

Beiträge zum Problem der Plastidenabänderungen

V. Über eine weitere isotope-(^{35}S)-induzierte Kernmutante, die Plastidenabänderungen hervorruft

P. MICHAELIS

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln-Vogelsang, Abteilung für Plasmavererbung

Contributions to the Problem of Plastid Change.

V. Another ^{35}S -Induced Nuclear Gene Mutant Effecting Plastid Changes

Summary. Seeds of *Epilobium hirsutum* were treated with 0.5 mC ^{35}S isotope. One treated plant gave rise to variegated plants when selfed. Crosses revealed that this was caused by a recessive gene mp_2 which induces plastid mutations.

That the observed variegation was due to mutations of the plastids could be derived from the evidence of the characteristic patterns of the leaves and from the occurrence of actual mixed cells. Maternal inheritance of the mutated plastids could not be demonstrated as the mp_2 gene induces most of the plastid mutations too late in the development of the leaves to exert an effect on the shoots and cell lines giving rise to egg cells.

A. Einleitung

Die große Seltenheit von Plastiden- und vor allen Dingen Plasmaabänderungen erschwert alle Untersuchungen zur Plastiden- und Plasmavererbung. Agenzien, die zur Erhöhung der Kernmutationsrate führen, haben bei den extrachromosomalen Erbträgern nur geringe Wirkungen. Das hat zur Folge, daß unsere Kenntnisse über die Umkombination der Erbträger, über die Wechselwirkungen dieser Erbträger untereinander und mit denen des Zellkernes und vor allen Dingen unser Wissen über ihre Mutabilität sehr gering blieb. Nachdem an Hand spontan entstandener Abänderungen die Umkombination plasmatischer Erbträger am Beispiel der Plastiden ausführlich untersucht worden war, wurde der Wunsch, Plastiden- und Plasmaabänderungen in größerer Zahl zu erhalten, besonders dringend, um Fragen der Mutabilität aufgreifen zu können.

Bei verschiedenen Objekten (Literatur bei HAGEMANN 1964 und MICHAELIS 1968) waren Kerngene gefunden worden, die in größerer Zahl Plastidenabänderungen induzieren, ohne daß dieses Material zu ausführlichen Untersuchungen über die Plastidenmutation verwendet worden wäre. Es wurde nun versucht, bei *Epilobium* ebenfalls solche Kerngene zu erzeugen.

Über eine Kernmutante, bei der im Gefolge von Störungen der Teilungsrhythmen Riesen- und Zwergplastiden auftraten, wurde schon berichtet (MICHAELIS 1964). Weitere Mitteilungen liegen vor über eine Kernmutante mp_1 (MICHAELIS 1965 a, MICHAELIS und FRITZ 1966, MICHAELIS 1968), bei der in ungewöhnlich dichter Folge zahlreiche der verschiedensten Plasma- und Plastidenabänderungen entstehen. An diesem Material wurden auch Plastidenrückmutationen (= Restitutionen) aufgefunden. Hier soll nun kurz über ein drittes Kerngen mp_2 berichtet werden, das ebenfalls Plastidenabänderungen induziert. Da hier die Plastidenabänderungsrate im Vergleich zum mp_1 -Gen nur relativ wenig erhöht ist, wurden ausführlichere Untersuchungen zu Gunsten von Versuchen mit dem mp_1 -Gen zurückgestellt. Hier sollen

nur die wichtigsten Ergebnisse in bezug auf Erbgang und Mutationsmuster geschildert werden.

B. Entstehung des mp_2 -Genes

1963 wurden Samen der homozygoten *Epilobium hirsutum*-Sippe Essen in einer Nährlösung mit dem radioaktiven Isotop ^{35}S zur Keimung gebracht. Die Sämlinge verblieben 28 Tage in dieser Nährlösung, bis sie in normale Erde pikiert wurden. In der Versuchsreihe mit der subletalen Dosis von 0,5 mC ^{35}S wurde eine Selbstungs-Nachkommenschaft (1964. 3196) einer behandelten Pflanze gefunden, in der unter 97 Pflanzen 22 (= 22,7%) gescheckt waren. Die Mutterpflanze war selbst in keiner Weise abgeändert.

Spontan entstandene Plastidenmutationen treten in sehr geringer Häufigkeit (unter 0,5%) einzeln unter zahlreichen Pflanzen auf. Nur wenn eine Plastidenmutation schon im Gewebe des mütterlichen Fruchtknotens entstand, können mehrere gleichartige Schecken in der Nachkommenschaft dieses Fruchtknotens auftreten. Ein solcher Fall wurde in den zahlreichen Mutationsversuchen bisher nur einmal gefunden. Die hier zu besprechende Nachkommenschaft der isotopebehandelten Pflanze 0,5 mC ^{35}S 23 selbst = 1964. 3196 stammte aus zwei Fruchtknoten, die beide 23,4% und 22,0% Schecken ergaben. Da beide Fruchtknoten in verschiedenen Sproßsektoren standen, ist es unwahrscheinlich, daß alle Schecken auf eine einzelne spontane Plastidenmutation zurückgeführt werden können. Eine Plastidenmutation vermag nur eine einzelne Zelldeszendenz zu verändern. Die Sproßsektoren einer Pflanze enthalten vier Zelldeszendenzen, die schon während der Embryoentwicklung der Pflanze getrennt werden. Eine Mutation vor diesem Zeitpunkt hätte sich aber auf alle Fälle schon während der Entwicklung der Mutterpflanze manifestieren müssen.

