

Der Umbau des Genoms von *Pisum sativum* durch induzierte Translokationen der Satelliten-Chromosomen

H. D. KLEIN und M. MILUTINOVIĆ

Institut für Genetik der Universität Bonn (BRD) und Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Belgrad (Jugoslawien)

Modification of the Genome of *Pisum sativum* by Induced Translocations in the Satellite Chromosomes

Summary. In connection with X-ray experiments on *Pisum sativum* 'Dippes gelbe Victoria', two translocation line showing dramatic deviations from the normal karyotype were selected and cytologically analysed (root tips). In line 62B, an exchange between the long arms of chromosome V and the satellite chromosome VII took place. In line 488, both satellite chromosomes IV and VII were involved in the exchange process, leading to a very short chromosome (VII T!), and a very long chromosome (IV T!) uniting both the satellites in one chromosome. The importance of these lines with regard to mutation breeding and evolution is discussed.

Einleitung

Als Folge von spontanen oder induzierten Chromosomen-Mutationen entstehen u. a. Translokationsformen, deren Karyotypen mehr oder weniger deutlich von der Ausgangssituation abweichen. Sie bilden eine Möglichkeit für die strukturelle Veränderung eines Genoms in der Phylogenie, und ihre Analyse erlaubt einen näheren Einblick in die Art und Weise, wie solche Veränderungen vor sich gehen und welche Folgen sie haben können. Neben diesem für die Evolution bedeutsamen Aspekt spielen genetische und züchterische Fragestellungen in diesem Zusammenhang eine Rolle. Durch den Umbau des Genoms und der damit verbundenen Zusammenfassung von Genen in neue Koppelungsgruppen ergeben sich Verhältnisse, die in den betreffenden Organismen veränderte Eigenschaften zur Folge haben können.

Wir verfügen derzeit über ca. 900 verschiedene Mutanten der gleichen Ausgangsform der Erbse, von denen nach unseren bisherigen, nur zum Teil veröffentlichten Untersuchungen etwa 80 Formen Translokationen aufweisen (Gottschalk 1965 a, b, 1968; Gottschalk und Milutinović 1970; Milutinović 1970). Das Vorliegen translokationsheterozygoter Genotypen wurde in diesen Fällen durch Ring- oder Kettenbildung der betroffenen Chromosomen in der ersten meiotischen Metaphase nachgewiesen. Sie bewirkten Anomalien während der Sporogenese, die zu einer ca. 50%igen Fertilitätsminderung führten. Im Unterschied dazu hat sich das Translokationssystem bei bestimmten *Oenothera*- und *Rhoeo*-Arten so stabilisiert, daß durch eine geeignete Verteilung der Chromosomen aus dem Ring volle Fertilität erreicht wurde und diese Formen den Charakter neuer Arten angenommen haben.

Da zwei Arbeitsrichtungen unseres Instituts mit evolutionistischen und züchterischen Problemen befaßt sind, scheint es notwendig, die verschiedenen Translokationsformen zytologisch genau zu erfassen, um sie in Form reiner Linien anbauen zu können. Als Vergleichsbasis dafür dient der Normalkaryotyp der von uns verwendeten Ausgangsform. Seine Ermittlung wurde unter besonderer Berücksichtigung der methodischen Probleme und im Vergleich zu den von Blixt (1958, 1959) an einer anderen Sorte ermittelten Ergebnissen in einer früheren Arbeit dargestellt (Klein und Milutinović 1972).

Die vorliegende Arbeit behandelt Translokationen, an denen die beiden Satelliten-Chromosomen des *Pisum*-Genoms beteiligt sind und die zu auffälligen Veränderungen des Normal-Karyotyps führen.

Material und Methode

Die in dieser Arbeit behandelten Translokationsformen mit den Sortimentsbezeichnungen 62B und 488 entstanden durch Röntgenbestrahlung lufttrockener Samen der Handelsorte 'Dippes gelbe Viktoria' von *Pisum sativum*. Die heterozygoten Individuen wurden bezüglich ihres Verhaltens in der Meiose und im Hinblick auf ihre Fertilitätseigenschaften bereits früher untersucht (Gottschalk 1968).

