

Auftreten von Mutationen bei *Oenothera hookeri* nach Behandlung des Pollens mit Meterwellen

CORNELIA HARTE

Institut für Entwicklungsphysiologie, Universität zu Köln (BRD)

Mutations in *Oenothera hookeri* after Treatment of the Pollen with Radio Waves

Summary. Pollen of *Oenothera hookeri* was exposed to radio waves ($\lambda = 1,5$ m; 1,4 and 1,8 mV/m) for 4 and 12 hrs. This pollen was crossed to normal emasculated flowers. The M_1 -generation and the M_2 - and M_3 -generations were investigated. The criteria for a mutagenic action of the treatment were: haploid plants in M_1 ; partial pollen lethality in M_1 , some due to chromosomal abnormalities; genetic heterogeneity of M_1 plants for lethal genes and for genes for reduced vitality as determined by the frequency of seeds with lethal embryos in M_2 ; segregation of morphological abnormalities in M_2 . All experiments demonstrated the mutagenic effect of the radio wave treatment.

Nachdem die mutationsauslösende Wirkung der Meterwellen am Auftreten von Chromosomenmutationen in bestrahlten Pflanzen bei zwei Objekten, *Vicia faba* (Zinecker-Brauer, persönliche Mitteilung 1948) und *Oenothera* (Harte 1949, 1972a) festgestellt war, ergibt sich die Frage, ob auch Punktmutationen durch diese Behandlung ausgelöst werden können. Erste Ergebnisse hierzu wurden bereits veröffentlicht (Harte 1959).

Material und Behandlung

Die Versuche wurden mit einer durch Selbstung vermehrten Inzuchtslinie von *Oenothera hookeri*, einer homozygoten Art, die in der Meiose als Chromosomenkonfiguration 7 Bivalente aufweist, mit Kurzzeitbehandlung des Pollens durchgeführt. An zwei Tagen wurden frühmorgens geschlossene Knospen, die sich ihrer Entwicklung nach kurz vor der Anthese befanden und sich am Abend desselben Tages öffnen würden, von den Pflanzen abgenommen und der Einwirkung einer an den beiden Versuchstagen verschiedenen Feldstärke 4 bzw. 12 Std. lang ausgesetzt, so daß sich vier Versuchsglieder ergeben. Für die Pollenbehandlung wurde derselbe Sender mit einer Wellenlänge von 1,5 m wie für die früheren Versuche (Brauer 1950) verwendet. Der Abstand der Knospen von der Antenne betrug 70 cm, die Feldstärke bei der Behandlung „stark“ etwa 1,8 V/m, bei „schwach“ 1,4 V/m. Eine Stunde nach Beendigung der Behandlung wurden je Versuchsglied 1–3 Knospen geöffnet und der Pollen auf die Narben von am Tag vorher kastrierten Blüten derselben Art gebracht. Mit dem Pollen einer Knospe wurden jeweils 2–3 Infloreszenzen mit je 2–3 Blüten bestäubt. Wie bei Mutationsversuchen üblich, wurden die durch Bestäubung mit dem behandelten Pollen entstandenen Pflanzen als M_1 -Generation bezeichnet, aus der durch kontrollierte Selbstbestäubung die M_2 -Generation, aus dieser wiederum die M_3 -Generation gewonnen wurde. Für die tabellarische Darstellung wurden die Ergebnisse eines Versuchsgliedes nach Prüfung der Homogenität zwischen den verschiedenen Aufzuchten zusammengefaßt.

Grundlagen der Auswertung des Versuchs

Bei der Auswertung wurde von folgenden Überlegungen ausgegangen. Wenn durch die Behandlung

des Pollens Mutationen ausgelöst wurden, ist ein der Mutationsrate proportionaler Anteil der M_1 -Pflanzen heterozygot. Dominante Mutanten sind bereits in der M_1 -Generation festzustellen, rezessive Mutanten werden erst in der M_2 -Generation zu erkennen sein. Die durchgeföhrten Untersuchungen an den Nachkommen des behandelten Pollens stellen verschiedene Teste für das Vorhandensein von Mutationen dar.

Wenn in den Pollenkörnern durch die Behandlung Mutationen ausgelöst werden, können diese sich in verschiedener Weise sowohl in der M_1 - als auch in der M_2 -Generation äußern. Soweit sie die Funktionsfähigkeit des Pollenkorns selber betreffen, werden sie sofort ausgeschaltet und entziehen sich der Beobachtung. Schädigung eines der generativen Kerne, die diesen entwicklungsunfähig machen, aber die Funktion des Pollenschlauchs nicht beeinträchtigen, wird entweder infolge Fehlens des Endosperms abortierende Samenanlagen oder die Entwicklung haploider Pflanzen verursachen (Straub 1939). Dominante Letalfaktoren werden ein Absterben der Embryonen nach der Befruchtung zur Folge haben. Dies müßte zu einer Erhöhung des Anteils der tauben Samen führen, die allerdings nur bei einer Häufigkeit derartiger Mutationen von wenigstens 10% der Pollenkörper als signifikante Differenz gegenüber dem Kontrollwert von etwa 5–8% tauber Samen entdeckt werden kann.

Dominante Mutationen und Aneuploidie müssen am abweichenden Phänotyp einzelner Pflanzen der M_1 -Generation zu erkennen sein. Gametophytische Letalfaktoren, die zum Absterben oder zu Entwicklungsstörungen des Pollens führen, sind durch Untersuchung des Pollens zu finden. Chromosomenmutationen, die nicht bei den ersten Kernteilungen in der Embryonalentwicklung zu Störungen des Mitoseablaufes und zum Zelltod führen, sind durch cytologische Untersuchung der Bindungsverhältnisse der

Chromosomen in der Meiose aufzudecken. Rezessive Punktmutationen sind schließlich durch Untersuchung der durch Selbstung der einzelnen M_1 -Pflanzen gewonnenen M_2 -Generation zu entdecken, und zwar rezessive Letalfaktoren durch Erhöhung des Anteils der tauben Samen auf etwa 25%, vitalitätsmindernde Gene, die die Überlebenswahrscheinlichkeit der Embryonen vermindern, durch eine geringere, aber signifikante Erhöhung des Anteils der tauben Samen gegenüber der Kontrolle. Weitere Punktmutationen und kleinere Chromosomenmutationen, die nicht letal wirken, sind an der Mendelspaltung abweichen der Phänotypen in der M_2 -Generation zu erkennen. Die Untersuchungen wurden entsprechend diesen Auswertungskriterien ausgeführt.

