

Genphysiologie quantitativer Merkmale bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.¹

Teil I: Spaltungsanalyse und Pigmentbiosynthese in quantitativen Chlorophyll b-Mangelmutanten

A. R. KRANZ

Botanisches Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main (BRD)

Physiological Genetics of Quantitative Characters in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Part 1: Segregation and biosynthesis of pigments in chlorophyll-*b* defect mutants

Summary. In biometric studies on the genetics of quantitative characters the problem of regulation of the activity of genes is rarely considered. Mutants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Cruciferae), defective for chlorophyll *b*, permit a direct biochemical and physiological determination of their quantitative gene effects in the biosynthetic pathway of the plastid pigments. In agreement with other authors, the detectable genotypes are found to be based on multiple alleles (ch^+ , ch^1 and ch^2) at the *ch* locus. This evidence was obtained by test crosses of two mutants with the wild type and by a phaenotypic classification of the progeny on the basis of preparatory thin layer chromatography, paper chromatography tests of single plants, and quantitative spectrophotometry of the lines. In ch^1/ch^1 the synthesis of chlorophyll *b* is completely blocked, in ch^2/ch^2 only about 10 percent of the wild-type pigment is present, and in the heterozygote ch^2/ch^1 a complementation effect is observed (i. e. superdominance of ch^2 over ch^1) resulting in still more pigment production. In the segregating generations the variances for chlorophyll and carotenoids of all the genotypes are higher than in the parents and therefore suggest a possible polygenic background for pigment development. However, the physiological effect of the genetic background is slight as compared with the effect of the major gene *ch*. Preliminary experiments show that in tissue extracts of wild type leaves (ch^+/ch^+) there is an effective agent which enables irradiated chloroplasts of the defective ch^1/ch^1 and ch^2/ch^2 genotypes to synthesize chlorophyll *b* in vitro. Further information on the mechanism, extent and the time of action of the active agent should be obtained by varying the conditions of irradiation and by refining the tests for pigment precursors.

Die Regulierung der Genaktivität wird gegenwärtig vor allem als ein entwicklungsphysiologisches Problem der intra- und extrazellulären Differenzierung gesehen. Zeitpunkt und Ort dieser Aktivität stehen im Mittelpunkt des Interesses und damit wird die Frage nach der Qualität der Regulation verbunden. Weitgehend übersehen wurde bisher das Problem der Regulation bei quantitativen Merkmalen, d. h. die Frage, wie es zur Aktivitätsleistung kommt, oder, physikalisch ausgedrückt, worauf diese Arbeit des Organismus in der Zeiteinheit beruht. Damit ist die Frage nach der Quantität der Regulation gestellt. Fortschritte in dieser Richtung würden die Kausalanalyse der Theoretischen und Angewandten Genetik entscheidend befürworten.

Einführung

Seit einigen Jahren existiert bei der genetisch leicht zu handhabenden Crucifere, *Arabidopsis thaliana* Heynh., eine Serie von experimentell induzierten, quantitativen Chlorophyll-Mutanten.² Sie lieferten

in zahlreichen Arbeiten, vor allem von Rédei (1965) und Röbbelen (1968) sowie ihren Mitarbeitern, grundlegende Einblicke in die genetische Steuerung der Chlorophyllbiosynthese und der Plastidenmorphogenese. So erlauben heute insbesondere die Chlorophyll *b*-Defekt-Mutanten eine direkte genetisch-biochemische und zellphysiologische Prüfung ihres Systems quantitativer Genwirkungen auf dem Biosyntheseweg der Blattpigmente.

Die Syntheseschritte der Chlorophylle *a* und *b* sind bei diesem Objekt im Vergleich mit anderen höheren Pflanzen recht gut bekannt (Egle 1960, Granick 1967, Hess 1968). Danach können mindestens vier Stellen des Syntheseweges durch Gene blockiert sein (Abb. 1):

Der Übergang von der α -Ketoglutarsäure zum Succinyl-CoA mit Hilfe der Co-Decarboxylase Thiamin-Pyrophosphat (Feenstra 1965, Li und Rédei 1969), der Einbau von Mg^{++} in Protoporphyrin IX oder die anschließende Bildung von Protochlorophyllid *a*, die Reduktion dieser Ausgangsverbindung der Chlorophylle zu Chlorophyllid *a* oder die schließliche Veresterung mit Phytol zu Chlorophyll *a* (Röbbelen 1957a), außerdem die Synthese des Chlorophylls *b* aus porphyrinogenen Chlorophyllvorstufen oder direkt aus Chlorophyll *a* (Röbbelen 1957b, Hiroto und Rédei 1963). Der endgültige Syntheseschritt des zweiten Chlorophylls ist noch umstritten, wenn auch

¹ Die pigmentphysiologischen Untersuchungen wurden durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

² Prof. Rédei, Columbia/Miss., und Prof. Röbbelen, Göttingen, danke ich an dieser Stelle sehr für die freundliche Überlassung des Saatgutes der in dieser Arbeit verwendeten Stämme.

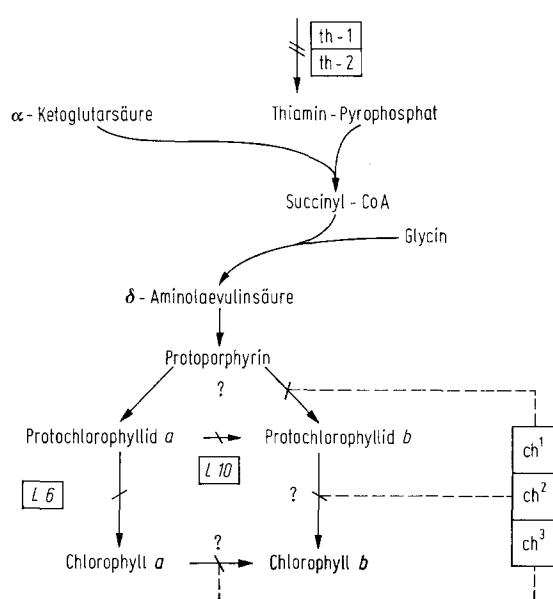


Abb. 1. Schema der Gen-kontrollierten Biosynthese der Chlorophylle bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Die Bezeichnung der bisher untersuchten Mutanten ist an den für sie wahrscheinlichen, defekten Reaktionsschritten eingetragen

an der spezifischen Steuerung durch einzelne Gene kein Zweifel besteht. Eine offene Frage ist auch noch, ob und wie die Entstehung der beiden Chlorophyllformen mit ihrer strukturellen Bindung an plastidenspezifische Proteine zum sog. Holochrom zusammenhängt. Immerhin kann eine normale Chloroplasteninnenstruktur auch ohne Chlorophyll b gebildet werden (Vélemínský und Röbbelen 1966).

