

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

Teil 2: Modifikation primärer und sekundärer Genwirkungen durch langwellige Strahlung bei monogenen Chlorophyll *b*-Defektmutanten¹

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 2: Modification of primary and secondary genetic effects of single-gene chlorophyll-*b* mutants by long-wave irradiation

Summary. An analysis of the quantitative molecular effects of genes requires information on the norm of reaction ("Reaktionsnorm") and on its variability in the genotype tested.

1) Experiments were carried out in an automatically controlled growth chamber to determine the optimal conditions for the norm of reaction of the plants to be tested. Genotypically determined variances between the characters studied and differences of means between test samples were most frequently significant when the growth conditions were those of an intermittent 16 hour day.

2) Changes in the transmitted radiation to wavelengths of above 500 nm or 600 nm respectively, while keeping the total radiant energy input constant, led to certain characteristic modifications in three of the mutants and in the wild type of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Four ontogenetic stages were affected. The mutants are monogenic defect mutants for synthesis of chlorophyll *b*; two different gene loci are involved.

3) Treatment with radiation of wavelengths above 600 nm (filtered red light) results in marked developmental disorders, after 100 days (three times the normal growth period) leaf rosettes had not yet developed. Moreover, leaf pigment and dry matter production of the wild type decreased by about 20 to 30 percent as compared with production in unfiltered normal light.

4) Filtered yellow light of wavelengths above 500 nm decreases the biosynthesis of chlorophyll *a* and of the carotenoids and the net assimilation rate, but does not influence chlorophyll *b* production, leaf area index and apparent use of radiant energy. Each of the genotypes, however, shows a different reaction to the same radiation treatment. Furthermore, each shows characteristic differences in response to altered quality of radiation. The wild type and the mutant *ch*²/*ch*² show certain similarities which are not shared by the two other genotypes *ch*¹/*ch*¹ and *ch*₃/*ch*₃. The latter two are characterized by more serious plastid defects.

5) The *ch*-locus has a primary effect on biosynthesis of chlorophyll *b* and secondary physiological effects on production of other leaf pigments and dry matter. When chlorophyll *b* is absent, there is no increase, but rather a reduction of the amount of chlorophyll *a*; however, there is no quantitative correlation between production of the two chlorophylls. The primary genetic effect of the two mutant loci is discussed, in accordance with Shibata's model of chlorophyll transformations. The secondary pleiotropic gene effects on dry matter production are probably due to additional binding of radiant energy by chlorophyll *b* and by the carotenoids. Complex interactions between the effects of the genes, and between gene effects and environmental effects must also be considered.

Umweltbedingungen können eine im Genom begründete Entwicklung auslösen bzw. zwischen alternativen im Genom vorbereiteten Möglichkeiten entscheiden. Dies gilt nicht nur für die Qualität der Reaktionen, sondern auch für ihre Quantität. Das ursprüngliche Konzept der Reaktionsnorm von Woltereck (1911) umfaßte zunächst nur die spezifischen, phänotypischen Wirkungen der verschiedenen Allele eines Gens, die durch die Umweltbedingungen determiniert werden. Sicher kann aber auch ein Reaktionsbereich aus den Wirkungen mehrerer Gene resultieren, die wiederum von zahlreichen Umweltparametern beeinflußt werden. Die Reaktionsmöglich-

keiten eines Genotyps werden daher wohl immer von einer Fülle von inneren und äußeren Faktoren reguliert (Mohr 1969). Die Spezifität dieser Möglichkeiten ergibt sich somit allein aus der Differenz verschiedener Genotypen und Umweltbedingungen. So wird auch die Reaktionsnorm einer Mutante erst durch Vergleich mit dem Wildtyp in einer veränderten Umwelt zu erfassen sein.

Einführung

Die exakte Analyse quantitativer, molekularer Genwirkungen setzt die Kenntnis der genetischen Grundlagen der Reaktionsnorm und ihrer Modifikation voraus. Im ersten Teil dieser Publikation wurde die genetische Grundlage abgestufter Chlorophyll *b*-

¹ Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die gewährten Sachbeihilfen.

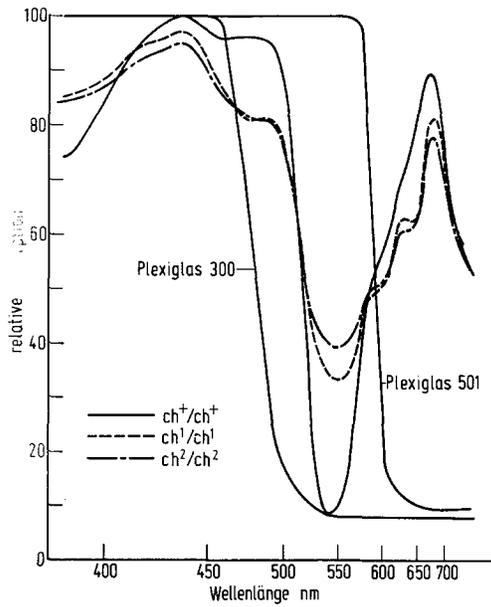


Abb. 1. Absorptionsspektren ganzer Blätter des Wildtyps ch^+/ch^+ , der Mutanten ch^1/ch^1 und ch^2/ch^2 sowie der verwendeten Plexiglasfilter. Die Blätter erhalten unter dem Filter Nr. 300 nur Gelblicht der Wellenlängen $> \sim 500$ nm und unter dem Filter Nr. 501 nur Rotlicht der Wellenlängen $> \sim 600$ nm

Defekte bei *Arabidopsis thaliana* untersucht (Kranz 1970). Wie dort bereits angekündigt wurde, sollte nun versucht werden, durch qualitative, energiegleiche Strahlungsänderung Merkmalsmodifikationen zu induzieren. Hierzu mußte ein geeigneter Strahlungsbereich bestimmt werden.

Aus den Absorptionskurven der verwendeten Plexiglasfilter in Abbildung 1 ist zu sehen, daß neben der ungefilterten Normallichtbehandlung mit Leuchtstoffröhren (vgl. hierzu auch Tab. 1) gefilterte Strahlung der Wellenlängen > 500 bzw. > 600 nm verwendet wurde. Dieser Strahlungsbereich erschien aus folgenden Überlegungen zur Erzeugung spezifischer Modifikationen bei den Chlorophyll *b*-Defektmutanten günstig und erfolgversprechend zu sein:

1. Vorangegangene Untersuchungen von Rédei (1965), Velemínský und Röbbelen (1966), Röbbelen (1968) sowie Kranz (1968) hatten ergeben, daß durch langwellige Strahlung die Plastidenstruktur und -funktion von *Arabidopsis* modifiziert werden können.

2. Das bekannte Aktionsspektrum der Chlorophyll-Synthese wird nur teilweise, das für die Bildung der Carotinoide kaum vom Ausfall der Strahlen < 550 nm betroffen (Virgin 1964, Goodwin 1965).

