

# Der Pigmentgehalt induzierter Mutanten von *Pisum sativum* als Grundlage einer neuen Farbcharakterisierung und seine Beziehung zur Plastidengröße

H. HIPKE

Institut für Genetik der Universität Bonn (BRD)

## The Pigment Content of Induced Mutants of *Pisum sativum* as Basis for a New Method of Color Specification and its Correlation with Plastid Size

**Summary.** Several methods for characterizing the color of pigment mutants can be found in the literature. Either verbal descriptions or comparisons with a color catalogue are used. These methods are subjective. Furthermore, the usual classifications of the pigment mutants as *viridis*, *chlorina* or *xantha* are not clearly defined. An attempt was therefore made to characterize the color of different *Pisum* mutants through a mathematically calculable „Farbwert“ (Color value) obtained by spectrophotometric pigment analysis. This value takes into account the quantity as well as the quality of the pigment. However, the color also depends on secondary factors, e.g. the size and the amount of plastids, their arrangement in the mesophyll, the extent of intercellular space, the waxy layer of the epidermis, and possible hairiness. The correlation between plastid size and pigment content was investigated.

### A. Einleitung

Pigmentmutanten sind als Objekte für viele Richtungen botanischer Forschung von großer Bedeutung, etwa für die Untersuchung von Etiolment oder außerkaryotischer Vererbung. Dieser Tatsache entsprechend liegt bereits eine umfangreiche Literatur vor, deren Durchsicht jedoch zeigt, daß in den meisten dieser Arbeiten die Mutanten nach dem äußerlich sichtbaren Merkmal der Blattfarbe klassifiziert und beschrieben werden. Dies geschieht mit der uns sprachlich zur Verfügung stehenden Skala von „dunkelgrün“ bis „grünlichgelb“ oder mit Hilfe der bekannten Farbkataloge wie dem „Code des Couleurs“ (Klincksieck u. Valette 1908) oder in neuerer Zeit dem „Pflanzenfarben-Atlas“ (Biesalski 1957). Da diese Methoden jedoch ungenau sind und nichts aussagen über die Pigmentzusammensetzung — ein Gelb kann auf einem Überschuß an Carotinoiden oder auf einem Mangel an Chlorophyll beruhen —, setzen sich die quantitativen Pigmentanalysen mehr und mehr durch. Sie sind relativ einfach durchzuführen, seit die spektralphotometrischen Meßmethoden so weit ausgebaut wurden, daß Serienmessungen möglich sind. In dieser Arbeit wird der Versuch unternommen, mit Hilfe der Pigmentanalysen zu einem „Farbwert“ zu gelangen, der die Färbung der einzelnen Mutanten zahlenmäßig ausdrückt.

An die Messung der Pigmentmengen schließt sich die Frage nach den Gründen für die Differenzen im Farbstoffgehalt verschiedener Mutanten an. Bisher völlig ungeklärt sind dabei die biochemischen Ursachen; auch für andere Objekte liegen nur sehr ver-

einzelte Ergebnisse vor, so etwa für *Vicia faba* (Heber u. Gottschalk 1963). In der vorliegenden Arbeit soll ein anderer möglicher Zusammenhang untersucht werden, nämlich die Beziehung zwischen Pigmentgehalt und Plastidengröße. Für weitere Arbeiten wäre es sicher lohnend, die Abhängigkeit der Pigmentmengen von der Anzahl der Plastiden pro Zelle und dem inneren Aufbau der Plastiden zu bestimmen.

### B. Material und Methode

Unsere Untersuchungen wurden an 19 strahleninduzierten Mutanten von *Pisum sativum* (Handelssorte: Dippes gelbe Viktoria) durchgeführt. Die Pflanzen wurden vergleichsweise im Freiland und in einer Klimakammer angebaut. Die Extraktion des Pflanzenmaterials und die quantitative Pigmentbestimmung erfolgte nach der bei Hipke (1970) bereits angegebenen Methode.