Die exakte Analyse quantitativer, molekulare Genwirkungen setzt die Kenntnis der genetischen Grundlagen der Reaktionsnorm und ihrer Modifikation voraus. Zunächst wird es daher Aufgabe der Arbeit sein, diese Voraussetzungen an den o. a. Chlorophyll b-Mutanten zu schaffen. Darüberhinaus wird später die Frage behandelt, unter welchen Bedingungen und in welchem Ausmaß Dauermodifikation auftritt. Hiernach ist vorgesehen, sowohl die molekularen genetischen Grundlagen der Plastidenpigment-Biosynthese zu überprüfen als auch den genphysiologischen Verhältnissen entsprechende biometrische Modelle aufzustellen.

Material und Methoden

Die Vorteile des Untersuchungsobjektes *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. für genetische Untersuchungen, einschließlich der Kultur in definierten Medien, sind bekannt (Rédei 1965). Die verwendeten Stämme sind vollständig homozygote und weitgehend isogene Linien, die durch sorgfältige Einzelpflanzenaufzucht und Saatgutvermehrung aus den Sortimenten von Rédei und Röbbelen gewonnen wurden. Hiroto und Rédei (1963) haben nach Röntgenbestrahlung die folgende Mutantenreihe mit Chlorophyll b-Mangel beschrieben: ch¹ = völlig Chlorophyll b-frei und ch² = stark reduzierter Gehalt. Eine dritte Mutante (ch³) besitzt etwas weniger Chlorophyll b als die Wild-

form (ch⁺); sie wurde inzwischen von Vélemínský und Röbbelen (1966) zusammen mit den beiden anderen Mutanten eingehend auf die feinstrukturelle Differenzierung und Pigmentbildung untersucht. In den vorliegenden Untersuchungen wurde als Wildform die Stammlinie der Mutanten En-2 verwendet. Alle bisher bekannten Spaltungsanalysen und eigene Testkreuzungen (Kranz 1970) sprechen für eine monogene Grundlage der Mutationen, wobei ch¹ und ch² einer Allelenreihe des ch-Locus der Kopplungsgruppe 4 angehören sollen (Lee-Chen und Steinitz-Sears 1967). ch³ (= V 81) ist offenbar zu diesen nicht allel, da die F₁-Pflanzen aus ch¹ × ch³ und ch² × ch³ grün sind (Röbbelen, briefliche Mitteilung).

Die angewandte Pigmentanalytik und Anzuchtbedingungen in einer programmgesteuerten Klimakammer wurden bereits eingehend beschrieben (Kranz 1966 und 1968), so daß hier eine kurzgefaßte Übersicht gegeben werden kann.

Anzucht: Ankeimen des Samens in Petrischalen mit Perlite, Übertragung einzelner Perlitekörnchen mit anhaftenden Keimlingen in das Kultursubstrat, bestehend aus Standarderde mit 8 T. Lehm, 2 T. Torf und 1 T. Sand in Pikierschalen (30 × 50 bzw. 8 × 8 cm). Klimazustände der Kammer waren 16 Std. Licht (15 klx) 25 °C, 50% rel. Feuchte zu 8 Std. Dunkel 15 °C, 80% rel. Feuchte.

Kreuzung: Kastration junger, geschlossener Blüten durch Beseitigung aller Antheren unter der Binokularlupe. Bestäubung durch Überstülpen frisch geöffneter Blüten, zum frühzeitigen Erkennen von Selbstbestäubungen nur zwischen Chlorophyllmutante (♀) × Wildtyp (♂). Reinigung der verwendeten Pinzetten in Alkohol. Zur Vermeidung von Verwechslungen nur eine Bestäubung/Pflanze und Beseitigung aller weiteren Blüten.

Pigmentanalysen: Zur vorbereitenden Beurteilung der Kreuzungsgenerationen Blattfarbenbonitur durch visuellen Vergleich mit Kontrollpflanzen der Eltern. Genaue Überprüfung einzelner Pflanzen mit dem qualitativen, papierchromatischen Serientest (Rédei 1968) aus nur einem Blatt von ~0,5 cm² Fläche. Extrakt in reinem Aceton, Fließmittel 10 T. Petroläther: 1,2 T Aceton, Trennung der Pigmente auf Papierstreifen in Reagenzgläsern 10 Min. aufsteigend, von der Front aus orangefarbige Carotinoide, gelbe Xanthophylle, blaugrünes Chlorophyll a und gelbgrünes Chlorophyll b. Nachweis geringer Spuren von Chlorophyll durch ihre Rotfluoreszenz bei 345 nm. Exakte Analyse aller Blattpigmente mit präparativer Dünnschichtchromatographie auf selbsthergestellten Platten nach Hager und Bertenrath (1962) und Fertigplatten (Merck Kieselgel F 254). Herabsetzung des oxidativen und photischen Chlorophyllabbau durch Verringern des O₂-Gehaltes in der Trennkammer, Lichtabschluß, Ascorbinsäurezusatz und horizontale Entwicklung der Platten. Messung der aufgetrennten Pigmente im registrierenden Spektralphotometer Zeiss RPQ. Quantitative Messung der Farbstoffkonzentration im Gesamtextrakt (80%iges Aceton) am Zeiss PMQ II. Konstanten nach den von Gottschalk und Müller (1964) für Chlorophyll b-Defektmutanten der Erbse bestimmten Werten, bei der Mutante ch¹ z. T. nach den von Egle und Ziegler (1965) berechneten Konstanten.