3. Nur die Chlorophylle absorbieren Strahlen über 550 nm, die Carotinoide dagegen nicht mehr. Die Absorption durch das Chlorophyll *a* ist dort relativ größer als die durch das Chlorophyll *b*.

4. Alle lichtinduzierten Absorptionsänderungen bei ~ 520 nm, die mit dem β -Carotin und Chlorophyll *b* in Verbindung gebracht wurden und ein Indikator für das Photosystem II der Photosynthese sein sollen (Levine 1969), sind hierdurch ausgeschaltet.

Tabelle 1. Programmgesteuerte Versuchsbedingungen in der Klimakammer III. Im Versuch 66-10 wird die Lichtqualität variiert bei energiegleicher Strahlung im Transmissionsbereich. Die gesamte Strahlungsenergie nimmt entsprechend der Einengung des Spektrums ab

Objekt	Linie	Genotyp	Substrat	Temperatur		rel. Feuchte		Strahlung	
				hell	dunkel	hell	dunkel	Normallicht	Rotlicht
<i>En-2</i>	ch^+/ch^+		8 T. Lehm	16 Std.	8 Std.	hell	dunkel	300-750 nm	600-750 nm
<i>ch¹</i>	ch^1/ch^1		2 T. Torf	25 \pm 2 °C	15 \pm 2 °C	55 \pm 5%	75 \pm 5%	12 \times TLF 65/55	12 \times TLF 65/55
<i>ch²</i>	ch^2/ch^2		1 T. Sand	25 \pm 2 °C	15 \pm 2 °C	55 \pm 5%	75 \pm 5%	12 \times WU 65/25	12 \times WU 65/25
<i>ch₃</i>	ch_3/ch_3							32,1 cal \cdot cm ⁻² \cdot d ⁻¹	20,2 cal \cdot cm ⁻² \cdot d ⁻¹

5. Subletale Effekte, die das Phytochromsystem (Mohr 1969) und die normale Reproduktionsrate verändern, treten hier noch nicht störend auf.

6. Die mutagene Wirkung des Strahlungsbereichs > 500 nm ist relativ gering und somit eine direkte Beeinflussung der molekularen Erbinformations-träger unwahrscheinlich (Zetterberg 1964).

Man kann also davon ausgehen, daß mit solchen spezifischen Strahlungsbehandlungen gegenüber den nur einmalig anwendbaren chemischen Antimetaboliten konstante Einwirkungsmöglichkeiten in das quantitative genphysiologische Geschehen eines höheren Organismus gegeben sind. Durch die Lichtbehandlung mit Wellenlängen > 550 nm sind hiernach folgende Modifikationen zu erwarten:

1. Eine quantitative Reduktion der primären Wirkung des *ch*-Locus auf die Chlorophyll *b*-Synthese, die beim Wildtyp besonders stark ausfallen müßte.

2. Eine Hemmung der pleiotropen Genwirkungen auf die postulierte Rolle des Chlorophylls *b* und des β -Carotins im Photosystem II der Photosynthese, die unabhängig vom Allelzustand des *ch*-Locus sein könnte.

3. Folglich eine drastische Herabsetzung der Assimilationsleistung und Stoffproduktion, die bei den pigmentdefekten Genotypen am stärksten wäre.

Methoden und Versuchsaufbau

Wie hier und in früheren Untersuchungen (Kranz 1967a und 1968) bereits festgestellt wurde, gehen von den mutierten Loci neben ihrer typischen Wirkung auf die Chlorophyll *b*- (*CB*) Biosynthese pleiotrope Effekte auf die Chlorophyll *a*- (*CA*) und Carotinoid- (*CC*) Bildung sowie die Stoffproduktionsmerkmale Blattflächenindex (*LI*), Nettoassimilationsrate (*NAR*) und apparente Strahlungsenergienutzung (*EAG*) aus. Daher wurden auch diese Nebenwirkungen mit in die Untersuchungen einbezogen.

Der Versuchsplan war hierarchisch gegliedert und umfaßte zunächst folgende Faktoren:

a_{1-4} = 4 Genotypen (ch^+/ch^+ , ch^1/ch^1 , ch^2/ch^2 und ch_3/ch_3)

b_{1-4} = 4 Ontogenesestadien (Jungpfl., Rosette, Blüte, Samenreife)

c_{1-3} = 3 Lichtbehandlungen (Normal-, Gelb- und Rotlicht)

d_{1-6} = 6 Merkmale (*CA*, *CB*, *CC*, *LI*, *NAR*, *EAG*).

Mit ihnen wurde eine vollständige Varianzanalyse durchgeführt. Die Signifikanz der Differenz zwischen zwei Versuchsfaktoren konnte bei paarweiser Zuordnung der Meßwerte mit dem *t*-Test bestimmt werden (Sokal und Rohlf 1969). Sämtliche numerischen und statistischen Rechenoperationen wurden mit dem Tisch-Computer Programm 101 ausgeführt.

Besonders beachtet wurde die weitgehende Konstanz aller Versuchsbedingungen. So wurden die Pflanzen während der gesamten Versuchszeit in der gleichen programmgesteuerten Klimakammer herangezogen. Die hierbei eingehaltenen Bedingungen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Die sonstigen Kulturbedingungen wurden bereits beschrieben (Kranz 1971). Stets wurde die gleiche Anzahl von 160 Pflanzen in eine Pikierschale gebracht, so daß bei Versuchsbeginn gleiche Bestandesdichten ($7,9$ cm² Standfläche/Pfl.) vorlagen. Von jedem Prüfglied wurden vier Proben entnommen, nachdem mehr als die Hälfte der Pflanzen die wie folgt definierten Ontogenesestadien

erreicht hatten: 1) Jungpflanze = ca. 8 Blätter/Pfl. mit deutlich erkennbarem Blattstiel. 2) Rosettenstadium = Terminalknospe des Blütenstandes gerade sichtbar. 3) Blütezeit = mindestens eine Blüte voll entfaltet. 4) Samenreife = mindestens ein Schötchen geplatzt. Diese Proben enthielten jeweils 200 bis 80 Einzelpflanzen, die entsprechend ihrer altersabhängigen Größe innerhalb einer Schale zufällig verteilt ausgewählt wurden. An ihnen konnten die Untersuchungsmerkmale in der Reihenfolge bestimmt werden²: Blattflächenmessung (Kranz 1964) Gefriertrocknung, Gewichts- und Chlorophyll- bzw. Kalorienbestimmung (Kranz 1966). Die Absorptionskurven der verwendeten Röhren und Haas-Plexiglasfilter Nr. 300 bzw. 501 und von ganzen Blättern der untersuchten *Arabidopsis*-Genotypen wurden mit dem registrierenden ZEISS-Spektralphotometer RPQ aufgenommen. Die Strahlungsmessungen werden mit zwei Bellani-Kugelpyranometern bzw. dem Robertson-Holmes-Selektivphotometer durchgeführt (Kranz 1967b).