Die Darstellung und Vermessung der somatischen Chromosomen im Wurzelspitzenmeristem erfolgte in der gleichen Weise, wie sie in einer vorausgegangenen Arbeit ausführlich geschildert wurden (Klein und Milutinović 1972). Um das Wesentliche stichwortartig zu wiederholen: Ankeimen der Samen in Petrischalen — Vorbehandlung der Wurzelspitzen mit 5,7-Dibromo-8-Hydroxychinolin — Färbung nach Feulgen und mit Orcein — Verarbeitung zu Quetschpräparaten — Fotografieren geeigneter Metaphaseplatten — Projektion der Negative auf Millimeterpapier — Nachzeichnen der Chromosomen-Konturen — Ausmessen und statistische Verarbeitung der Ergebnisse mit einem Tischcomputer.

Die Benennung und Charakterisierung der Chromo-

somen erfolgte nach einem von Blixt (1959) vorgeschlagenen Schlüssel.

Ergebnisse

Die Metaphase I der Meiosis in den beiden Genotypen 62 B und 488 ist — nach der bereits zitierten Arbeit von Gottschalk (1968) — charakterisiert durch die Ausbildung von 4-Ring-Konfigurationen. Daraus ergeben sich mit einer bestimmten Häufigkeit in den Nachfolgestadien Verteilungsanomalien, die zur Ausbildung genomatisch unausgewogener und daher nicht funktionsfähiger Sporen führen. Dies wirkt sich letztlich in einer m.o.w. starken Herabsetzung der Fertilität in den betroffenen Individuen aus.

Für das Zustandekommen der 4-Ringe wurden jeweils einfache reziproke Translokationen angenommen, was durch unsere Karyotyp-analysen voll bestätigt wird.

Bezüglich der Vitalitäts- und Wuchseigenschaften und im Hinblick auf morphologische und physiologische Merkmale zeigen sich bei den translokations-homo- und -heterozygoten Organismen keine drastischen Unterschiede zu der Ausgangsform (AF). Eine gründliche vergleichende Analyse steht jedoch noch aus. Die geringe Samenproduktion der struktur-heterozygoten Pflanzen ist vermutlich ausschließlich auf die meiotischen Störungen zurückzuführen.

Ein weiteres gemeinsames Merkmal der beiden Linien besteht darin, daß an dem Austauschprozeß zumindest ein Satelliten-Chromosom beteiligt ist. Ferner bewirken die translozierten Stücke eine derart deutliche Veränderung des Karyotyps, wie sie bisher bei der Erbse noch nicht bekannt geworden ist (Abb. 1). Die einzelnen Meßwerte für die Charakterisierung der Chromosomen in den Translokationslinien und der AF sind in der Tab. 1 zusammengestellt.

62 B

Diese Linie entstand durch einen Stückaustausch zwischen dem Satelliten-Chromosom VII und dem Chromosom V. Der wahrscheinliche Ablauf des Translokationsprozesses ist schematisch in Abb. 2 dargestellt. Danach erfolgt im längeren Arm von V

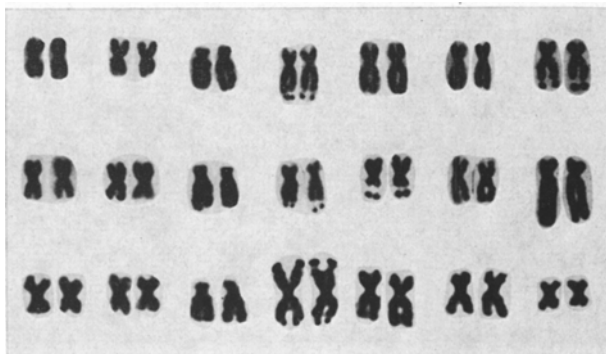


Abb. 1. Die Karyotypen der Ausgangsform (oben) sowie der beiden Translokationslinien 62B (Mitte) und 488 (unten)

an einer unmittelbar dem Zentromer benachbarten Stelle ein Bruch. Dadurch entsteht ein relativ langes azentrisches Fragment und ein Chromosomenabschnitt mit fast terminalem Zentromer.