Zur Bestimmung der Plastidengröße wurden nach Strügger (1951) kleine Blattstücke mit der Unterseite nach oben in isotonische Saccharoselösung auf einen Objektträger gelegt und Teile des Mesophylls (Schwammparenchym) mit einer Rasierklinge abgeschabt. Im Mikroskop wurden mit Hilfe eines Okularmikrometers die Durchmesser von 100 Plastiden je Mutante gemessen und zu einem Mittelwert vereinigt. Im Text werden außerdem die Standardabweichungen und die Signifikanzverhältnisse angegeben.

### C. Ergebnisse und Diskussion

*Der Farbwert:* Es stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, um die Färbung einer Pflanze auszudrücken. Im einfachsten Fall belegen wir sie mit einer sprachlichen Bezeichnung wie hellgrün oder gelb. Prinzipiell das gleiche geschieht, wenn wir die Pflanze

Tabelle 1. Vergleich des Farbwerts mit der Farbcharakterisierung nach dem äußeren Farbeindruck, den Farbmeßtafeln nach Ostwald und der Mutantenbezeichnung; außerdem sind die Meßwerte für Chlorophyll a (a), Chlorophyll b (b), Carotinoide (c) und Gesamtpigment (a + b + c) in der Dimension µg Pigment pro Gramm Frischgewicht angegeben

Mutante	a	b	c	a+b+c	Meßtafel	Farbeindruck	Farbwert
122	1115,1	353,5	401,8	1870,4	4 IV ni23	blaugrün, dunkler als NF	51,8
NF	1094,5	359,5	418,6	1872,6	4 IV ni23	normal	48,9
2323A	1052,5	357,2	415,2	1824,9	4 IV ni23	normal	46,2
489C	1040,1	345,9	418,6	1804,6	4 IV pi23-24	normal	44,8
2701 chlorotica	997,6	325,9	416,0	1739,5	4 IV pi23	± normal	42,9
75A	1011,0	304,9	419,6	1735,5	4 VIII pg23	etwas heller als NF	41,7
2191	913,4	293,7	381,6	1588,7	4 VI ng23-24	etwas heller als NF	38,0
58C chlorotica	920,8	262,4	392,8	1576,0	4 VI pi24	etwas heller als NF	36,9
2570 chlorotica	742,3	247,8	390,6	1380,7	4 VIII pg23	etwas heller als NF	26,2
2826A chlorotica	571,6	180,6	259,1	1011,3	4 VI ng24	etwas heller als NF	22,2
2498 chlorotica	575,0	189,8	280,4	1045,2	4 VIII pg24	heller als NF	21,4
2609 chlorotica	528,0	209,1	336,2	1073,3	4 VIII pg24	heller als NF	16,9
10287 chlorina	466,4	201,8	257,9	926,1	4 VI le24	hellgrün	16,7
2325A chlorina	413,9	162,5	210,5	776,9	4 X pe24	grüngelb	15,2
2029 chlorina	196,9	92,2	195,2	484,3	1 VIII ne1	hellgrün	4,8
3032A xantha	24,5	—	41,6	66,1	4 IV ea24	gelb	0,4
2185 xantha	22,4	—	58,3	80,7	1 VI ga2	gelb	0,3

mit Hilfe eines Farbkataloges (Klincksieck u. Valette 1908; Ridgway 1912; Séguy 1936; Ostwald; Biesalski 1957) einordnen, nur sind hier die Bezeichnungen vorgegeben und meist numerisch. Auch die schon von Gustafsson (1940) eingeführten nomenklatorischen Unterteilungen wie *viridis*, *chlorina* oder *xantha* beziehen sich auf den äußeren Farbeindruck, ohne daß sich die Grenze zwischen den einzelnen Gruppen exakt festlegen läßt.

