

LAKATOS I (1974) Falsifikation und die Methodologie wissenschaftlicher Forschungsprogramme. In: LAKATOS I & MUSGRAVE A (Hg) Kritik und Erkenntnisfortschritt. Braunschweig: Vieweg, S. 89-189.
LØVTRUP S (1987) Darwinism: The refutation of a myth. Croom Helm.

NEUHAUS K (2000) Wächst der „Stammbaum der Evolution“ jetzt im Vorgarten der Schöpfungslehre? Stud. Int. J. 7, 88-89.
RIEDL R (1975) Die Ordnung des Lebendigen. Hamburg.
SCHMIDT F (Hg, 1990) Neodarwinistische oder kybernetische Evolution? Heidelberg.

Experimentelle Mutagenese bei *Arabidopsis thaliana*

Die Evolutionstheorie geht davon aus, daß durch das Zusammenwirken von zufälliger Mutation und anschließender Selektion nicht nur eine Differenzierung und Spezialisierung bereits vorhandener Strukturen erfolgen kann (Mikroevolution), sondern neue, vorher nicht vorhandene Konstruktionen entstehen können (Makroevolution). Es wird davon ausgegangen, daß evolutionäre Veränderungen lange Zeiträume benötigen, was zum Teil an der relativen Seltenheit von Mutationen liegt. Umgekehrt kann auf dieser Basis angenommen werden, daß eine Erhöhung der Mutationsrate eventuell zusammen mit einer stärkeren Selektion Evolution beschleunigen und damit eventuell im Laborsystem beobachtbar machen könnte.

Die Blütenpflanze *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) aus der Familie Brassicaceae (zu dieser Familie gehören z. B. Kohl und Rettich) wird als Modellorganismus in der Pflanzengenetik verwendet (Abb. 1). Die Pflanze ist klein, anspruchslos und kann auf begrenztem Raum kultiviert werden. Ihre Generationszeit ist 6 Wochen, das haploide Genom enthält auf 5 Chromosomen etwa 130-140 Millionen Basenpaare DNA. Die komplette Sequenzierung durch die „*Arabidopsis* Genom Initiative“¹ wird für die nächsten 12 Monate erwartet.

Künstliche Mutagenese ist ein wichtiges molekularbiologisches Verfahren, um Aussagen über die Funktion von Proteinen oder Genen zu gewinnen. Dabei wird künstlich die Mutationsfrequenz beispielsweise in Pflanzensamen erhöht und die so gewonnenen Mutanten nach interessierenden Mutationen durchsucht, welche dann weiter untersucht werden.

In der Mutagenese finden Röntgenstrahlen, schnelle Neutronen und Chemikalien wie Ethylmethansulfonat (EMS) Verwendung. EMS führt vornehmlich zu spezifischen DNA-Veränderungen (Alkylierung), wodurch bei der Replikation das Basenpaar von G:C zu A:T verändert wird (SEGA 1984, BURNS et al. 1986). Das besondere daran ist, daß EMS vor allem Punktmutationen erzeugt.

Extrapolationen von bei Mikroorganismen gefundenen Raten ergeben für *Arabidopsis* eine abgeschätzte Spontanmutationsrate von 0,0033 pro Genom und Replikation (DRAKE 1991, DRAKE et al. 1998), wobei einzelne Genorte des *Arabidopsis*-Genoms recht unterschiedliche Raten aufweisen

können. Eine Studie fand für genetisch bestimmte Merkmale, die mit der Fortpflanzung in Zusammenhang stehen wie die Anzahl der Früchte, oder die Anzahl der Samen pro Früchte eine im Verlauf mehrerer Generationen um einen Mittelwert schwankende Variabilität (SHAW et al. 2000).

Bei *Arabidopsis* wird bevorzugt Mutagenese mittels EMS betrieben, da dieser farblose, leicht flüchtige, bei Zimmertemperatur flüssige Stoff ein leistungsfähiges Mutagen ist, welches zugleich nur eine geringe Sterblichkeit verursacht. Dabei werden jeweils einige Tausend *Arabidopsis*-Samen in einer 100 millimolaren EMS-Lösung einige Stunden gebadet und anschließend kultiviert. Unter EMS ist die Mutationshäufigkeit um ein vielfaches erhöht (KOORNEEF et al. 1982) – wahrscheinlich ein Faktor der Größenordnung einige 1000.