Ergebnisse

Reaktionsnorm: Zunächst wurde in Vorversuchen geklärt, welche kontrollierbaren Umweltparameter eine möglichst optimale Erfassung der in den drei Mutanten gegenüber dem Wildtyp veränderten Merkmale erlauben. Auf Grund eigener Erfahrungen und der schon erwähnten Experimente von Rédei und Röbbelen war zu erwarten, daß der günstigste Klimabereich zwischen 15 und 25 °C sowie 80 und 50% rel. Feuchte bei einer Tageslänge von >16 Std. liegt. Ferner war bekannt, daß im langwelligen Bereich des sichtbaren Spektrums die stärksten plastidenphänotypischen Effekte erzielt werden und die Ontogenese-phase zwischen Rosettenbildung und Blütezeit stets die größten Merkmalsunterschiede zeigt. Schließlich ergab die varianzanalytische Beurteilung zweier Klimakammerversuche (siehe Tab. 2), daß bei den Umweltbedingungen des Versuchs Nr. 66-10 die genotypischen Varianzen aller Merkmale größer waren als die Versuchsfehlervarianz. Im Versuch Nr. 66-1 war dies nur bei den Pigmentquotienten der Fall. Auch jene Varianzen, welche durch die applizierte verschiedene Strahlungsqualität hervorgerufen wurden, waren im Versuch 66-10 signifikant. Insgesamt betrachtet, ergaben die Umweltbedingungen dieses Versuchs mehr signifikante Varianzen als die des Versuchs 66-1. Der Versuch 66-10 führte demnach zu einer besseren Zerlegung der quadrierten Streuungen und damit Trennung des Faktoreinflusses von der Fehlervarianz.

Dieses Ergebnis ist ferner an der beträchtlichen Differenzierung der Merkmalsmittelwerte beider Versuche zu erkennen, die in Abbildung 2 in Säulendiagrammen dargestellt ist. Alle Mutanten und der Wildstamm können offensichtlich im Versuch 66-10 phänotypisch besser unterschieden werden. Demgemäß sind dort die \bar{x} -Differenzen im *t*-Test wesentlich häufiger signifikant. Die Merkmale *LI*, *NAR* und *EAG* erreichen hierbei im Wildtyp ch^+/ch^+ den höchsten Wert und nehmen bei den Mutanten in der Reihen-

² Für ihre zuverlässige technische Mitarbeit danke ich wiederum besonders Frl. G. Meyer.

folge $ch^2/ch^2 > ch^1/ch^1 > ch_3/ch_3$ ab. Auch der Pigmentquotient $CA + CB/CC$ folgt im Versuch 66-10 diesen quantitativen Abstufungen. Das Verhältnis der beiden Chlorophylle CA/CB weicht hiervon deshalb ab, da ja die Mutanten die bekannten Chlorophyll *b*-Defizite besitzen; dieser Quotient steigt folglich von $ch^+/ch^+ < ch_3/ch_3 < ch^2/ch^2$ bis zum Wert ∞ der CB-freien Mutante ch^1/ch^1 .

Modifikationen: Die in I_1 zunächst applizierten Strahlungsbereiche Normallicht, Gelblicht (Filter 300, $\lambda > 500$ nm) und Rotlicht (Filter 501, $\lambda > 600$ nm) ergaben eine bei allen Genotypen feststellbare Verlängerung der Entwicklungszeit mit zunehmender Wellenlänge und damit Einengung des Spektrums (Abb. 3). Während die Zeitunterschiede zwischen den

Tabelle 2. Varianzanalysen der Vorversuche zur Bestimmung der günstigsten Reaktionsbedingungen

Versuch 66-1 (I_0 , Temperatur $20 \pm 1^\circ C$, rel. Feuchte $65 \pm 5\%$, Beleuchtungsdauer 24 L/0 D Std.)

Versuch 66-10 (I_1 , Temperatur $25/15 \pm 1^\circ C$, rel. Feuchte $55/75 \pm 5\%$, Beleuchtungsdauer 16 L/8 D Std.)

*** = Signifikanzgrenze $\alpha < 0.001$, ** = Signifikanzgrenze $\alpha < 0.01$, * = Signifikanzgrenze $\alpha < 0.05$

Faktor	Merkmal	Vers. '66-1 (I_0)			Vers. '66-10 (I_1)		
		s^2	f	F	s^2	f	F
Genotypen	LI	0.39	3	1.18	9.65	3	7.78***
	NAR	3.03	3	3.06	1.82	3	4.92**
	EAG	3.41	3	8.97	1.45	3	11.15***
	CA/CB	49.60	2	48.16***	248.40	2	38.57***
	$\frac{CA + CB}{CC}$	4.91	3	14.44***	13.54	3	21.49***
Pflanzenalter	LI	4.16	3	12.63**	9.22	3	7.44***
	NAR	0.61	3	0.62	2.80	3	7.57***
	EAG	0.29	2	0.76	0.01	2	0.08
	CA/CB	0.63	2	0.61	3.39	3	0.53
	$\frac{CA + CB}{CC}$	0.70	2	2.06	1.12	3	1.78
Fehler	LI	0.33	6		1.24	24	
	NAR	0.99	6		0.37	24	
	EAG	0.38	3		0.13	11	
	CA/CB	1.03	4		6.44	15	
	$\frac{CA + CB}{CC}$	0.34	6		0.63	21	