Nach Auffindung der Nachkommenschaft 1964. 3196 wurden 1964 an den überwinterten Ausläufertrieben der Mutterpflanze Selbstungen und Kreuzungen wiederholt. Auf fünf Ausläufertrieben wurden

Tabelle 1. F_2 - und F_3 -Kreuzungen mit dem mp_2 -Gen

| Gene- ration | Aus- sehen | gene- tische Konsti- tution | Selbstung | | | | $mp_2\varnothing \times Ep. hirsutum$ Essen ♂ | | | | $Ep. hirsutum$ Essen♀ $\times mp_2\sigma$ | | | |
|-----------------|---------------------------|--------------------------------------|--|------|-------------------------------------|--|---|------|-------------------------------------|--|---|------|-------------------------------------|--|
| | | | Zahl der gleich- artigen ♀-Pfl. | n | mp_2 - Scheck- kung in % | spon- tane Scheck- kung in % | Zahl der gleich- artigen ♀-Pfl. | n | mp_2 - Scheck- kung in % | spon- tane Scheck- kung in % | Zahl der gleich- artigen ♀-Pfl. | n | mp_2 - Scheck- kung in % | spon- tane Scheck- kung in % |
| F ₂ | ge- scheck- te Pfl. | mp_2/mp_2 | 7 | 733 | 81,7 | 0 | 7 | 836 | 0 | 0 | 6 | 1373 | 0 | 0 |
| | grüne Pfl. | mp_2/Mp_2 | 4 | 218 | 19,7 | 0 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | grüne Pfl. | Mp_2/Mp_2 | 2 | 31 | 0 | 0 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| F ₃ | ge- scheck- te Pfl. | mp_2/mp_2 | — | — | — | — | 1 | 144 | 0 | 1,5* | 1 | 74 | 0 | 0 |
| | grüne Pfl. | mp_2/Mp_2 | 25 | 3753 | 20,5 | 0,03* | 25 | 2750 | 0 | 0,1* | 24 | 2550 | 0 | 0 |
| | grüne Pfl. | Mp_2/Mp_2 | 4 | 883 | 0 | 0,11* | 4 | 601 | 0 | 0 | 4 | 474 | 0 | 0 |

* Es handelt sich bei diesen Pflanzen — nach Scheckungsmuster und Häufigkeit zu schließen — um spontane Plastidenmutanten, die nicht durch das mp_2 -Gen induziert wurden.

insgesamt 19 Kreuzungen durchgeführt. Unter den 1211 aufgezogenen Pflanzen fehlten Schecken völlig. Die Abänderung war also unter den Ausläufertrieben eliminiert worden. Ein solcher Vorgang ist bei den *Epilobium*-Mutationsversuchen nicht selten. Die Ausläufer entstehen in den Achseln der ersten Primärblätter. Bei der langen Halbwertszeit des ^{35}S -Isotops ist es wahrscheinlich, daß zahlreiche der induzierten Mutanten erst nach der Anlage der Primärblätter entstehen und daher den Ausläufertrieben fehlen müssen.

Zur weiteren Prüfung des Falles wurden auf gescheckten Selbstungspflanzen sowie auf grünen Pflanzen reziproke Kreuzungen mit der normalen Ausgangssippe *Ep. hirsutum* Essen durchgeführt, um den Erbgang der Scheckung zu prüfen.

C. Kreuzungsversuche

1964 und 1966 wurden folgende F_2 u. F_3 Kreuzungen durchgeführt und 1965, 1966 und 1967 ausgesetzt und im Pikierkasten ausgezählt (Tab. 1).

Nach Selbstung gescheckter ($mp_2 mp_2$) Pflanzen war die Mehrzahl (81,7%) der Nachkommen \pm deutlich gescheckt. Bei einzelnen Pflanzen beschränkte sich die Scheckung auf nur wenige Flecken, und es ist sehr wahrscheinlich, daß sich die Fleckung zum Zeitpunkt der Auszählung noch nicht an allen Pflanzen manifestierte. Nach der Selbstung 35 grüner ($mp_2 Mp_2$, $Mp_2 Mp_2$) Pflanzen ließen sich 29 heterozygote Pflanzen mit etwa 20% Scheckung unter den Nachkommen und 6 homozygote normale Pflanzen ohne die kennzeichnende Scheckung des mp_2 -Genes unterscheiden. Das entspricht in hohem Maße der Aufspaltung eines rezessiven Kerngenes (mp_2).

Bei den Selbstungen zeigten die Nachkommen gescheckter Äste und Tragblätter gegenüber der normalen Äste und Tragblätter derselben Pflanze keine gesicherten Unterschiede. Bei einer typischen Plastidenvererbung sind die Nachkommen gescheckter Äste \pm gescheckt, die Nachkommen grüner Äste aber rein grün.

Bei den reziproken Kreuzungen mit der normalen *Ep. hirsutum*-Ausgangssippe Essen ($Mp_2 Mp_2$) traten — abgesehen von einigen seltenen spontanen Schecken — keinerlei gescheckte Pflanzen auf. Ein solches Ergebnis ist bei Rückkreuzung eines rezessiven Genes mit dem normalen Allel zu erwarten, nicht aber nach Kreuzung auf Pflanzen, die typische Plastidenabänderungen enthalten. Daß die Scheckungen auf Plastidenmutation beruhen, läßt sich auf Grund der Kreuzungsversuche also nicht belegen.

