

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg.)

MUTATIONS AUSLÖSUNG DURCH ULTRAKURZWELLEN.

Erste Mitteilung.

Von

CORNELIA HARTE.

(Eingegangen am 21. Juni 1949.)

A. Einleitung.

Die Ultrakurzwellen ($\lambda = 1$ cm bis 20 m) kommen als natürliche Strahlung vor, die vor allem im Zusammenhang mit den Sonnenflecken besonders hohe Intensitäten erreichen kann. Daneben wird ihre immer stärkere Verwendung in Technik und Rundfunk von Bedeutung. Die UKW-Strahlung ist also dauernd in der Umgebung der Lebewesen vorhanden, in nach Zeit und Ort wechselnder Stärke, so daß vielfache Möglichkeiten der Beeinflussung gegeben sind. Es ist daher von besonderem Interesse, ihre biologische Wirkung kennenzulernen. Der Einfluß von Meterwellen auf das Teilungswachstum im Wurzelspitzenmeristem wurde bereits untersucht (BRAUER, HARTE und KIEPENHEUER 1949, BRAUER 1949). Das Ziel der hier begonnenen Untersuchungen ist es, die Wirkung der Meterwellen auf die Meiosis festzustellen.

B. Material und Methode.

Als Versuchspflanzen dienten kräftige Seiteninfloreszenzen des Bastards *Oenothera suaveolens sulfurea* \times *Hookeri* DE VRIES, also der gleichen Komplexkombination, wie sie auch OEHLKERS (1943) für die Mutationsauslösung durch Chemikalien verwendete. Die Infloreszenzen wurden unter Wasser auf 40 cm gekürzt und dann der Behandlung ausgesetzt. Diese erfolgte bei Zimmertemperatur mit einem Röhrenoszillator der Wellenlänge 1,5 m. Es wurde das gleiche Gerät verwendet wie für die Untersuchung der Mitosis, das bei BRAUER, HARTE und KIEPENHEUER

beschrieben wurde.¹ Die Feldstärke betrug in einer Entfernung von 95 cm parallel zur Antenne, wo sich die Gipfel der Infloreszenzen befanden, 1,5 Volt/m, Bestrahlungsdauer 15 Minuten. Die Kontrollpflanzen, die gleichzeitig abgeschnitten waren, befanden sich während der Bestrahlung in einem mehrere 100 m vom Versuchszimmer entfernten Raum. Anschließend wurden die Versuchs- und Kontrollpflanzen zu je 5 bis 7 in 500 ccm Erlenmeyerkolben aus Jenaer Glas in Leitungswasser gestellt und in die Kältekammer mit 10° konstanter Temperatur gebracht. Die Fixierung der Knospen erfolgte vormittags zwei, vier und sechs Tage nach der Bestrahlung. Fixiergemisch Alkohol-Eisessig 2:1, Färbung mit Eisenkarmin und Verarbeitung als Quetschpräparate. Die Versuche wurden im Juli 1948 durchgeführt.

Optik: Leitz Ortholux, Ölimmersion 100 mal, Okulare Leitz Periplan 12 mal und Seibert Periskop 15 mal.

C. Darstellung der Befunde.

Die Fixierung zwei Tage nach der Bestrahlung zeigte deutliche Störungen im Chromosomenzustand der PMZ, die als Primäreffekte angesprochen werden müssen. Die Zellen im Stadium der mittleren Diakinese wurden in analysierbare und nicht analysierbare eingeteilt. In den letzteren fanden sich häufig Verklebungen und Verklumpung der Chromosomen. Auch in den Zellen, in denen die Chromosomen ohne grobe Störungen einigermaßen übersichtlich gelagert waren, fanden sich mehrfach Verklebungen der Chromosomenenden und seitliche Verklebungen, also Störungen der Matrix. Unter 90 Zellen wurde eine mit einer chromosomalen Fragmentation beobachtet. Nur in einer Zelle traten zwei in sich geschlossene Univalente auf, die als Folge einer echten Chromosomenmutation zu betrachten sind.

