

Die Simulation quantitativer Merkmale durch Gene mit biochemisch definierbarer Wirkung

V. Untersuchungen zur Meßmethodik

G. FORKMANN und W. SEYFFERT

Institut für Biologie der Universität Tübingen, Lehrstuhl für Genetik, Tübingen (BRD)

Simulation of Quantitative Characters by Genes with Biochemically Definable Action

V. Investigations of the Methods of Measurement

Summary. At measuring the anthocyanin content of the flowers of defined genotypes of the stock, *Matthiola incana*, in preceding investigations a comparatively high variability of the measured values within the lines was observed. The investigations on the genetics of the quantitative character "anthocyanin content" are based on these measurements. Therefore it is important to examine whether or not an insufficient isogenisation of the genetic background of the parental lines or errors in the measuring technique are partly responsible for the high variability. The elimination of recognizable sources of error should lead back the variation within a line mainly to the interaction between genotype and environment.

The results show that differences in the genetic background are unlikely. On the contrary there are the following sources of error in the hitherto applied technique:

1. Unequal sampling with respect to the developmental stage of the flowers and of the single petals within double flowers.
 2. Unequal patterns of extraction dependent on the quantity and quality of the anthocyanins.
 3. Errors in pipetting in connection with the dilution of extracts.
- An improved technique of sampling and processing is proposed.

1. Einleitung

Im Zusammenhang mit dem Vorhaben, quantitative Merkmale durch Gene mit biochemisch definierbarer Wirkung zu simulieren, sind Messungen der Gesamtmenge der Anthocyanpigmente/Petalenfrischgewicht verschiedener Genotypen der annuellen Crucifere *Matthiola incana* R. Br. erforderlich. Die dabei erhaltenen Meßwerte der Genotypen einer diallelen Kreuzungsnachkommenschaft gehen in genetische und mathematische Modelle ein, die die Schätzung additiver, dominanz- und interaktionsbedingter Beiträge der an der Ausbildung des Merkmals beteiligten Gene erlauben. Eine exakte Schätzung der Beiträge einzelner Gene und ihrer Interaktionen ist jedoch nur dann zu erwarten, wenn der Meßwert jedes Genotyps dem tatsächlichen Anthocyangehalt möglichst genau entspricht. Repräsentiert dagegen ein Meßwert den Anthocyangehalt des entsprechenden Genotyps nur ungenügend, sind Fehlinterpretationen des Verhaltens der beteiligten Gene unvermeidbar.

Die in den letzten Jahren ermittelten Meßwerte ließen Zweifel an der Brauchbarkeit der bisherigen Meßmethodik und an der Homogenität des Materials aufkommen. Wiederholte Messungen gleicher Genotypen zeigten häufig eine erhebliche Variabilität, die die Verlässlichkeit der geschätzten Parameter beeinträchtigte. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, die

Ursachen der hohen Variabilität der Meßwerte genauer zu untersuchen. Mit Sicherheit unterliegt die Gesamtmenge der Anthocyanpigmente einem starken Umwelteinfluß. So ist zumindest ein Teil der aufgetretenen Variabilität auf diesen Faktor zurückzuführen. In einem geeigneten Modell sollte sich jedoch eine umweltbedingte Variabilität nicht störend auf die Interpretation des Genverhaltens auswirken, sondern vielmehr einen Einblick in die Interaktionen zwischen Genotyp und Umwelt gewähren.

Die Meßwerte gleicher Genotypen variieren aber nicht nur bei Messungen über mehrere Tage oder Wochen, sondern auch bei innerhalb eines Tages wiederholten Messungen eines Genotyps beträchtlich (Tab. 4). Umweltbedingte Einflüsse können somit nicht alleinige Ursache der hohen Variabilität sein. Deshalb sollte untersucht werden, ob die beobachtete Variabilität genetisch bedingt ist (im Hinblick auf das Merkmal noch nicht ausreichend isogener Hintergrund) und in welchem Ausmaß die bisherige Meßmethodik eine exakte Bestimmung des Anthocyangehalts gewährleistet.

2. Material und bisherige Methode

Da eine ausführliche Beschreibung des Materials bereits vorliegt (Seyffert, 1971), wird hier nur ein kurzer Überblick gegeben. Die Untersuchungen werden an der annuellen Crucifere *Matthiola incana* R. Br. durchgeführt.

Tabelle 1. Nach der bisherigen Methode ermittelte Meßwerte und Schätzwerte der Parameter einiger typischer Linien

<i>bluv</i>	Meßwerte von 10 aufeinanderfolgenden Meßtagen										\bar{x}	$s_{\bar{x}}$	cv
2222	724	625	867	823	1040	1117	1019	982	763	932	889,2	49,5	17,0
2022	339	591	357	582	402	623	360	442	413	337	444,6	35,4	25,1
2202	591	531	668	861	771	972	842	630	690	632	718,8	43,8	19,3
2220	490	615	489	568	840	838	732	661	454	677	636,4	44,1	21,0
0222	486	534	604	666	788	830	883	620	552	994	695,7	53,4	24,0
Meßwerte innerhalb eines Tages wiederholter Messungen													
2222	1197	878	934	817	795	761	939	1002	784		900,8	46,0	15,0
2022	660	507	502	396	631	519					535,8	39,3	18,0
2202	659	770	861	780	810	691					761,8	30,6	9,8
2220	561	761	825	627	739	420	518	691	767		656,6	44,8	20,0
0222	761	931	610	782	660	606					725,0	51,4	17,0

Als quantitatives Merkmal dient die Gesamtmenge der Anthocyanpigmente/Petalenfrischgewicht.

An der Merkmalsbildung sind die vier Loci *b*, *l*, *u* und *v* beteiligt, deren Funktion weitgehend bekannt ist (Seyffert, 1960, 1962). Mit Hilfe der vier Genpaare lassen sich insgesamt 16 homozygote Linien darstellen. Sie werden beginnend mit 2222*) (für den vierfach homozygot dominanten Genotyp) bis 0000 (für den vierfach rezessiven Genotyp) durchnummeriert. Im Experiment werden die 16 Linien diallel gekreuzt, die 256 Nachkommenschaften im Freiland angebaut und die Anthocyanmengen jeder Nachkommenschaft während der Hauptblütezeit bestimmt.