Untersuchung der M_1 -Generation

1. Keimung und Entwicklung der Pflanzen

Die Kreuzungen nach Kurzzeitbehandlung von reifem Pollen bei 2 Feldstärken und je 2 Behandlungszeiten ergeben guten Samenansatz. Von jedem der vier Versuchsglieder wurden aus vier gut entwickelten Kapseln, soweit möglich von verschiedenen Mutterpflanzen und Pollenspendern, je 200 Samen entnommen, die Keimung protokolliert und die Sämlinge aufgezogen. Für jedes Versuchsglied standen somit vier unabhängige, aber gleichzeitig aufgezogene Nachkommenschaften für die Beurteilung zur Verfügung. Mit den restlichen Samen wurde für einige Versuchsglieder eine zweite Aufzucht durchgeführt.

Behandlung	1. Aufzucht		2. Aufzucht	
	Aufzuchtnummer		Aufzuchtnummer	
1,8 V/m 4 Std.	1 bis 4		4	
1,8 V/m 12 Std.	5 bis 8		7 und 8	
1,4 V/m 4 Std.	9 bis 12			
1,4 V/m 12 Std.	13 bis 16			
Kontrolle	Keimung	17 bis 20		
	Aufzucht	18		

Der Anteil der keimhaltigen und der tauben Samen als Test für das Auftreten dominanter Letalfaktoren zeigt keine Beziehung zur Behandlung und unterscheidet sich nicht von den Kontrollkreuzungen mit unbehandeltem Pollen (Tab. 1). Die Keimgeschwindigkeit und die Ausfälle während der Aufzucht als Teste für das Auf-

treten von dominanten vitalitätsmindernden Genen lassen ebenfalls keine Differenzen zur Kontrolle erkennen.

Während der weiteren Aufzucht traten einige Unterschiede zur Kontrollaufzucht aus Nachkommen unbehandelter Pollen deutlich hervor. Insgesamt wurden unter den Bestrahlungsnachkommen neun haploide Pflanzen gefunden. Diese treten bei *Oenothera* gelegentlich spontan mit einer Häufigkeit von etwa 0,2% auf (Harte 1972 b). Ihre Entstehung ist zu erwarten, wenn der generative Kern im Pollen geschädigt wurde und einer seiner Abkömmlinge nicht zur Befruchtung fähig ist (Straub 1939). In dieser Häufung sind sie als ein Anzeichen für eine Schädigung des Pollens durch die Bestrahlung zu werten. In der relativen Häufigkeit der spätschossenden Pflanzen und der nichtschossenden Rosetten unterscheiden sich die Aufzuchten nicht. Unter den Bestrahlungsnachkommen finden sich eine Anzahl Abweicher (kleine Schmalblattpflanzen, Pflanzen mit verkümmertem Hauptproß oder mit verkümmerten weißen, sterilen Blüten), wie sie in der Kontrolle und in anderen Aufzuchten von *Oe. hookeri* nicht beobachtet wurden. Die meisten dieser Pflanzen kamen nicht zur Blüte oder ergaben nach Selbstung keine Samen, so daß die genetische Grundlage der Abweichung nicht geprüft werden konnte. Es liegt die Vermutung nahe, daß dominante Mutationen die Ursache sind.

2. Untersuchung des Pollens

Von allen Pflanzen, die an Haupt- oder Seiten-sprossen Blüten gebildet hatten, wurde der Pollen von zwei Blüten mikroskopisch auf das Auftreten von leeren, kleinen, verkümmerten oder sonst abnormen Körnern untersucht (Tab. 1).

Zwei Pflanzen hatten fast leere Antheren, 16 Pflanzen wiesen einen abnorm hohen Anteil an leeren, abgestorbenen Pollenkörnern auf, weitere 6 wurden in der zweiten Aufzucht gefunden (Abb. 1). Bei den Pflanzen mit partieller Pollenletalität wurden in einer Stichprobe des Pollens aus einer oder mehreren Knospen die leeren und die normalen Körner ausgezählt (Tab. 2 und 3). Von diesen

Tabelle 1. Entwicklung der M_1 -Generation, je 4 Aufzuchten

Behandlung des Pollens	Sa-men	mit Embryonen			% keim-haltig	über-lebend	Ausfall in % der Keim-linge	Haploide	morpho-log. Ab-weicher	Pollen morpholog. nor-maler Pflanzen	
		gekeimt	nicht gekeimt	taub						normal	partiell letal
1. Aufzucht											
4 Std. stark	800	726	4	70	91,25	603	16,94	2	7 (1) ⁺²	582	10
12 Std. stark	800	741	9	50	93,75	668	9,85	3	7	654	4
4 Std. schwach	472	433	5	34	92,79	404	6,69	1	5 (2)	397	2
12 Std. schwach	800	759	7	34	95,75	662	12,77	—	2 (1)	655	1
Kontrolle	800	712	7	81	89,87	152 ⁺¹	13,14	—	—	149	1
2. Aufzucht											
4 Std. stark	403					296					
12 Std. stark	283					253		2			

⁺¹: Nur eine der 4 Aussaaten wurde aufgezogen.

⁺²: Die Zahlen in () geben die Schecken mit Plastidenmutationen unter den Abweichern an.

Tabelle 2. Pollenletalität der *M₁*-Pflanzen

Behandlung	Kapsel	Pflanze	<i>M₁</i> -Generation			<i>M₂</i> -Generation		
			Pollenkörner		% letal	Keimprobe		Pollen-aus-bildung %
			normal	leer		Anzucht Samen	taube Samen	
4 Std. stark	1	86	391	283	42,0 ⁺	100	11,0	
	3	161	30	27	47,4 ⁻	100	16,0	
	4	21	78	45	36,6 ⁺	70	8,6	
	4	47	244	229	48,5 ⁻	120	3,3	
	4	80	514	159	23,6 ⁺	100	7,0	
	4	90	249	51	17,0 ⁺	—	—	
	4	105	146	30	17,0 ⁺	70	27,1	
12 Std. stark	5	67	36	35	49,3 ⁻	100	23,0	
	5	121	184	133	42,0 ⁻	100	10,0	
	6	29	81	93	53,4 ⁻	100	6,0	
	7	83	170	173	50,4 ⁻	100	34,0	
4 Std. schwach	10	15	67	64	48,9 ⁻	100	7,0	normal
	10	83	97	91	48,4 ⁻	100	33,0	
12 Std. schwach	15	35	178	160	47,3 ⁻	—	—	
Kontrolle	18	122	137	97	41,5 ⁻	—	—	

⁻ = Pollenletalität nicht gesichert von 50% abweichend⁺ = Pollenletalität gesichert kleiner als 50%

Tabelle 3. Pollenletalität (2. Aufzucht)

Behandlung	Kapsel	Pflanze	<i>M₁</i> -Generation			<i>M₂</i> -Generation		
			Pollenkörner		Anzahl Blüten	Homogenität zw. Blüten (χ^2 -Test)	Pollenkörner	
			gezählt	% leer			gezählt	% leer
4 Std. stark	4	a	800	24,3	4	P < 0,001	—	
		b	400	71,2	2	P > 0,8	650	34,5
12 Std. stark	7	a	400	44,8	2	P > 0,8	—	
		b	400	47,0	2	P > 0,05	200	47,0
	8	a	400	42,0	2	P > 0,3	—	
		b	900	37,5	5	P < 0,001	—	

Pflanzen wurde an einem anderen Tag der Pollen erneut untersucht. In allen Fällen wurde das Bild der ersten Untersuchung bestätigt.

