-GERTZEN: Chemical mutagenesis in barley. In: *Barley Genetics I*, pp. 35–54. Wageningen 1964. — 32. RIEGER, R., und A. MICHAELIS: Chromatidenaberrationen nach Einwirkung von Äthylmethansulfonat (Methansulfonsäureäthylester) auf Primärwurzeln von *Vicia faba* L. *Kulturpflanze* **8**, 230–243 (1960). — 33. RÖBBELEN, G.: Wirkungsvergleich zwischen Äthylmethansulfonat und Röntgenstrahlen im Mutationsversuch mit *Arabidopsis thaliana*. *Naturwissenschaften* **49**, 65 (1962). — 34. RÖBBELEN, G.: The effects of two endogenous factors on artificial mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. In: J. VELEMSKY and T. GICHNER (Ed.), *Induction of Mutations and the Mutation Process*, pp. 42–45. Prague 1965a. — 35. RÖBBELEN, G.: Plasmomutations. In: G. RÖBBELEN (Ed.), *Arabidopsis Research*, pp. 100–103. Göttingen 1965b. — 36. SHAMA RAO, H. K., and E. R. SEARS: Chemical mutagenesis in *Triticum aestivum*. *Mutation Res.* **1**, 387–399 (1964). — 37. SPECKMANN, G. J.: The mutagenic effect of treatment with EMS at different temperatures in *Pisum sativum*. *Euphytica* **13**, 337–344 (1964). — 38. TESSMAN, I., R. K. PODDAR and S. KUMAR: Identification of the altered bases in mutated single-stranded DNA I. In vitro mutagenesis by hydroxylamin, ethyl methanesulfonate and nitrous acid. *J. Mol. Biol.* **9**, 352–363 (1964). — 39. WALKES, S., and G. AHNSTRÖM: Correlation between the mutation frequency and the alkylation of deoxyribonucleic acid upon treatment of seeds of *Arabidopsis thaliana* with ethyl methanesulfonate. In: G. RÖBBELEN (Ed.), *Arabidopsis Research*, pp. 165–169. Göttingen 1965. — 40. VEEN, J. H. VAN DER, and M. GERLACH: Chimeric structure after EMS treatment of seeds. *Arabidopsis Inform. Serv.* **2**, 14 (1965).

## Feinstruktur der Pollenschläuche im Griffel von *Petunia*

J. VAN DER PLUIJM und H. F. LINSKENS

Botanisches Laboratorium der Universität Nijmegen

### Fine structure of pollen tubes in the style of *Petunia*

**Summary.** From electron microscopic observation of transverse sections through the style of *Petunia* it was possible to show that the pollen tubes grow within the compact matrix of the middle lamellae of the transmitting tissue. This it does enzymatically by dissolving a pipelike path in front of the tube tip. From the fine structure of the cytoplasm and the organelle content, the cells of the tubes and of the transmitting tissue can be distinguished. Differences in the fine structure of the cytoplasm and the wall between inhibited (incompatible) and normal growing (compatible) pollen tubes can be demonstrated *in situ*. This is discussed in terms of localisation of the incompatibility reaction on the surface of the inhibited pollen tubes. The interpretation is in agreement with genetical and biochemical observations elsewhere.

Die submikroskopische Struktur der Pollenschlauchwand wurde schon wiederholt untersucht (O'KELLEY u. CARR 1954, MÜHLETHALER u. LINSKENS 1956). Auch liegt eine Reihe von Beobachtungen

über die Feinstruktur des Pollenschlauchplasmas nach Keimung *in vitro* vor (LARSON u. LEWIS 1962, ROSEN 1964, ROSEN et al. 1964, SASSEN 1964a, 1964b). Hingegen fehlen bislang elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pollenschläuchen *in situ*, d. h. während ihres Wachstums durch das Leitgewebe des Griffels. Im Hinblick auf eventuelle Änderungen in der Feinstruktur im Zusammenhang mit der Wachstumshemmung des Pollenschlauches, welche als Folge inkompatibler Bestäubung innerhalb selbstinkompatibler Rassen auftritt (LINSKENS 1955, 1961, 1965), wurde eine Einsicht in die submikroskopische anatomische Situation bei dem biochemisch gut untersuchten Objekt versucht.

### Material und Methode

Griffel von *Petunia hybrida* Klon T2U (Selbststerilitätsallele  $S_3S_3$ ) wurden mit eigenem Pollen bzw. mit Pollen des Klones W166k (Selbststerilitätsallele  $S_1S_2$ ) bestäubt und in der abgeschnittenen Blüte bei