

Auslösung von Chromosomenmutationen durch Meterwellen in Pollenmutterzellen von *Oenothera*

CORNELIA HARTE

Institut für Entwicklungsphysiologie, Universität zu Köln

Eingegangen am 28. Dezember 1971 / Angenommen am 7. Januar 1972

Induction of Chromosome Mutations by Radiowaves in PMZ of *Oenothera*

Abstract. Inflorescences of *Oenothera* with young flower buds were irradiated with radiowaves. One series of experiments was done with short treatments (1h, 4 h, and 12 h) of $\lambda=1.50$ m; another serie with treatment of the plants during the whole vegetation period. In pollen-mother-cells in diakinesis a great number of chromosomal mutants, fragmentations as well as recombinations, were found. The results are in agreement with earlier experiments on the mutagenic action of short radiowaves.

Die mutationsauslösende Wirkung von Meterwellen ($\lambda=1,5$ m) wurde bereits früher nachgewiesen (Harte, 1949, 1959; Zinecker-Brauer, 1948). Ergänzend zu diesen Versuchen sollen weitere Befunde über die Auslösung von Chromosomenmutationen in bestrahlten Pflanzen vorgelegt werden.

I. Material und Methode

Das verwendete Material sind Inflorescenzen von *Oenothera (suaveolens sulfurea × hookeri) flava*. Dieser Bastard weist in der Meiose der Pollenmutterzellen die Chromosomenkonfiguration 1 Viererring + 5 Bivalente auf und ist durch seine vielfache Verwendung für Mutationsuntersuchungen cytologisch gut bekannt. Für die Laborversuche wurden Haupt- oder kräftige Seiteninfloreszenzen abgeschnitten, unter Wasser auf 40 cm gekürzt und in Erlenmeyerkolben mit Leitungswasser gestellt, in denen sie während der Behandlung und bis zur Fixierung verblieben. Die Behandlung erfolgte mit demselben Sender, der schon von Brauer für die Versuche mit Wurzelspitzen von *Vicia faba* und die früher beschriebenen Versuche mit *Oenothera* verwendet wurde (Brauer, 1950; Harte, 1949). Die Infloreszenzspitzen waren 80—95 cm von der Antenne entfernt. Die Feldstärke in dieser Entfernung betrug etwa 1,4 V/m. Die Außentemperatur während der Behandlung konnte nicht konstant gehalten werden. Sie lag je nach Versuch zwischen 16° und 20° C. Nach der Behandlung wurden die Pflanzen in Klimakammern bei +10° C und künstlicher Belichtung gehalten. Die Fixierung der Knospen erfolgte 4 und 6 Tage nach der Behandlung. Nicht alle Fixierungen ergaben genügend PMZ in geeigneten Stadien, so daß nur einige für die Auswertung verwendet werden konnten.

Für den Freilandversuch erfolgte die Aufzucht der Pflanzen vom Rosettenstadium Anfang Mai an auf 3 Beeten in unmittelbarer Nähe eines UKW-Senders

auf dem Gelände des NDR in Hamburg; 2 Fixierungen nach 2 bzw. 3 Monaten, im Juli und August. Die 3 Beete unterschieden sich durch die Feldstärke der Meterwellenstrahlung, $\lambda=3$ m. Diese betrug 250 mV/m, 750 mV/m und 1175 mV/m, gemessen vor dem Bepflanzen der Beete in 1 m Höhe über dem Boden. In $1\frac{1}{2}$ m Höhe waren die Meßwerte etwas geringer, in 10 cm Höhe wurde etwa die Hälfte der oben angegebenen Werte erreicht. Die Sproßspitzen waren also während der Vegetationsperiode wechselnder Strahlungsintensität ausgesetzt (nach Angaben des technischen Stabes des NDR)¹.

Die Fixierung der Antheren erfolgte in Alkohol-Eisessig 3:1, Färbung mit Eisenkarmin und Verarbeitung als Quetschpräparate. Mikroskopische Untersuchung mit Ölimmersion bei 1000facher Vergrößerung.

Übersicht über die Versuche

(Versuch A: Behandlung 15 min, bereits früher publiziert.)

Versuch B: Behandlung 1 Std.

Versuch C: Behandlung 4 Std.

Versuch D: Behandlung 12 Std.