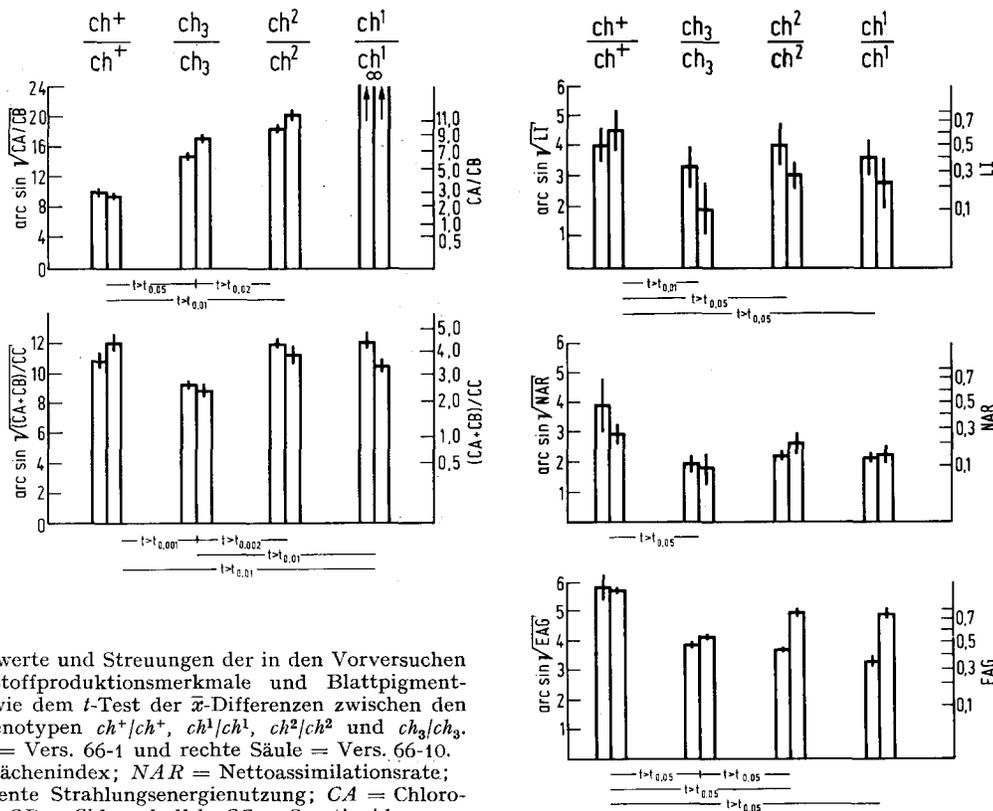


Abb. 2. Mittelwerte und Streuungen der in den Vorversuchen bestimmten Stoffproduktionsmerkmale und Blattpigmentquotienten sowie dem *t*-Test der \bar{x} -Differenzen zwischen den *Arabidopsis*-Genotypen ch^+/ch^+ , ch^1/ch^1 , ch^2/ch^2 und ch_3/ch_3 .
 Linke Säule = Vers. 66-1 und rechte Säule = Vers. 66-10.
 LI = Blattflächenindex; NAR = Nettoassimilationsrate;
 EAG = Apparente Strahlungsenergienutzung; CA = Chlorophyll *a*; CB = Chlorophyll *b*; CC = Carotinoide

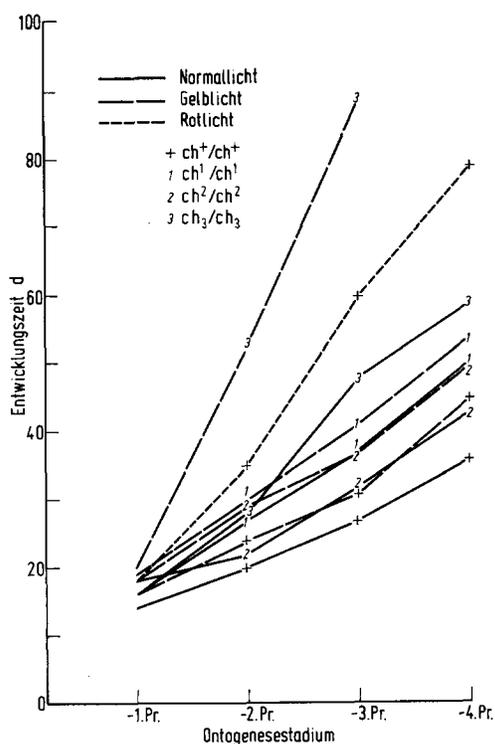


Abb. 3. Entwicklungszeit der in Vers. Nr. 66-10 bei verschiedenen Lichtqualitäten kultivierten *Arabidopsis*-Genotypen vom Zeitpunkt des Versuchsbeginns bis zu den Probenentnahmen.

- 1. Pr. = Jungpflanze
- 2. Pr. = Rosettenstadium
- 3. Pr. = Blütezeit
- 4. Pr. = Samenreife

Prüfgliedern beim Pikieren der Keimpflanzen etwa 1 bis 2 Tage betrogen, wurde die Samenreife bis zu 5 Wochen später erreicht, und zwar bei dem mit Rotlicht behandelten Wildtyp. Die Mutanten erreichten unter dieser Strahlung sogar bis zum Abbruch des Versuchs nach 100 Tagen niemals das Rosettenstadium. Unter Gelblicht entwickelte sich die Mutante ch_3/ch_3 am langsamsten (vergleiche hierzu auch Abb. 4). Sie benötigte hier bis zur Blüte 89 Tage, gegenüber 59 Tagen unter Normallicht. Die Behandlung mit Strahlen der Wellenlängen $> \sim 600$ nm führte also zu einer drastischen Schädigung aller Mutanten, die ihre weitere Anwendung in den Untersuchungen un-

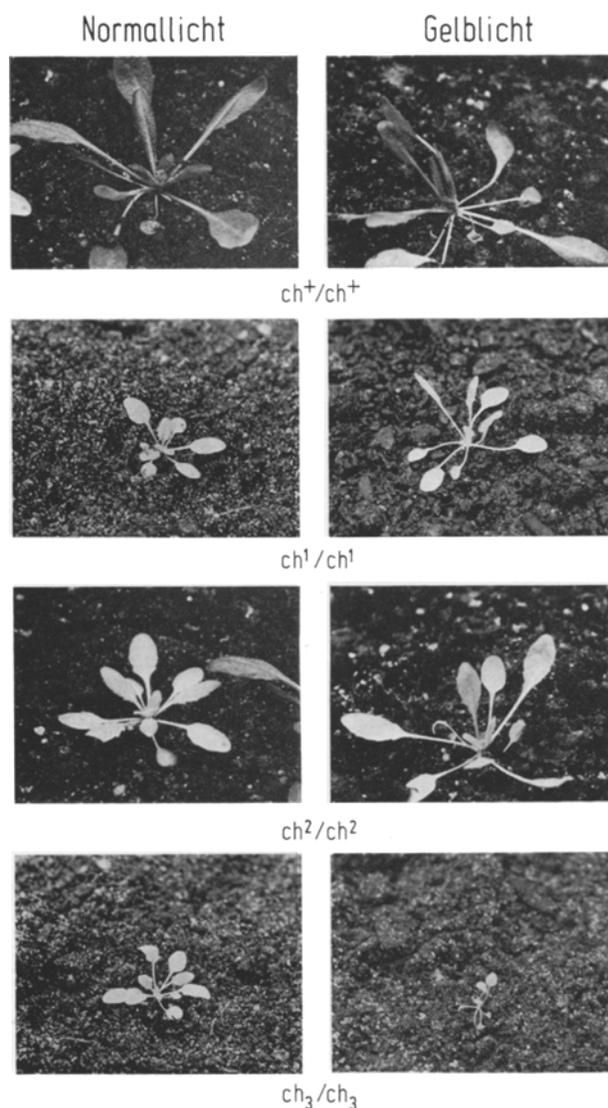


Abb. 4. Einzelpflanzen der unter Normallicht und Gelblicht aufgewachsenen Genotypen ch^+/ch^+ (Wildtyp), ch^1/ch^1 , ch^2/ch^2 , und ch_3/ch_3 (Mutanten) im Jungpflanzenstadium (Vers. Nr. 66-10, $3/4$ nat. Gr.)