In der 1. Generation mutagenetisch veränderter Pflanzen kommen typischerweise chlorophyllarme Areale in geringer Anzahl (eine Pflanze unter 100 bis 1000) vor.² Ihr Auftreten gilt als Indikator für eine erfolgreiche Mutagenese, ihr Auftreten erklärt sich wie folgt: Pflanzensamen sind vielzellige Organe. Durch Mutagenese werden in einigen ihrer Zellen genomische Veränderungen erzeugt, in anderen nicht. Es entstehen so ausgewachsene Pflanzen, die Mosaik aus intakten und veränderten Genomen sind, was sich beispielsweise im Vorliegen einzelner chlorophyllarmer Blätter an einer ansonsten unauffälligen Pflanze zeigt. In der 2. Generation zeigen 20-30% der Pflanzen ontogenetische oder physiologische Veränderungen wie ein allgemein kränkliches Aussehen, vorzeitiges oder verspätetes Blühen, Sterilität oder Zwergwuchs (REITER et al. 1997) und Chlorosis (Bleichheit durch Chlorophyllmangel). Festzuhalten ist, daß eine EMS-Behandlung durchweg und typischerweise defizitäre Pflanzen hervorbringt.

Jede Arbeitsgruppe durchsucht die entstandenen Mutationen nach den für die angestrebten Forschungsfragen relevanten Mutationen. Die weitaus größte Zahl ist jeweils uninteressant und wird verworfen. Aus diesem Grunde existiert keine genaue Aufstellung über alle bisher beobachteten Mutationen. Freilich geben die bisher näher untersuchten Mutationen einen guten Eindruck für typische durch Mutagenese induzierte Veränderungen.

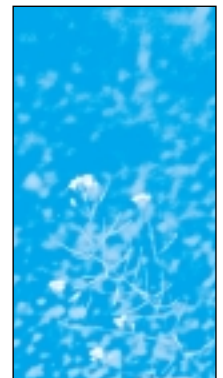


Abb. 1: *Arabidopsis thaliana* – ein unscheinbares Pflänzchen aus der Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae).



Abb. 2: Blütenmutanten der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*). Links: Blüte besteht nur aus Kelchblättern, Mitte: Blüte besteht nur aus Fruchtblättern (Stempel), rechts: Alle Blütenteile sind in laubblattartige Gebilde umgewandelt. (Aus Nature 353, ©1991 Macmillan Magazines Limited)

So wurde die Bildung anomaler Blüten mit zufälligem Verlust von Blütenorganen beschrieben: Blütenblätter, Kelchblätter, Stempel oder Staubblätter können fehlen (Abb. 2). Ebenso kann die Pflanze eine gestörte Pflanzenorganentwicklung zeigen (ROE et al. 1993, IRISH & SUSSEX 1990, BOWMAN et al. 1992). Die Zuckerkomposition der Monosaccharidseitenketten von Proteinen der Zellwände kann verändert sein: eine Arbeit beschrieb beispielsweise eine 50-prozentige Reduzierung des Arabinosegehaltes aufgrund eines Defektes in der UDP-L-Arabinose *de novo*-Synthese (BURGET & REITER 1999).

Es wurden Pflanzen mit einem vorzeitigen Abbruch der Pollenentwicklung, einem Defekt beim Auswachsen der Pollenschläuche oder in der Bildung des Pflanzenembryos beschrieben (GRINI et al. 1999).

Pflanzen, die homozygot für EMS-induzierte Mutationen sind, können Verwachsungen von Organen zeigen: Beispiele sind Fusionen zwischen Blütenorganen wie Kelchblättern und Blütenblättern ohne Einfluß auf die Fruchtbarkeit oder Fusionen zwischen Eizellen mit nachfolgender Sterilität oder Semisterilität der weiblichen Blütenorgane (LOLLE & HSU 1998).