Es erschien zweckmäßig, die Ursachen der hohen Variabilität vor allem an den 16 Linien zu untersuchen, da diese Ausgangspunkt der Kreuzungsnachkommenschaften sind und mögliche Unterschiede des genetischen Hintergrundes zwischen den Pflanzen eines Genotyps hier besonders gut erkennbar sein sollten. Darüberhinaus schließen die erforderlichen Messungen die Verwendung aller Kreuzungsnachkommenschaften aus Zeitgründen von vornherein aus. Die Untersuchungen wurden 1970 und 1971 in der Zeit von Juli bis Oktober vorgenommen. Bis einschließlich 1970 wurde die Gesamtmenge der Anthocyanpigmente/Petalenfrischgewicht folgendermaßen gemessen:

1. Tag: Die Entnahme der Blüten erfolgt zwischen 16 und 18 Uhr. Dabei wird die erste voll entfaltete Blüte eines zufällig ausgewählten Triebes gepflückt. Regenasse Blüten werden ausgeschüttelt, beschmutzte Blüten gesäubert. Zum Ausgleich von Turgeszenzunterschieden werden die Blüten in wassergefüllte Reagenzgläser eingestellt und über Nacht im Kühlraum bei +4 °C belassen.

2. Tag: Von jeder Blüte werden 80 bis 100 mg gut gefärbter Petalen mit einer überschuligen Waage in Reagenzgläser eingewogen. Bei ungefüllten Blüten sind dafür meist alle vier Petalen erforderlich; bei gefüllten Blüten wird ein Blütensektor verwendet. Die eingewogenen Petalen werden mit der 20fachen Menge 1%iger methanolischer Salzsäure versetzt, die Reagenzgläser sofort mit Stopfen verschlossen und für ca. 24 Stunden zur Extraktion im Kühlraum bei +4 °C aufgestellt.

3. Tag: 0,1 ml des Extraktes wird mit 2 ml 1%iger methanolischer Salzsäure verdünnt und in 0,5 cm Quarzküvetten im registrierenden Spektralphotometer (Zeiss RPQ II) im Bereich von 550 bis 480 nm gemessen. Die mit 10^3 multiplizierten Maxima der Extinktionskurven ergeben die Meßwerte.

Mit dieser Methode wurden die Genotypen einer diallelen Kreuzungsnachkommenschaft im Sommer 1970 über

einen Zeitraum von vier Wochen wiederholt gemessen. Darüberhinaus wurde der Anthocyangehalt der Linien mehrmals pro Tag bestimmt. In Tab. 1 sind aus Platzgründen nur die daraus resultierenden Meßserien einiger Linien und die Schätzwerte der Parameter zusammengestellt. Die hohe Variabilität der Werte einer Meßserie, die sowohl bei Messungen über mehrere Tage als auch bei Messungen innerhalb eines Tages zu verzeichnen ist, kann dabei als charakteristisch für alle gemessenen Genotypen angesehen werden.

Um die Ursachen der hohen Variabilität zu erkennen, wird bei den folgenden Untersuchungen die vorgegebene Meßmethode in verschiedener Weise modifiziert.

3. Ergebnisse

3.1. Variabilität zwischen den Pflanzen eines Genotyps und innerhalb einer Pflanze

Zunächst wurde an den 16 Linien untersucht, in welchem Ausmaß genetische Ursachen zur hohen Variabilität der Meßwerte beitragen.

Weist der genetische Hintergrund der Pflanzen einer Linie in bezug auf das Merkmal Unterschiede auf, ist zu erwarten, daß die Meßwerte voll entfalteter Blüten verschiedener Triebe einer Pflanze erheblich weniger variieren als die Meßwerte voll entfalteter Blüten verschiedener Pflanzen einer Linie. Trifft das nicht zu, dürften die Meßwertschwankungen eher auf Fehler in der Meßmethodik zurückzuführen sein.

Um diese Alternative zu klären, wurden einerseits von je 10 Pflanzen jeder Linie je eine voll entfaltete Blüte entnommen und deren Anthocyangehalt bestimmt, andererseits von einer gut verzweigten Pflanze jeder Linie die erste voll entfaltete Blüte jedes Triebes entnommen und gemessen. Die Aufarbeitung der Blüten erfolgte zunächst nach der bisherigen Meßmethodik. Da alle Blüten einer Meßserie am gleichen Tag entnommen wurden, sollten sich umweltbedingte Schwankungen nur sehr geringfügig auswirken.

In die Tab. 2 und 3 sind stellvertretend für alle untersuchten Linien einige charakteristische Meßserien aufgenommen worden. Wie die Schätzwerte der Parameter der Tab. 2, 3 und 4 zeigen, ist die Variabilität der Meßwerte von Blüten verschiedener

*) Die Zahlen stehen für die Loci *bluv*, wobei mit 0 die rezessive, mit 1 die heterozygote und mit 2 die homozygot dominante Situation charakterisiert wird.

Tabelle 2. *Meßwerte und Schätzwerte der Parameter visuell gleicher Blüten verschiedener Pflanzen einer Linie*

bluv	Meßwerte										\bar{x}	V	s	cv
2222	1009	1012	1030	1153	950	907	986	838	892	996	977	7628	87	8,9
2202	702	771	690	679	701	753	792	786	739	892	751	4127	64	8,6
2020	821	702	757	787	616	853	640	589	527	575	687	12848	113	16,5
0222	799	813	803	919	661	817	874	812	704	752	795	5653	75	9,5
0220	738	828	709	667	807	771	701	573	822	804	742	6631	81	11,0
0200	480	507	468	461	580	557	531	461	546	660	525	4060	64	12,1

Tabelle 3. *Meßwerte und Schätzwerte der Parameter visuell gleicher Blüten verschiedener Triebe einer Pflanze*

bluv	Meßwerte										\bar{x}	V	s	cv
2222	1143	1100	1040	937	948	920	926	981	723	945	966	13262	115	11,9
2202	726	707	647	651	897	763	803	773	857	650	747	7704	88	11,7
2020	469	626	659	455	511	446	497	—	—	—	523	7232	85	16,3
0222	807	605	688	828	851	581	680	—	—	—	720	11927	109	15,2
0220	846	714	698	695	760	930	726	—	—	—	767	7882	89	11,6
0200	451	527	480	477	497	460	395	440	567	550	484	2761	53	10,8