Um eine genauere Farbcharakterisierung zur Verfügung zu haben, soll versucht werden, jeder Mutante einen eigenen, in Zahlen ausdrückbaren „Farbwert“ zuzuordnen, der nicht vom Farbsehen des Untersuchers abhängt, sondern mathematisch bestimmbar ist. Ausgehend davon, daß Chlorophyll b am wenigsten zum Gesamteindruck beiträgt, da es als gelbgrünes Pigment zwischen dem blaugrünen Chlorophyll a und den gelben Carotinoiden liegt, wurde zunächst der Quotient Chlorophyll a/Carotinoide (a/c) gebildet. Da jedoch neben dem Pigmentverhältnis auch die Pigmentmenge für die Farbbildung von Bedeutung ist, wurde der Quotient a/c noch multipliziert mit dem Zahlenwert des Gesamtpigmentgehalts (a+b+c). Nur um die Zahlen nicht zu groß werden zu lassen, wurde dann noch durch 100 dividiert. Der so erhaltene Wert wird im Folgenden unter dem Farbwert (Fw) zu verstehen sein:

$$Fw = \frac{a}{c} \cdot \frac{a+b+c}{100}$$

Tabelle 1 zeigt einen Vergleich der auf diese Weise berechneten Zahlenwerte mit der sprachlichen Bezeichnung der Farbe und der Bestimmung mit Hilfe der „Farbmeßtafeln nach Ostwald“. Weiterhin enthält die Tabelle die Meßwerte für Chlorophyll a(a), Chlorophyll b(b), Carotinoide (c) und Gesamtpigment (a + b + c) in der Dimension µg Pigment pro g Frischgewicht.

Den höchsten Farbwert besitzt mit 51,8 die Mutante 122, die tatsächlich dunkler erscheint als die Normalform (NF) mit 48,9. Bei den *chlorotica*-Formen liegt der Farbwert zwischen 42,9 (2701) und 16,9 (2609), bei den *chlorina*-Formen zwischen 16,7 (10287) und 4,8 (2029) und bei den *xantha*-Formen schließlich unter 1,0. Damit dürfte die Eignung dieses Wertes bereits verdeutlicht sein.

Die restlichen drei bearbeiteten Mutanten besitzen einen Gradienten in der Farbstärke aufeinanderfolgender Blätter; die Mutanten 2306 und 2710C gehören zur *chlorescens*-, 2233 zur *virescens*-Gruppe. Sie stellen damit eine weitere Möglichkeit dar, die Eignung des Farbwertes zu prüfen. Der bereits äußerlich sichtbare Gradient der Färbung muß sich auch im Farbwert ausdrücken. Abbildung 1 enthält die berechneten Werte für die ersten drei Blätter der Pflanzen. Wie zu erwarten war, nimmt der Farbwert bei steigender Insertionshöhe der untersuchten Blätter bei den *chlorescens*-Formen ab, bei der *virescens*-Form zu.

Der somit genügend charakterisierte Farbwert hat sich, wie den Beispielen zu entnehmen ist, zumindest bei den Untersuchungen an *Pisum sativum* bewährt. In seine Berechnung gehen sowohl die Gesamtmenge an Pigment als auch das Verhältnis von Chlorophyll a

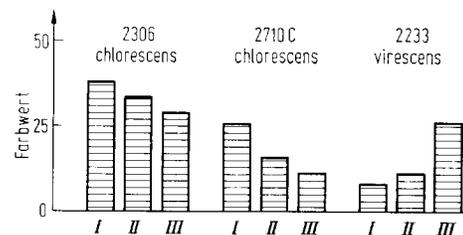


Abb. 1. Farbwerte für unteres (I), mittleres (II) und oberes (III) Blatt bei *chlorescens*- und *virescens*-Mutanten. Die Farbwerte verhalten sich entsprechend der Zu- bzw. Abnahme des äußeren Farbeindrucks der Blätter