Tabelle 3. *t*-Test der χ_{ij} -Differenz \bar{d} (Normallicht minus Gelblicht) des Vers. Nr. 66-10 (Generation I_1) Kennzeichnung der Signifikanzgrenzen wie in Tab. 2

Merkmale	\bar{d}	S_d	<i>f</i>	<i>t</i>
LI	0.0042	± 0.2267	11	0.06
NAR	0.0362	± 0.0519	11	2.43 ⁺
EAG	-0.1361	± 0.2409	7	-1.60
CA mg/g	0.6647	± 0.6345	11	3.63 ⁺⁺
CA mg/dm ²	0.1063	± 0.1907	11	1.93
CB mg/g	-0.0117	± 0.1593	11	-0.25
CB mg/dm ²	-0.0156	± 0.0565	11	-0.96
CC mg/g	0.2492	± 0.2603	11	3.32 ⁺⁺
CC mg/dm ²	0.0385	± 0.0700	11	1.91
Entw.zeit d	-4.1667	± 2.2896	11	-6.30 ⁺⁺⁺

möglich machte. Nur der Wildtyp ch^+/ch^+ konnte daher im Rotlicht näher auf seine Pigment- und Stoffproduktionseigenschaften untersucht werden. Er erreichte unter Gelblicht zu Beginn seiner Ontogenese um etwa 10% und am Ende um ca. 15% niedrigere Werte sowie im Rotlicht annähernd doppelt so stark reduzierten Pigmentgehalt und Stoffproduktion.

Betrachtet man nun die gesamte Wirkung der Gelblichtbehandlung auf alle Genotypen (Tab. 3), so fällt auf, daß auch hier die Mengen an gebildetem Chlorophyll *a* (CA) und Carotinoiden (CC) im Trocken-gewicht bzw. pro Blattfläche gegenüber den Werten bei normaler Beleuchtung herabgesetzt sind (siehe auch Abb. 5 und 6). Der Chlorophyll *b*-Gehalt (CB) wird dagegen nicht im gleichen Maße verändert.

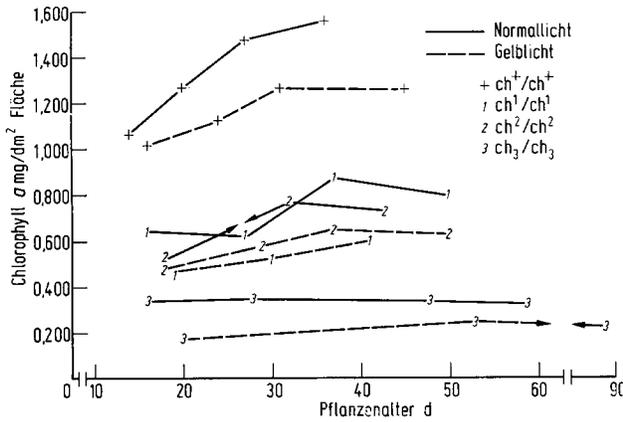


Abb. 5. Chlorophyll a-Gehalt pro Blattfläche der bei verschiedener Lichtqualität kultivierten *Arabidopsis*-Genotypen im Verlauf ihrer Ontogenese (66-10, I₁).

— = Normallicht
 - - - = Gelblicht
 + = ch^+/ch^+
 1 = ch^1/ch^1
 2 = ch^2/ch^2
 3 = ch_3/ch_3

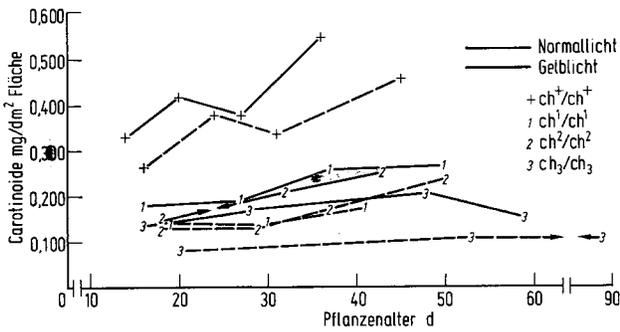


Abb. 6. Carotinoide-Gehalt pro Blattfläche der bei verschiedener Lichtqualität kultivierten *Arabidopsis*-Genotypen im Verlauf ihrer Ontogenese (66-10, I₁). Zeichenerklärung wie in Abb. 5

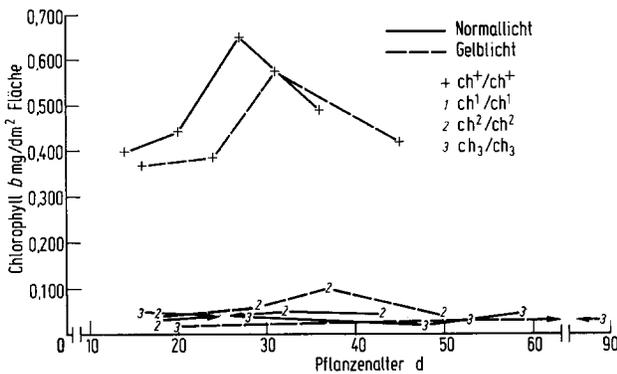


Abb. 7. Chlorophyll b-Gehalt pro Blattfläche der bei verschiedener Lichtqualität kultivierten *Arabidopsis*-Genotypen im Verlauf ihrer Ontogenese (66-10, I₁). Zeichenerklärung wie in Abb. 5

Gelblicht setzt demnach die Chlorophyll a- und Carotinoid-Biosynthese quantitativ herab, ohne die Chlorophyll b-Bildung wesentlich zu beeinflussen.

Auch der Blattflächenindex (LI), ein Maß für die erzielbare Bestandesdichte, und die apparente Ener-

gienutzung (EAG), die den Anteil der chemisch gebundenen Strahlungsenergie darstellt, werden durch den Ausfall der Wellenlängen $< \sim 550 \text{ nm}$ nicht wesentlich verändert. Dagegen ist die Nettoassimilationsrate (NAR) als Maß für die auf die Blattfläche bezogene Stoffproduktionsleistung signifikant verringert (s. Tab. 3).

Vergleicht man die Wirkung der gelben Strahlung bei den einzelnen Genotypen, so bildet hier offensichtlich die Mutante ch^2/ch^2 signifikant mehr Chlorophyll b während ihrer ganzen Ontogenese (Abb. 7). Bei den anderen Genotypen ist die CB-Synthese im Gelblicht etwas geringer als unter normaler Bestrahlung. Im Genotyp ch^1/ch^1 kann auch durch Gelblicht keine CB-Bildung induziert werden.