Triebe einer Pflanze nicht signifikant niedriger als die Variabilität der Meßwerte von Blüten verschiedener Pflanzen einer Linie. Somit sind zumindest größere, zur Erklärung der hohen Variabilität ausreichende genetische Unterschiede zwischen den Pflanzen einer Linie unwahrscheinlich. Häufig ist sogar zu beobachten, daß die Varianzen der Meßwerte innerhalb einer Pflanze größer sind als die Varianzen der Meßwerte verschiedener Pflanzen der gleichen Linie. Als Ursachen der hohen Variabilität sollten deshalb hauptsächlich andere Faktoren in Frage kommen. Für einen Nachweis kleiner genetischer Unterschiede zwischen den Pflanzen einer Linie, die möglicherweise von diesen Faktoren überdeckt werden, ist der vorgenommene *F*-Test nicht genügend effizient.

Da die hohe Variabilität der Meßwerte offenbar nicht genetisch bedingt ist, ist nun zu prüfen, ob Fehler in der Meßmethodik die Zuverlässigkeit der Meßwerte beeinträchtigen.

Tabelle 4. *F-Test für die zwischen den Pflanzen und innerhalb der Pflanzen einer Linie beobachteten Varianzen*

bluv	Varianzen-quotient	$F_{(0,05)}$	$F_{(0,01)}$
2222	1,738	3,18	5,35
2202	1,866	3,18	5,35
2020	1,776	4,10	7,98
0222	2,109	3,37	5,80
0220	1,188	3,37	5,80
0200	1,470	3,18	5,35

3.2. Untersuchungen zur Meßmethodik

Ausgehend von der bisherigen Meßmethodik waren vor allem folgende Fragen zu klären:

1. Welchen Einfluß hat die visuelle Auswahl der ersten voll entfalteten Blüte eines zufällig ausgewählten Triebes auf den Meßwert?

2. Wie hoch ist die Variabilität innerhalb einer gefüllten Blüte?

3. Gewährleistet eine ca. 24stündige Extraktionszeit ein optimales Herauslösen der Anthocyanpigmente?

4. Welche Fehlerquellen bestehen beim Aufarbeitungsprozeß?

Tabelle 5. *Meßwerte und Schätzwerte der Parameter der an vier aufeinanderfolgenden Tagen gemessenen Eltern eines 8 × 8 Diallels*

bluv											\bar{x}	$V_{\bar{x}}$	$s_{\bar{x}}$	cv
2222	1090	1242	1345	1240	1229	2755	52,5	8,0						
2022	401	404	464	399	417	246	15,7	7,0						
2202	1031	1075	1030	1091	1057	240	15,5	2,0						
2002	585	585	585	506	565	390	19,8	6,0						
0222	1164	1246	1198	1277	1221	628	25,1	4,0						
0022	772	768	845	820	801	352	18,8	4,0						
0202	762	659	840	898	791	2653	51,5	13,0						
0002	507	494	473	489	491	49	7,0	2,0						

3.2.1. *Variabilität zwischen den Blüten eines Triebes.* Zunächst wurde untersucht, ob die Art der Blütenauswahl eine optimale Messung des Merkmals gestattet. Dazu war es erforderlich, die Meßwerte der verschiedenen Entwicklungsstadien der Blüten eines Triebes, beginnend mit den Knospen bis zu Blüten mit Welkeerscheinungen, zu ermitteln. Der Verlauf der Meßwerte sollte darüber Aufschluß geben, welches Blütenstadium sich am besten für die Messung des Merkmals eignet.

Knospen und Blüten ausgewählter Triebe aller 16 Linien wurden in dieser Form untersucht. Für die verschiedenen Knospen- und Blütenstadien werden folgende Bezeichnungen verwendet:

A: Knospen, die bereits etwas Farbe zeigen,
 B: sich öffnende Knospen,
 C: sich entfaltende Blüten,

D: voll entfaltete Blüten, wie sie für die Messungen bisher benutzt wurden,
 E: Blüten mit geringfügigen Welkeerscheinungen,
 F: stark verwelkte Blüten.

Jede der 16 Linien wurde in der Zeit von August bis Oktober 1970 und 1971 mit mindestens sechsfacher Wiederholung in der beschriebenen Form untersucht. Da auch hier zwischen den einzelnen Linien und Meßterminen keine wesentlichen Unterschiede auftreten, wurden in die Abb. 1 und 2 nur einige typische Meßserien aufgenommen. Die mehrfache Wiederholung der Bezeichnung B bis F resultiert aus der für die entsprechenden Blütenstadien gefundenen maximalen Anzahl der Blüten. Die Zahlen 1 bis 5 geben hierbei Aufschluß über die Stellung der Blüte innerhalb eines Blütenstandes, wobei mit 1 jeweils die jüngste, dem Vegetationspunkt am nächsten stehende Blüte gekennzeichnet wird, und damit über ihr Alter.

Statt einer erwarteten Optimumkurve mit hohen und nur wenig variierenden Meßwerten für die D-Blüten, ist eine ausgeprägte Zwei- oder Mehrgipfligkeit zu beobachten. Oft liegt ein Maximum bereits im Bereich der noch nicht voll entwickelten Blüten des C- oder gar B-Stadiums, während gerade die ersten Blüten des D-Stadiums vielfach niedrigere Werte aufweisen, die erst zum E-Stadium hin wieder ansteigen. Besonders bemerkenswert ist aber die stets hohe Variabilität der Meßwerte des späten C-

und frühen D-Stadiums, da die Blüten bisher aus diesem Bereich entnommen wurden.

Das Verhalten der Meßwerte zeigt sehr deutlich, daß die Auswahl der ersten voll entfalteten Blüte eines Triebes weder einen möglichst hohen Meßwert, noch eine geringe Variabilität der Meßwerte garantiert. Ein großer Teil der beobachteten Meßwertschwankungen dürfte somit auf die Art der bisherigen Blütenauswahl zurückzuführen sein.

3.2.2. Variabilität innerhalb gefüllter Blüten. Um zu entscheiden, welche Petalen einer gefüllten Blüte zur Einwaage benutzt werden dürfen, muß deren Variabilität untersucht werden.