D. Mikroskopische Untersuchungen

Die Erbversuche zeigen deutlich, daß die Scheckung durch ein mendelndes Gen ausgelöst wird. Sie geben aber keinen Aufschluß über die Ursachen der Scheckung selbst. Es kämen Plastiden- resp. Plasmaabänderungen in Frage, wenn eine mütterliche Vererbung der Scheckung nachweisbar wäre, oder es ist möglich, daß das mp_2 -Gen auf dem Umwege über unbekannte physiologische Faktoren die Scheckungsmuster bedingt und als Mustergen zu bezeichnen wäre. Schließlich wäre auch an chromosomale Störungen oder an eine Genlabilität zu denken. Zur Entscheidung zwischen diesen Alternativen können mikroskopische Untersuchungen sowie Musteranalysen beitragen.

Bei einer mikroskopischen Untersuchung der F_1 -Schecken wurden trotz der sehr einheitlich erscheinenden Musterung sehr verschiedene Plastidenstörungen beobachtet. Als auffälligste der beobachteten Abänderungen sind neben den normalen Plastiden (Abb. 1b links oben) a) Plastiden zu nennen, die gegenüber normal nur wenig verkleinert sind (Abb. 1a links oben), aber in den Zellen in verringerter Zahl vorkommen, b) Plastiden, die blaßgrün und deutlich verkleinert sind (Abb. 1b rechts unten), c) Plastiden, die in frühen Entwicklungsstadien schaumig degenerieren und unter Bildung von Lipoidtröpfchen und unter Chlorophyllverlust verquellen (Abb. 1c). In größeren Zellarealen mit solchen Plastiden kommt es zu Zellteilungsausfällen, die

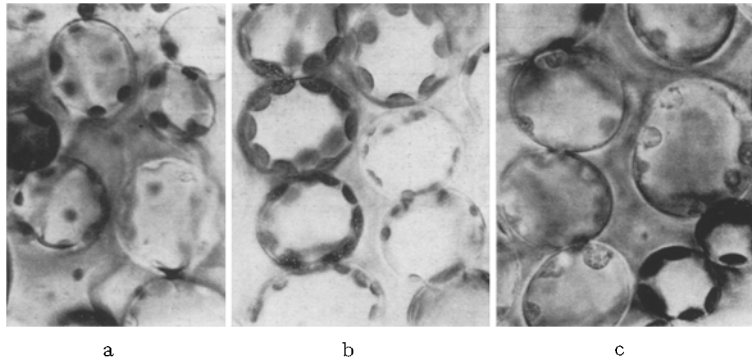


Abb. 1. Verschiedene Plastidenabänderungen unter den Nachkommen der Pflanze 1963. 0,5 mC ^{35}S . 23. — a) Oben links schwach verkleinerte Plastiden, die in geringerer Zahl je Zelle vorkommen; b) Oben links normale Plastiden, unten rechts stark verkleinerte, blaßgrüne Plastiden; c) Farblose verquellende Plastiden

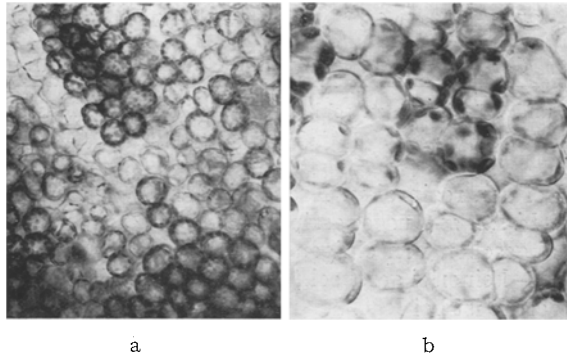


Abb. 2. a) Entmischungsmuster der Scheckungen; b) Teilungswellen in einem jungen Blatt, in dem links oben neben verkleinerten, blaßgrünen, mutierten Plastiden Geschwisterzellpaare mit normalen Plastiden liegen. Die einzelnen Geschwisterzellpaare enthalten ähnliche Zahlenverhältnisse normaler Plastiden

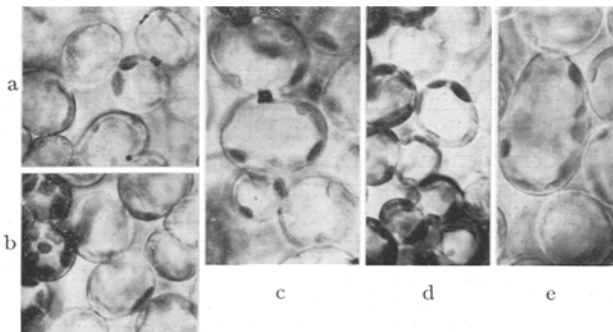


Abb. 3. Mischzellen. — a) Zwei normale Plastiden neben stark verkleinerten, blaßgrünen Plastiden; b) Unten zwei verkleinerte grüne Plastiden neben farblosen verquellenden Plastiden; c) Grüne Plastiden neben verquellenden Plastiden; d) Drei normale Plastiden neben verkleinerten blaßgrünen Plastiden; e) Zwei verkleinerte grüne Plastiden neben farblosen verquellenden Plastiden

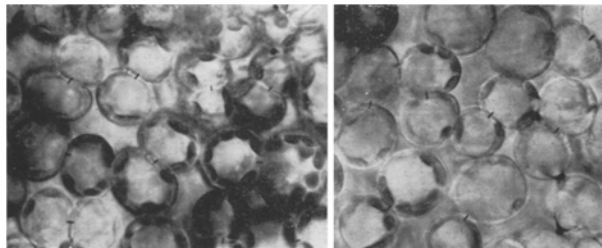


Abb. 4. Mischzellen aus jungen Blättern. In Geschwisterzellen kommen ähnliche Mischungsverhältnisse zwischen normalen und abgeänderten Plastiden vor. Geschwisterzellen wurden mit einem Strich durch die Querwand bezeichnet

bei Unterlagerung weißer Gewebeschichten durch normale Zellen Gewebeverzerungen verursachen.