In vitro-Versuche: Plastidenpräparation nach Anderson und Boardman (1966). Herstellung des Gewebeextraktes aus etiolierten Keimlingen und Protochlorophyllreduktion im Gemisch (Plastidensuspension + Gewebeextrakt) auf der Grundlage des von Röbbelen (1956) angewendeten Verfahrens. Geringe Spuren von Plastidenbruchstücken und Blattpigmenten waren im Gewebeextrakt präparativ nicht auszuschließen.³

³ Für ihre tatkräftige, zuverlässige Mitarbeit danke ich meiner technischen Assistentin Fräulein G. Meyer sowie Herrn stud. rer. nat. W. Geist und W. Herber.

Versuchsergebnisse

Vorangegangene Überlegungen und Vorversuche hatten ergeben, daß keines der vier Pigmentbestimmungsverfahren allein für die Beurteilung von Einzelpflanzen in den Spaltungsgenerationen optimal ist. Die visuelle Blattfarbenbonitur sagt nichts aus über die Zusammensetzung der Blattpigmente, wenn auch es das schnellste Verfahren ist und keine Pflanzen verbraucht werden, die für die Weiterzucht benötigt werden. Der papierchromatische Serientest liefert nur qualitative Informationen über die betreffenden Farbstoffe bei relativ geringem, die Pflanzen jedenfalls nicht schädigenden Materialverbrauch. Die präparative Dünnschichtchromatographie gewährt zwar die genauesten Angaben (Absorptionsspektren) über jedes erfaßte Pigment; der Material- und Zeitbedarf ist aber bei den notwendigen großen Pflanzenzahlen zu hoch. Außerdem sind hierbei zwar absolute Angaben über die Pigmentmengen möglich, in größeren Versuchsreihen jedoch nicht sicher genug zu reproduzieren. Leicht durchzuführen sind dagegen in solchen Untersuchungen die quantitativen Blattpigmentmessungen im Gesamtextrakt. Wir haben daher ein kombiniertes Verfahren zur phänotypischen Klassifizierung angewandt, das die Vorteile der einzelnen Methoden an der richtigen Stelle im Züchtungsverlauf nutzt und deren Nachteile vermeidet (Tab. 1).

Tabelle 1. Anzahl der untersuchten Pflanzen in der Spaltungsanalyse (χ^2 -Test für 3:1- bzw. 1:1-Spaltung.
 $\oplus = P > 0,8$ $\ominus = P < 0,2$)

Phänotypische Klassifizierung						
Versuch Nr.	68-6	gelb	grün	gelb	grün	gelb
	69-8	$ch^1 \times ch^+$	$ch^2 \times ch^+$	$ch^1 \times ch^2$		
70-5						
Diallele Kreuzung						
	P	15	15	14	14	15
Blattfarben-Bonitur						
F_1		59		133		64
		16				
Papierchromato- gr. Test		44 : 118	33 : 76	74 : 96		
	F_2	13 : 38 \oplus				
		8 : 15:5	8 : 16:5	5 : 16:5		
Quantitative Pigment-Messg.	F_3	8 : 20	8 : 21	5 : 21		
		108 : 316				
	R_1	70 : 82				
	ch^1	ch^+	ch^2	ch^+	ch^1	ch^2
	ch^1	.	ch^2	.	ch^1	.
	Genotypische Klassifizierung					

Alle Kreuzungen zwischen dem Wildtyp und den Mutanten ergaben normalgrüne F_1 -Phänotypen bei der Blattfarbenbonitur. In den Folgegenerationen sowie nach Rückkreuzung mit dem Mutantenelter traten Aufspaltungen in eine normalgrüne und eine gelbgrüne Phänotypenklasse auf, die den verwende-

ten Eltern glichen. Bei der Kreuzung der Mutanten untereinander waren alle F_1 -Pflanzen ebenso gelbgrün wie diese und auch in den Folgegenerationen änderte sich das nicht (vgl. Tab. 1). Der darauf in der F_2 an Einzelpflanzen eingesetzte papierchromatographische Test zeigte, daß die gelbgrüne Phänotypenklasse auch in der qualitativen Pigmentzusammensetzung dem betreffenden Mutantenelter entsprach. Alle diese F_2 -Individuen aus der Kreuzung $ch^1 \times ch^+$ enthielten kein Chlorophyll b, diejenigen aus $ch^2 \times ch^+$ sehr wenig Chlorophyll b. Schwierigkeiten bereitete die phänotypische Klassifizierung der F_2 -Pflanzen aus der dritten Kreuzung $ch^1 \times ch^2$. Offenbar gestatten die geringen Pigmentmengen hier keinen sicheren Nachweis des stets reduzierten Chlorophylls b. Abweichungen vom wahren Spaltungsverhältnis sind deshalb dort nicht auszuschließen.

Die aus den F_2 -Pflanzen nachgezogenen F_3 -Linien sowie die R_1 lieferten genügend große Pigmentproben, an denen eine quantitative Messung der drei Hauptpigmente vorgenommen werden konnte. Wiederum wurden in allen Kreuzungsnachkommenschaften zwei Phänotypenklassen erhalten, von denen die eine etwa dreimal soviel Individuen und die gleiche Pigmentqualität und -quantität wie der Wildtyp besaß, die andere dagegen hierin dem Mutantenelter entsprach. Auch in der F_3 aus $ch^1 \times ch^2$ waren die Pflanzen in der muttergleichen Klasse mehr als dreimal so häufig wie die praktisch Chlorophyll b-freien ch^1 -Typen. Der χ^2 -Test für 3:1-, 1:2:1- und 1:1-Spaltung in F_2 , F_3 und R_1 ergab bei 10 von 12 untersuchten Nachkommenschaften mit Wahrscheinlichkeiten zwischen $P = 0,2$ bis 0,8 gute Übereinstimmung zwischen den beobachteten und erwarteten Genotypen für monogene, dominante Vererbung.