Beim Chromosom VII erfolgt der Bruch etwa in der Mitte des längeren Schenkels. Dabei kommt ein relativ kleines azentrisches Fragment mit der Satellitenregion und ein anderer Chromosomenteil mit nahezu medianem Zentromer zustande.

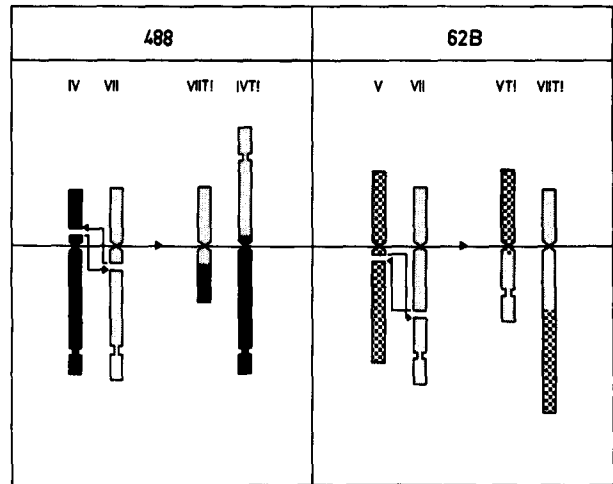


Abb. 2. Schematische Darstellung des Rekombinationsvorganges, der zu den Translokations-Chromosomen der Linien 488 und 62B geführt hat. Dabei bestimmt die Herkunft des Zentromers die Benennung der Austausch-Chromosomen

Die Bruchflächen rekombinieren in der durch die Pfeile der Abb. 2 angegebenen Weise und führen zu den neuen mit V T1 und VII T1 charakterisierten Chromosomen. Aus dem Vergleich der normalen und translozierten Chromosomen läßt sich nach Anwendung des *t*-Testes schließen, daß die Längen der kurzen Chromosomenarme nicht verändert worden sind.

Vergleicht man die durchschnittliche Genomlänge der AF mit der von 62B, so ergibt sich eine Differenz von 0,78 μ zugunsten des durch die Translokation entstandenen Genotyps 62B. Auf Grund unserer eigenen Beobachtungen sowie der Untersuchungen von Blixt (1959) ist dies mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, daß bei Anwendung von Hydroxychinolin der Kontraktionsgrad langer Chromosomenschenkel wesentlich geringer ist als bei kurzen Chromosomenarmen. Bei Berücksichtigung dieses Sachverhaltes bezüglich des langen Arms von VII T1 wird der Unterschied von durchschnittlich 0,78 μ verständlich.

488

An dem Translokationsvorgang, der zur Ausbildung des Genotyps 488 geführt hat, sind die beiden im Normalkaryotyp vorhandenen Satelliten-Chromosomen IV und VII beteiligt. Es ergibt sich aufgrund des Austauschprozesses, daß anstelle der beiden AF-Chromosomen mit jeweils einem Satellit satelliten-

Tabelle 1. Zusammenstellung der wichtigsten Daten zur Charakterisierung der Chromosomen der AF und der Translokationslinien 62B und 488 von *Pisum*