Eine relative Häufigkeit von etwa 50% leerer Körner lässt auf die Anwesenheit eines gametophytisch wirkenden Letalfaktors schließen, der eine Gen- oder eine Chromosomenmutation (Deletion) sein kann. Eine Pollenletalität von weniger als 50% kann durch Störung der Meiose infolge von Inversionen und Translokationen, die nach crossing-over Gonen mit unbalancierten Chromosomensätzen entstehen lassen, zustande kommen.

Eine Pflanze (1-127) wies einen Anteil von etwa 50% kleinen, hellen, aber nicht leeren Pollenkörnern auf. Eine

Tabelle 4. Cytologische Untersuchung der Meiose in den PMZ der *M₁*-Pflanzen

Versuch	Auf-zucht N Nr.	Anzahl der Pflanzen			Tetraden normal	keine geeig- neten Knospen	nicht fixiert			
		Chromosomen- konfiguration		7 Bivalente						
		sonstige								
4 Std. stark	1	161	144	1 ⁺	13	3	0			
4 Std. stark	4	104	58	1 ⁰	19	15	11			
12 Std. stark	7	173	136	0	33	4	0			
4 Std. schwach	9	172	110	1 ⁺ 1 ^Δ	51	7	2			
12 Std. schwach	13	169	100	0	60	4	5			
Kontrolle	18	150	123	0	21	1	5			

⁺ = haploid⁰ = Viererring + 5 Bivalente^Δ = PMZ und Tetraden teilweise degenerierend, einzelne Knospen mit leeren Antheren^v = keine Diakinese oder Metaphase I gefunden, aber spätere Stadien der Meiose, soweit vorhanden, und Tetraden normal.

fast pollenschwache Pflanze, in deren Antheren nur wenig normale Pollenkörper gefunden wurden, war auch morphologisch abweichend mit weißen kleinen Blüten, mißbildeten Narben und aufreißenden Fruchtknoten mit freiliegenden Samenanlagen, fast ohne Samenansatz.

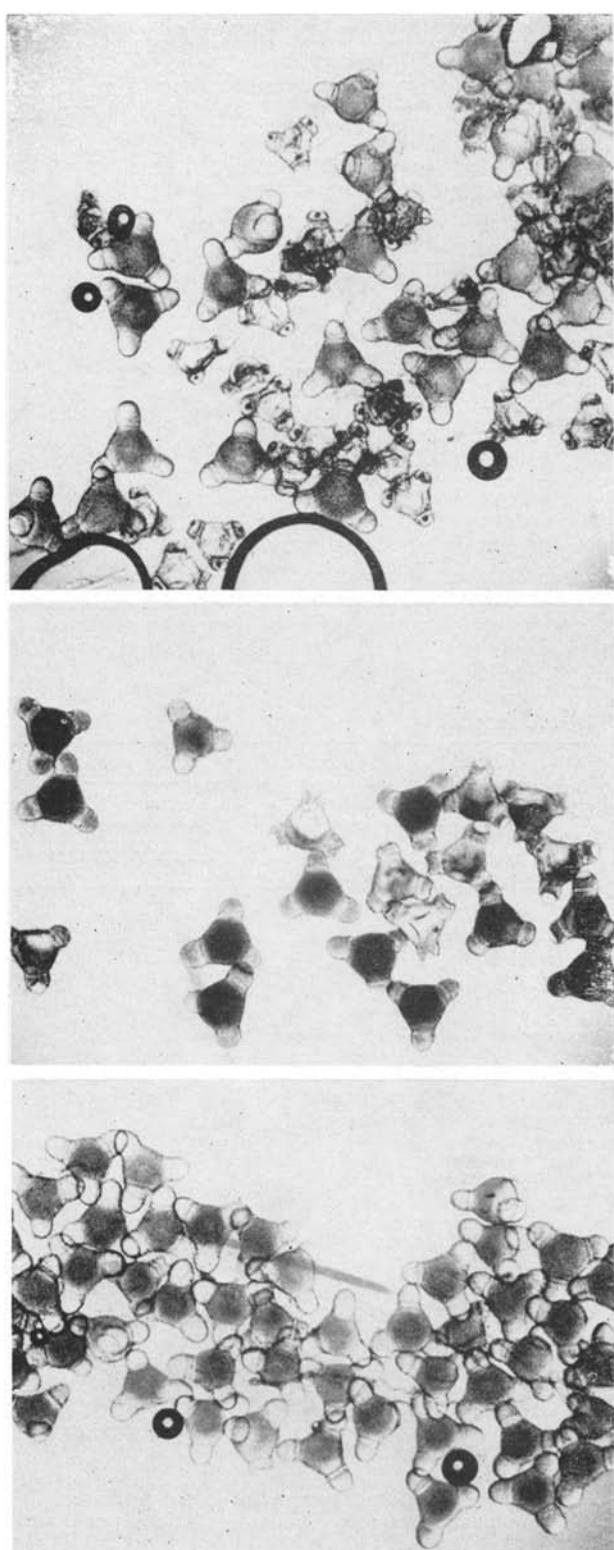


Abb. 1. Partielle Pollenletalität

- a Pfl. 1 Letalität der jungen Pollenkörner
- b Pfl. 2 Letalität kurz vor der Reife der Pollenkörner
- c *Oe. hookeri*, normaler Pollen

3. Untersuchung der Meiose in Pollenmutterzellen der M_1 -Pflanzen

Diese Untersuchungen sollten Informationen über das Auftreten von Chromosomenmutationen, die nicht durch das Filter der Mitose während der Entwicklung der M_1 -Pflanzen ausgeschaltet wurden, geben.