Diese Spaltungen zeigen in Übereinstimmung mit den Angaben anderer Autoren (Hirono und Rédei 1963, Lee-Chen und Steinitz-Sears 1967 und Li und Rédei 1969), daß die gekreuzten Genotypen in einem Hauptfaktor, dem ch -Locus, homoallel sind. Das Major-Gen bewirkt im Allelzustand ch^1/ch^+ normale Blattpigmentmengen und -zusammensetzung, beim ch^1/ch^1 -Genotyp reduzierten Pigmentgehalt und vollständige Blockade der Chlorophyll b-Biosynthese und bei der ch^2/ch^2 -Konstitution Pigmentverluste insbesondere im Chlorophyll b.

Die aus den präparativen Dünnschichtchromatogrammen gewonnenen Absorptionsspektren aller in Aceton löslichen Pigmente zeigen die qualitativen und quantitativen Unterschiede noch einmal genauer (Abb. 2). Gegenüber dem Wildtyp ch^1/ch^+ ist bei der Mutante ch^1/ch^1 kein Chlorophyll b-Spektrum vorhanden, Chlorophyll a um etwa 30% reduziert und auch die β -Carotin- und Luteinbildung geringer (um ca. 10%). Auffallend ist der erhöhte Neoxanthin gehalt in der Mutante. Die geringe Verschiebung der Maxima aller Pigmente ist wohl auf Meßfehler zurückzuführen.

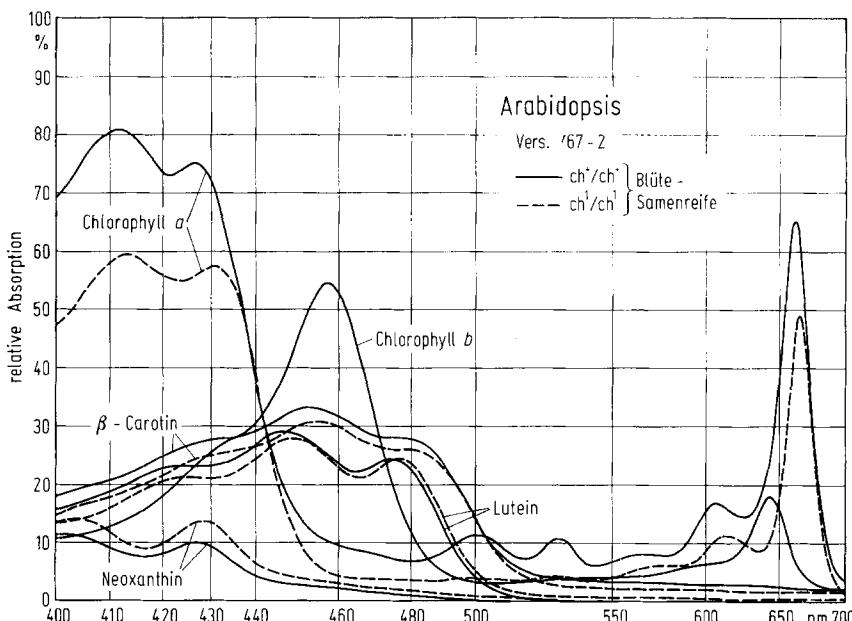


Abb. 2. Absorptionsspektren der durch präparative Dünnschichtchromatographie isolierten Blattpigmente aus blühenden *Arabidopsis*-Pflanzen (Vers. Nr. 67-2). Durchgezogene Linien (Wildtyp ch^+/ch^+) und gestrichelte Kurven (Mutante ch^1/ch^1) folgen der relativen Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge

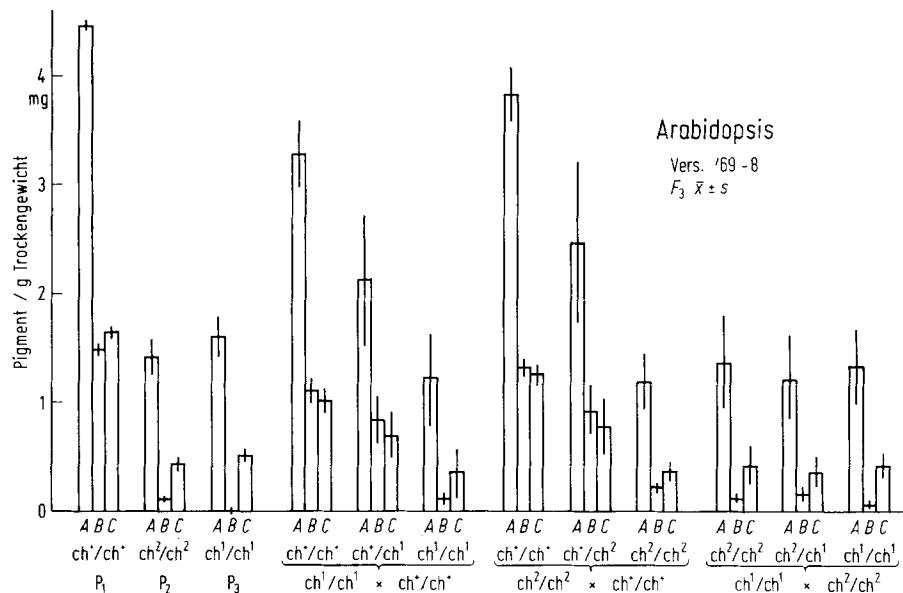


Abb. 3. Mittlerer Pigmentgehalt ($x \pm s$) blühender Pflanzen der Eltern (P_1 , P_2 , P_3) und ihrer nach Kreuzung in F_3 erhaltenen Genotypen. Versuch Nr. 69-8, quantitative Pigmentmessung im 80%igen Aceton-Gesamtextrakt