Die Zahl dieser verschiedenen Plastidentypen ist bei den geringen Manifestationsmöglichkeiten an den Plastiden als groß zu bezeichnen. Die Mehrzahl der Plastidentypen kommt bei allen Pflanzen teils in getrennten Arealen, teils in Mischung miteinander vor. Zwischen den einzelnen Plastidentypen — nicht bei allen — kommen wechselseitige Beeinflussungen vor, wenn verschiedene Plastiden in einer Zelle vereinigt sind oder homoplastidisch verschiedene Zellen dicht aneinandergrenzen.

Diese Verschiedenartigkeit der Plastiden überraschte einigermaßen, nachdem alle Schecken mit dem mp_2 -Gen sehr ähnliche Scheckungsmuster aufwiesen. Die Ähnlichkeit der Musterung beruht also nicht auf gleichen Plastidenabänderungen. Sie ist dadurch zu erklären, daß die Scheckung auf kleine und kleinste Flecken beschränkt bleibt, an denen die Eigenarten der verschiedenen Plastidentypen makroskopisch noch nicht unterschieden werden können. Die Gleichheit der Musterung ist nicht durch gleiche Plastidenabänderungen, sondern durch gleiche Entmischungsstadien bedingt.

Zur Deutung der Scheckungsursachen sind folgende Beobachtungen wichtig:

Die abgeänderten Plastiden kommen in scharf getrennten Zelldeszendenzen (Abb. 2a) vor, die der Entwicklungsgeschichte des Blattes und den im Blatt ablaufenden Zellteilungsvorgängen entsprechen. Das ist in dem Sinne zu deuten, daß die Eigenarten der Plastiden über eine längere Zahl von Zellteilungsfolgen konstant beibehalten werden. Physiologisch bedingte Muster sehen ganz anders aus. Sie schneiden meistens die Zelldeszendenzen und stehen in Beziehung zu den physiologischen Unterschieden im Blatt, sie laufen z. B. parallel der Blattnervatur, dem Blattrand etc. Das ist bei den mp_2 -Schecken auszuschließen: Die Plastidenunterschiede sind nicht phänotypisch bedingt, sondern erblich fixiert.

In vielen, wenn auch nicht allen Flecken lassen sich eindeutige „Mischzellen“ nachweisen, in denen die beiden verschiedenen Plastidentypen in kennzeichnenden Zahlenverhältnissen in einer Zelle nebeneinander liegen (Abb. 3). Solche Mischzellen sind ein Kennzeichen einer Plastidenvererbung und schließen Kernabänderungen sowie Abänderungen des extraplastidalen Plasmons aus. Es ist nur nachzuweisen, daß sie nicht als Pseudomischzellen vorgetäuscht werden. Ein gutes Unterscheidungsmittel zwischen echten Mischzellen und Pseudomischzellen ist das Vorkommen ähnlicher Mischungsverhältnisse in Geschwisterzellen. Abb. 4 gibt Ausschnitte aus jungen Blättern, in denen die Zusammengehörigkeit der Geschwisterzellen noch zu erkennen ist. Sie sind in Abb. 4 durch Verbindungsstriche an den Trennwänden gekennzeichnet (vgl. auch Abb. 2b). Die Geschwisterzellen besitzen ähnliche Zahlenverhältnisse: sie sind entweder beide farblos, besitzen beide wenige abgeänderte, resp. viele normale Plastiden oder haben beide einen normalen Plastidenbestand.

Solche Verhältnisse können kaum durch physiologische Beeinflussung entstehen, sind aber bei einer zufallsgemäßen Plastidenumkombination zu fordern.

Die mikroskopischen Beobachtungen über das Vorkommen echter Mischzellen und die Lage der Plastidenabänderungen in Zelldeszendenzen liefern Indizien, daß an der mp_2 -Scheckung Abänderungen des Plastoms zum mindesten beteiligt sind.

Nun besteht zwischen den Ergebnissen der Erbversuche und denen der mikroskopischen Untersuchungen ein offener Widerspruch: Bei Vorliegen einer Plastomabänderung wäre eine mütterliche Weitergabe der abgeänderten Plastidenmerkmale zu erwarten gewesen. Die Analyse der makroskopischen Scheckungsmuster vermag nun zur Erklärung dieses Widerspruches beizutragen.

E. Die Scheckungsmuster

Ein Kennzeichen aller mp_2 -Schecken ist die sehr feine, manchmal nur schwer zu beobachtende Spritzung einzelner Blätter. An den Schecken entstehen selbst bei mehrjähriger Kultur nie völlig entmischte Blatthälften oder rein weiße Sproßteile. Weiterhin ist auffällig, daß die Scheckung in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze sehr verschieden stark ist. Sie ist am besten im Rosettenstadium zu erkennen, aber nur schwierig in der Blütenregion aufzufinden. Abb. 5 zeigt typisch gescheckte Blätter des Folgesprosses, Abb. 6 zwei besonders stark gescheckte Rosettenpflanzen.

Wenn nun im folgenden die mp_2 -Scheckung beschrieben und erklärt werden soll, sei sie einer typischen Scheckung gegenüber gestellt, wie sie nach spontaner Plastidenmutation durch Umkombination entsteht (MICHAELIS 1957, 1964, 1967, 1969a). Erfolgt in einem Sektor einer Pflanze eine Plastidenabänderung, so bleibt die durch Umkombination entstehende Scheckung auf diesen einen Sektor beschränkt. Bei den mp_2 -Schecken beginnt zwar die erste Scheckung in einem einzelnen Sektor der Pflanze. Sie greift aber häufig sehr schnell auf die übrigen Sektoren über und ist auch späterhin unregelmäßig auf alle vier Sektoren der Pflanze verteilt (Abb. 8). Eine solche Scheckung in verschiedenen Sektoren ist sonst nur bei Störungen der Entwicklungsgeschichte möglich, für die hier keine weiteren Anzeichen vorliegen. Ein solches Verhalten ist aber vor allen Dingen bei Neuentstehungen von Scheckungen zu erwarten, vor allem durch Neumutationen, bei denen die gescheckten Sektoren auf mehreren unabhängigen Mutationen beruhen.