Von jeder der 16 Linien wurde eine große D-Blüte entnommen, deren Petalen von innen nach außen in Einzelproben aufgeteilt, und nach der bisherigen Meßmethodik aufgearbeitet. Die Abb. 3 zeigt die Meßserien einiger typischer Linien.

Bei fast allen Blüten steigt der Anthocyangehalt der Einzelproben von innen nach außen an. Der Anstieg ist dabei oft nicht kontinuierlich, sondern wird von Proben mit niedrigen Meßwerten unterbrochen. Wiederholungen der Messungen führten zu gleichen Ergebnissen.

Das Alter der Petalen hat also einen nicht unerheblichen Einfluß auf die Höhe der Meßwerte. Da bei der bisherigen Meßmethodik vorwiegend Petalen eines Blütensektors eingewogen wurden, ist anzunehmen, daß dazu je nach Größe und Füllungsgrad

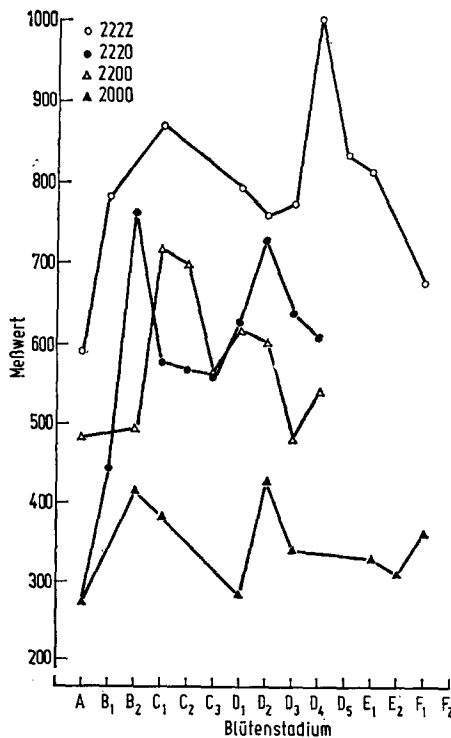


Abb. 1. Verlauf der Meßwerte verschiedener Blütenstadien eines Triebes (Cyanidintypen, $b+b^+$)

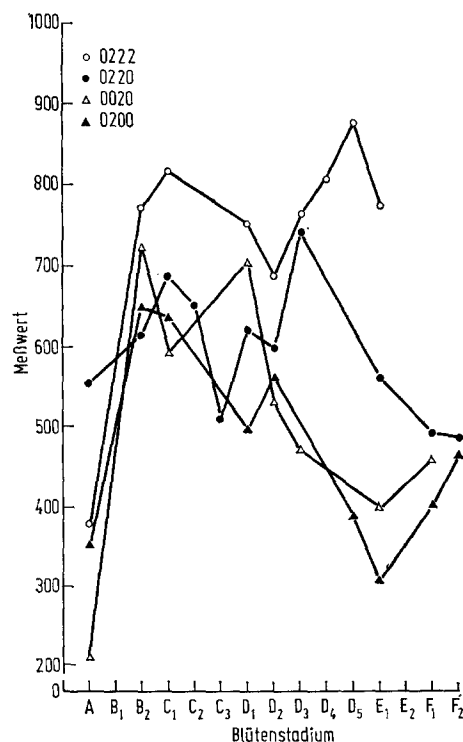


Abb. 2. Verlauf der Meßwerte verschiedener Blütenstadien eines Triebes (Pelargonidintypen, bb)

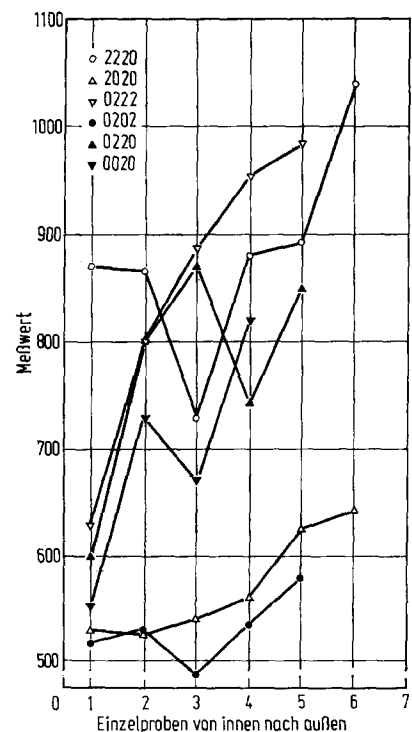


Abb. 3. Meßserien der Einzelproben aus gefüllten Blüten

der Blüten jüngere und ältere Petalen in unterschiedlicher Zahl verwendet wurden. Somit kann auch das Einwiegen unterschiedlich alter Petalen eines Blütensektors zur hohen Variabilität der Meßwerte beigetragen haben.

3.2.3. Überprüfung des Extraktionsverhaltens der Anthocyane. Bei wiederholtem Verdünnen und Messen von Proben aus einigen Extrakten fiel auf, daß mit zunehmender Extraktionszeit oft auch eine Zunahme der Extinktionsmaxima zu verzeichnen ist. Bei aus 8 bis 10 Blüten bestehenden Proben wurde das besonders deutlich. Es war deshalb anzunehmen, daß die bisherige ca. 24stündige Extraktionszeit ein vollständiges Herauslösen der Anthocyanpigmente in vielen Fällen nicht gewährleistet.

Zur Überprüfung des Extraktionsverhaltens wurde von jeder Linie eine aus 10 voll entfalteten Blüten bestehende Probe eingewogen (500 mg) und mit der 20fachen Menge 1%iger methanolischer Salzsäure versetzt. Nach ca. 18stündiger Extraktion wurde eine Probe entnommen, verdünnt und gemessen. In Abständen von ein bis zwei Stunden wurden weitere Proben entnommen, verdünnt, und gemessen. An den darauffolgenden Tagen wurden die Messungen mit der Entnahme von Proben nach 42-, 48-, 66- und 90stündiger Extraktionszeit fortgesetzt. Eine Wiederholung der Untersuchungen führte zu gleichen Ergebnissen. Die Abb. 4 zeigt am Beispiel einiger typischer Linien die in den beiden Versuchsreihen erhaltenen mittleren Extraktionskurven.