Einige vorteilhafte Mutanten sind ebenfalls beschrieben worden: *Arabidopsis*-Pflanzen mit vergrößerter Resistenz gegenüber mikrobiellen Pathogenen, beispielsweise verstärkter lokaler Apoptose von *Pseudomonas syringae*-infizierten Zellen mit dem Effekt der Begrenzung der Infektausbreitung (RATE et al. 1999), eine erhöhte Anzahl von Früchten und Samen pro Frucht (SHAW et al. 2000). Diese Neuerungen verbleiben jedoch stets im mikroevo-lutiven Rahmen.

Die durch EMS vornehmlich bewirkte erhöhte Frequenz von Punktmutationen (Transition von G:C zu A:T) ist nur einer von mehreren relevanten Mutationsmechanismen. Weitere Mechanismen sind unter anderem Genumordnungen, Duplikationen, Deletionen oder Inversionen. Die dadurch ausgelösten größeren Veränderungen sind aller Wahrscheinlichkeit nach deshalb aber nicht positiver. Bleibt abzuwarten, ob die symmetrische Mutationseffektverteilung, die von SHAW et al. (2000) beobachtet wurde, sich langfristig bestätigt. Die große Anzahl der hier vorgestellten Studien, die Funktionsverluste beschreiben, scheint dies jedoch nicht gerade nahezulegen: Sobald das adaptive Potential ausgeschöpft ist, dürften sich wohl auch hier mehr negative als positive Mutationen zeigen.

Hinweise auf Makroevolution sind jedenfalls aus den hier dargestellten Ergebnissen nicht zu gewinnen, aber sehr wohl zu mikroevo-lutivem Verlust von Funktion und Pluripotenz.

Emilie G. Burget & Wolfgang B. Lindemann

Anmerkungen

¹ neueste Informationen unter www.arabidopsis.org/agi.html
² zu Technik und Effekten von EMS bei *Arabidopsis* siehe OTTOLINE LEYSER HM & FURNER IJ: „EMS mutagenesis of *Arabidopsis*“, unter http://www.arabidopsis.org/comguide/chap_1_plants/6_EMS_mutagenesis.html

Literatur

- BOWMAN JL, SAKAI H, JACK T, WEIGEL D, MAYER U & MEYEROWITZ EM (1992) SUPERMAN, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Development* 114, 599-615.
- BURGET EG & REITER WD (1999) The *mur4* Mutant of *Arabidopsis* is partially defective in the *de Novo* Synthesis of uridine diphospho L-arabinose. *Plant Physiol.* 121, 383-389.
- BURNS PA, ALLEN FL & GLICKMAN BW (1986) DNA sequence analysis of mutagenicity and site specificity of ethyl methanesulfonate in *Uvr+* and *UvrB-* strains of *Escherichia coli*. *Genetics* 113, 811-819.
- DRAKE JW (1991) A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7160-7164.
- DRAKE JW, CHARLESWORTH B, CHARLESWORTH D & CROW JF (1998) Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148, 1667-1686.
- GRINI PE, SCHNITTGER A, SCHWARZ H, ZIMMERMANN I, SCHWAB B, JURGENS G & HULSKAMP M (1999) Isolation of ethyl methanesulfonate-induced gametophytic mutants in *Arabidopsis thaliana* by a segregation distortion assay using the multimarker chromosome 1. *Genetics* 151, 849-863.
- IRISH VF & SUSSEX IM (1990) Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell* 2, 741-753.
- KOORNEEF M, DELLAERT LW & VAN DER VEEN JH (1982) EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana*. *Heynh. Mutat. Res.* 93, 109-123.
- LOLLE S J HSU W (1998) Genetic analysis of organ fusion in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 149, 607-619.
- RATE DN, CUENCA JV, BOWMAN GR, GUTTMAN DS & GREENBERG JT (1999) The gain-of-function *Arabidopsis* *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell* 11, 1695-1708.
- REITER WD, CHAPPLE C & SOMERVILLE CR (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. *Plant J.* 12, 335-345.
- ROE JL, RIVIN CJ, SESSIONS RA, FELDMANN KA & ZAMBRYSKI PC (1993) The *Tousled* gene in *A. thaliana* encodes a protein kinase homolog that is required for leaf and flower development. *Cell* 75, 939-950.
- SEGA GA (1984) A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.* 134, 113-142.
- SHAW RG, BYERS DL & DARMO E (2000) Spontaneous mutational effects on reproductive traits of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 155, 369-378.