Die Umkombination normaler und abgeänderter Plastiden führt normalerweise zu einem sehr charakteristischen phasischen Ablauf der Scheckung: a) Solange die Zahl der mutierten Plastiden noch klein ist, ist die Scheckung nur mikroskopisch zu erkennen (latente Phase). b) Mit Zunahme der mutierten Plastiden und mit dem Vorkommen homoplastomatisch abgeänderter Zellen äußert sich die Plastidenabänderung in einer sehr feinen Spritzung. Sie ist auf relativ kleine Areale beschränkt, die von den Zelldeszendenzen der Zellen mit den ersten mutierten Plastiden gebildet werden. Dieser ersten sichtbaren Phase nach einer Plastidenabänderung entspricht das Bild der meisten mp_2 -Schecken. c) Bei der normalen Plastidenumkombination geht die Spritzung mit dem



Abb. 5. Zwei typische gescheckte Blätter mit den kleinen Scheckungsspritzern

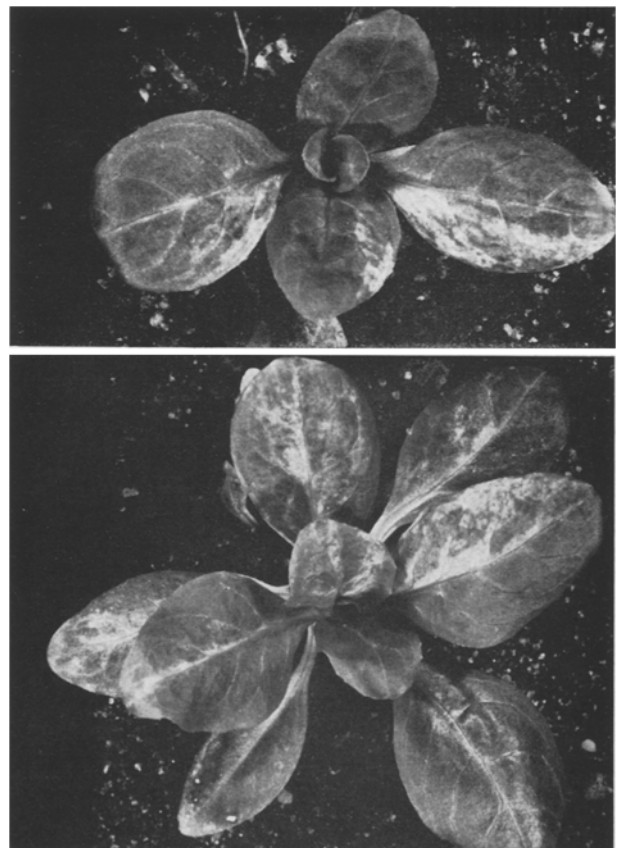


Abb. 6. Zwei besonders stark gescheckte Rosetten aus der Selbstung einer mp_2mp_2 -Pflanze



Abb. 7. Verhältnismäßig große Scheckungsareale, die die frühesten Mutationen von Plastiden anzeigen (Tertiärsektoren und isolierte Spritzer)

Wachstum der abgeänderten Zelldeszendenzen sehr schnell in eine größere Scheckung über. Zum Höhepunkt der Plastidenumkombination findet man Flecken der verschiedensten Größe in kennzeichnender Verschachtelung: eine feine Spritzung, Areale mit Flecken der verschiedensten Größe, Tertiär- und Primärsektoren sowie rein weiße Zellhälften (dritte Phase mit verschachtelter Musterung). Hier ist wesentlich, daß die Größe der Scheckungsflecken Rückschlüsse auf den Zeitpunkt zuläßt, zu dem die den Fleck bildende Zelldeszendenz homoplastomatisch wurde. Rein weiße Blatthälften entstehen z. B., wenn vor der Anlage des Blattes eine Deszendenz homoplastomatisch farblos wurde. Primärsektoren entstehen während der ersten 4–6 Zellteilungsfolgen der Blattanlage im noch ungegliederten Vegetationspunkt. Tertiärsektoren entstehen in den folgenden etwa 6–12 Teilungsfolgen in den jüngsten Blatthöckern des Vegetationspunktes, nachdem die Blatlamina schon mehrschichtig wurde. Die Folge immer kleiner bleibender Flecken und Spritzer entsteht in immer späteren Entwicklungsstadien der Blätter, wobei die Fleckengröße und die Zahl der einen Fleck bildenden Zellen mit jeder späteren Zellteilungsfolge ungefähr um die Hälfte kleiner wird. Abgeänderte Einzelzellen entstehen nach der letzten im Blatt abgelaufenen Teilungsfolge. d) Nach dem Höhepunkt der Plastidenumkombination nimmt normalerweise schließlich in einer vierten Phase die Zahl der kleinsten und kleinen Flecken wieder ab, während die rein weißen und die rein grünen Zelldeszendenzen ihre Areale vergrößern. e) Schließlich besteht die Pflanze nach vollzogener Entmischung nur mehr aus rein grünen und rein weißen Sproßteilen. Eine

Fleckung fehlt oder wird nur durch Aufteilung der Zelldeszendenzen auf verschiedene Organe wie Blätter vorgetäuscht.