Versuch E: Dauerbehandlung über 2 bzw. 3 Monate.

Zur Kontrolle wurden gleichzeitig mit den Versuchen Infloreszenzen in entsprechender Weise behandelt, jedoch ohne Bestrahlung. Die Versuche B, C, D wurden zweimal durchgeführt (Bezeichnung B₁, B₂ usw.).

II. Cytologische Auswertung der fixierten Knospen

Untersuchung der Diakinese

a) Auswertungskriterien

Die PMZ im Stadium der Diakinese wurden in analysierbare und nicht analysierbare Zellen eingeteilt. In den analysierbaren Zellen wurde das Auftreten von sicheren Chromosomenmutationen und von Chromosomenanordnungen, die mutationsverdächtig waren, festgestellt. Die Fälle, in denen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit eine Anomalie angenommen werden muß, welche aber durch ungünstige Lage der Chromosomen nicht eindeutig zu identifizieren war, wurden als „verdächtig“ klassifiziert. Zellen, in denen die 14 Chromosomen und ihre Bindungsverhältnisse nicht eindeutig zu erkennen waren, wurden als „nicht analysierbar“ bezeichnet. Diese Klasse ist nicht einheitlich, denn sie enthält einerseits Zellen im Stadium der frühen Diakinese, in der die Chromosomen meist ineinander verknäult sind und sich schwer im einzelnen verfolgen lassen, was vor allem in einem Präparat der Kontrollfixierung der Fall war, andererseits aber die Zellen, in denen so komplizierte Umbauten der Chromosomen vorliegen, daß eine ins einzelne gehende Analyse unmöglich ist, sowie auch Zellen, in denen durch Verklebungen der Verlauf der Chromosomen und ihre Bindungsverhältnisse undeutlich werden. Diese beiden letzten Typen der nicht analysierbaren

¹ Dem NDR Hamburg, insbesondere Herrn Dr. Ing. J. Peters, sei für die Unterstützung des Freilandversuches bestens gedankt.

Zellen sind in normalem Material, ebenso wie in der hier untersuchten Kontrolle, selten.

Aus den Protokollen ist demnach die Anzahl der normalen Zellen, der Zellen mit Chromosomenaberrationen, die Anzahl sowie die Art der Aberrationen zu entnehmen. In den normalen Zellen wurde die Anzahl und die Verteilung der Endchiasmen bestimmt. Für alle Auszählungen gilt, daß vor der Zusammenfassung der Werte von verschiedenen Antheren und Knospen die Homogenität geprüft wurde. In keinem Fall ergaben sich signifikante Differenzen zwischen den Auszählungen eines Versuchsgliedes.

b) Häufigkeit abnormer PMZ

a. Kurzzeitbehandlung. Die relative Häufigkeit der nicht analysierbaren Zellen nimmt 4 Tage nach Beendigung der Bestrahlung mit der Dauer der Behandlung zu (Tabellé 1). Nach der Bestrahlung wurden in allen Fixierungen, die genügend Zellen in Diakinese für eine Analyse enthielten, in erheblichem Umfang Anordnungen der Chromosomen gefunden, die als Folge von Chromosomenmutationen gedeutet werden müssen. Als sichere Anomalien wurden diese Anordnungen nur dann gezählt, wenn der Verlauf der Verbindung zwischen den Chromosomenenden deutlich zu erkennen war.

Unter den analysierbaren Zellen nimmt der Anteil derjenigen mit Chromosomenaberration ebenfalls mit der Dauer der Behandlung zu. Für die Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Dauer der Nachbehandlung steht nur der Versuch mit 1 Std Bestrahlung zur Verfügung, die einen gesicherten Anstieg aberannter Zellen nach 6 Tagen im Vergleich zu 4 Tagen ergibt. Ein solcher wurde früher nach einer Bestrahlungsdauer von 15 Minuten ebenfalls festgestellt.