Dieser Reaktion der Genotypen in den Pigmenteigenschaften entspricht die reduzierende Wirkung des Gelblichts auf LI bei den Mutanten ch^1/ch^1 und ch_3/ch_3 ; sie ist in ihnen stärker ausgeprägt als im Wildtyp und ch^2/ch^2 (Abb. 8). Die entsprechenden Kurven entfernen sich mit zunehmendem Pflanzenalter immer weiter voneinander; m. a. W. der Ausfall der relativ kurzwelligen Strahlung bewirkt hier eine starke Abnahme der Blattflächenentwicklung und damit der Bestandesdichte. Der Wildtyp ch^+/ch^+ und die Mutante ch^2/ch^2 reagieren aber wesentlich schwächer.

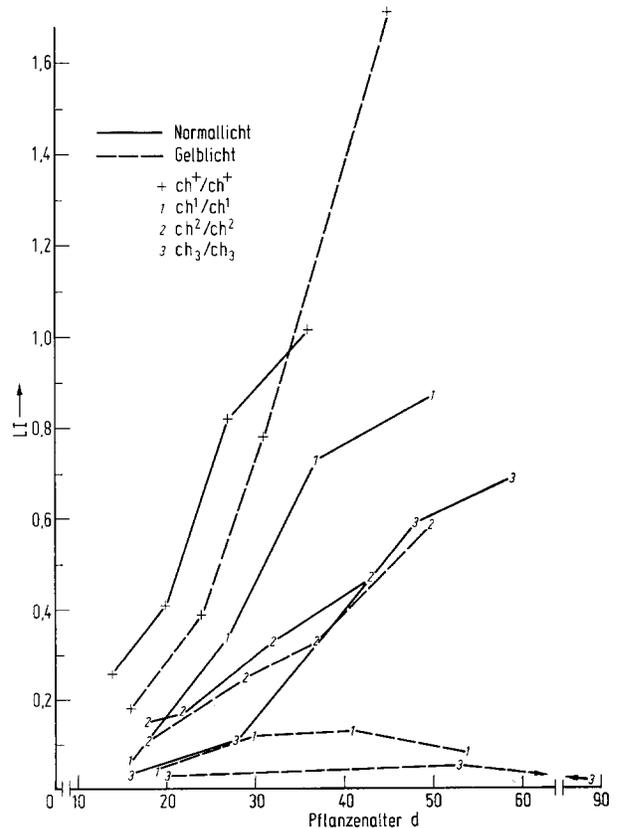


Abb. 8. Blattflächenindex der bei verschiedener Lichtqualität kultivierten *Arabidopsis*-Genotypen im Verlauf ihrer Ontogenese (66-10, I₁)

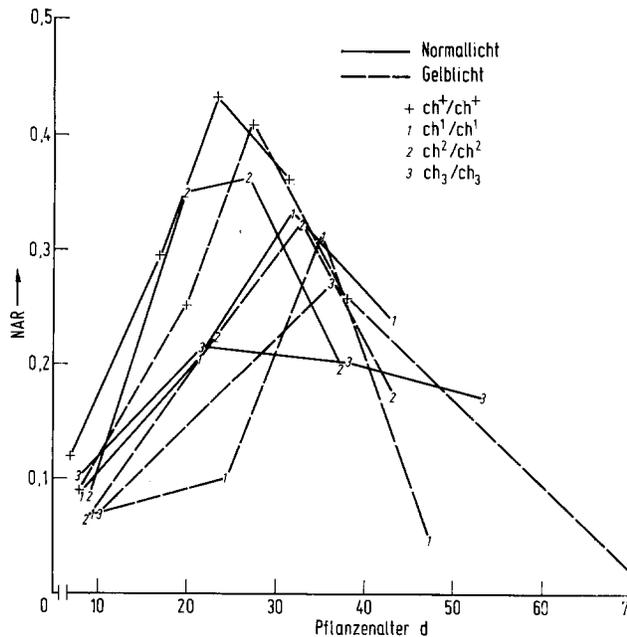


Abb. 9. Nettoassimilationsrate der bei verschiedenen Lichtqualitäten kultivierten *Arabidopsis*-Genotypen im Verlauf ihrer Ontogenese (66-10, I_1)

Im Stoffproduktionsmerkmal *NAR* beeinflusst Gelblicht einzelne Genotypen ebenfalls sehr spezifisch. Während ch^1/ch^1 beim Schossen auffallend geringere Nettoassimilationsraten erzielt, leistet ch_3/ch_3 offenbar während der Blüte wesentlich mehr als unter Normallicht (Abb. 9). Wildtyp und Mutante ch^2/ch^2 produzieren unter den verschiedenen Strahlungsbedingungen annähernd gleich viel Trockensubstanz. Auch in der Nutzung der Strahlungsenergie zeigen diese beiden Genotypen nur geringe, reduzierende Gelblichtreaktionen, die Mutanten ch^1/ch^1 und ch_3/ch_3 dagegen wiederum stärkere Wirkung. Die Verschiebung der Kurven nach rechts ergibt sich aus der bereits erwähnten Verlängerung der Entwicklungszeit.

Die verschiedenen Genotypen verhalten sich demnach nicht unter gleichen Strahlungsbedingungen quantitativ verschieden, sie reagieren auch in bestimmten Merkmalen mit unterschiedlicher Stärke und Richtung auf die qualitativ veränderte Strahlung. Hierbei zeigen Wildtyp und Mutante ch^2/ch^2 untereinander ähnlichere Reaktionen als die beiden anderen Genotypen ch^1/ch^1 und ch_3/ch_3 .

Diskussion

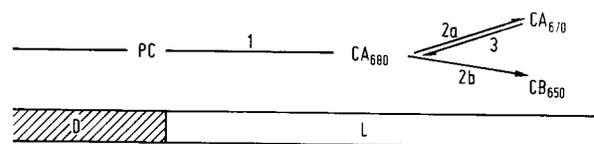
Wie bereits gezeigt werden konnte (Kranz 1970), sind bei den genphysiologischen Effekten des *ch*-Locus Hauptwirkungen, die die *CB*-Biosynthese betreffen, von Nebenwirkungen auf verschiedene andere Merkmale zu unterscheiden. Zunächst sollen erstere als primäre Genwirkungen und letztere als sekundäre Effekte bezeichnet werden, wenn auch wir noch nicht genau wissen, ob sie direkt mit der

molekularen Geninformationsabgabe bzw. -übertragung verknüpft sind.

Der Beginn der Proplastidendifferenzierung kann bei der Mutante *im* von *Arabidopsis* durch Blaulicht eingeschaltet werden (Röbbelen 1968), obwohl der Wildtyp hierzu Rotlicht benötigt. Da in *im* wahrscheinlich die RNase-Aktivität gesteigert ist (Rédei 1967), könnte diese primär vielleicht eine Protein-Mutante mit einem sekundären Chlorophylldefekt sein. Bei der Mutante ch^1/ch^1 sind Granstrukturproteine für die *CB*-Bildung nicht erforderlich (Velemínský und Röbbelen 1966), also kann hier die primäre Genwirkung nicht die *EM*-sichtbaren Strukturproteine betreffen.