Die Fixierung nach vier Tagen zeigt ein völlig anderes Bild. Der Anteil der nicht analysierbaren Zellen (Tab. 1 und 2) hat zugenommen, diese sehen aber ganz anders aus als bei der ersten Fixierung. Allgemeine Verklumpung der Chromosomen kommt äußerst selten vor. Meist sind die Chromosomen eng umeinander geschlungen, so daß der Verlauf der einzelnen Chromosomen und die Art ihrer Bindung nicht mit Sicherheit zu erkennen ist. Die große Anzahl der Verklebungen ist darauf zurückzuführen, daß in einer einzigen abweichenden Zelle sich mehrere Stellen fanden, an denen jeweils einige Chromosomen mit ihren Enden verklebt waren. Die Häufigkeit der Zellen mit Verklebungen der Chromosomen ist dagegen sehr gering. Auch die nicht analysierbaren Stellen entstehen

¹ Der Sender und das Kontrollgerät wurde freundlicherweise von Herrn Dr. KIEPENHEUER, Fraunhofer-Institut Freiburg, zur Verfügung gestellt, wofür an dieser Stelle bestens gedankt sei.

Tabelle 1. Abhängigkeit im Auftreten der Anomalien vom Abstand von der Bestrahlung.

Fixierungstag	Zeit nach Behandlung	Zellen in Diakinese	Davon nicht analysierbar	Analysierbar	In den analysierbaren Zellen				Verklebungen
					sichere Umbauten der Chromosomen	verdächtige Stellen	einzelne nicht analysierbare Stellen		
16. Juli	2 Tage	90	29	61	2	0	20	6	
18. "	4 "	325	105	220	29	19	60	8	
20. "	6 "	97	32	65	7	7	7	0	

Tabelle 2. Unterschied im Auftreten der Anomalien in verschiedenen Knospen. Fixierung vier Tage nach der Bestrahlung (18. Juli).

Knospe	Zahl der Antheren	Zellen in Diakinese	Davon nicht analysierbar	Analysierbar	In den analysierbaren Zellen				Verklebungen
					sichere Umbauten	verdächtige Stellen	einzelne nicht analysierbare Stellen		
A	3	115	49	66	17	9	19	2	
B	6	133	31	102	7	5	22	5	
C	2	44	14	30	4	4	9	0	
D	4	33	11	22	1	1	10	1	
	15	325	105	220	29	19	60	8	

nicht wie in der Fixierung nach zwei Tagen durch Verklumpung der Chromosomen, sondern meist dadurch, daß bei mehrfachem Interlocking die Zusammengehörigkeit der Chromosomen nicht mehr deutlich zu erkennen ist. In einigen Präparaten waren die Chromosomen größer als normal, sowohl in Länge wie Breite, und auffallend blaß gefärbt, während in anderen Antheren der gleichen Knospen in der Diakinese Chromosomen von normaler Größe und Färbbarkeit gefunden wurden.

In den PMZ, die sich in Diakinese befanden, wurden eine große Anzahl von ungewöhnlichen Chromosomenkonfigurationen gefunden, deren Entstehung nur erklärlich ist durch Umbauten der Chromosomen. Neben einer chromosomalen Fragmentation wurden eine Reihe von Translokationen gefunden. Wegen der Komplikation, die durch die Terminalisation der Chiasmen entsteht, ist es in den meisten Fällen nicht möglich, chromosomale und chromatidale Translokationen zu unterscheiden. Die wenigen Fälle, die eindeutige Feststellungen erlaubten, waren alle chromatidale Restitutionsen.