zu den Carotinoiden ein. Er ist also von der Quantität, aber auch von der Qualität der vorhandenen Farbstoffe abhängig, was von einer Farbcharakterisierung unbedingt zu verlangen ist. Im Vergleich zur Benutzung von Farbkarten hat der Farbwert den Vorteil, daß er sich mathematisch berechnen läßt und damit vom Farbsehen des Beobachters unabhängig ist. Weiterhin ist die Farbskala mit Hilfe des Farbwertes besser unterteilbar, als es mit den Mitteln der Sprache möglich ist. Daß diese Unterteilung nur bis zu einem bestimmten Grad sinnvoll sein kann, ist selbstverständlich. Ein Nachteil des Farbwertes ist zweifellos, daß sich mit dem Zahlenwert nicht unmittelbar eine Farbvorstellung verbindet. Der Farbwert ist abstrakter als die Farbkarte, was sich jedoch ändern könnte, wenn sich in weiteren Versuchen herausstellen sollte, daß der Farbwert ohne Rücksicht auf das verwendete Objekt bei gleicher Färbung zum gleichen Zahlenwert führt. Außerdem kann die Charakterisierung mit dem Farbkatalog sofort und am natürlichen Standort der Pflanze vorgenommen werden, während zur Berechnung des Farbwertes eine quantitative Pigmentbestimmung durchgeführt werden muß. So ist es wohl besser, von einer Ergänzung der Farbkarte statt von einem Ersatz zu sprechen.

Wie schon angedeutet, wäre es von Bedeutung festzustellen, wie weit sich der Farbwert auch bei anderen Gattungen und Arten zur Farbcharakterisierung eignet. Die Pigmentmengen und auch die Pigmentzusammensetzung sind innerhalb vieler anderer Objekte sicher nicht so grundsätzlich verschieden, daß die Berechnung nach der angegebenen Formel nicht zu vergleichbaren Werten führen würde. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß der äußere Farbeindruck eines Blattes nicht nur von Menge und Zusammensetzung der Pigmente bestimmt wird, sondern darüber hinaus auch von der Anzahl der Plastiden pro Zelle und ihrer Anordnung im Mesophyll, von der Größe der Interzellularen, von der Wachsschicht auf der Epidermis sowie von einer eventuellen Behaarung abhängt (Egle 1960). Ein eindrucksvolles Beispiel dafür ist der bei vielen Arten anzutreffende Blattpfand, bei dem sich Ober- und Unterseite in der Färbung unterscheiden. Der Versuch, die einzelnen Mutanten oder Arten mit einem Farbwert zu belegen, wird daher um so besser gelingen, je konstanter diese sekundär auf die Farbgebung einwirkenden Faktoren sind.

**Die Plastidengröße:** Einer der Faktoren, die auf die Pigmentmengen und damit auf die Färbung Einfluß nehmen könnten, soll im folgenden Teil untersucht werden, nämlich die Größe der Plastiden. Dazu wurden bei jungen Freiland- und Klimakammerpflanzen die Durchmesser von je 100 Plastiden bestimmt. Die Mittelwerte sind zusammen mit der Standardabweichung und den Signifikanzverhältnissen in Tabelle 2 angegeben; bei den *chloroscens*-Mutanten

Tabelle 2. *Plastidendurchmesser* ( $\frac{3}{4}$ ) in  $\mu\text{m}$  mit Standardabweichungen und Signifikanzverhältnissen nach dem *t*-Test. Es bedeuten: — Abweichung nicht signifikant; + Abweichung signifikant  $0,005 > P > 0,01$ ; ++ Abweichung signifikant  $0,01 > P > 0,001$ ; +++ Abweichung signifikant  $P < 0,001$

Mutante	Klimakammer $\varnothing$ in $\mu\text{m}$	Freiland $\varnothing$ in $\mu\text{m}$
F	4,98 $\pm$ 0,88	4,84 $\pm$ 0,54
NF	4,98 $\pm$ 0,88	4,84 $\pm$ 0,54
85C	4,79 $\pm$ 0,58	—
75A	4,77 $\pm$ 0,44	+
122	4,38 $\pm$ 0,47	+++
489C	4,60 $\pm$ 0,81	++
2029	4,23 $\pm$ 0,59	+++
2191		4,25 $\pm$ 0,42 +++
2233	4,43 $\pm$ 0,56	+++
2306	I 4,32 $\pm$ 0,76 II 4,21 $\pm$ 0,65 III 4,13 $\pm$ 0,65	+++ +++ +++
2323A	4,76 $\pm$ 0,47	4,26 $\pm$ 0,45 +++
2323A	4,76 $\pm$ 0,47	4,26 $\pm$ 0,45 +++
2325A		3,17 $\pm$ 0,25 +++
2498		4,00 $\pm$ 0,57 +++
2570		4,39 $\pm$ 0,48 +++
2609		3,84 $\pm$ 0,56 +++
2710C	I 3,68 $\pm$ 0,63 II 3,45 $\pm$ 0,58 III 3,27 $\pm$ 0,67	+++ +++ +++
2826A		4,09 $\pm$ 0,54 +++
3032A	3,28 $\pm$ 0,45	+++
10287		4,39 $\pm$ 0,63 +++