Unter Berücksichtigung der wahrscheinlichen Dauer der Meiose bei *Oenothera* unter den Bedingungen der Nachbehandlung ist anzunehmen, daß sich die Zellen, die nach 4 Tagen im Stadium der Diakinese waren, zur Zeit der Behandlung im frühen Pachytän befanden, während die in der Fixierung nach 6 Tagen untersuchten Zellen in der beginnenden Prophase (Leptotän) behandelt wurden (Linnert, 1951).

b. Dauerbehandlung. In allen vier Fixierungen aus dem Versuch mit Dauerbehandlung war etwa $\frac{1}{3}$ der Zellen nicht analysierbar, und zwar gehörten diese fast ausschließlich zu den beiden Typen, die auf schwere Schädigungen durch die Bestrahlung schließen lassen. Ebenso auffällig ist die Anzahl der Zellen mit Aberrationen, davon einige mit mehreren unabhängigen Chromosomenumbauten.

c) Art der Chromosomenaberrationen

Es wurden sehr verschiedenartige Chromosomenkonfigurationen beobachtet, die nur als Folge von chromosomalen oder chromatidalen Brüchen und Restitutionen zu interpretieren sind. Im einzelnen ist es wegen der Chiasmenbildung in der Meiose nicht in jedem Fall möglich, über die chromosomalre oder chromatidale Natur des primären Bruches

Tabelle 1. Chromosomenaberrationen nach UKW-Behandlung verschiedener Dauer

Ver- such	Dauer der Be- strahlung	Nach- behand- lung	Anzahl Zellen			mit Chromosomenaberrationen			C. Harte:		
			Kno- nen	Anthe- ren	unter- sucht	nicht analy- sierbar	%	analy- sierbar	nor- mal	An- zahl	%
						sierbar			sicher	ver- dächtig	
Kon- trolle	—	4 Tage	2	8	170	37	21,7	133	130	3	2,3
B ₂	1 Std	4 Tage	5	7	—	— ^a	—	38	31	7	18,4
C ₁	4 Std	4 Tage	3	6	91	20	21,9	71	52	19	26,8
D ₂	12 Std	4 Tage	1	3	175	56	32,0	119	85	34	28,6
B ₁	1 Std	6 Tage	1	5	142	17	11,9	125	64	61	48,8
E ₁	2 Monate	—	1	3	127	43	33,9	84	59	25	24
E ₂	3 Monate	—	8	17	438	122	27,9	316	255	61	19,3

^a Nicht ausgezählt.

zu entscheiden. Es wurden jedoch sichere Chromosomenfragmentationen beobachtet sowie sichere chromatidale Restitutionen und Brüche (Abb. 1). Es sind dieselben Typen von Aberrationen und Umbauten der Chromosomen, wie sie auch aus anderen Mutationsversuchen mit *Oenothera* bekannt sind (z. B. Oehlkers, Linnert und Stange, 1951). Die Umbauten können innerhalb eines Chromosoms abgelaufen sein, aber auch verschiedene Chromosomen betreffen. Die schon in der ersten Mitteilung (Harte, 1949) getroffene Feststellung, daß an Restitutionen auffallend häufig Chromosomen beteiligt sind, die in der Meiose durch die Paarung benachbart sind, also Umbauten innerhalb eines Bivalents oder zwischen Chromosomen des Viererringes, bestätigt sich hier (Tabelle 2). Die Abweichung von der Erwartung bei zufälliger Rekombination von zufällig auf die Chromosomen verteilten Brüchen ist signifikant.

Tabelle 2. Verteilung der Aberrationen auf die Chromosomen

Chromosomen aus	Sicher	Verdächtig
Viererring	49	34
Ring + Bivalent	21	11
einem Bivalent	44	26
zwei Bivalenten	22	9
Ring oder Bivalenten	9	—

Zur Erklärung könnte angenommen werden, daß sowohl Chromosomenbrüche als auch Restitutionen sehr häufig auftreten. Da in der Prophase der Meiose die homologen Chromosomen einander bereits weitgehend genähert, wenn nicht schon gepaart sind, ist die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination von Brüchen zwischen den durch die Paarungsvorgänge benachbarten Chromosomenteilen wesentlich größer als zwischen Chromosomen verschiedener Paarungsgruppen.

Im einzelnen wurden die im folgenden beschriebenen Chromosomenaberrationen mit vollständig terminalisierten Endchiasmen beobachtet (Abb. 1).

Aus einem Bivalent: durch eine Endbindung geschlossenes Ringunivalent in Verbindung mit einem weiteren gleichartigen Chromosom oder einem Stabunivalent in derselben Zelle; Verbindung von drei oder allen vier Chromosomenenden in einem Bivalent.