Von fünf Aufzügen der M_1 -Generation sowie der Kontrollgruppe wurden von allen Pflanzen junge Knospen fixiert (Alkohol: Eisessig 3:1). Nach Färbung mit Karminessigsäure wurde in Quetschpräparaten die Meiose in der PMZ untersucht. Es wurde die Chromosomenkonfiguration in der Diakinese und Metaphase I bestimmt, auf grobe Abweichungen der Chromosomenlänge geachtet, jedoch ohne Messungen durchzuführen, und das Gesamtbild der Zellen der Metaphase I, Anaphase I sowie der Tetraden notiert (Tab. 4). Der Anteil der Pflanzen, für die die Chromosomenkonfiguration bestimmt werden konnte, ist ausreichend groß. Für einige haploide Pflanzen war eine cytologische Kontrolle der Anwesenheit von 7 Univalenten in den PMZ möglich, die übrigen lieferten keine Knospen mit für die Untersuchung geeigneten Stadien.

Von den Pflanzen, die durch Pollenletalität oder phänotypische Abweichungen aufgefallen waren, wurden in der Diakinese Zählungen der Endchiasmen durchgeführt, um Anhaltspunkte für das Vorhandensein von kleineren Chromosomenmutationen, die sich nicht in einer abnormalen Konfiguration anzeigen, wie Deletionen oder kleiner Inversionen, zu finden (Tab. 5). Die relative Häufigkeit der Endchiasmen ist im allgemeinen sehr hoch. Die meisten Pflanzen mit partieller Pollenletalität stimmen darin mit den Normalen überein.

Bei drei Pflanzen ist eine signifikante Erhöhung des Bindungsausfalls, der auf eine Störung der Chiasmenbildung oder der Paarung in einem Chromosomenpaar schließen lässt, zu verzeichnen. Dies legt den Verdacht auf das Vorliegen einer Chromosomenmutation, z. B. Deletion, nahe, die zu klein ist, um sich bei den bereits stark kontrahierten Diakinese-Chromosomen in einer merklichen Verkürzung anzusehen, andererseits aber groß genug ist, um den normalen Ablauf der meiotischen Vorgänge im betroffenen Chromosomenabschnitt zu behindern und die Pollenkörper mit diesem defekten Chromosom zum Absterben zu bringen.

Es wurden zwei Pflanzen mit einer reziproken Translokation zwischen nicht-homologen Chromosomen gefunden.

Pflanze 4-80. Nur sehr wenige Zellen in Diakinese. Diese enthalten eindeutig einen Ring aus 4 Chromosomen und 5 Bivalente. Einordnung in M I gestört. Typische Metaphasenfiguren sind selten, meist stark kontrahierte, diakinese-ähnliche Chromosomen in der Platte zusammengebaut. Soweit der Chromosomenring deutlich auszumachen ist, liegt er meist in Zickzackanordnung, aber auch andere Anordnungen wurden beobachtet. In A I sind Chromosomenbrücken häufig (Auszählung aus 2 Antheren: 54 Zellen normal, 25 mit Chromosomenbrücke). Einige Zellen in früher Anaphase I geben Anhaltspunkte dafür, daß die Chromosomenbrücke aus dem Viererring entsteht. Die Anaphasenfigur ist nur selten normal ausgebildet, wahrscheinlich also Bewegung der

Tabelle 5. Endchiasmen in der Diakinese in PMZ von M_1 -Pflanzen mit teilweiser Pollenletalität

Nummer der Aufzucht Pflanze	% Pollen- letalität	Anzahl der PMZ	Endbindungen					geschlossene End- bindungen je Zelle	relative Häufigkeit der Endbindungen	
			geschloss. offen	14 0	13 1	12 2	11 3		geschloss. offen	
1	86	42,0	643	611	31	1	—	13,97	0,996	0,004
	127	50% helle, kleine Körner fast steril	142	99	40	3	—	13,68+	0,977	0,023
	138		77	72	5	—	—	13,93	0,995	0,005
3	42	—	23	21	2	—	—	13,91	0,994	0,006
	161	47,4	20	19	1	—	—	13,95	0,996	0,004
4	21	36,6	50	46	4	—	—	13,92	0,994	0,006
	22	normal	79	76	3	—	—	13,96	0,997	0,003
	27	normal	136	134	2	—	—	13,98	0,999	0,001
	47	47,3	50	47	3	—	—	13,94	0,996	0,004
	90	17,0	50	46	4	—	—	13,92	0,994	0,006
5	62	—	25	24	1	—	—	13,96	0,997	0,003
	71	—	25	25	0	—	—	14,0	1,0	0
	121	42,0	61	21	32	7	1	13,19+	0,943	0,057
7	83	50,4	50	41	7	2	—	13,78+	0,984	0,016
18	122	41,5	50	47	3	—	—	13,94	0,996	0,004

+ = Bindungsausfall signifikant höher als bei den normalen Pflanzen.

Chromosomen gestört. In den Tetraden sehr viele Kleinkerne, die als Reste der Chromosomenbrücken und Fragmente gedeutet werden können. Pollenletalität 23,6%.

Pflanze 5-121. Relativ wenig gut analysierbare Zellen in Diakinese, darunter eine Zelle mit einer Kette aus vier Chromosomen und in einer weiteren Zelle ein Quadrivalent mit Dreierbindung zwischen einem geschlossenen und einem Stabbivalent, in den übrigen Zellen häufig zwei Stabbivalente. Die partielle Pollenletalität dieser Pflanze wird wahrscheinlich durch eine sehr kleine, reziproke Translokation im Euchromatin verursacht (vgl. Marquardt 1948). Betroffen ist nicht das Paar Nukleolechromosomen und keines der kleineren Chromosomen. Die Chromosomen der Stabbivalente sind immer die größten des Kerns. Pollenletalität 42%.

4. Zusammenfassung

Die M_1 -Generation verhält sich in bezug auf alle gewählten Untersuchungskriterien so, wie es nach den vielfältigen Erfahrungen der Mutationsforschung zu erwarten ist, wenn der Pollen vor der Bestäubung einer mutagenen Einwirkung ausgesetzt war. Die Häufigkeit der beobachteten Störungen lässt eine Beziehung zur Feldstärke während der Pollenbehandlung erkennen, jedoch nicht zur Dauer der Behandlung bei gleicher Feldstärke.