Chromosom Nr.	Genotyp	Anzahl untersuchte Chromosomen	\bar{M} Chromosomenlänge in μ	\bar{M} Armlänge der Chromosomen in μ			Quotient längerer Arm	Armlängen in% der durchschnittlichen Gesamtgenomlänge				
I	AF	112	3,90	2,10 $\pm 0,0224$			1,80 $\pm 0,0216$	1,17 $\pm 0,0057$	6,71 $\pm 0,0715$			
II	AF	104	3,85	1,93 $\pm 0,0226$			1,92 $\pm 0,0197$	1,01 $\pm 0,0026$	6,16 $\pm 0,0859$			
III	AF	67	4,42	3,28 $\pm 0,0417$			1,14 $\pm 0,0182$	2,90 $\pm 0,0495$	10,48 $\pm 0,1332$			
IV	AF	195	4,70	2,58 $\pm 0,0254$	0,55 $\pm 0,0049$		1,57 $\pm 0,0166$	2,01 $\pm 0,0185$	8,24 $\pm 0,0811$	1,75 $\pm 0,0156$		5,01 $\pm 0,0530$
	488	140	6,76	2,64 $\pm 0,0329$	0,76 $\pm 0,0060$	2,81 $\pm 0,0289$	0,55 $\pm 0,0049$	1,01 $\pm 0,0101$	8,42 $\pm 0,0889$	2,42 $\pm 0,0191$	8,96 $\pm 0,0901$	1,75 $\pm 0,0156$
V	AF	65	5,03	3,02 $\pm 0,0592$			2,01 $\pm 0,0287$	1,50 $\pm 0,0259$	9,65 $\pm 0,1891$			
	62B	133	4,33	2,17 $\pm 0,0261$	1,40 $\pm 0,0177$		0,76 $\pm 0,0060$	1,01 $\pm 0,0065$	7,06 $\pm 0,0261$	4,36 $\pm 0,0177$		2,36 $\pm 0,0189$
VI	AF	33	4,41	2,86 $\pm 0,0768$			1,55 $\pm 0,0432$	1,85 $\pm 0,0361$	9,14 $\pm 0,2454$			
VII	AF	195	4,98	2,70 $\pm 0,0279$	0,76 $\pm 0,0060$		1,52 $\pm 0,0163$	2,30 $\pm 0,0210$	8,62 $\pm 0,0891$	2,42 $\pm 0,0191$		4,85 $\pm 0,0520$
	488	153	2,96	1,57 $\pm 0,0126$			1,39 $\pm 0,0121$	1,13 $\pm 0,0042$	5,01 $\pm 0,0672$			
	62B	103	6,46	4,82 $\pm 0,0471$			1,64 $\pm 0,0238$	2,92 $\pm 0,0033$	15,02 $\pm 0,0471$			

tragende Abschnitte von IV und VII in einem Chromosom vereinigt werden. Dadurch entsteht ein langes Chromosom mit jeweils einem Satellit an seinen beiden Enden, das nach unserer Kenntnis zumindest für *Pisum* einmalig ist. Weiterhin ergeben sich nach Vollzug des in Abb. 2 näher dargestellten Austauschprozesses aus den beiden Chromosomen IV und VII mit submedian bis subterminal gelegenen Zentromer die beiden neuen Translokationsformen IV!T und VII!T mit nahezu medianer Zentromerlage. Die Gesamtgenomlängen der AF und von 488 sind mit 31,29 μ und 31,33 μ praktisch identisch.

Diese auffallend gute Übereinstimmung ist im Lichte der oben erwähnten Blixtschen These durchaus verständlich, da in der Bilanz bei den zu vergleichenden Genotypen jeweils 2 gleich kurze und 2 gleich lange Chromosomenarme vorliegen und somit eine unterschiedliche Beeinflussung des Kontraktionsgrades durch Hydroxychinolin kaum wirksam werden kann.

Diskussion

Bisher sind Chromosomenmutationen bei *Pisum* in größerer Zahl beschrieben worden (ausführliche Literatur bei Gottschalk 1968, Gottschalk und Klein 1970). Sie wurden selektiert nach Bestimmung der Pollenfertilität in den F₁-Bastarden der Kreuzung

zwischen verschiedenen Linien und Sorten. Reziproke Translokationen wurden identifiziert durch die Bildung von Chromosomenassoziationen unterschiedlichen Aussehens und unterschiedlichen Valenzgrades in der MI der Struktur-Bastarde. In Kombination mit genanalytischen Studien wurden bisher 10 reziproke Translokationen ermittelt (Lamprecht 1964). Davon sind jedoch nur 4 Formen durch Karyotyp-Analysen an somatischen Zellen als Translokationen genau verifiziert (Blixt 1959). Für eine fünfte Linie ist der Karyotyp zwar bekannt (Blixt 1959), die Übereinstimmung mit den diesbezüglichen genanalytischen Verhältnissen ist jedoch noch nicht geklärt (Lamprecht 1964).