Aus dem Chromosomenring: Ringunivalent + Kette oder Ring von drei Chromosomen; Verbindung eines sicher ringförmig geschlossenen Chromosoms mit 1 oder 2 weiteren Chromosomenenden durch eine Dreier- oder Viererbindung; Verbindung zwischen drei oder vier Chromosomenenden verschiedener Chromosomen des Viererringes.

Zwischen Chromosomen des Viererringes und einem Bivalent: Kette oder Ring aus fünf oder sechs Chromosomen; Dreierverbindungen zwischen Chromosomen des Ringes und einem Bivalent.

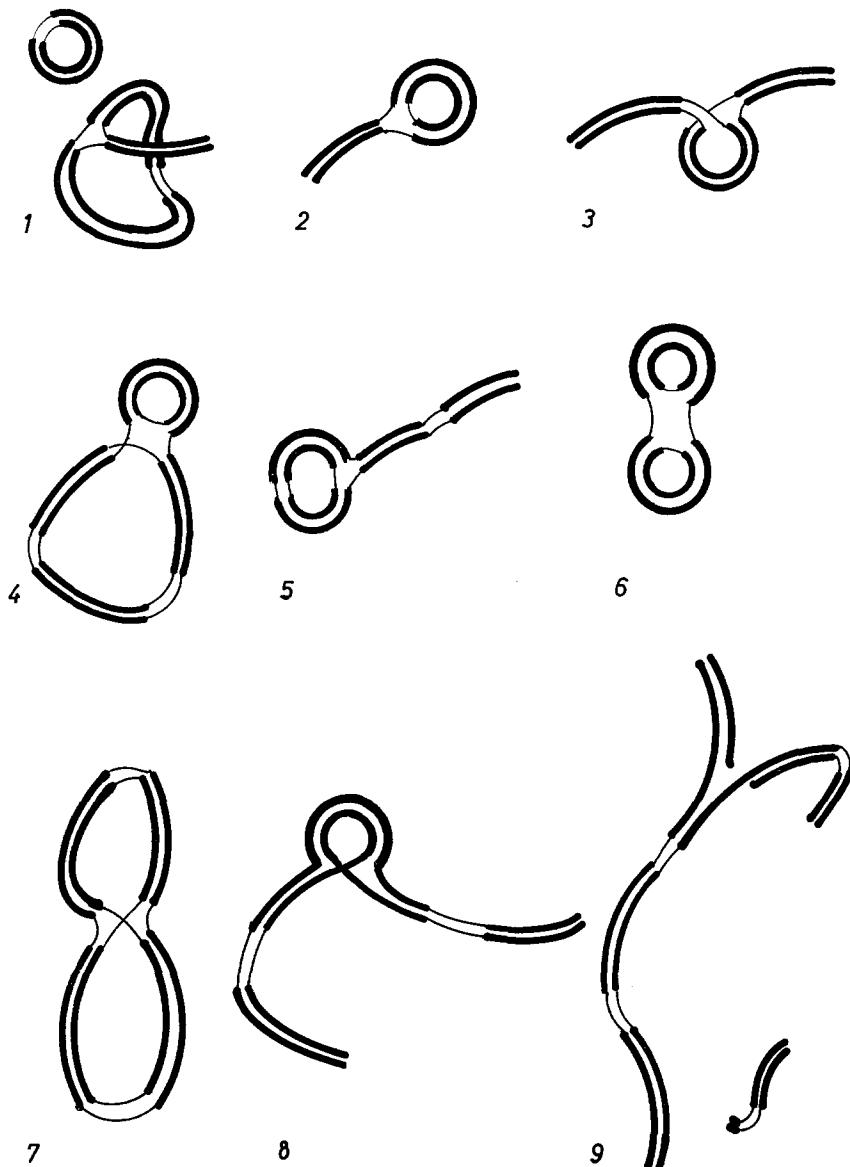


Abb. 1. Dreierbindung und Ringunivalent aus Viererring. 2 Dreierbindung in Bivalent. 3 Dreierbindung aus 2 Bivalents. 4 Viererbindung (3:1) zwischen Chromosomen des Viererrings. 5 Dreierbindung aus 2 Bivalents. 6 Viererbindung in einem Bivalent. 7 Viererbindung zwischen Chromosomen des Viererrings (2:2). 8 Chromatidaler Umbau (Inversion) in einem Chromosom des Viererrings. 9 Chromatidale Translokation zwischen einem Chromosom des Viererrings und einem Bivalentchromosom, Fragment durch Endbindung an das andere Bivalentchromosom gebunden