Untersuchung der M_2 -Generation

1. Umfang des Materials

In allen Aufzuchten der Behandlungsserie „stark“ (Aussaat Nr. 1 bis 8), je zwei Aufzuchten der beiden Behandlungen „schwach“ (Aussaat Nr. 9, 10, 13, 14) und der Kontrollaufzucht (Aussaat 18) wurde von jeder Pflanze, die eine Infloreszenz entwickelt hatte, durch Selbstung eine M_2 -Familie gewonnen. Diese Nachkommenschaften dienen der Prüfung auf rezessive Mutationen.

Mit wenigen Ausnahmen war der Samenansatz gut. Die Quote der erfolglosen Selbstungen war nicht höher als bei diesem Versuchsobjekt üblich, die wenigen Fälle können daher als Bestäubungsfehler aufgefaßt werden.

Mit der Nachkommenschaft jeder Pflanze wurde ein Keimversuch mit einer Stichprobe von meist 100 Samen aus einer Kapsel durchgeführt und dabei der Anteil der keimhaltigen und der tauben Samen bestimmt. Von den meisten Mutterpflanzen wurde eine zweite Probe gleichen Umfangs aus einer anderen Kapsel untersucht. Die Ergebnisse dieser beiden Stichproben stimmen im Rahmen der Zufallsabweichungen überein.

Von insgesamt 221 Nachkommenschaften wurden je 50 Sämlinge pikiert und zur Untersuchung auf Mutationen für morphologische Merkmale aufgezogen (85 aus Aussaat Nr. 1, 93 aus Aussaat Nr. 4, 22 aus der Kontrollaussaat Nr. 18 und 21 Nachkommenschaften von Pflanzen der übrigen Aussaaten, die durch partielle Pollenletalität oder morphologische Abweichungen aufgefallen waren). Von den übrigen Nachkommenschaften wurde eine Probe von Samen in kleinen Saatschalen in Erde ausgesät und die Keimlinge auf Anomalien der Kotyledonen und ersten Rosettenblätter hin untersucht.

Mit einem Teil der restlichen M_1 -Samen wurde eine weitere Aufzucht durchgeführt, von der nur die Pflanzen geselbstet wurden, die morphologisch durch meist schwer definierbare Unterschiede auffielen. In 17 dieser M_2 -Nachkommenschaften, die mutationsverdächtig waren, wurden alle Pflanzen wiederum geselbstet.

2. Prüfung auf rezessive Letalfaktoren

2.1. Voraussetzungen. Bei *Oenothera hookeri* ist der Anteil der tauben Samen, deren Entstehen auf das Absterben der Embryonen während der Entwicklung zurückzuführen ist, sehr gering und liegt erfahrungsgemäß im Mittel zwischen 5 und 8%. Wenn durch die Behandlung Mutationen ausgelöst werden, sind auch rezessive Letalfaktoren zu erwarten, für die die M_1 -Pflanzen heterozygot sein müssen. Bei Selbstung können diese herauspalten und einen Anteil von im Mittel 25% letaler Embryonen ergeben. Unter Be-

rücksichtigung des normalen Anteils an aus anderen Ursachen absterbenden Embryonen und der Voraussetzung, daß weder die Entwicklung der Gametophyten noch die Befruchtungswahrscheinlichkeit der Gameten durch die Mutation beeinflußt werden, ergibt sich für derartige Nachkommenschaften die Erwartung von etwa 30% tauber Samen. Sind Mutationen aufgetreten, die nicht unbedingt letal wirken, aber die Überlebenswahrscheinlichkeit der Homozygoten deutlich herabsetzen, dann sollte der Anteil der taub Samen unter 30% bleiben. Sind bei unvollständiger Penetranz der Letalwirkung auch die Heterozygoten betroffen, dann wird sich dies in einer Erhöhung des Anteils der taub Samen anzeigen, der über 30% ansteigen kann.

2.2. Die Prüfhypothese. Diese Voraussagen gelten für die Mittelwerte der verschiedenen Grundgesamtheiten. Da für die Stichproben mit Zufallsabweichungen vom Mittelwert der Grundgesamtheit, zu der sie gehören, gerechnet werden muß, kann nicht eine einzelne Nachkommenschaft für sich gewertet werden. Es kann aber geprüft werden, ob die Menge der Stichproben aus vielen Nachkommenschaften eine Verteilung zeigt, die mit der Erwartung unter der Annahme, daß keine Letalgene im Material enthalten sind, übereinstimmt.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurde von folgenden Überlegungen ausgegangen. Für eine Menge von Nachkommenschaften aus genetisch einheitlichen Pflanzen können die untersuchten Proben als Stichproben aus einer Grundgesamtheit mit einem gegebenen Verhältnis von tauben zu keimhaltigen Samen angesehen werden. Die Differenzen können als Zufallsabweichungen von einem gemeinsamen Mittelwert angesehen werden.

Die erwartete Verteilung von tauben und keimhaltigen Samen in Stichproben gleichen Umfangs ist durch die Binomialverteilung gegeben. Bei einem Stichprobenumfang von $n = 100$ und einer genügend großen Anzahl von Stichproben ist die Binomialverteilung für praktische Zwecke der Normalverteilung hinreichend angenähert, wenn der Mittelwert $\mu = 0,5$ beträgt. Bei einer Abweichung von diesem Mittelwert, wie sie hier sicher vorliegt, kann die daraus resultierende Asymmetrie der Verteilung durch die Winkeltransformation ausgeglichen werden (Fisher und Yates 1948). Aus der Streuung der Stichproben bei gegebenem Umfang n kann der Mutungsbe reich berechnet werden, in dem ein bestimmter Anteil der Stichproben erwartet werden kann. Gewählt wurde der Bereich von 5% bis 95% der theoretischen Summenprozentverteilung. Eine zusätzliche Prüfung dafür, ob auch die Extremwerte sich der erwarteten Verteilung einfügen, ergibt sich aus der Forderung, daß, falls die Unterschiede nur zufällig sind, sich die empirische Summenprozentkurve im Wahrscheinlichkeitsnetz angenähert durch eine Gerade darstellen lassen muß.