Die verwendete Form besitzt normal in der Diakinese einen Viererring und fünf Bivalente. Für die Entstehung von Chromosomenmutationen gibt es demnach mehrere Möglichkeiten: 1. zwischen den Chromosomen eines Bivalentes, 2. zwischen zwei Chromosomen aus verschiedenen Bivalenten, 3. innerhalb des Viererringes, 4. zwischen einem Chromosom des Viererringes und einem Bivalentchromosom. Diese Einteilung entspricht derjenigen, die von Oehlkers und Linnert (1949) verwendet wurde, die auch Schemata der möglichen Konfigurationen bringen. Umbauten innerhalb eines Chromosoms sind ebenfalls möglich und wurden auch in einigen Fällen gefunden, sie sind aber nicht immer mit Sicherheit von Translokationen zwischen den beiden Chromosomen eines Bivalentes oder zwischen benachbarten Ringchromosomen zu unterscheiden. Einige Konfigurationen, z. B. geschlossene Univalente, sind möglich bei chromosomalen und chromatidalen Translokationen in einem Bivalent wie auch bei Umbauten innerhalb der Chromosomen eines Bivalentes, da die in der Diakinese sichtbare Konfiguration sowohl durch die Umbauten wie durch die Chiasmen und deren gegenseitige Lage auf den Chromosomen bedingt wird. Die Veränderungen innerhalb eines Chromosoms wurden deshalb, trotzdem einige sichere Fälle vorhanden sind, nicht als gesonderte Gruppe gezählt. Die Verteilung der Mutationen auf die Genome, die in Tab. 3 dargestellt ist, zeigt keine zufallsgemäße Beteiligung der genannten vier Gruppen, sondern es findet sich eine eindeutige Bevorzugung der Konfigurationen, bei denen die Restitution sich zwischen zwei Chromosomen vollzogen hat, die bei der Paarung benachbart sind, also innerhalb eines Bivalentes und innerhalb des Viererringes. Einige Zellen wiesen mehrere Mutationen auf. Im ganzen wurden in 220 analysierbaren Zellen 29 sichere Chromosomenmutationen gefunden.

Tabelle 3. Art der Chromosomenaberrationen und ihre Verteilung auf die Genome.

Tag der Fixierung	Tage nach Bestrahlung	Chromosomale Fragmentation (in Bivalent)	Translokationen				Wegen Bina- dungsauflösung nicht zu ent- scheiden ob im Ring oder zwischen Bivalenten	Wegen Interlocking nicht zu entschei- den ob in Bivalent oder zwischen zwei Bivalenten
			innerhalb eines Bivalentes	zwischen zwei Bivalenten	innerhalb des Viererringes	zwischen Ring und Bivalent		
16. Juli	2 Tage	1	0	0	0	0	0	0
18. "	4 "	1	8	6	3	2	1	1
20. "	6 "	0	2	2	0	0	0	0
Summe		2	10	8	3	2	1	1

Tabelle 4. Pollenausbildung.

Tag der Fixierung	Zeit nach Bestrahlung	Zahl der Antheren	Zahl der Pollenkörner	Anzahl der Körner mit n Keimporen						Zwerg- pollen	Summe der anormalen Pollenkörner	
				5	4	3			2			1
						regelmäßig	unregelmäßig	Zwergpollen				
18. Juli	4 Tage	3	600	0	25	565	6	2	1	0	34	5,7%
20. "	6 "	1	200	1	1	161	11	14	10	2	39	19,5%
		1	200	0	3	186	9	1	1	0	14	7%
		1	200	0	12	163		25			37	18,5%
Summe ..		3	600	1	16	510			73	90	15,6%	

Neben den Konfigurationen, die sich sicher als Folgen von Chromosomenmutationen erkennen ließen, fanden sich zahlreiche Stellen in den Zellen, an denen der Lage der Chromosomen nach ebenfalls eine Mutation vermutet werden mußte, die aber wegen verschiedener Umstände, wie Interlocking, Überlagerung durch andere Chromosomen, ausgezogene Bindungen, Verschlingungen der Chromosomen und ähnlichem nicht eindeutig zu klassifizieren waren. Diese wurden als „verdächtige Stellen“ protokolliert. Unter dieser Gruppe, ebenso wie bei den nicht analysierbaren Stellen und den unübersichtlichen Zellen, werden sich wahrscheinlich noch eine größere Anzahl von echten Chromosomenmutationen verbergen, deren Häufigkeit aber nicht genau feststellbar ist. Es hat den Anschein, als ob in den Antheren mit blaß gefärbten Chromosomen mehr Mutationen vorhanden sind als in denen mit normal gefärbten Chromosomen, aber die Differenzen sind wegen der geringen Anzahl von Zellen, die jeweils in einem Präparat im richtigen Stadium der mittleren Diakinese waren, nicht zu sichern (höchstens 44, im Durchschnitt aber nur 15 analysierbare Zellen pro Anthere).