Eine Anzahl von Aberrationen sind als chromosomal oder chromatidale Translokationen zu deuten, die eine Terminalisation der Chiasmen verhinderten, oder als seitliche Translokation unter Beteiligung eines chromosomal Bruches und nur eines Chromatids eines anderen Chromosoms. Von diesen Anordnungen der Chromosomen kann vorausgesagt werden, daß sie später zu Störungen der Anaphasebewegung durch Bildung bizentrischer Chromosomen und azentrischer Fragmente führen werden.

d) Häufigkeit der Endchiasmen

In den normalen Zellen wurde die Zahl der Endbindungen zwischen den Chromosomen festgestellt. Die Unterscheidung des Bindungsausfalls in Ring- und Bivalentchromosomen ergibt gegenüber früheren Untersuchungen (Harte, 1954) keine neuen Gesichtspunkte, so daß sie hier vernachlässigt werden kann. Die entsprechenden Ergebnisse der bereits früher publizierten Versuche mit 15 min Bestrahlung (Versuch A) wurden zur Ergänzung der hier beschriebenen Versuche herangezogen (Tabelle 3).

Der Ausfall an Endbindungen ist in Versuchen mit Kurzzeitbestrahlung sehr hoch. Dies scheint jedoch weniger an der Bestrahlung als an den allgemeinen Versuchsbedingungen zu liegen, denn die Verteilung ist nicht signifikant von der Kontrolle verschieden. Beim Freilandversuch liegt der Bindungsausfall wesentlich höher, als sonst bei Freilandpflanzen dieser Sorte gefunden wurde. Eine Entscheidung darüber, ob dies eine Folge der Dauerbestrahlung oder der Umweltfaktoren ist, ist nicht zu fällen, weil bei dieser Versuchsanordnung die Aufzucht einer exakt vergleichbaren Kontrollpopulation, die in allen Bedingungen außer der Bestrahlung mit der Behandlungspopulation übereinstimmt, unmöglich ist.

Tabelle 3. *Endbindungen der Chromosomen in den Diakinesen normaler Zellen*

Ver- such	Dauer der Behand- lung	Nach- behand- lung	N	Anzahl der Zellen								End- chiasmen/ pro Zelle					
				Endbindungen: geschlossen													
				14	13	12	11	10	9	8	7						
			Endbindungen: offen							0	1	2	3	4	5	6	7
A ₁	15 min	2 Tage	56	11	19	18	5	2	1	—	—	—	12,5				
		4 Tage	170	30	53	38	52	14	3	—	—	—	13,6				
		6 Tage	50	5	8	14	8	12	2	—	1	—	11,5				
K ₁	Kon- trolle	4 Tage	133	30	47	28	21	3	4	—	—	—	12,4				
B ₂	1 Std	4 Tage	31	16	10	4	—	—	—	1	—	—	13,2				
C ₁	4 Std	4 Tage	51	11	17	15	6	2	—	—	—	—	12,6				
D ₂	12 Std	4 Tage	85	18	29	29	7	1	1	—	—	—	12,6				
B ₁	1 Std	6 Tage	62	11	18	15	16	2	—	—	—	—	12,3				
E	2 Monate	—	102	29	34	24	12	2	1	—	—	—	12,7				
	3 Monate	—	378	105	131	82	37	18	4	1	—	—	12,7				

e) Untersuchung der Anaphase der ersten meiotischen Teilung

In der Anaphase treten gehäuft Chromosomenbrücken (bizentrische Chromosomen) und in der Spindel liegenbleibende Chromosomen auf. Neben den Chromosomenbrücken wurden in einigen Fällen Fragmente beobachtet. In der Mitte der Spindel liegende Chromosomen sind als azentrische Chromosomen oder Fragmente zu deuten. Einzeln liegende Chromosomen an anderen Stellen der Spindel können Fragmente oder in der Anaphasenbewegung gestörte Chromosomen sein. In Kontrollfixierungen wurden diese Chromosomenanordnungen äußerst selten beobachtet. Die Häufigkeit dieser Störungen, die zum größten Teil als Folgen von Chromosomenaberrationen zu deuten sind, ist aus Tabelle 4 zu entnehmen. Auch hier ist ein Anstieg der relativen Häufigkeit der gestörten Zellen sowohl in Abhängigkeit von der Dauer der Behandlung als auch von der Dauer der Nachbehandlung zu finden.