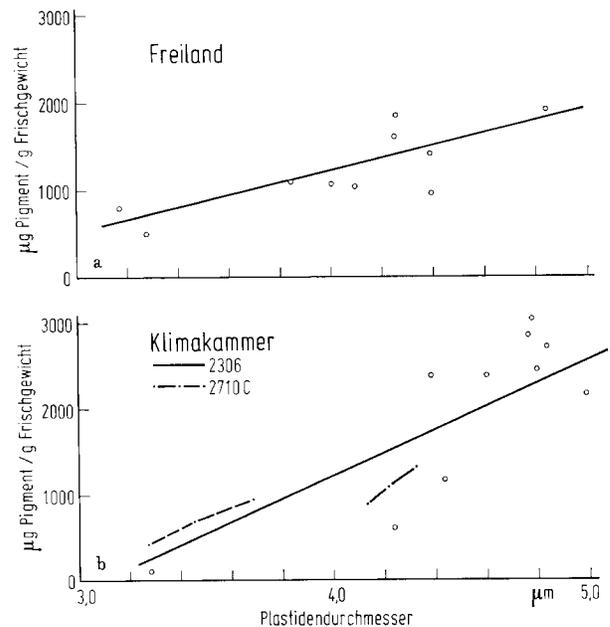


Abb. 2. Korrelation zwischen Gesamtpigmentgehalt und Plastidendurchmesser bei Freiland- (2a) und Klimakammerpflanzen (2b). Bei den beiden *chloroscens*-Mutanten 2306 und 2710C wurden die Plastiden verschieden hoch inserierter Blätter getrennt analysiert. In beiden Diagrammen ist die Regressionsgerade eingezeichnet

wurden die Durchmesser im unteren (I), mittleren (II) und oberen (III) Blatt getrennt bestimmt.

Von allen untersuchten Pflanzen besitzt die Normalform die größten Plastiden mit 4,84  $\mu\text{m}$  Durchmesser bei Freilandanbau und 4,98  $\mu\text{m}$  bei Klimakammeranbau. Die Mutanten variieren zwischen 3,17  $\mu\text{m}$  (2325A, Freiland) und 4,83  $\mu\text{m}$  (2701, Klimakammer). Trägt man den Plastidendurchmesser gegen den Gesamtpigmentgehalt auf (Abb. 2), so läßt sich eine gewisse Proportionalität zwischen diesen beiden Größen sowohl bei Freiland- als auch bei Klimakammerpflanzen feststellen. Diese ist besonders deutlich bei den beiden *chlorescens*-Mutanten 2306 und 2710C zu erkennen, wo der Plastidendurchmesser innerhalb der Pflanze mit abnehmender Farbintensität ebenfalls abnimmt.

Eine Korrelation zwischen Plastidengröße und Gesamtpigmentgehalt ist sicher nicht unerwartet, wenn man berücksichtigt, daß die Plastiden die einzigen Zellorganellen sind, die diese Pigmente enthalten. Jedoch kann die Korrelation gestört oder undeutlich sein, wenn die Plastiden zwar eine normale Größe, aber einen defekten inneren Bau besitzen oder wenn die Pflanze durch Erhöhung der Plastidenzahl pro Zelle den Pigmentmangel auszugleichen versucht. So sind auch die Literaturstellen zu diesem Problem recht divergierend. Eyster (1929) fand bei einer *albino*-Form vom Mais „giant plastids“ und schloß daraus, daß keine Korrelation bestehe. Gustafsson (1942) hingegen berichtet, daß bei einer albinotischen Gerstenmutante die Plastiden vier- bis fünfmal kleiner als bei der Ausgangsform waren. Auch Schwartz (1949) und Michael (1953) fanden eine Korrelation. Wild (1958) gibt mit einer Form von *Antirrhinum majus* ein Beispiel dafür, daß die Zahl der Plastiden abnehmen kann bei gleichzeitiger Zunahme des Durchmessers.