Bei den mp_2 -Pflanzen ist nun ganz offensichtlich der phasische Ablauf der Umkombination noch vor Erreichen des Höhepunktes der Entmischungen abgebrochen. Es wurden keine völlig entmischten Blatthälften und keine abgeänderten Primärsektoren gebildet. Abb. 7 zeigt Beispiele, in denen die Entmischungen ausnahmsweise weit fortgeschritten sind: es sind gerade noch Tertiärsektoren angedeutet. Mikroskopisch ließen sich aber in dem anscheinend nach farblos entmischten Gewebe noch grüne Plastiden nachweisen, ein Zeichen, daß auch hier die Entmischung noch nicht völlig vollzogen war. Typisch neben solchen Ausnahmefällen sind aber Scheckungen, wie sie die linke Blatthälfte des in Abb. 7 rechts abgebildeten Blattes und die Blätter der Abb. 5 besitzen, bei denen die Einzelflecken größtenteils an der Grenze der makroskopischen Erkennbarkeit und Abbildbarkeit liegen.

Zur Erklärung dieser sehr abweichenden Musterung kommen zwei Möglichkeiten in Frage: a) Der phasische Ablauf der Plastidenentmischung kann durch Modifizierung der zufallsgemäßen Umkombination z. B. durch einseitige Verteilung, mangelhafte Durchmischung der Plastiden (MICHAELIS 1961, 1965 b, 1965 c), Plastidenkonkurrenz etc. in kennzeichnender Weise abgeändert werden. Es gelang jedoch in keiner Weise, irgendwelche Veränderungen der zufallsgemäßen Umkombination aufzufinden, die die abweichende Scheckung erklären könnte. Diese Erklärungsmöglichkeit scheidet also aus. b) Wenn der phasische Ablauf der Plastidenentmischung schon in frühen Stadien unterbrochen wird, so kann das auch dadurch entstehen, daß die Plastidenentmischungen erst so spät während der Blattentwicklung einsetzen, daß die Zahl der noch im Blatt ablaufenden Zellteilungsfolgen zu gering ist, um den ganzen phasischen Ablauf zu gewährleisten. Mit anderen Worten: man müßte zur Erklärung der abnormen Musterung annehmen, daß die Plastidenmutationen erst in späteren Stadien der Blattentwicklung einsetzen. Das begrenzte Teilungswachstum des Blattes verhindert eine weitere Entmischung der mutierten Plastiden. Diese Erklärungsmöglichkeit scheint den beobachteten Fakten am besten zu entsprechen.

Die Musteranalyse macht es also sehr wahrscheinlich, daß das mp_2 -Kerngen in den zentralen Deszendenzlinien des Scheitelmeristemes keine Plastidenabänderungen erzeugen kann, da abgeänderte Sproßsektoren völlig fehlen. Die ersten homoplastomatisch abgeänderten Zelldeszendenzen entstehen frühestens nach Vorwölbung der Blattanlagen am Vegetationspunkt. Der Höhepunkt der Plastidenmutationen muß aber in relativ späten Stadien der Blattentwicklung liegen.

Unter solchen Umständen muß weiter angenommen werden, daß die Scheckungen der mp_2 -Pflanzen nicht auf einige wenige Abänderungsvorgänge zurückgeführt werden können. Offenbar entstehen in den Blättern in verschiedenen Teilen der Pflanzen immer wieder neue Abänderungen. Auf alle Fälle muß in den einzelnen Blättern die Scheckung stets wieder neu entstanden sein. Es ist sogar wahrscheinlich, daß die Dichte der Spritzungen wesentlicher durch die

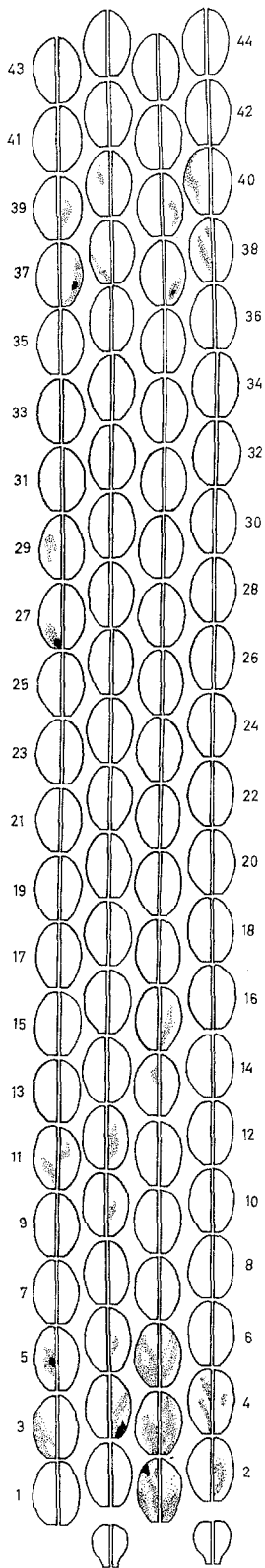


Abb. 8. Muster einer mp_2mp_2 -Pflanze, das die starke Scheckung der Rosettenblätter und die seltene Scheckung im Blühspross anzeigt. Die Blätter der einzelnen Wirtel sind stark zusammengeschoben gezeichnet

Abänderungsdichte als durch die Plastidenentmischung bestimmt wird.