Tabelle 4. *Anomalien in der Anaphase der 1. meiotischen Teilung*

Ver- such	Dauer der Behand- lung	Nach- behand- lung	<i>N</i>	Anzahl der Zellen			An- zahl An- theren
				nor- mal	mit Brücke	mit Frag- menten und zurückblei- benden Chro- mosomen	
A ₁	15 min	6 Tage	126	98	4	24	3
B ₁	1 Std	4 Tage	79	55	3	21	1
C ₁	4 Std	4 Tage	226	208	1	16	4
D ₁	12 Std	4 Tage	247	233	2	12	1

Im Versuch B₁ (1 Std., Fix. 6 Tage) fanden sich viele Anaphasenbrücken und liegenbleibende Chromosomen, die nicht ausgezählt wurden. Es waren nur relativ wenige normal aussehende Zellen dieses Stadiums vorhanden. In der Anaphase II wurden in jeder Spindel liegenbleibende Chromosomen beobachtet. In der Telophase II lagen mehrfach Chromosomen außerhalb der sich bildenden Tetradenkerne.

Zusammenfassung

Infloreszenzen von *Oenothera (suaveolens sulfurea × hookeri) flava* mit jungen Knospen wurden einer Behandlung mit Meterwellen sowohl in Kurzzeitversuchen mit $\lambda = 1,50$ m als auch in Dauerbehandlung ($\lambda = 3$ m) ausgesetzt. In den Pollenmutterzellen fanden sich bei Untersuchung im Stadium der Diakinese in erheblichen Umfang Chromosomenmutationen.

Die vorgelegten Ergebnisse bestätigen die früheren Befunde über die mutationsauslösende Wirkung einer Behandlung mit Meterwellen.

Eine quantitative Analyse der Abhängigkeit der Wirkung von der Dosis und der zeitlichen Ausdehnung der Behandlung konnte infolge der Schwierigkeiten der Dosisbestimmung und der exakten Dosierung nicht durchgeführt werden. Die Mutationsauslösung tritt bereits bei Einwirkung einer relativ geringen Feldstärke ein. Die Befunde nach Dauerbehandlung können nicht die Deutung ausschließen, daß eine Steigerung der Wirkung oberhalb einer bestimmten unbekannten Dosis nicht mehr ins Gewicht fällt. Der auslösende Mechanismus bleibt nach wie vor unklärt.

Literatur

- Brauer, I.: Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Meterwellen verschiedener Feldstärke auf das Teilungswachstum der Pflanzen. *Chromosoma (Berl.)* **3**, 483—509 (1950).
- Harte, C.: Mutationsauslösung durch Ultrakurzwellen. *Chromosoma (Berl.)* **3**, 440—447 (1949).
- Harte, C.: Untersuchungen über die Variabilität der Chiasmenbildung bei *Oenothera*-Bastarden. II. Die Verteilung der Endchiasmen auf Ring- und Bivalentchromosomen in Formen mit einem Viererring. *Chromosoma (Berl.)* **6**, 237—276 (1954).
- Harte, C.: Cytological and genetic studies on mutants of *Oenothera* originating after irradiation with radio waves. *Proc. IX Internat. Both. Congr.* **2**, 152 (1959).
- Linnert, G.: Die Bestimmung des Zeitpunktes für das Auftreten von Chromosomenmutationen in der Meiosis von *Oenothera* nach experimenteller Einwirkung. *Z. Vererbungsl.* **83**, 414—421 (1951).
- Oehlkers, F., Linnert, G., Stange, L.: Die Häufigkeit experimentell durch Röntgenstrahlen und Chemikalien induzierter Chromosomenumbauten auf den unterscheidbaren Anteilen der *Oenothera*-Genome in der Meiosis. *Z. Vererbungsl.* **83**, 479—484 (1951).

Prof. Dr. Cornelia Harte
Institut für Entwicklungsphysiologie
Universität zu Köln
D-5000 Köln-Lindenthal
Gyrhofstr. 17
Deutschland