A = Chlorophyll *a* mg/g Trockengewicht; B = Chlorophyll *b* mg/g Trockengewicht
C = Carotinoide mg/g Trockengewicht

Auch die quantitativen Pigmentanalysen der F_3 -Liniengruppen ergaben, daß vom *ch*-Locus pleiotrope Genwirkungen ausgehen, die alle drei Hauptpigmente, Chlorophyll *a* und *b* sowie die Carotinoide zur Blütezeit verändern (siehe Abb. 3). Außerdem ist an den Säulenhöhen des Diagramms zu sehen, daß die den Eltern entsprechenden Rekombinantengruppen insgesamt et-

was niedrigere Chlorophyll *a*- und Carotinoidwerte sowie wenig höhere Chlorophyll *b*-Werte bei den mutantengleichen Genotypen besitzen; letzteres ist aber statistisch nicht zu sichern, denn es liegt noch im Grenzbereich der meßmethodischen Fehler. In allen F_3 -Genotypen sind die Streuungen wesentlich größer als bei den Eltern P_1 , P_2 und P_3 , was auf einen polygenen Hintergrund hinweist.⁴

Die heterozygoten F_3 -Individuen haben intermediäre Pigmentmengen mit stärkerer Expressivität des Wildallels, so daß relativ niedrige Chlorophyll-Quotienten erhalten werden (Tab. 2). In der Kreuzung zwischen den rezessiven Mutanten ergaben die heterozygoten F_3 -Pflanzen schwach heterotische Chlorophyll *b*-Gehalt, der auf begrenzte Superdominanz des ch^2 -Allels schließen läßt.⁵ Das Verhalten der Carotinoide entspricht bei den einzelnen Genotypen weitgehend dem des Chlorophylls *a*; daher sind auch im Verhältnis der Chlorophylle *a* und *b* zu den Carotinoiden keine spezifischen Abweichungen gegenüber dem reinen Chlorophyllquotienten vorhanden.

Insgesamt betrachtet, gehen offenbar vom Allelzustand ch^1/ch^1 sowohl qualitative, die Chlorophyll *b*-Synthese blockierende als auch quantitative, die gesamte Blattpigmentbildung reduzierende Wirkungen aus. In der genotypischen Konstitution ch^2/ch^2 ist die Blockade der Chlorophyll *b*-Bildung teilweise aufgehoben, d.h. auch hier ist eine quantitative Wirkung festzustellen. Bei den Heterozygoten liegen komplementative Effekte vor, die die Hemmung der Chlorophyll *b*-Bildung teilweise aufheben.

⁴ Der *F*-Test lieferte mit $\alpha < 0,025$ signifikant verschiedene Varianzen zwischen den entsprechenden Genotypen der F_3 und P_{1-3} .

⁵ Der *t*-Test ergab mit $\alpha < 0,05$ signifikante Differenz der \bar{x} zwischen ch^2/ch^2 und ch^2/ch^1 .

Tabelle 2. Pigmentquotienten in den Rekombinanten und Heterozygoten einiger Kreuzungsnachkommen des ch-Locus

Genotyp	Generation							
	<i>P</i>		<i>F</i> ₁		<i>R</i> ₁		<i>F</i> ₃	
	<i>CA/CB</i> ,	<i>CA + CB/CC</i>	<i>CA/CB</i> ,	<i>CA + CB/CC</i>	<i>CA/CB</i> ,	<i>CA + CB/CC</i>	<i>CA/CB</i> ,	<i>CA + CB/CC</i>
<i>ch</i> ⁺ / <i>ch</i> ⁺	3.02	3.58	—	—	3.88	3.14	2.91	4.10
<i>ch</i> ⁺ / <i>ch</i> ¹	—	—	3.06	3.37	—	—	2.54	4.30
<i>ch</i> ¹ / <i>ch</i> ¹	∞	3.10	—	—	24.16	2.67	22.17	3.23
<i>ch</i> ⁺ / <i>ch</i> ²	—	—	—	—	—	—	2.68	4.35
<i>ch</i> ² / <i>ch</i> ²	12.82	3.53	—	—	—	—	11.42	3.55
<i>ch</i> ² / <i>ch</i> ¹	—	—	—	—	—	—	7.18	3.86

Tabelle 3. Ergebnisse orientierender In-vitro-Versuche zur Frage einer enzymatisch blockierten Chlorophyll b-Biosynthese

Probenzusammensetzung	Plastiden	Extrakt	Versuch 1 10 Min. Licht			Versuch 2 120 Min. Licht	Versuch 3 180 Min. Licht	Versuch 4 30 Min. Dunkel
			<i>CA mg/g Tp</i>	<i>CB mg/g Tp</i>	<i>CA/CB</i>			
<i>ch</i> ⁺ / <i>ch</i> ⁺	<i>ch</i> ⁺ / <i>ch</i> ⁺	—	1.422	0.458	3.1	2.6	3.7	3.0
<i>ch</i> ¹ / <i>ch</i> ¹	<i>ch</i> ¹ / <i>ch</i> ⁺	—	0.654	0.093	7.0	22.3	76.0	∞
<i>ch</i> ² / <i>ch</i> ²	<i>ch</i> ⁺ / <i>ch</i> ⁺	—	0.443	0.083	5.3	7.4	8.1	—
Kontrolle	{ <i>ch</i> ⁺ / <i>ch</i> ⁺	—	3.261	1.208	2.7	—	—	2.2
	{ <i>ch</i> ¹ / <i>ch</i> ¹	—	3.532	— 0.061*	— 57.9	—	—	24.1
	{ <i>ch</i> ² / <i>ch</i> ²	—	3.186	0.173	18.4	—	—	6.5

* noch innerhalb des meßmethodischen Fehlers von 3%;

CA = Chlorophyll *a*, *CB* = Chlorophyll *b*, *CC* = Carotinoide, *Tp* = Probentrockengewicht