Unter diesen Verhältnissen erscheint es notwendig, die Scheckung der mp_2 -Pflanzen mit der der mp_1 -Pflanzen zu vergleichen (MICHAELIS 1965 a, MICHAELIS und FRITZ 1966, MICHAELIS 1968). In beiden Fällen beruht die Scheckung nicht auf einem einmaligen Plastidenabänderungsvorgang wie bei den spontan entstehenden Scheckungen, sondern auf Häufung \pm zahlreicher, aufeinander folgender Abänderungen. Das erste Auftreten der Scheckungen ist in beiden Fällen ähnlich und äußert sich in einer mehr oder minder dichten Spritzung. Während aber bei Pflanzen, die das rezessive mp_1 -Gen homozygot enthalten, schon an den Rosettenpflanzen völlig farblose Primärsektoren auftreten können, ist bei den mp_2 -Pflanzen nur die feine Spritzung gegeben. Weiterhin entstehen bei den mp_1 -Pflanzen die typischen Entmischungsmuster. Es treten zahlreiche rein ab-

geänderte Blatthälften und Seitensprosse auf. Die grünen Blattanteile bleiben aber infolge von Neumutationen weiterhin stets fein gespritzt. An einer Pflanze können sogar mehrere farblich ganz verschiedene Plastidenabänderungen zur Entmischung kommen und sich miteinander kombinieren.

Beide Gene lösen also eine Vielzahl verschiedener Plastidenabänderungen aus. Das mp_1 -Gen ist — wie es auch bei der Spontanmutation die Regel ist — schon in den meristematischen Zellen wirksam, während das mp_2 -Gen offenbar erst später wirksam wird.

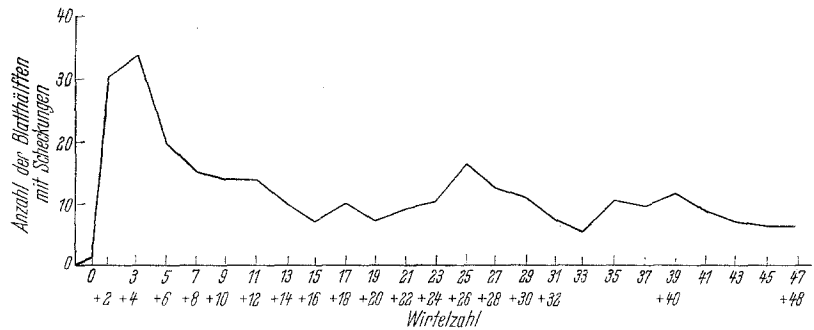


Abb. 9. Kurve der durchschnittlichen Scheckungshäufigkeit von 15 mp_2mp_2 -Pflanzen. Auf der Abszisse ist die Zahl der Blattwirtel, auf der Ordinate die Zahl der gescheckten Blatthälften aufgetragen. Die Kurve gibt die starke Scheckung der auf die Keimblätter folgenden Blattwirtel und das Absinken der Scheckung am Blühspross wieder

F. Der zeitliche Ablauf der Abänderungsvorgänge während der verschiedenen Phasen der Pflanzenentwicklung

Eine weitere Eigenart der mp_2 -Scheckungen ist das Nachlassen der Scheckungen vom Stadium der Keimlingsrosette bis zur Blühperiode. Nachdem aus der Analyse der Scheckungsmuster wahrscheinlich gemacht werden konnte, daß die Plastidenabänderungen erst während der Entwicklung eines Blattes induziert werden, gibt die Scheckenhäufigkeit der einzelnen Blätter Hinweise über die Variabilität der Wirkung des mp_2 -Genes. In Abb. 8 ist das Musterprotokoll einer mp_2 -Schecke schematisch wiedergegeben: Zuunterst sind die beiden Keimblätter gezeichnet, darüber die dekussiert stehenden Blätter der einzelnen Blattwirtel, wobei die Internodien stark zusammengeschoben sind. Die Abbildungen zeigen, daß in den ersten 6—10 Blattwirteln der Keimlingsrosette die Scheckungen relativ stark sind (vgl. auch Abb. 6), die Scheckungen werden dann aber verhältnismäßig schnell seltener und treten mit großen Unterbrechungen auf oder verschwinden ganz. Abb. 9 gibt die Mittelwerte einer größeren Anzahl von Pflanzen wieder. Die gescheckten Blätter sind in jungen Rosetten zwei- bis dreimal häufiger als zur Blütezeit. Aus diesen Feststellungen ist zu entnehmen, daß die Aktivität des mp_2 -Genes in den verschiedenen Entwicklungsphasen verschieden ist. Über die eigentlichen Ursachen dieser Aktivitätsschwankung lassen sich zur Zeit ohne weitere Untersuchungen keine Angaben machen. Es kommen vor allem in Frage: Einflüsse der Umwelt, des Entwicklungszustandes der Zellen und schließlich die Struktur und der physiologische Zustand der Plastiden selbst während ihrer Differenzierung von den Jungchloroplasten zu den hoch strukturierten Chloroplasten der ausdifferenzierten Zellen.

G. Zusammenfassung der Diskussion

Unter den Selbstungsnachkommen der mit ^{35}S behandelten *Epilobium-hirsutum*-Pflanze 1963. 0,5 mC ^{35}S . 23 traten 22,7% Schecken auf. Die Kreuzungsversuche belegen, daß die Scheckungen durch das monohybrid spaltende, rezessive Kerngen mp_2 induziert werden. Die mikroskopische Untersuchung der Schecken macht es sehr wahrscheinlich, daß an der Scheckung verschiedene Abänderungen des Plastostoms beteiligt sind. Es treten echte Mischzellen

auf, die für Plastidenmutationen kennzeichnend sind. Es ist aber erstaunlich, daß diese Abänderungen des Plastoms nicht durch die Mutter auf die Nachkommen übertragen werden, obwohl sich keine Elimination nachweisen läßt.