Linien mit geringem und mittlerem Anthocyangehalt erreichen bereits nach ca. 24- bis 48stündiger Extraktion ihr Maximum. Dagegen zeigen Linien mit hohem Anthocyangehalt, daß oft auch nach 48 Stunden noch keine vollständige Extraktion der Anthocyane stattgefunden hat. Darüberhinaus ist bei diesen Linien zu beobachten, daß die Petalen sogar nach 90 Stunden Extraktion noch etwas dunkler gefärbt sind als das Lösungsmittel. Das läßt auf ein ungünstiges Verhältnis zwischen Anthocyangehalt und zugegebener Lösungsmittelmenge schließen. Versuche, bei denen statt mit der 20fachen mit der 40fachen Lösungsmittelmenge extrahiert wurde, ergaben dann auch eine weitere Zunahme der bisherigen Extraktionsmaxima. Durch zusätzliches Schütteln aller Proben konnte schließlich erreicht werden, daß nach spätestens 48stündiger Extraktionszeit alle Genotypen maximal extrahiert sind.

3.2.4. Fehlerquellen bei der Aufarbeitung der Blüten. Auch die Aufarbeitung der Blüten weist auf dem Weg über das Einwiegen der Petalen, das Auffüllen der Proben mit Lösungsmittel, das Verdünnen der Extrakte und das Messen im Spektralphotometer erhebliche Fehlermöglichkeiten auf. Deshalb waren auch hier Ursachen für die hohe Variabilität der Meßwerte zu vermuten.

Zunächst wurde geprüft, ob die verwendete ober-schalige Waage (Mettler P 163 N, Anzeige: 1 mg)

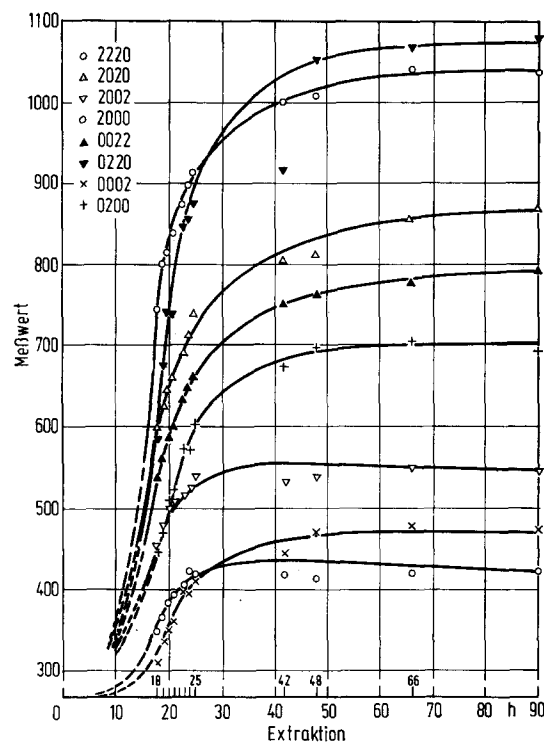


Abb. 4. Extraktionskurven von Linien mit niedrigem, mittlerem und hohem Anthocyangehalt

ein ausreichend genaues Einwiegen der Petalen gewährleistet. Dazu wurde eine große Anzahl der mit üblicher Sorgfalt eingewogenen Proben auf der Analysenwaage nachgewogen. Die Differenz zwischen dem an der ober-schaligen Waage abgelesenen Gewicht und dem von der Analysenwaage angezeigten Gewicht betrug durchschnittlich 1 mg. Das ist ca. 1% des Gewichtes der gesamten Probe. Jedoch treten einzelne Abweichungen bis zu 3 mg auf, die den Meßwert in gewissem Maße beeinflussen können. Dem steht aber die für die umfangreichen Meßreihen unbedingt erforderliche Zeitersparnis beim Einwiegen mit der ober-schaligen Waage gegenüber. Da künftig Proben von 400 bis 500 mg eingewogen werden, sollten sich selbst Abweichungen von 3 mg nur geringfügig auf den Meßwert auswirken.

Die beim Pipettieren des Lösungsmittels auftretenden Fehler waren so gering, daß Auswirkungen auf den Meßwert kaum nachweisbar waren. Bei sorgfältigem Arbeiten können sie deshalb als Ursache der Meßwertschwankungen ausgeschlossen werden. Dagegen konnte gezeigt werden, daß bei dem für das Verdünnen notwendigen Pipettieren der Extrakte (0,1 ml) schon geringe Fehler den Meßwert erheblich beeinflussen. Um diesen Fehler zu ermitteln, wurden 250 verschiedene Extrakte untersucht. Aus jedem Extrakt wurden dreimal hintereinander je 0,1 ml entnommen, mit 2 ml Lösungsmittel verdünnt und im Spektralphotometer gemessen. Für die drei Meßwerte jeder Serie lassen sich Variationskoeffizienten berechnen. Dabei traten Werte zwischen 0 und 6,5

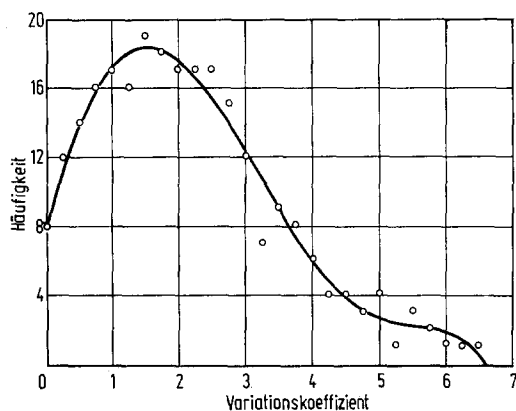


Abb. 5. Häufigkeitsverteilung der Variationskoeffizienten aus je drei Meßwerten eines Extraktes