Diese mit den klassischen Methoden der Genetik gewonnenen Ergebnisse sagen nun noch nichts aus über das Wirkungsprinzip des *ch*-Locus. Geht man zunächst davon aus, daß die Chlorophyll *b*-Bildung in Analogie zu der des Chlorophylls *a* (Röbbelen 1956) durch eine gekoppelte photochemische und eine enzymatische Reaktion aus Protochlorophyllvorstufen oder Chlorophyll *a* entsteht, so müßten sich die Existenz eines Enzyms und die photochemische Reaktion in einer In-vitro-Versuchsreihe nachweisen lassen. Hierzu wurden Plastidensuspensionen der beiden Mutanten mit chloroplastenfreien Gewebeextrakten des Wildtyps vereinigt und danach verschiedene Belichtungszeiten bei Zimmertemperatur angewandt (Tab. 3). Schon nach einer Belichtung von 10 Minuten ist in den zellfreien Gemischen mit den Mutanten überhaupt bzw. mehr Chlorophyll *b* vorhanden als in den Kontrollen; daher sind die Chlorophyllquotienten hier kleiner als bei diesen. Wird die Belichtungszeit verlängert, so nehmen die Pigmentquotienten entsprechend zu. Wird das Gemisch 30 Minuten verdunkelt, so wird kein Chlorophyll *b* nachgewiesen. Jedoch ist bei keiner Behandlung in den Gemischen mit den Mutanten das normale Chlorophyll *a/b*-Verhältnis von etwa 3:1 erreicht. Am zellfreien Zustand allein kann dies nicht liegen, da das Gemisch aus dem reinen Wildtyp den normalen Quotienten liefert. Entweder liegen hier spezifische Veränderungen in der Enzymaktivität vor, oder die verschiedenen Substrate bewirken die

quantitativen Hemmungen der Chlorophyll *b*-Synthese.

Genauere Aussagen werden erst dann möglich sein, wenn verbesserte Nachweismethoden der Chlorophyllvorstufen und ihrer Übergangsprodukte erarbeitet sind. Ein Derivativ-Spektrophotometrie-Verfahren wird von uns hierfür z. Z. entwickelt. Die bisher beobachteten Reaktionen werden dahingehend gedeutet, daß die Chlorophyll *b*-Bildung in den Mutanten ganz bzw. teilweise genetisch blockiert wird, indem ein Wirkstoffprinzip nicht oder quantitativ reduziert im plastidenfreien, wäßrigen Extrakt des Wildtyps vorhanden ist. Erst nach Zugabe des Extrakte zur Plastidensuspension der Mutante wird die Chlorophyll *b*-Bildung im Licht ermöglicht.

Diskussion

Die biometrischen Probleme der Genetik quantitativer Merkmale werden sowohl durch die Nachweis-schärfe für den Phänotyp als auch von der genetischen Nachweisgrenze her bestimmt. Wenn auch die Beschreibung eines Gen/Phän-Verhältnisses mit den statistischen Verfahren der Varianz- und Kovarianzanalyse nicht problematisch ist, so bereitet doch die mathematische Formulierung eines Modells vielseitige Schwierigkeiten, das den möglichen genetischen Situationen (Additivität, Multiplikativität, Dominanz, Epistasie usf.) gerecht wird (Seyffert 1960, Weber 1967). In unserem Fall wäre zunächst zu entscheiden, ob und in welchem Umfang die untersuchten Blatt-

pigmentmerkmale durch Polygene oder Homoallele eines Locus beeinflußt werden; auch ein gemischtes Modell wäre denkbar. Die vorliegenden Kreuzungsergebnisse zeigen, daß jedenfalls ein Hauptgen im Spiel ist. Die in den Spaltungsgenerationen erhöhten Varianzen deuten einen evtl. polygenen Hintergrund an, doch bleibt dessen Wirkungsspektrum in der Blattpigment-Synthese begrenzt. Es ist eine Frage der Genphysiologie, ob nun die geprüften Genotypen einem Cistron zugeordnet sind. Zur Klärung lassen sich hier leider nicht die verfeinerten Nachweismethoden der Mikrobengenetik anwenden. Im o. a. Spaltungsexperiment verhalten sich jedenfalls die Genzustände der Mutanten wie Allele, die einem Cistron angehören. Auch die Fragen, ob dieser *ch*-Locus sich in mehreren Primäreffekten pleiotrop verhält oder über viele sekundäre Auswirkungen das Polypäne Blattpigmente beeinflußt, lassen sich nur genphysiologisch befriedigend beantworten. Insofern erscheint es im vorliegenden Fall auch nicht sinnvoll zu sein, ohne Kenntnis der Genfunktion des *ch*-Locus in der Biosynthese der Blattpigmente vorweg zwischen allgemein physiologischen und formalgenetischen Korrelationen zu unterscheiden, wie dies Barthelmes (1964) für die mit dem Blühalter der *Arabidopsis* verbundenen Merkmalskorrelationen versuchte.

Die Spezifität des *ch*-Locus für die Synthese des Chlorophylls *b* (*CB*) bzw. deren Blockade haben kürzlich Li und Rédei (1969) auch dadurch nachweisen können, daß sie in heterozygoten *ch⁺/ch¹*-Pflanzen mit Röntgenstrahlen und Äthylmethansulfonat somatische Mutationen auslösten, die kein *CB* mehr bildeten. Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen, daß darüberhinaus eine Pleiotropie der Allele *ch⁺*, *ch¹* und *ch²* sowie auch der zu einem anderen Gen gehörigen Mutante *ch₃* hinsichtlich der Gesamtmenge der Plastidenpigmente vorhanden ist; d. h. die rezessiven Heterozygoten bilden auch signifikant weniger Chlorophyll *a* (*CA*) und Carotinoide (*CC*) und die Heterozygoten mit Ausnahme des Genotyps *ch²/ch¹* erreichen nicht ganz den Farbstoffgehalt des Wildtyps (vgl. Abb. 3). Hierbei besteht aber kein positiv linearer Zusammenhang zwischen der synthetisierten Quantität an *CB* und *CA*. Die Rangfolgen der Genotypen sind für *CA* *ch⁺/ch⁺* > *ch¹/ch¹* > *ch²/ch²* > *ch₃/ch₃*, jedoch für *CB* *ch⁺/ch⁺* > *ch²/ch²* ≈ *ch₃/ch₃* > *ch¹/ch¹*. Die *CB*-freien *ch¹/ch¹*-Pflanzen bilden mehr *CA* als die Chlorophyllmangelmutanten *ch²* und *ch₃*. Dieses Ergebnis liefert ein Argument gegen die häufig vertretene Vorstellung (Marks 1966), daß *CB* sozusagen substratabhängig aus einem primär aufgebauten *CA*-Pool gebildet würde.