Die Translokationen finden sich sowohl im Euchromatin wie im Heterochromatin. Häufig entstehen wieder Chromosomen mit einer Insertionsstelle, aber eine Anzahl von Figuren ließ sich nur so interpretieren, daß durch die Translokationen ein Chromosom mit zwei Insertionsstellen [bikommissurales Chromosom nach MARQUARDT (1941)] und eines ohne Insertionsstelle, aber auch ohne freie Bruchflächen, (akommissurales Chromosom) entstanden waren. Auch das Vorkommen von Ringchromatiden und zugehörigem chromatidalem Fragment wurde beobachtet. In der Anaphase fanden sich Chromosomenbrücken (= bikommissurale Chromosomen), liegenbleibende Chromosomen (= akommissurale Chromosomen) und kleinere Fragmente, die als Folge der in der Diakinese beobachteten Chromosomenmutationen anzusehen sind.

Am sechsten Tag nach der Bestrahlung nimmt die Häufigkeit der in der Diakinese beobachteten Mutationen etwas ab, es treten aber immer noch Umbauten der Chromosomen auf, die sich auch in den gleichen Anaphasestörungen wie am vierten Tag bemerkbar machen, wie die folgende Übersicht zeigt: In drei Antheren fanden sich zusammen 74 Zellen in Anaphase, die sich auf verschiedene Gruppen verteilten:

normale Anaphasen	52
Chromosomenbrücken zwischen den Anaphasengruppen (bikommissurale Chromosomen)	3
liegenbleibende (akommissurale) Chromosomen	19
Brücke + zurückbleibende Chromosomen	1

Die Ausbildung der jungen Pollenkörner aus etwa 5 mm langen Antheren ist in den beiden ersten Fixierungen normal. Es handelt sich

dabei um Knospen, in denen die Meiosis kurz vor oder nach der Bestrahlung beendet war. Es finden sich nur wenige abweichende Pollenkörner und die Differenzen zwischen den einzelnen Antheren sind gering. Gezählt wurden aus drei Antheren von verschiedenen Knospen jeweils 200 Körner. Am sechsten Tag treten aber starke Störungen im Pollenbild auf (Tab. 4). Neben den in verminderter Häufigkeit vorhandenen vierporigen Körnern, die nach den Untersuchungen an trisomen *Oenotheren* mehr als sieben Chromosomen enthalten, kommen auch unregelmäßige dreiporige vor, weiter kleinere mit zwei oder einer Keimpore und Zwergpollen ohne Keimpore. Sehr selten fanden sich ganz große Körner mit fünf Keimporen. Die Unterschiede in der Häufigkeit der Anomalien zwischen den einzelnen Antheren aus verschiedenen Knospen sind ziemlich groß. Dieses anormale Pollenbild weist auf starke Verteilungsstörungen bei den Meiosis an den vorhergehenden Tagen, wie sie auch in der Anaphase I am vierten Tag beobachtet wurden.

D. Schluß.

Aus diesen Beobachtungen folgt, daß Meterwellen ($\lambda = 1,5 \text{ m}$) bei der geringen Feldstärke von 1,5 Volt/m und kurzen Bestrahlungsdauer von 15 Minuten bereits ein starkes mutationsauslösendes Mittel darstellen. Die Behandlung erfolgte mit freier Raumwelle, wodurch im Gegensatz zur Bestrahlung zwischen Elektroden bei der verwendeten Feldstärke eine schädliche Erwärmung des Objektes völlig ausgeschlossen ist. Die aufgetretenen Mutationen und Primäreffekte können also keineswegs als Folgen einer Hitzeschädigung aufgefaßt werden.