Unsere vorliegenden Ergebnisse zeigen nun eindeutig, daß es nie zu einer Anhäufung von *CA*, sondern fast immer zu einer Abnahme von *CA* in den Mutanten kommt, wenn *CB* fehlt. Dabei besteht kein quantitativer Zusammenhang zwischen der Bildung der beiden Chlorophylle (siehe Abb. 5 u. 7). Im Schwachlicht (400–500 ftc) trat in den Versuchen von Hirono und Rédei (1963) keine *CB*-Zunahme oder Normalisierung des *CA/CB*-Quotienten ein. Doch fanden Velemínský und Röbbelen mit zunehmender Tageslänge des Schwachlichts solche Effekte in der Mutante ch_3/ch_3 und im Starklicht eine gewisse Photo-labilität. Wir stellten bei den Mutanten ch^2/ch^2 und ch_3/ch_3 im schwachen Dauerlicht des Vorversuchs (5230 lx, $37.0 \text{ cal.cm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$) eine relative *CB*-Zunahme gegenüber dem starken Licht eines 16-Std.-Tages (11500 lx, $32.1 \text{ cal.cm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$) fest (vgl. Abb. 2). In jedem Fall scheint die *CB*-Bildung lichtabhängig zu sein, wie aus den vorangegangenen Gewebe-Extrakt-Versuchen (Kranz 1971) zu ersehen ist; außerdem geht sie beim Wildtyp im Gelblicht besonders stark zurück.

Das neuerdings von Meister (1967) bestätigte und von ihm erweiterte Modell der Umwandlungsreaktionen der Chlorophylle von Shibata (1957) besteht aus mindestens drei Schritten, die von einem im Dunkeln gebildeten, gemeinsamen Protochlorophyll (*PC*) zu den beiden Chlorophyllen (*CA*, *CB*) führen soll:



Hiernach existiert *CA* in zwei bei 680 bzw. 670 nm maximal absorbierenden Formen, und *CB* entsteht aus einem gewissen Überschuß des zuerst gebildeten Chlorophylls. Auf unsere *Arabidopsis*-Mutanten übertragen würde die primäre Wirkung des *ch*-Locus den Reaktionsschritt 2b betreffen und die *CA*-Bildung hemmenden Genwirkungen (z. B. in dem mit diesen nicht allelen Genotyp ch_3/ch_3) die Schritte 2a und/oder 3; der dritte Reaktionsschritt kann erst erfolgen, wenn die Reaktion 2b abgelaufen ist. Außerdem könnten die Schritte 1 und 3 mit den o. a. Schwach-

lichtreaktionen sowie 2a und b mit den Starklichtreaktionen identisch sein. Auch läßt sich nun erklären, warum *CA*-freie Mutanten mit *CB* nicht existieren können; zuerst muß im Reaktionsschritt 1 die Umwandlung des *PC* zu *CA*₆₈₀ erfolgt sein. Schließlich ist denkbar, daß die Rückbildung des *CA*₆₇₀ zu *CA*₆₈₀ oder die Neubildung des langwelligen *CA* (Reaktionsschritte 1 und 3) solange nicht stattfindet, bis *CB* als Endprodukt vorliegt.

Unter den offenbar auf Pleiotropie beruhenden sekundären Genwirkungen sind die O₂-Entwicklung, Hill-Reaktion und Umsatzrate des Elektronentransports der Photosynthese in der *ch*¹/*ch*¹ um ca. 50% < beim Wildtyp *ch*⁺/*ch*⁺ (Fröhlich und Schön 1970), woraus geschlossen wird, daß die Funktion des *CB* nur in einer zusätzlichen Lichtabsorption und -übertragung besteht. Früher behauptete allgemeine Beziehungen des *CB* zum Stärkestoffwechsel (Müller 1964) sind sicher nicht vorhanden, da auch die völlig *CB*-freie *ch*¹/*ch*¹ Assimilationsstärke bildet (Hirono und Rédei, 1963), und zwar nicht nur in den Keimblättern, sondern auch im Mesophyll der Folgeblätter (eigene unveröffentlichte Untersuchungen).

Der unter den Filtern festgestellte Stoffproduktionsrückgang könnte auch mit der Einengung des Spektrums im langwelligen Bereich zusammenhängen, denn die Energieabsorption der *CC* ist schon im Gelblicht und die des *CB* im Rotlicht fast null, d. h. der Rückgang der gesamten Strahlungsenergieabsorption müßte in den Mutanten mit *CB*- und *CC*-Mangel unter den Filtern relativ zum Normallicht kleiner sein als im Wildtyp und dadurch die *NAR* weniger reduziert werden. Das trifft nicht zu (siehe Abb. 9). Der *NAR*-Rückgang der Mutanten ist im Gelblicht eher stärker, da ja auch ihr *CA*-Gehalt drastisch verringert ist. Wenn ein solcher Zusammenhang zwischen Blattpigment und Stoffproduktion bestehen sollte, würde er ferner nur innerhalb der für die Pigmentausrüstung der photosynthetischen Einheit optimalen Grenzen (Wild und Egle 1967) auftreten.

Wie eingangs begründet, ist das Ziel dieser Untersuchungen die Aufklärung der genphysiologischen Grundlagen quantitativer Merkmale am Beispiel bestimmter Blattpigmentmutanten von *Arabidopsis*. Sicher bedarf es hierzu noch weiterer Versuche, um die z. T. noch nicht genügend gesicherten Überlegungen zu prüfen. Doch zeigen die bisher erzielten Ergebnisse, insbesondere das quantitativ verschiedene Verhalten der einzelnen Genotypen unter gleichen und qualitativ veränderten Strahlungsbedingungen, daß sowohl auf der Ebene der einfachen, primären Genwirkungen als auch dem Niveau der pleiotropen, sekundären Geneffekte mit komplizierten Interaktionen gerechnet werden muß.

Zusammenfassung

Die exakte Analyse quantitativer, molekularer Genwirkungen setzt die Kenntnis der Reaktionsnorm

der untersuchten Genotypen und ihrer Modifikation voraus.

1. Die in einer programmgesteuerten Klimakammer durchgeführten Experimente liefern zunächst die optimalen Versuchsbedingungen für die Reaktionsnorm der Untersuchungsobjekte. Die genotypisch bedingten Varianzen der untersuchten Merkmale und die Mittelwertsdifferenzen zwischen den Prüfgliedern sind im Wechselklima eines 16 Std.-Tages am häufigsten signifikant.