auf. Über diesen Bereich wurden 26 Klassen zu je 0,25 Einheiten gebildet und die 250 Variationskoeffizienten diesen Klassen zugeordnet. In der Abb. 5 ist die Häufigkeit der Variationskoeffizienten gegen ihre Größe aufgetragen. Zur optischen Verdeutlichung des Kurvenverlaufs wurde eine Regressionsfunktion fünfter Ordnung mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate an dem Punkteschwarm angepaßt und maschinell geplottet (Wang 720 B/702). Die Häufigkeitsverteilung zeigt deutlich, daß die drei Meßwerte der überwiegenden Zahl der Meßserien nur wenig variieren. Am häufigsten treten Variationskoeffizienten um 1,5 auf. Das entspricht einer Abweichung zwischen den drei Meßwerten einer Serie von ca. 20 Einheiten. Es gibt jedoch auch einige Meßserien mit hohen Variationskoeffizienten, wobei die entsprechenden Meßwerte zwischen 50 und 100 Einheiten voneinander abweichen. Im Regelfall stimmen dabei zwei Meßwerte gut überein, während der dritte Wert deutlich abweicht. In einem derartigen Fall kann angenommen werden, daß die beiden übereinstimmenden Meßwerte eher dem „wahren Wert“ entsprechen als der abweichende Wert.

Wegen des zu hohen Arbeitsaufwandes ist aber eine dreimalige Messung aller Extrakte nicht möglich. Jedoch konnte die Exaktheit der Arbeitsausführung durch zweimalige Messung so gesteigert werden, daß die Resultate nur noch in Ausnahmefällen voneinander abwichen. Falls stärkere Abweichungen beobachtet werden, ist dann eine Korrektur anhand einer Kontrollmessung leicht möglich.

4. Diskussion

Wie die Untersuchungen zur Meßmethodik zeigen, wirken verschiedene Faktoren auf die Variabilität der Meßwerte ein. Da die Ursachen der Variabilität erst im Verlauf der Zeit ermittelt werden konnten, besteht die Möglichkeit, daß ältere Untersuchungsergebnisse durch bis dahin noch nicht bekannte Faktoren beeinflusst wurden.

So könnten mögliche Unterschiede im genetischen Hintergrund der Pflanzen eines Genotyps durch die

hohe Variabilität der zur Messung verwendeten *D*-Blüten und das Einwiegen eines Blütensektors überdeckt worden sein. Durch Entnahme mehrerer Blüten einer Pflanze und das Einwiegen von Petalen eines mittleren Blütenbereichs war jedoch festzustellen, daß die Variabilität zwischen den Pflanzen einer Linie mit der Zahl der für eine Probe verwendeten Blüten bis auf kleine, für die jeweiligen Pflanzen nicht konstante Abweichungen zurückgeht. Wenn also überhaupt genetische Unterschiede zwischen den Pflanzen einer Linie auftreten, sind sie zumindest für die im Hinblick auf das Merkmal als isogen erkannten Linien nur sehr gering. Auch sollten ungenügende Extraktion und Pipettierfehler bei diesen Untersuchungen aus noch zu erläuternden Gründen keine große Rolle gespielt haben.

Die Messungen des Anthocyangehalts verschiedener Blütenstadien eines Triebes zeigten, daß es außerordentlich schwer ist, ein sicheres Kriterium für die Auswahl der zu messenden Blüten zu finden. Jedoch sollte die Entnahme mehrerer Blüten des späten *C*- und frühen *D*-Stadiums und die Bildung eines entsprechenden Gesamtmeßwertes die Variabilität entscheidend verringern. Weitere Untersuchungen ergaben, daß dafür ca. 8 bis 10 Blüten erforderlich sind.

Bei den ersten Untersuchungen des Anthocyangehaltes verschiedener Blütenstadien eines Triebes wurden noch Petalen eines Blütensektors eingewogen. Die Variabilität zwischen den Blüten eines Triebes könnte deshalb teilweise durch die Variabilität innerhalb einer Blüte verursacht worden sein. Bei späteren unter Berücksichtigung der Variabilität innerhalb einer Blüte durchgeführten Messungen blieb die Variabilität zwischen den Blüten eines Triebes jedoch erhalten. Auch bei diesen Untersuchungen sollten ungenügende Extraktion und Pipettierfehler nur eine geringe Rolle gespielt haben.

Die Untersuchung der Variabilität innerhalb einer gefüllten Blüte ließ erkennen, daß das Alter der einzelnen Petalen einen erheblichen Einfluß auf deren Anthocyangehalt hat. Dagegen sollten altersbedingte Unterschiede des Anthocyangehalts zwischen den vier Petalen ungefüllter Blüten weniger stark ausgeprägt sein. Ein Verzicht auf gefüllte Blüten zugunsten ungefüllter ist aber, bedingt durch das „Immerspalten“ der Kulturleukoje, den teilweise geringen Samenansatz und die Verluste bei der Jungpflanzenanzucht, kaum möglich. Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen ist jedoch anzunehmen, daß das Einwiegen von Petalen gleichen Alters aus einem mittleren Bereich gefüllter Blüten zu besseren Ergebnissen führt als das Einwiegen von Petalen eines Blütensektors.

Die in Einzelproben aufgeteilten Petalen einer gefüllten Blüte zeigen nicht nur ein Ansteigen des Anthocyangehalts von innen nach außen, sondern oft auch ein mehr oder weniger ausgeprägtes plötzliches Absinken der Meßwerte einzelner Proben. Ein ähnliches Verhalten ist auch bei den Messungen

des Anthocyangehalts verschiedener Blütenstadien eines Triebes festzustellen. Da die aus Petalen verschiedenen Alters bestehenden Einzelproben einer Blüte in gewissem Maße den verschiedenen Blütenstadien eines Triebes entsprechen, ist anzunehmen, daß für die Zwei- oder Mehrgipfligkeit gleiche Ursachen vorliegen. Sie konnten bisher nicht exakt ermittelt werden. Mikroskopische Untersuchungen der Petalen zeigen, daß die Zellen der B- und C-Blüten meist wesentlich kleiner sind als die der D-Blüten. Bei etwa gleichbleibender Anthocyan synthese rate ist ein durch Streckungs- und Differenzierungswachstum hervorgerufener Verdünnungseffekt vorstellbar, der in den ausgewachsenen Zellen der D-Blüten langsam ausgeglichen wird.