Zuverlässige Karyotypen-Analysen an *Pisum* sind bisher nur von Blixt durchgeführt worden und beziehen sich neben der als Normalform betrachteten Linie 110 lediglich auf die fünf oben erwähnten Formen. Im übrigen führten diese reziproken Austauschvorgänge mit Ausnahme der Linie 379 nicht zu größeren Abweichungen vom Normalkaryotyp. In unserem Falle jedoch wurden nach Induktion mittels Röntgenstrahlen sehr drastische Veränderungen der Ausgangssituation erzielt, die — selbst ohne Anwendung statistischer Methoden — sehr deutlich und ohne Schwierigkeiten unter dem Mikroskop erkannt werden können. Dies haben die entsprechenden Ab-

bildungen sehr klar gezeigt. Besonders eindrucksvoll ist in diesem Zusammenhang die Situation in 488. Neben einem sehr kleinen Chromosom (dem kleinsten des Genoms) mit nahezu median gelegenen Zentromer ist ein Chromosom gebildet worden, das sowohl durch seine ungewöhnliche Länge als auch besonders durch die beiden Satelliten an den Enden der Arme sofort im mikroskopischen Bild auffällt. Ein Chromosom dieser Art ist bisher bei *Pisum* noch nicht beschrieben worden.

Es wäre interessant, zu untersuchen, welche morphologischen und physiologischen Wirkungen diese Vereinigung der beiden Satelliten in einem Chromosom zur Folge hat. Man könnte sich vorstellen, daß hierbei Positioneffekte wirksam werden. Diese Form scheint darüber hinaus geeignet — etwa nach Kreuzung mit 62B — einen Typ herausspalten zu lassen, der insgesamt 2 Satellitenchromosomen mit 3 Satelliten enthält und somit eine noch stärkere Abweichung von der Struktur des Ausgangsgenoms aufweist. Würde man solche Formen als Ausgangsmaterial für neue Bestrahlungsversuche verwenden, so wären in Verbindung mit weiteren strukturellen Veränderungen auch Genmutationen in großer Zahl zu erwarten. Sie könnten mit dazu beitragen, aus der ursprünglichen Ausgangsform eine „Sorte“ oder gar eine Art mit mehr oder weniger großen Abweichungen zu entwickeln. Neben den Möglichkeiten für eine eventuelle Verbesserung züchterisch bedeutsamer Merkmale ließen sich Modellvorstellungen entwickeln, ob und in welcher Weise künstlich hervorgerufene Veränderungen oder induzierte Manipulationen des Genoms in der Natur ablaufenden oder abgelaufenen evolutionistischen Prozessen entsprechen. Nachgewiesenermaßen sind bereits einfache Genmutationen in der Lage, evolutionistisch relevante Gestaltungs- und Leistungsänderungen hervorzurufen (Gottschalk 1971). Dies müßte unserer Überzeugung nach durch die Kombination einer größeren Zahl von Chromosomen- und Genmutationen in noch stärkerem Umfang möglich sein. Entsprechende Untersuchungen werden vorbereitet.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Karyotypen von zwei röntgeninduzierten Formen von *Pisum sativum* dargestellt und mit dem Karyotyp der Ausgangsform 'Dippes gelbe Viktoria' verglichen. Die zytologische Analyse erbrachte deutliche Unterschiede zwischen der Vergleichsform und diesen beiden Linien, die auf jeweils eine einfache reziproke Translokation zurückgeführt werden konnten. In beiden Fällen waren Satelliten-Chromosomen an dem Austauschprozeß beteiligt.