Die signifikante Erhöhung des *CB*-Gehaltes der Heterozygoten *ch²/ch¹* gegenüber ihren Eltern zeigt eine geringe Superdominanz des *ch²*-Allels gegenüber dem *ch¹*-Allel. Bei *Arabidopsis* sind solche Superdominanzreaktionen offenbar nicht selten, denn schon Wricke (1955) fand diese im Gesamtchlorophyll induzierter Autopolyploider sowie Li und Rédei (1969)

unter Mutanten des Thiaminstoffwechsels. Dort liefern homoallele Hybriden von Mutanten, die den Pyrimidinanteil des Thiamins benötigen, den biochemischen Beweis für die Superdominanz-Hypothese. Unsere Untersuchungsergebnisse ergänzen diese Beobachtungen; offenbar wirkt der *ch*-Locus mit seinen Allelen primär sowohl auf verschiedene Stellen der Plastidenpigment-Biosynthese als auch im verstärkten Maße auf einen entscheidenden Reaktionsschritt in der *CB*-Synthese ein. Komplementative Effekte heben in den Heterozygoten und Rekombinanten die Blockade des zweiten Chlorophylls teilweise auf.

Wie an zahlreichen *albino*-Mutanten beim Mais festgestellt wurde (Faludi, Daniel und Kelemen 1960), vermag ein primärer Defekt in der *CC*-Bildung die Chlorophylle sekundär zu zerstören infolge einer hierdurch ermöglichten Ausbleichung im Starklicht. Die Chlorophyll-Synthese der Mutanten des *ch*-Locus kann aber, wie in den folgenden Teilen der Publikation noch ausführlich belegt wird, auch im selektiven Schwachlicht nicht vollständig normalisiert werden, d. h. für das Hauptgen *ch* trifft ein solcher sekundärer Ausbleichungseffekt nicht zu. Damit entfällt auch die Möglichkeit eines primären Leucin-Defekts, der bekanntlich einen Engpaß in der *CC*-Synthese bestimmter Pigmentmangelmutanten des Weizens und der Gerste hervorruft (Walles 1967). Bei den hier untersuchten *Arabidopsis*-Mutanten ist damit wohl auch die beim Mais nachgewiesene Teilzerstörung der Plastidenpigmente infolge eines photooxydativen Katalaseabbaus (Mitchell und Anderson 1965) unwahrscheinlich. Vielmehr weisen die Ergebnisse unserer orientierenden Versuche im zellfreien Zustand (siehe Tab. 3) auf ein Wirkstoffprinzip hin, das im belichteten plastidenfreien Extrakt der Normalform quantitativ die *CB*-Synthese reguliert.

Zusammenfassung

In biometrischen Untersuchungen zur Genetik quantitativer Merkmale wird bisher weitgehend das Problem der Genregulation übersehen. Chlorophyll *b*-Defektmutanten der Crucifere *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. erlauben eine direkte biochemische und physiologische Prüfung ihrer quantitativen Genwirkungen in der Biosynthesekette der Plastidenpigmente. Auf Grund bestimmarer Testkreuzungen zwischen zwei Mutanten und der Normalform sowie eines kombinierten Verfahrens zur phänotypischen Klassifizierung bestehend aus präparativer Dünnenschichtchromatographie aller Plastidenpigmente, visueller Blattfarbenbonitur, papierchromatographischem Einzelplanzentest und quantitativer Pigmentmessung der Linien werden in Übereinstimmung mit anderen Autoren die nachweisbaren Genotypen einer Allelenreihe *ch⁺*, *ch¹* und *ch²* des *ch*-Locus zugeordnet. *ch¹/ch¹* blockiert die Chlorophyll *b*-Synthese vollständig, *ch²/ch²* nur etwa zu 90% gegenüber dem Wildtyp und in der Heterozygote *ch²/ch¹* wird offen-

bar die Blockade durch komplementative Effekte noch stärker aufgehoben (Superdominanz des *ch²*-über das *ch¹*-Allel). Die in den Spaltungsgenerationen erhöhten Chlorophyll- und Carotinoid-Varianzen aller Genotypen gegenüber den Eltern weisen auf einen evtl. polygenen Hintergrund der Gesamtpigmentbildung hin, dessen physiologischer Wirkungsbereich aber relativ zu dem des Hauptgens *ch* begrenzt ist. Orientierende In-vitro-Versuche ergeben, daß im plastidenfreien Blattgewebe-Extrakt des Wildtyps *ch⁺/ch⁺* ein Wirkstoffprinzip vorhanden ist, das belichtete Chloroplasten der *in vivo* pigmentdefekten Genotypen *ch¹/ch¹* und *ch²/ch²* zur Chlorophyll *b*-Synthese befähigt. Weiterführende Aussagen über Art, Umfang und Zeitpunkt der hierbei angenommenen Enzymaktivitäts- bzw. Substratsänderungen werden von Versuchen mit variierten Strahlungsbedingungen und verbesserten Nachweismethoden der Pigmentvorstufen erwartet.