Wenn durch die Behandlung des Pollens homozygot letal wirkende oder vitalitätsmindernde Allele entstanden sind, ist die Population der M_1 -Pflanzen nicht mehr genetisch homogen und nach Selbstung ergeben sich Nachkommenschaften, die nicht als Stichproben aus einer Grundgesamtheit angesehen

Tabelle 6. Prüfung auf Letalgene und vitalitätsmindernde Gene anhand der Häufigkeit tauber Samen in Stichproben von je 1000 Samen aus den Selbstungsnachkommenschaften der M_1 -Pflanzen (M_2 -Generation). Angegeben ist die Anzahl der Nachkommenschaften mit der betreffenden relativen Häufigkeit tauber Samen

Behandlung	Nr. der X_1 -Genera tion	% tauber Samen						Anzahl der untersuchten Nachkommenschaften \bar{x}	Mutungs grenzen für 90% der Verteilung	gefundene Verteilung	unterhalb der unteren Grenze	Mitte der Verteilung	oberhalb der oberen Grenze	
		0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59							
4 Std. stark	1	23	39	5	—	—	—	—	67	11,9	1,4	29,9	0	
	2	121	44	3	—	—	—	—	168	7,4	0,3	23,9	3	
	3	30	30	7	—	—	—	—	67	11,5	1,3	30,1	1	
	4+	22	41	21	3	3	—	1	91	16,7	0,8	47,1	1	
12 Std. stark	5	50	47	13	1	1	—	—	112	11,7	1,3	30,5	2	
	6	58	40	8	6	6	0	2	—	120	13,3	1,9	32,7	5
	7	24	29	26	25	20	12	3	1	140	27,5	9,7	50,1	24
	8	31	41	33	32	12	2	0	1	152	22,1	6,4	43,9	23
4 Std. schwach	9	2	20	23	46	29	16	4	—	140	34,8	14,9	58,1	14
	10	6	26	37	36	10	4	2	1	119	27,7	9,8	50,3	6
12 Std. schwach	13	38	65	41	8	—	—	—	—	152	15,7	2,9	35,9	9
	14	31	52	18	8	3	1	—	—	113	15,9	3,1	36,1	7
Kontrolle	18+	5	11	3	1	—	—	—	—	20	14,1	0	49,1	0

+ = Stichprobenumfang 70 Samen
++ = Stichprobenumfang 60 Samen

werden können. Die Bestimmung der relativen Häufigkeit tauber Samen in Stichproben gleichen Umfangs muß dann entweder eine mehrgipflige Verteilung oder eine Verteilung mit breit ausgezogenem Gipfel ergeben, in der mit übernormaler Häufigkeit hohe Extremwerte vorkommen. Die Darstellung als Summenprozentkurve im Wahrscheinlichkeitsnetz ergibt dann eine Abweichung von der erwarteten Geraden nach rechts.

2.3. Ergebnisse. Aufgrund der Prüfhypothese wurden die Grenzen des Mutungsbereichs berechnet, zwischen denen 90% der Verteilung liegen sollten. Die tatsächlich gefundenen Verteilungen weichen gesichert davon ab. Die Verteilung des Anteils der tauben Samen in den Nachkommenschaften zeigt eine übermäßige Streuung (Tab. 6). Die Untersuchung der Übereinstimmung des Befundes mit der Erwartung anhand der Berechnung des Mutungsbereichs zeigt eine übernormale Häufung von Stichproben, die unter der Grenze liegen, die 5% der Verteilung abtrennt, und zu wenig im oberen Bereich über der 95% Grenze (Tab. 7). Bei der Kontrollpopulation stimmt die Verteilung der Stichproben dagegen angenehrt mit der Erwartung überein. Dieser Effekt ist zu erwarten, wenn der Schätzwert für den Mittelwert der ganzen Population aufgrund hoher Extremwerte, die nicht zur gleichen Grundgesamtheit gehören wie die Hauptmasse der Stichproben, zu groß ausfällt. Die Darstellung der Summenprozentkurve im Wahrscheinlichkeitsnetz zeigt entsprechend die Rechtsabweichung von der postulierten Geraden (Abb. 2).

Tabelle 7. Vergleich der gefundenen Verteilung der Nachkommenschaften für die Häufigkeit tauber Samen mit der Erwartung bei genetischer Homogenität der M_1 -Pflanzen

Behandlung	Nr.	Anzahl der Nachkommenschaften			
		unterhalb Mitte der unteren Verteilung		oberhalb der oberen Grenze	
		5%-Grenze	5%-Grenze		
4 Std. stark	1 bis 4	5	378	4	
12 Std. stark	5 bis 8	54	414	34	
4 Std. schwach	9 und 10	20	226	10	
12 Std. schwach	13 und 14	16	235	8	
Summe		95	1259	56	
Erwartung		70,5	1269	70,5	

$$\chi^2 = 11,5734, n = 2, P < 0,01.$$

Einen weiteren Beweis dafür, daß es sich nicht um Zufallsabweichungen handelt, liefert die Auswertung von 200 Samen (unter Hinzunahme der zweiten Stichprobe) derselben Pflanzen, die für einen Teil der Aufzuchten durchgeführt wurde. Die Zufallsstreuung ist bei Stichproben dieses Umfangs geringer. Der Mutungsbereich ist entsprechend schmäler, aber es sollte derselbe Anteil der Population innerhalb der Grenzen liegen. Es liegt aber ein größerer Anteil außerhalb. Dieser Effekt kann

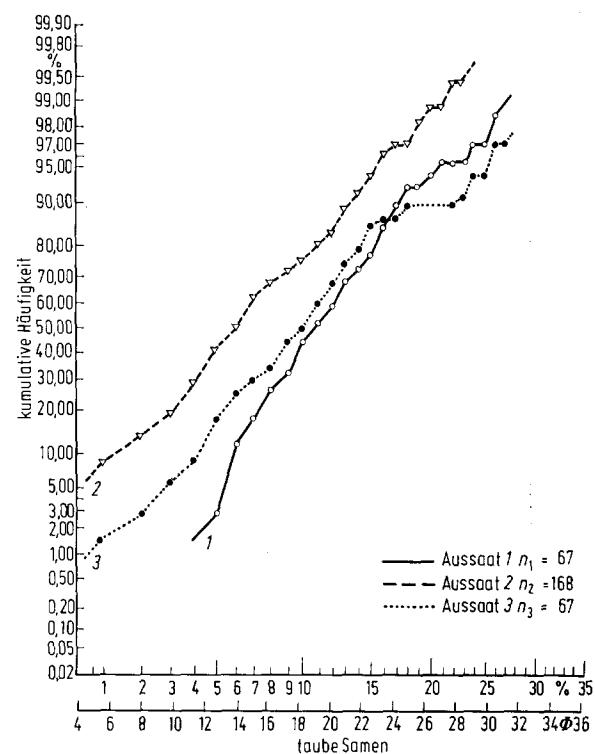


Abb. 2. Summen-%-kurve des Anteils der tauben Samen in den Aussaaten 1, 2 und 3, M_2 nach Behandlung des Pollens mit 1,8 mV/m, 4 Std. Die drei Gruppen unterscheiden sich geringfügig, aber nicht statistisch gesichert durch die umweltbedingte Häufigkeit der tauben Samen in den als normal zu bezeichnenden Nachkommenschaften. Darstellung im Wahrscheinlichkeitsnetz (Ordinate); Teilung der Abszisse: % tauber Samen nach Winkeltransformation

nur zustande kommen, wenn die beobachteten Differenzen nicht zufällig sind, sondern die Menge der untersuchten Nachkommenschaften inhomogen ist und aus Teilstaurationen mit unterschiedlichem Mittelwert zusammengesetzt ist.