Auf den ersten Blick scheint auch die ungenügende Extraktion eine der Ursachen der hohen Variabilität der Meßwerte zu sein. Die vorgegebene Meßmethodik verlangt jedoch bei ca. 200 bis 300 Messungen pro Tag eine gleiche Zeiteinteilung der einzelnen Meßtage einer Meßperiode. Damit ist eine weitgehend gleiche Extraktionszeit der Proben über alle Meßtage gewährleistet. Die hohe Variabilität der Meßwerte einer Meßperiode oder gar an einem Tag wiederholter Messungen läßt sich somit nur in sehr geringem Maße auf Extraktionsunterschiede zurückführen.

Dagegen sind Abweichungen zwischen den mittleren Meßwerten gleicher Genotypen verschiedener Meßperioden möglicherweise nicht nur auf Umweltfaktoren zurückzuführen, sondern auch auf die unterschiedliche Zeiteinteilung der Meßtage der entsprechenden Meßperioden. So liegen die mittleren Meßwerte des Jahres 1969 um durchschnittlich 150 Einheiten unter den mittleren Meßwerten des Jahres 1970. Bei den 1969 durchgeführten 176 Messungen pro Tag wurden jeweils erst die Extrakte verdünnt und danach die Proben eingewogen. Die Extraktionszeit der Proben erreichte dadurch nur 20 bis 22 Stunden. In der Meßperiode 1970 waren über 300 Messungen pro Tag auszuführen. Bei dieser großen Probenzahl ist eine Arbeitskraft mit dem Einwiegen und Auffüllen der Proben weitgehend ausgelastet. Das Einwiegen der Proben und das Verdünnen der Extrakte erfolgte deshalb gleichzeitig. Dadurch wurde eine Extraktionszeit von 24 bis 26 Stunden eingehalten. Somit kann zumindest ein Teil der Abweichungen zwischen den mittleren Meßwerten der Jahre 1969 und 1970 auf die unterschiedlichen Extraktionszeiten zurückgeführt werden.

Weitaus größere Probleme der bisher ca. 24stündigen Extraktionszeit ergeben sich aus der Beobachtung, daß sie für Genotypen mit geringem Anthocyangehalt meist zur vollständigen Extraktion ausreicht, während Genotypen mit mittlerem und hohem Anthocyangehalt nur unzureichend extrahiert werden. Darüberhinaus gibt es Hinweise auf eine unterschiedliche Extraktionsgeschwindigkeit der chemisch

verschiedenen Anthocyanqualitäten. Beide Faktoren führen bei ungenügender Extraktion zu Fehlinterpretationen der Aktionen und Interaktionen der beteiligten Gene.

Abweichungen zwischen zwei zu gleicher Zeit vorgenommenen Verdünnungen eines Extraktes können bei sorgfältigem Arbeiten weitgehend vermieden werden. Sie traten nur bei den Messungen 1971 auf, die von einer weniger routinierten Arbeitsgruppe ausgeführt wurden. Bis auf die Überprüfung des Extraktionsverhaltens wurden jedoch alle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit schon 1970 ausgeführt und 1971 lediglich zum Teil wiederholt. Da für 1970 eine besonders erfahrene Arbeitsgruppe zur Verfügung stand, ist anzunehmen, daß Pipettierfehler beim Verdünnen der Extrakte zur Variabilität der Meßwerte nur geringfügig beigetragen haben.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß der unterschiedliche Anthocyangehalt visuell gleicher Blüten als Hauptursache der hohen Variabilität der Meßwerte gleicher Genotypen anzusehen ist. Die mit zunehmender Blütenzahl für eine Probe verbundene Abnahme der Variabilität der Meßwerte bestätigt diese Annahme. In geringerem Ausmaß kann auch das Einwiegen eines Blütensektors zur hohen Variabilität beigetragen haben. Bei sorgfältiger Aufarbeitung der Blüten, insbesondere sorgfältiger Verdünnung der Extrakte und optimaler Extraktionszeit sollten Abweichungen der Meßwerte vom „wahren Anthocyangehalt“ der Proben vermeidbar sein.

5. Verbesserte Meßmethodik

Für eine geeignete Methode zur quantitativen Messung der Anthocyanpigmente sind zwei Gesichtspunkte zu beachten:

1. Die Versuche zur Simulation quantitativer Merkmale setzen die Aufarbeitung von 200 bis 300 Proben/Tag voraus. Die Methode darf somit nicht zu arbeitsintensiv sein.

2. Die Methode muß exakte Meßwerte gewährleisten, die die Gesamtmenge der Anthocyanpigmente der entsprechenden Genotypen repräsentieren.

Aufwendige Extraktionsverfahren (Soxhlet, Ultraschall, Homogenisator) müssen deshalb von vornherein ausgeschlossen werden. Ebenso unmöglich ist bei der pro Tag aufzuarbeitenden Probenzahl ein sukzessives Extrahieren mit mehreren Teilmengen des Lösungsmittels, die dann vereinigt werden. Deshalb wird der zwar sehr viel langsameren, jedoch weitgehend unabhängig von Arbeitskräften verlaufenden Extraktion in einer Schüttelmaschine der Vorzug gegeben. Für die Aufarbeitung einer Serie von Proben resultiert daraus ein Vier-Tage-Rhythmus.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen wird der Gesamtgehalt der Anthocyanpigmente/Petalenfrischgewicht künftig folgendermaßen bestimmt:

1. Tag: Die Entnahme der Blüten erfolgt zwischen 16 und 18 Uhr. Von jedem Genotyp werden 8 voll entfaltete Blüten verschiedener Pflanzen ausgewählt. Regennasse Blüten werden ausgeschüttelt, beschmutzte Blüten gesäubert. Zum Ausgleich von Turgeszenzunterschieden werden die Blüten in wassergefüllte Reagenzgläser eingestellt und über Nacht im Kühlraum bei $+4^{\circ}\text{C}$ belassen.

2. Tag: Beim Einwiegen werden gut gefärbte Petalen der 8 Blüten eines Genotyps zu einer Probe von 400 mg vereinigt (ca. 50 mg von jeder Blüte). Bei ungefüllten Blüten sind dafür alle vier Petalen erforderlich, bei gefüllten Blüten werden die Petalen aus dem mittleren Bereich der Blüte entnommen. Eingewogen wird mit einer oberhalbigen Waage in 50 ml Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen. Die eingewogenen Petalen werden mit der 40fachen Menge 1%iger methanolischer Salzsäure versetzt, die Kolben sofort mit Stopfen verschlossen und ca. 48 Stunden zur Extraktion bei $+4^{\circ}\text{C}$ geschüttelt.