Literatur

1. Anderson, J. M., Boardman, N. K.: Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis. I. Chlorophyll contents and photochemical activities of particles isolated from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 403–421 (1966).
2. Barthelmes, I.: Merkmalskorrelationen und Selektion bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Z. Pflanzenzücht.* **52**, 272–332 (1964).
3. Egle, K.: Biogenese des Chlorophylls, Vorstufen, Beziehungen zum Hämin, Protochlorophyll. *Handb. Pflanzenphysiol.* **V**, 323–353 (1960).
4. Egle, K., Ziegler, R.: Zur quantitativen Analyse der Chloroplastenpigmente. I. Kritische Überprüfung der spektralphotometrischen Chlorophyll-Bestimmung. *Beitr. Biol. Pfl.* **41**, 11–37 (1965).
5. Faludi, B., Daniel, A. F., Kelemen, G.: Increased photosensitivity of leaf pigments and its relation to the respiratory system in *albino* mutants of corn. *Physiol. Plantarum* **13**, 227–236 (1960).
6. Feenstra, W. J.: Production of thiamineless mutants. *Arabid. Inf. Serv.* **2**, 24 (1965).
7. Gottschalk, W., Müller, F.: Quantitative Pigmentuntersuchungen an strahleninduzierten Chlorophyllmutanten von *Pisum sativum*. I. Die Letalmutanten. *Planta* **61**, 259–282 (1964).
8. Grannick, S.: The heme and chlorophyll biosynthetic chain. In: T. W. Goodwin, *Biochemistry of Chloroplasts* **2**, 373 to 410. London and New York: Academic Press 1967.
9. Hager, A., Bertenrath, T.: Verteilungschromatographische Trennung von Chlorophyllen und Carotinoiden grüner Pflanzen an Dünnschichten. *Planta* **58**, 564–568 (1962).
10. Heß, D.: *Biochemische Genetik*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.
11. Hirono, Y., Rédei, G. P.: Multiple Allelic Control of Chlorophyll *b* Level in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **197**, 1324–1325 (1963).
12. Kranz, A. R.: Stoffproduktion und Assimilationsleistung in der Evolution der Kulturpflanzen. I. Einführung und experimentelle Grundlagen. *Biol. Zbl.* **85**, 597–626 (1966).
13. Kranz, A. R.: The fixation of radiation energy during the development in chlorophyll *b* deficient mutants of *Arabidopsis*. *Arabid. Inf. Serv.* **5**, 56–57 (1968).
14. Kranz, A. R.: Interallele Wechselwirkung und Pleiotropie des *ch*-Locus von *Arabidopsis*. *Arabid. Inf. Serv.* **7**, 28–30 (1970).
15. Lee-Chen, S., Steinitz-Sears, L. M.: The location of linkage groups in *Arabidopsis thaliana*. *Canad. J. Genet. Cytol.* **IX**, 381 to 384 (1967).
16. Li, S. L., Rédei, G. P.: Direct Evidence for Models of Heterosis provided by Mutants of *Arabidopsis* Blocked in the Thiamine Pathway. *Theor. Appl. Genet.* **39**, 68–72 (1969).
17. Marks, G. S.: The biosynthesis of heme and chlorophyll. *Bot. Rev.* **32**, 56–94 (1966).
18. Mitchell, R. L., Anderson, I. C.: Catalase Photooxidation. *Science* **150**, 72 (1965).
19. Rédei, G. P.: Genetic blocks in the thiamine synthesis of the angiosperm *Arabidopsis*. *Amer. J. Bot.* **52**, 834–841 (1965).
20. Rédei, G. P.: *Arabidopsis* for the classroom. *Arabid. Inf. Serv.* **5**, 5–7 (1968).
21. Rédei, G. P., Li, S. L.: Effects of X rays and ethyl methanesulfonate on the chlorophyll *b* locus in the soma and on the thiamine loci in the germline of *Arabidopsis*. *Genetics* **61**, 453–459 (1969).
22. Röbbelen, G.: Über die Photochlorophyllreduktion in einer Mutante von *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **47**, 532–546 (1956).
23. Röbbelen, G.: Untersuchungen an strahleninduzierten Blattfarbmutanten von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Z. indukt. Abstamm.-Vererb. lehre* **88**, 189–252 (1957a).
24. Röbbelen, G.: Eine Blattfarbmutter ohne Chlorophyll *b* von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Naturwissenschaften* **44**, 288–289 (1957b).
25. Röbbelen, G.: Genbedingte Rotlicht-Empfindlichkeit der Chloroplastendifferenzierung bei *Arabidopsis*. *Planta* **80**, 237–254 (1968).
26. Seyffert, W.: Untersuchungen über die Vererbung quantitativer Charaktere an *Arabidopsis thaliana* (L.). *Z. Pflanzenzücht.* **42**, 356–401 (1960).
27. Vélemínský, J., Röbbelen, G.: Beziehungen zwischen Chlorophyllgehalt und Chloroplastenstruktur in einer *chlorina*-Mutante von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **68**, 15–35 (1966).
28. Walles, B.: Use of biochemical mutants in analysis of chloroplast morphogenesis. In: T. W. Goodwin, *Biochemistry of Chloroplasts* **2**, 633–653. London and New York: Academic Press 1967.
29. Weber, E.: Mathematische Grundlagen der Genetik. In: H. Stubbe, *Genetik-Grundlagen, Ergebnisse und Probleme in Einzeldarstellungen*, Bd. **5**, 1–464. Jena: VEB Gustav Fischer 1967.
30. Wricke, G.: Ein Fall von Superdominanz bei einer experimentell hergestellten Autotetraploidie von *Arabidopsis thaliana*. *Z. indukt. Abstamm.-Vererb. lehre* **87**, 47–64 (1955).

Eingegangen am 29. Juli 1970

Angenommen durch W. Seyffert

PD Dr. A. R. Kranz
Botanisches Institut
J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main
Siesmayerstr. 70
D-6 Frankfurt/Main (BRD)