Es ist möglich, die Menge der Nachkommenschaften so in Teilmengen zu zerlegen, daß in jeder dieser Teilmengen die Variabilität als zufällige Abweichung der Stichproben aus einer Grundgesamtheit angesehen werden kann. Die Variationsbereiche dieser Teilmengen überschneiden sich, so daß in diesem Überschneidungsbereich für die einzelne Nachkommenschaft nicht bestimmt werden kann, zu welcher Teilstauration sie gehört.

Die Zerlegung jeder der Verteilungen in mehrere Gruppen ergibt, daß eine Teilmenge mit einem Mittelwert zwischen 5% und 6% tauber Samen vorhanden ist, die als normal angesehen werden kann, d. h. keine zusätzlichen letal oder vitalitätsmindernd wirkenden Gene enthält. Eine zweite, kleinere Teilmenge, die nur aus wenigen Nachkommenschaften besteht, liegt um $\mu = 30\%$. Von den im Zwischenbereich liegenden Nachkommenschaften kann im Einzelfall nicht gesagt werden, zu welcher Teilmenge sie gehören. Beispiele für die Verteilung und die Zerlegung in Teilstaurationen sind in Abb. 3 gegeben.

2.4. Zusammenfassung. Es treten Nachkommenschaften auf, die auf Heterozygotie für die Letalgene

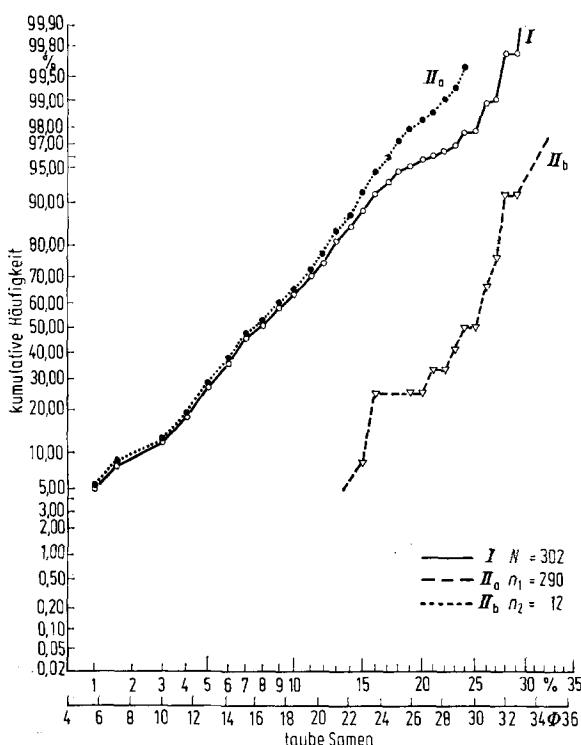


Abb. 3. Zerlegung der Summen %-kurve des Anteils der tauben Samen in 2 Teilmengen mit normalem und mit erhöhtem Anteil tauber Samen. (Wahrscheinlichkeitsnetz; Teilung der Abszisse wie in Abb. 2)

in der geselbsteten M_1 -Pflanze schließen lassen. Daneben ist aber eine übernormale Häufigkeit von Nachkommenschaften mit einem Teil tauber Samen (= lebensunfähiger Embryonen) zwischen 10% und 25% zu finden, die auf das Vorkommen von vitalitätsmindernden Genen schließen lassen. Die einzelnen Gruppen von Nachkommenschaften weichen etwas voneinander ab, was bei der Unmöglichkeit einer genauen Dosierung der Bestrahlung des Pollens in den verschiedenen für die Kreuzungen verwendeten Knospen auch zu erwarten ist.

Die Beobachtungen widersprechen der Hypothese einer genetischen Einheitlichkeit der M_1 -Pflanzen und der M_2 -Nachkommenschaften. Sie berechtigen dagegen zu der Annahme, daß infolge der Behandlung des Pollens in der M_1 -Generation eine erhebliche Heterozygotie für Letalgene und vitalitätsmindernde Gene hervorgerufen wurde.

3. Spaltung nach morphologischen Merkmalen in der M_2

3.1. Prüfung der Abweicher. In den Aufzuchten der M_2 wurden Spaltungen nach morphologischen Merkmalen gefunden.

Es wurde besonders auf folgende Merkmale geachtet: Entwicklung der Sämlinge, Form und Farbe der ersten Rosettenblätter im Pikierkasten, der im Freiland nach dem Auspflanzen gebildeten Rosettenblätter, sowie der Stengelblätter, Schossen und Entwicklung des Hauptspresses, Ausbildung des Sproßgipfels, Form und Größe

der Petalen, Farbe der Petalen, Anthocyanbildung an Sproß, Knospen und Früchten, Form der Früchte.

Zur Kontrolle darüber, ob es sich bei den auffallenden Phänotypen um genetisch bedingte Abweichungen handelte, wurden die Abweicher geselbstet und in der M_3 die Konstanz des Merkmals geprüft. Bei letal wirkenden Veränderungen wurden die normalen Geschwisterpflanzen geselbstet, von denen ein Teil heterozygot sein mußte, und die Häufigkeit der spaltenden Nachkommenschaften sowie die Spaltungsverhältnisse geprüft. In 3 Fällen lieferten diese Nachzuchten den Beweis dafür, daß die Ursache für die beobachteten morphologischen Abänderungen in der Mutation einfach mendelnder Gene zu suchen ist. Andere, die vor allem Abweichungen der Ausbildung der Blätter und des Sproßgipfels betrafen, erwiesen sich durch die normale Nachkommenschaft als Modifikationen.

Derartige morphologische Abweichungen werden in normalen Zuchten von *Oe. hookeri* nur äußerst selten beobachtet. In der hier beobachteten Häufung sind sie als weiteres Anzeichen für eine Strahlenschädigung des Pollens zu werten.