Trotzdem die Wirkung von UKW auf Gewebekulturen und Bakterien bereits mehrfach geprüft wurde, meist allerdings einseitig vom medizinischen Standpunkt aus, liegt über ihre mutagene Wirkung bisher nur eine Beobachtung von KRAJEVOY vor (1936, 1937, zit. nach TISCHLER 1942). Diese Untersuchung ist bis auf eine kurze Erwähnung bei TISCHLER (1942) unbeachtet geblieben und wurde uns erst nach Beendigung der Versuche bekannt. Er fand nach Bestrahlung von Pisum-Samen mit einer Wellenlänge von zirka 4 m (Feldstärke unbekannt) nach der Keimung einmal Fragmente und Translokationen in den Wurzelspitzen. Daß Meterwellen von $\lambda = 1,5 \text{ m}$ bei der Einwirkung auf Kerne des Wurzelmeristems wachsender Wurzeln ebenfalls Mutationen auslösen, zeigen die Untersuchungen von BRAUER an Wurzelspitzen von *Vicia Faba* (BRAUER, 1949).

Die Feststellung der mutagenen Wirkung von UKW ist für die Mutationsforschung von besonderer theoretischer Bedeutung, weil sie eine Strahlung darstellen, deren Wirkung wegen ihrer geringen Quantenenergie nur schwer durch Trefferereignisse erklärt werden kann. Der mutagenen Wirkung der UKW kommt weiterhin eine erhebliche Bedeu-

tung dadurch zu, daß diese Strahlung in der Natur zeitweise in Stärken vorkommt, bei denen die Auslösung von Mutationen erwartet werden muß. Eine eingehendere Diskussion des Problems und die genauere Auswertung des Materials soll im Zusammenhang mit der Veröffentlichung weiterer Untersuchungen über die Wirkung längerer Bestrahlungszeiten und anderer Intensitäten erfolgen.

Die praktische Bedeutung der Untersuchungen liegt darin, daß bei der stark erweiterten Anwendung von UKW für Rundfunk- und Fernsehendungen damit zu rechnen ist, daß in der Umgebung der Sendeanlagen die Pflanzen starken Schädigungen ausgesetzt sind, für deren tatsächliches Vorkommen bereits die Beobachtungen über die sogenannten UKW-Schneisen in Wäldern in der Nähe von Richtstrahlantennen und über das Eingehen der Pflanzen in der Nähe von Fernsehsendern vorliegen.

Literatur.

Brauer, I. 1949: Die Wirkung von Meterwellen verschiedener Feldstärke auf das Teilungswachstum in den Wurzelspitzen von *Vicia Faba*. Im Druck. — **Brauer, I.** (1949): Die Auslösung von Chromosomenmutationen durch Meterwellen im Wurzelspitzenmeristem von *Vicia Faba* (in Vorbereitung). — **Brauer, I., C. Harte und O. Kiepenheuer** (1949): Über die Wirkung von Meterwellen auf das Pflanzenwachstum. *Naturwiss.* **36**. — **Marquardt, H.** (1942): Über Bau, Häufigkeit und Auswirkungen spontaner Translokationen. *Flora N. F.* **35**, 239—302. — **Oehlkers, F.** (1943): Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. *Z. Vererbl.* **81**, 313—341. — **Oehlkers, F. und G. Linnert**: Neue Versuche über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. *Z. Vererbl.* **93**, 136—156. — **Tischler, G.** (1942): Allgemein Pflanzenkaryologie. 2. Hälfte. In *Handb. d. Pflanzenanatomie*. Bornträger, Berlin.

Errata

to the paper "A Cytochemical Study of the Feulgen Nucleal Reaction" by Henry Saverio di Stefano, published in "Chromosoma" Vol. III, No. 4, 1948.

Page 290, legend Fig. 3 to read as follows:

Fig. 4. Absorption curve of cartilage nuclei of *Rana pipiens*, fixed in Carnoy's fluid, showing the relationship between the intensity of color produced by the trichloroacetic acid Millon reaction and duration of hydrolysis.

Page 291, legend Fig. 4 to read as follows:

Fig. 3. Absorption measurements of cartilage nuclei of *Rana pipiens*, fixed in Carnoy's fluid, showing the relationship between duration of hydrolysis and the amount of methyl green bound by the nuclei.