#### Zusammenfassung der Ergebnisse

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden an 19 strahleninduzierten Mutanten von *Pisum sativum* durchgeführt. Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Jeder Mutante wurde auf Grund der Ergebnisse quantitativer Pigmentbestimmungen ein „Farb-

wert“ zugeordnet, um für die einzelnen Genotypen eine exaktere Farbcharakterisierung zu haben, als es mit den sprachlichen Farbbezeichnungen oder anhand der Farbkataloge möglich ist. Die Eignung des Farbwertes für das benutzte Objekt wurde belegt, weitere Möglichkeiten seiner Anwendung wurden diskutiert.

2. Die Durchmesser der Plastiden variieren bei den einzelnen Mutanten zwischen 3,17  $\mu\text{m}$  (2325A) und 4,83  $\mu\text{m}$  (2701) und liegen damit unter dem Wert der Normalform (4,98  $\mu\text{m}$  bei Klimakammer-, 4,84  $\mu\text{m}$  bei Freilandanbau).

3. Bei den *chlorescens*-Mutanten 2306 und 2710C nimmt der Plastidendurchmesser innerhalb der Pflanze mit sinkender Farbintensität ab.

4. Es wurde gezeigt, daß eine gewisse Korrelation zwischen dem Plastidendurchmesser und dem Gesamtpigmentgehalt besteht.

#### Literatur

1. Biesalski, E.: Pflanzenfarben-Atlas. Göttingen: Musterschmidt-Verlag 1957. — 2. Egle, K.: Menge und Verhältnisse der Pigmente. In: W. Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. V/1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960. — 3. Eyster, W. H.: Variation in size of plastids in genetic strain of *Zea mays*. Science **69**, 48 (1929). — 4. Gustafsson, A.: The mutation system of the chlorophyll apparatus. Lunds Univ. Arsskr., N.F. **36**, 1–40 (1940). — 5. Gustafsson, A.: The plastid development in various types of chlorophyll mutations. Hereditas **28**, 483–492 (1942). — 6. Heber, U., Gottschalk, W.: Die Bestimmung des genetisch fixierten Stoffwechselblocks einer Photosynthese-Mutante von *Vicia faba*. Z. Naturforschung **18**, 36–44 (1963). — 7. Hipke, H.: Untersuchungen über den Einfluß äußerer Faktoren auf die Pigmentausrüstung induzierter Mutanten von *Pisum sativum* (1970; im Druck). — 8. Klincksieck, P., Valette, Th.: Code des Couleurs. Paris 1908. — 9. Michael, K.: Vergleichende Untersuchungen über die Farbeigenschaften und den Bau der Blätter von *Aurea*-Varietäten verschiedener Gehölze. Züchter **23**, 296–317 (1953). — 10. Ostwald: Farbentafeln, bearb. v. d. D. Werkstelle für Farbenkunde, Dresden. — 11. Ridgway, R.: Color Standards and Color Nomenclature. Washington DC. 1912. — 12. Schwartz, D.: The chlorophyll mutants of maize. Bot. Gaz. **111**, 123–130 (1949). — 13. Séguy, E.: Code universel des Couleurs, 1936. — 14. Struger, S.: Die Strukturordnung im Chloroplasten. Ber. dt. bot. Ges. **64**, 69–83 (1951). — 15. Wild, A.: Experimentelle Beeinflussung des Granamusters einer abweichenden Plastidensorte von *Antirrhinum majus*. Planta **50**, 379–387 (1958).

Eingegangen 23. Juni 1970

Angenommen durch H. Kuckuck

Dr. H. Hipke  
Institut für Genetik der Universität Bonn  
Kurfürstenstr. 74  
D-53 Bonn (Germany BRD)