3.2. Beobachtete Mutationen. mut 21: blattlos. Die Sämlinge bilden außer den Kotyledonen keine Blätter aus, sie bleiben in diesem Zustand mehrere Wochen bis Monate und gehen dann ein (Abb. 4).

mut 22: gelbe Sämlinge. Die Rosettenblätter sind gelb-grün bis fast gelb. Die Pflanzen bleiben schnell im Wachstum gegenüber den normalen Geschwisterpflanzen zurück und gehen nach mehreren Wochen bis Monaten ein (Abb. 5). Spaltung in M_3 nach Selbstung der grünen M_2 -Pflanzen: 11 Aufzuchten nur grüne Sämlinge, also homozygot; 13 Aufzuchten spaltend (Prüfung der Erwartung 1:2; $\chi^2 = 1,69$; $P > 0,1$). In den spaltenden Aufzuchten wurden 323 grüne und 99 gelbe Sämlinge beobachtet (Prüfung der Erwartung 3:1; $\chi^2 = 0,53$; $P > 0,3$; Homogenität der 13 Familien: $\chi^2 = 12,09$; $P > 0,01$).

mut 25: Kleinblatt, Stengelblätter von normaler Form, aber deutlich kürzer als bei *Oe. hookeri*.

3.3. Vererbung der Pollenletalität. Die Nachzuchten der partiell-pollenletalen Pflanzen ergaben für die meisten nur normale Pflanzen in der Nachkommen-



Abb. 4. Spaltende Aufzucht mit Sämlingen der Mutation „blattlos“ neben normalen Geschwisterpflanzen



Abb. 5. Spaltende Aufzucht mit Sämlingen der Mutation „gelbe Sämlinge“ neben normalen Geschwisterpflanzen

schaft. Dies ist zu erwarten, wenn nicht Pollenletalität, sondern Letalität der Gonen oder der Gametophyten vorliegt, so daß die Anomalien auch nicht durch die Eizellen weitergegeben werden können. In einigen dieser Nachzuchten ergab sich ein besonders hoher Anteil an tauben Samen, woraus zu schließen ist, daß der Embryosack u. U. noch befruchtet werden kann, aber eine normale Entwicklung des Embryos nicht mehr möglich ist. In wenigen Fällen wurde in der M_2 -Generation bei etwa 50% der Pflanzen wiederum partielle Letalität des Pollens gefunden (Tab. 3).

3.4. Zusammenfassung. Alle Beobachtungen an der M_1 und den durch Selbstung gewonnenen Generationen M_2 und M_3 lassen nur die Deutung zu, daß durch die Behandlung des Pollens Mutationen verschiedenster Art ausgelöst wurden.

Mosaikpflanzen in der M_1

In der M_2 -Generation wurden phänotypisch auffallende Pflanzen gefunden, die aus morphologisch verschiedenenartigen Teilen zusammengesetzt waren. Diese sollen gesondert behandelt werden (Harte 1972c, in Vorbereitung).

Diskussion

Die Untersuchung der M_1 - und M_2 -Generationen nach Behandlung des Pollens mit Meterwellen gibt für alle verwendeten Kriterien Hinweise auf die mutationsauslösende Wirkung der Behandlung. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß durch Meterwellenbestrahlung in Pollennutzerzellen und in somatischen Zellen Chromoso-

menmutationen ausgelöst werden (Zinecker-Brauer, persönliche Mitteilung 1948; Harte 1949, 1972 a). Die Untersuchung der M_2 -Generation weist eine Häufigkeit von Mutanten nach, wie sie in langjährigen Beobachtungen an unbehandelten Zuchten von *Oe. hookeri* nie gefunden wurde. Das Auftreten der Haploiden, die Häufigkeit letaler Embryonen, die partielle Pollenletalität und Chromosomentranslokationen sind ebenfalls Phänomene, die nur durch mutagene Wirkung der Pollenbehandlung zu erklären sind.

Zusammenfassung

An *Oenothera hookeri* wurde eine Behandlung des Pollens mit Meterwellen ($\lambda = 1,5$ m) durchgeführt. Nach Kreuzung auf unbehandelte Blüten wurden die Generationen M_1 und die durch Selbstung gewonnenen M_2 und M_3 untersucht. Die Kriterien für die mutagene Wirkung der Pollenbehandlung sind: Häufung von haploiden Pflanzen in der M_1 , Auftreten von partieller Pollenletalität, zum Teil verbunden mit Chromosomenmutationen, genetische Heterogenität der M_1 -Pflanzen in bezug auf Letalfaktoren und vitalitätsmindernde Gene, getestet an der Häufigkeit letaler Embryonen in der M_2 , Nachweis von Punktmutationen durch die Spaltung nach morphologisch abweichenden Merkmalen in der M_2 .

Literatur

1. Brauer, I.: Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Meterwellen verschiedener Feldstärke auf das Teilungswachstum der Pflanzen. Chromosoma 3, 483—509 (1950). — 2. Fisher, R. A., Yates, F.: Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research. London-Edinburgh: Oliver and Boyd 1948. — 3. Harte, C.: Mutationsauslösung durch Ultrakurzwellen. Chromosoma 3, 440—447 (1949). — 4. Harte, C.: Cytological and genetical studies on mutants of *Oenothera* originating after irradiation with radiowaves. Proc. IX International Botanical Congress, Montreal 2, 152 (1959). — 5. Harte, C.: Auslösung von Chromosomenmutationen durch Meterwellen in Pollennutzerzellen bestrahlter Pflanzen. Chromosoma, im Druck (1972a). — 6. Harte, C.: Haploide Pflanzen bei *Oenothera*. Biolog. Zbl., im Druck (1972b). — 7. Harte, C.: Mosaikpflanzen in der M_2 bei *Oenothera* nach Behandlung mit Meterwellen. TAG, im Druck (1972c). — 8. Marquardt, H.: Das Verhalten röntgeninduzierter Viererringe mit großen interstitiellen Segmenten bei *Oenothera hookeri*. Z. indukt. Abstammungs- u. Vererbungslehre 82, 415—429 (1948). — 9. Straub, J.: Die Erzeugung von Blütenpflanzen mit verminderter Chromosomenzahl (Hybridoploidie). Ber. dt. Bot. Ges. 57, 155—174 (1939). — 10. Zinecker-Brauer, I.: Auslösung von Chromosomenmutationen in Wurzel spitzen von *Vicia faba* nach Behandlung mit Meterwellen (persönliche Mitteilung 1948).

Eingegangen am 31. Januar 1972
Angenommen durch W. Seyffert

Frau Professor Dr. Cornelia Harte
Institut für Entwicklungsphysiologie
Universität zu Köln
Gyrhofstr. 17
D-5 Köln-Lindenthal (Germany/BRD)