2. Durch qualitative, energiegleiche Strahlungsänderung im Transmissionsbereich > 500 bzw. > 600 nm werden bei der Crucifere *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. bestimmte Merkmalsmodifikationen in vier Ontogenesestadien von drei monogenen, quantitativen Chlorophyll *b*-Defektmutanten und dem Wildtyp induziert; diese gehören zwei verschiedenen Gen-Loci an.

3. Die Strahlungsbehandlung mit Wellenlängen oberhalb 600 nm (gefiltertes Rotlicht) führt zu einer drastischen Entwicklungsschädigung der Mutanten, so daß sie nach 100 Tagen, d. h. der dreifachen normalen Vegetationszeit, keine Blattrosetten bilden. Die Blattpigmente und Stoffproduktion des Wildtyps gehen dabei um ca. 20 bis 30% gegenüber jenen bei ungefiltertem Normallicht zurück.

4. Gefiltertes Gelblicht mit Wellenlängen > 500 nm setzt die Nettoassimilationsrate herab, ohne die Chlorophyll *b*-Bildung, den Blattflächenindex und die apparente Strahlungsenergiebindung wesentlich zu beeinflussen. Die einzelnen Genotypen verhalten sich aber nicht nur unter gleichen Strahlungsbedingungen quantitativ verschieden, sie reagieren auch in bestimmten Merkmalen mit unterschiedlicher Stärke und Richtung auf die qualitativ veränderte Strahlung. Hierbei zeigen der Wildtyp und die Mutante *ch*²/*ch*² untereinander ähnlichere Reaktionen als die beiden anderen Genotypen *ch*¹/*ch*¹ und *ch*₃/*ch*₃, welche die stärkeren Plastiddefekte besitzen.

5. Die genphysiologischen Effekte des *ch*-Locus bestehen aus primären Hauptwirkungen, die die Chlorophyll *b*-Biosynthese betreffen, und sekundären Nebenwirkungen auf die anderen Blattpigment- und Stoffproduktionsmerkmale. Wenn Chlorophyll *b* fehlt, kommt es zu keiner Anhäufung, sondern immer zu einer Abnahme des Chlorophylls *a*; dabei besteht kein quantitativer Zusammenhang in der Bildung der Chlorophylle. Die primäre Genwirkung der beiden Mutanten-Loci wird an den erweiterten Modellreaktionen der Chlorophyllumwandlung von Shibata diskutiert. Die sekundären, pleiotropen Genwirkungen auf die Stoffproduktion beruhen offenbar auf der zusätzlichen Strahlungsenergiebindung des Chlorophylls *b* und der Carotinoide. Hierbei muß mit komplexen Interaktionen innerhalb und zwischen den Genwirkungen und den Umwelteinflüssen gerechnet werden.

Literatur

1. Fröhlich, J., Schön, W. J.: Umsatzraten einiger Photoreaktionen in isolierten Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana*. Arabid. Inf. Serv. **7**, 30–31 (1970). — 2. Goodwin, T. W.: Biosynthesis of Carotenoids. In: T. W. Goodwin, Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, 143–174. New York and London: Academic Press 1965. — 3. Hirono, Y., Rédei, G. P.: Multiple Allelic Control of Chlorophyll b Level in *Arabidopsis thaliana*. Nature **197**, 1324–1325 (1963). — 4. Kranz, A. R.: Ein Beitrag zur photoelektrischen Blattflächenmessung. Angew. Bot. **37**, 335–350 (1964). — 5. Kranz, A. R.: Stoffproduktion und Assimilationsleistung in der Evolution der Kulturpflanzen. I. Einführung und experimentelle Grundlagen. Biol. Zbl. **85**, 597–626 (1966). — 6. Kranz, A. R.: Genetic and ontogenetic correlations between leaf pigment and assimilation efficiency in mutants of *Arabidopsis thaliana*. Arab. Inf. Serv. **4**, 20–21 (1967a). — 7. Kranz, A. R.: Endogene und exogene Beeinflussung der apparenten Strahlungsenergienutzung annueller Pflanzen. Angew. Bot. **41**, 271–278 (1967b). — 8. Kranz, A. R.: The fixation of radiation energy during the development in chlorophyll b deficient mutants of *Arabidopsis*. Arab. Inf. Serv. **5**, 56–57 (1968). — 9. Kranz, A. R.: Genphysiologie quantitativer Merkmale bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Teil 1. Spaltungsanalyse und Pigmentbiosynthese in quantitativen Chlorophyll b-Mangelmutanten. Theor. Appl. Genet. **41**, 45–51 (1971). — 10. Levine, R. P.: The analysis of photosynthesis using mutant strains of algae and higher plants. Annual Rev. Pl. Physiol. **20**, 523–540 (1969). — 11. Meister, A.: Untersuchungen zur Chlorophyllbildung in etiolierten Pflanzen mit Hilfe der Derivat-Spektrophotometrie. studia biophysica **5**, 59–66 (1967). — 12. Mohr, H.: Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1969. — 13. Müller, F.: Untersuchungen über Chloroplastenfarbstoffe und Assimilationsstärke chlorophyll b-freier, durch Röntgenbestrahlung induzierter Mutanten von *Pisum sativum*. Planta **63**, 65–82 (1964). — 14. Rédei, G. P.: Genetic Control of Subcellular Differentiation. In: G. Röbbelen, Arabidopsis Research, Arab. Inf. Serv., 119–127 (1965). — 15. Rédei, G. P.: Biochemical aspects of a genetically determined variegation in *Arabidopsis*. Genetics **56**, 431–443 (1967). — 16. Röbbelen, G.: Genbedingte Rotlicht-Empfindlichkeit der Chloroplastendifferenzierung bei *Arabidopsis*. Planta **80**, 237–254 (1968). — 17. Shibata, K.: Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves. J. Biochem. **44**, 147–173 (1957). — 18. Sokal, R. R., Rohlf, F. J.: Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. San Francisco: W. H. Freeman 1969. — 19. Velemínský, J., Röbbelen, G.: Beziehungen zwischen Chlorophyllgehalt und Chloroplastenstruktur in einer *chlorina*-Mutante von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Planta **68**, 15–35 (1966). — 20. Virgin, H. I.: Some Effects of Light on Chloroplasts and Plant Protoplasm. In: A. C. Giese, Photophysiology I, 273–304. New York and London: Academic Press 1964. — 21. Wild, A., Egle K.: Die Größe der photosynthetischen Einheit bei normal grünen und bei chlorophyllarmen Mutanten. Beitr. Biol. Pfl. **43**, 455–488 (1967). — 22. Woltereck, R. (1911). Zit. in: R. P. Wagner and H. K. Mitchell, Genetics and Metabolism. New York-London-Sydney: J. Wiley and Sons 1964. — 23. Zetterberg, G.: Mutagenic Effects of UV and Visible Light. In: A. C. Giese, Photophysiology II, 247–281. New York and London: Academic Press 1964.

Eingegangen am 28. August 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)