Bei 62B erfolgte eine Translokation zwischen dem langen Arm von Chromosom V und dem satellitentragenden langen Arm von VII. Die Linie 488 entstand durch Austausch zwischen den beiden Satelliten-Chromosomen IV und VII, und zwar in der Weise,

daß ein sehr kleines satellitenfreies und ein sehr langes Chromosom gebildet wurde, welches an den Enden seiner etwa gleich langen Arme jeweils einen Satelliten trägt. Die Vereinigung der beiden Satelliten-Regionen in einem Chromosom ist bisher für *Pisum* noch nicht beschrieben worden.

Zum Schluß wurde kurz die Bedeutung diskutiert, die solche drastischen Veränderungen des Karyotyps für die züchterische Praxis und für evolutionistische Fragestellungen haben könnten.

Literatur

1. Blixt, S.: Cytology of *Pisum*. II. The normal karyotype. *Agri Hort. Genet.* **16**, 221–237 (1958).
2. Blixt, S.: Cytology of *Pisum*. III. Investigation of five interchange lines and coordination of linkage groups with chromosomes. *Agri Hort. Genet.* **17**, 47–55 (1959).
3. Caroli, G., Blixt, S.: Cytological verification of the genanalytically proved interchange between the chromosomes III and V of *Pisum*. *Agri Hort. Genet.* **12**, 107 to 114 (1954).
4. Caroli, G., Blixt, S.: A cytological investigation for verifying the genanalytical results regarding no. 680 of *Pisum*. *Agri Hort. Genet.* **13**, 95–102 (1955).
5. Caroli, G., Blixt, S.: Cytological investigation of line no. 21 of *Pisum*. *Agri Hort. Genet.* **13**, 207 to 213 (1955).
6. Gottschalk, W.: Die Mutationsforschung in der modernen Pflanzenzüchtung. *Die Umschau* **65**, 693–697 (1965a).
7. Gottschalk, W.: Die Beeinflussung der Fertilität von Pflanzen durch mutierte Gene. *Die Umschau* **65**, 729–734 (1965b).
8. Gottschalk, W.: Origin and behaviour of rings of 4 and 6 chromosomes during meiosis of *Pisum*. *The Nucleus* **11**, 61–74 (1968).
9. Gottschalk, W.: Die Bedeutung der Genmutationen für die Evolution der Pflanzen. *Fortschritte der Evolutionsforschung*, Bd. 6, Stuttgart: Fischer 1971.
10. Gottschalk, W., Klein, H. D.: Bibliography of *Pisum* containing publications in the field of genetics, cytology, cytogenetics, mutation research, and mutation breeding. *Pisum Newsletter* **2**, 36–75 (1970).
11. Gottschalk, W., Milutinović, M.: Die Analyse hochgradiger Chromosomenverkettungen in der Meiosis von *Pisum sativum*. *Caryologia* **23**, 473–488 (1970).
12. Klein, H. D., Milutinović, M.: Methodische Untersuchungen zur Ermittlung des Karyotyps von *Pisum sativum* als Grundlage für die zytologische Identifizierung von Translokationen. *Genetica (Beograd)* **4** (1972), im Druck.
13. Lamprecht, H.: Polymere Gene und Chromosomenstruktur bei *Pisum*. *Agri Hort. Genet.* **10**, 158 bis 168 (1952).
14. Lamprecht, H.: Partielle Sterilität und Chromosomenstruktur bei *Pisum*. *Agri Hort. Genet.* **22**, 56–148 (1964).
15. Milutinović, M.: Die Induzierung von Translokationen und deren Einfluß auf den Ablauf der Mikrosporogenese. *Z. wiss. Landwirtschaftswesen (Belgrad)* **23**, 41–48 (1970).

Eingegangen am 17. Februar 1973

Angenommen durch H. Stubbe

Dr. H. D. Klein; Dr. M. Milutinović
 Institut für Genetik
 der Universität Bonn
 Kirschallee 1
 53 Bonn (Germany/BRD)