Die Analyse der Scheckungsmuster macht es sehr wahrscheinlich, daß das mp_2 -Gen in den Scheitelmeristemzellen des Vegetationspunktes keine Plastidenabänderungen hervorrufen kann und gegen die Blütezeit die Scheckungen abnehmen. Die Plastidenabänderungen entstehen frühestens in den ersten Blattanlagen, zur Mehrzahl aber erst während der Entwicklung der Blätter. Nimmt man zusätzlich zu diesen Feststellungen an, daß das mp_2 -Gen nicht nur in den Scheitelmeristemzellen unwirksam ist, sondern auch in den Zelldeszendenzten, die zu den Eizellen führen, so wäre es verständlich, daß eine mütterliche Übertragung der Plastomabänderungen fehlt.

Die Annahme, daß das mp_2 -Gen nur in bestimmten Entwicklungsstadien einzelner Gewebe Plastidenabänderungen hervorrufen kann, scheint auf den ersten Blick sehr gewagt zu sein. Es ist aber schon ausführlicher über Plastidenrückmutationen (Restitutionen) berichtet worden (MICHAELIS 1969a), die bei spontanen Schecken und bei Pflanzen, die das Plastiden- und Plasmaabänderungen hervorrufende mp_1 -Gen besitzen, aufgefunden und untersucht wurden. Bei einzelnen Plastidenabänderungen fanden Plastidenrestitutionen während der ganzen Blattentwicklung statt und wurden hier auch auf die Nachkommen in mütterlichem Erbgang übertragen. Bei anderen Plastidentypen fanden die Restitutionen ausschließlich während der allerletzten Entwicklungsstadien der Blattentwicklung statt. Hier konnte keine mütterliche Vererbung der Restitutionsplastiden festgestellt werden. Zwischen den durch das mp_2 -Gen induzierten Plastidenabänderungen und bestimmten Plastidenrestitutionen besteht also eine gewisse Parallele (vgl. auch MICHAELIS 1969b). Zur Zeit ist noch offen, auf welchen molekular- oder struktorgenetischen Vorgängen diese Plastidenabänderungen beruhen.

Wenn hier von Kerngenen gesprochen wird, die Plastidenabänderungen auslösen, so sind hier nur

zwei besonders gut faßbare Glieder einer Reaktionskette genannt. Es ist durchaus in Betracht zu ziehen — wenn zur Zeit auch nicht zu beweisen —, daß die mp -Gene primär Plasmaabänderungen induzieren, die dann erst ihrerseits die Plastidenabänderungen hervorrufen. Es ist bekannt, daß bei Plasmon- und Plastomabänderungen die Rate der Plastidenmutationen erhöht sein kann (MICHAELIS 1962a, 1962b).

Literatur

1. HAGEMANN, R.: Plasmatische Vererbung. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag 1964. — 2. MICHAELIS, P.: Über die Vererbung von Plastidenmerkmalen. *Protoplasma* **48**, 403–418 (1957). — 3. MICHAELIS, P.: Genetische, entwicklungsgeschichtliche und zytologische Untersuchungen zur Plasmavererbung I. Über zufalls-gemäße und einseitige Verteilung plasmatischer Erbräger während der Zellteilungen, zugleich ein Beitrag zur Analyse intraindividuelle Scheckungsmuster. *Flora* **151**, 162–201 (1961). — 4. MICHAELIS, P.: Über gehäufte Plastidenabänderungen I. *Biol. Zbl.* **81**, 91–128 (1962a). — 5. MICHAELIS, P.: Über gehäufte Plastidenabänderungen II. *Planta* **58**, 34–49 (1962b). — 6. MICHAELIS, P.: Beiträge zum Problem der Plastiden-Abänderung I. Über geninduzierte Störungen der Teilungsrhythmen von Zelle und Plastiden. *Z. Bot.* **52**, 382–426 (1964). — 7. MICHAELIS, P.: Über kerninduzierte Plasma- und Plastidenabänderungen. *Z. Naturforsch.* **20 b**, 264–267 (1965a). — 8. MICHAELIS, P.: Genetische, entwicklungsgeschichtliche und zytologische Untersuchungen zur Plasmavererbung III. Einseitige Plastidenverteilung und Fehlen heteroplastomatischer Mischzellen. *Z. Vererbungsl.* **96**, 1–12 (1965b). — 9. MICHAELIS, P.: IV. Beschleunigte Plastidenumkombination infolge unvollständiger Durchmischung der Plastiden vor der Zellteilung. *Flora* **156**, 1–19 (1965c). — 10. MICHAELIS, P.: The investigation of plasmone segregation by the pattern analysis. Vortrag Japan 1965. *Nucleus* **10**, 1–14 (1967). — 11. MICHAELIS, P.: Beiträge zum Problem der Plastidenabänderung IV. Über das Plasma- und Plastidenabänderungen auslösende, isotopen-(^{32}P)-induzierte Kerngen mp_1 von *Epilobium*. *Molec. Gen. Genetics* **101**, 257–306 (1968). — 12. MICHAELIS, P.: Über Plastidenrestitutionen. Abgeschlossen. (1969a). — 13. MICHAELIS, P.: Über eine vermutliche Kombination von Plasma- und Plastidenabänderungen mit abnormen Scheckungsmustern und abnormem Erbgang. *Flora im Druck* (1969b). — 14. MICHAELIS, P., und H.-G. FRITZ: Beiträge zum Problem der Plastiden-Abänderung II. Chlorophyllbestimmungen an Pflanzen und Plastiden-„Rückmutationen“. *Z. Naturforsch.* **21 b**, 66–71 (1966).