4. Tag: Zweimal 0,2 ml des Extraktes werden mit je 1,8 ml des Lösungsmittels verdünnt und in 0,5 cm Glasküvetten im registrierenden Spektralphotometer (Zeiss RPQ II) im Bereich von 550 bis 480 nm so gegen das Lösungsmittel gemessen, daß die beiden Kurven übereinander gezeichnet werden. Weichen die beiden Maxima der Verdünnungen eines Extraktes deutlich voneinander ab, wird zur Kontrolle der besseren Extinktionswerte eine dritte Verdünnung gemessen. Der Mittelwert der Maxima zweier dicht zusammenliegender Messungen eines Extraktes wird als Meßwert der Probe verwendet.

Die Extinktionskurven der Cyanidine erreichen bei ca. 529 bis 525 nm, die der Pelargonidine bei ca. 512 bis 505 nm ihr Maximum. Die Ordinate im Probenmaximum dreistellig abgelesen und mit 10^3 multipliziert ergibt den in den Simulationsmodellen verwendeten Meßwert.

Erste mit der verbesserten Meßmethodik erzielte Meßwerte sind in Tabelle 5 (S. 281) zusammengestellt. Die 64 Genotypen eines 8×8 Diallels wurden über 4 Tage gemessen. Aus Platzgründen sind in die Tabelle nur die Meßwerte der am Diallel beteiligten Linien aufgenommen. Von den 64 Genotypen weisen 42 Variationskoeffizienten zwischen 0 und 7,5 auf. Nur 12 der Variationskoeffizienten liegen noch über 10. Dabei ist zu beachten, daß die Messungen vom 27. 9. bis 2. 10. 1971 durchgeführt wurden, das Blütenmaterial somit nicht in jedem Fall optimal war. Es ist deshalb zu erwarten, daß Messungen in der Hauptblütezeit zu noch besseren Ergebnissen führen.

Für die gleichen Genotypen wurden 1970 Meßwerte mit der bisherigen Methodik ermittelt (s. a. Tab. 1).

Dabei wiesen nur 2 Genotypen Variationskoeffizienten von wenig unter 10 auf. Die überwiegende Mehrheit der Genotypen hatte Variationskoeffizienten zwischen 10 und 20; einige Genotypen sogar über 20. Das macht deutlich, daß sich die hohe Variabilität der Meßwerte infolge der verbesserten Meßmethodik erheblich verringert hat.

Der weitaus größte Teil der jetzt noch auftretenden Variabilität dürfte auf umweltbedingte Einflüsse zurückzuführen sein. Neben der Schätzung der Beiträge einzelner Gene und ihrer Interaktionen sollte es mit Hilfe geeigneter Modelle nun auch möglich sein, Aussagen über den gewiß nicht unerheblichen und für die einzelnen Genotypen möglicherweise unterschiedlichen Einfluß der Umwelt zu erhalten.

6. Zusammenfassung

Bei der Messung des Anthocyangehaltes der Blüten definierter Genotypen der Levkoje, *Matthiola incana*, wurde in zurückliegenden Versuchen eine verhältnismäßig hohe Variabilität der Meßwerte innerhalb der Genotypen beobachtet. Da diese Meßwerte die Grundlage für die Untersuchung der Genetik des quantitativen Merkmals „Anthocyangehalt“ bilden, war es wichtig zu prüfen, ob eine nicht ausreichende Isogenität des genetischen Hintergrundes der verwendeten Linien oder Fehler in der Meßmethodik mit für die hohe Variabilität verantwortlich sind. Die Ausschaltung erkennbarer Fehlerquellen sollte die Variation innerhalb eines Genotyps im wesentlichen auf die Interaktion zwischen Genotyp und Umwelt zurückführen.

Die Ergebnisse zeigen, daß Unterschiede im genetischen Hintergrund unwahrscheinlich sind. Dagegen wurden folgende Fehlerquellen in der bisherigen Aufarbeitungs- und Meßmethodik erkannt:

1. Ungleiche Probenentnahme hinsichtlich des Entwicklungsstadiums der Blüten und der einzelnen Petalen innerhalb gefüllter Blüten.
2. Ungleiches Extraktionsverhalten in Abhängigkeit von der Anthocyanquantität und -qualität und
3. Pipettierfehler beim Verdünnen der Extrakte.

Es wird eine verbesserte Technik der Probenentnahme und -aufbereitung vorgeschlagen.

Literatur

1. Jana, S., Seyffert, W.: Simulation of quantitative characters by genes with biochemically definable action. III. The components of genetic effects in the inheritance of anthocyanins in *Matthiola incana* R. Br. Theoret. Appl. Genetics **41**, 329–337 (1971). — 2. Jana, S., Seyffert, W.: Simulation of quantitative characters by genes with biochemically definable action. IV. The analysis of heritable variation by the diallele technique. Theoret. Appl. Genetics **42**, 16–24 (1972). — 3. Seyffert, W.: Über die Wirkung von Blütenfarbgenen bei der Levkoje,

- Matthiola incana* R. Br. Z. f. Pflanzenzüchtung **44**, 4—29 (1960). — 4. Seyffert, W.: Über Geninteraktionen bei der Ausbildung von Blütenfarben. Rep. XVI. Intern. Hort. Congr. (Brussels) IV, 19—28 (1962). — 5. Seyffert, W.: Die Simulation quantitativer Merkmale durch Gene mit biochemisch definierbarer Wirkung. I. Ein einfaches Modell. Züchter **36**, 159—163 (1966). — 6. Seyffert, W.: Simulation of quantitative characters by genes with biochemically definable action. II. The material. Theoret. Appl. Genetics **41**, 285—291 (1971).

Eingegangen am 21. Februar 1972

Angenommen durch H. Stubbe

Dipl. Biol. G. Forkmann
Prof. Dr. W. Seyffert
Inst. f. Biologie d. Universität Tübingen
Lehrstuhl f. Genetik
Auf der Morgenstelle 1
D-74 Tübingen (Germany/BRD)