

N<sup>o</sup> 23. **Hans Ulrich**, Zürich. — Die Beziehung zwischen Strahlendosis und Mutationsrate bei Röntgenbestrahlung von *Drosophila*-Zygoten<sup>1</sup> (Mit 3 Textabbildungen.)

Zoologisches Institut der E.T.H.

Bald nachdem H. J. MULLER (1927) bei *Drosophila* die mutationsauslösende Wirkung der Röntgenstrahlen entdeckt hatte, wurde festgestellt (OLIVER 1930, u. a.), dass die Häufigkeit der strahleninduzierten Mutationen linear mit der applizierten Dosis ansteigt. Die dabei benutzte und seither in strahlengenetischen Versuchen besonders häufig verwendete Methode war, adulte *Drosophila*-♂♂ zu bestrahlen und sodann mittels geeigneter Kreuzung die in ihren Keimzellen ausgelösten rezessiv-geschlechtsgebundenen Letalfaktoren zu erfassen.

Die festgestellte lineare Beziehung zwischen Strahlendosis und Mutationsrate ist theoretisch und praktisch höchst bedeutungsvoll. Sowohl der Befund selbst als auch seine Deutung wurden besonders in letzter Zeit verschiedentlich kritisiert. Bedenken ergaben sich vor allem aus der Tatsache, dass die bei der üblichen Bestrahlung von *Drosophila*-♂♂ bestrahlten Keimzellen hinsichtlich ihres Entwicklungsstadiums, und damit bezüglich ihrer Strahlenempfindlichkeit heterogen sind. Auf eine solche Heterogenität und ihre Folgen wurden auch experimentell gefundene Abweichungen von der linearen Dosisabhängigkeit der Mutationsrate zurückgeführt (MULLER u. Mitarb. 1954).

Angesichts der Bedeutung der Frage schien es uns angezeigt, die Beziehung zwischen Strahlendosis und Mutationsrate erneut eingehend zu prüfen, und zwar mit Hilfe der von uns ausgearbeiteten Methode der Zygotenbestrahlung von *Drosophila*, die gegenüber der herkömmlichen Fliegenbestrahlung gewisse Vorteile bietet. Zu erwähnen ist namentlich, dass das bestrahlte Zygoten-Material homogener ist, dass wir die Anzahl der bestrahlten Zygoten genau

---

<sup>1</sup> Mit Unterstützung durch den Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung. Ein Teil der Versuche wurde von Herrn dipl. Natw. ETH DENIS BASSAND durchgeführt.

kennen, und schliesslich, dass die Zygoten besser und unmittelbarer als die in den Fliegen befindlichen Keimzellen zusätzlichen Umwelteinflüssen vor, während oder nach der Bestrahlung ausgesetzt werden können, so beispielsweise Gasen oder Chemikalien.

### METHODE

Eine grosse Anzahl 4—5 Tage alter unbegatteter Wildtyp-♀♀ von *Drosophila melanogaster* wurde zusammen mit zahlreichen Muller 5-♂♂ unter die Glasglocke einer speziellen Legeapparatur gebracht. Die nach erfolgter Paarung jeweils innert 10 min auf die leicht auswechselbare Legeschale der Apparatur abgelegten F<sub>1</sub>-Eier wurden 10 min später, also im Alter von 10—20 min, und somit als noch ungefurchte Zygoten bestrahlt. Strahlenquelle war eine 50kV-Röntgenröhre, die Bestrahlungsdauer betrug stets 3 min, die Strahlendosis wurde durch Verändern des Fokusabstandes variiert. Die Zygoten befanden sich zur Bestrahlung in einer kleinen Plexiglasskammer, durch welche ein Luftstrom geleitet wurde (Abb. 1).

Versuchsanordnung für Bestrahlung in Luft oder Stickstoff

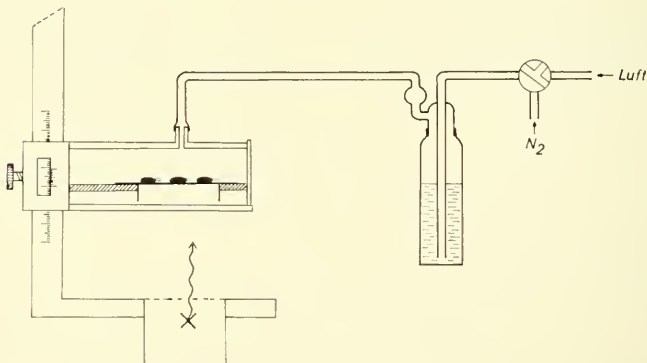


ABB. 1.

Nach der Bestrahlung kamen die Zygoten auf Agarblöcken in Aufzuchttröhrchen. Diese hatten einen inneren Durchmesser von 3 cm, eine Höhe von 11 cm, und enthielten rund 50 cem mit Hefe bedeckten Futterbrei. Durch Auszählen der nicht geschlüpften

Zygoten 2 Tage nach der Bestrahlung wurde die embryonale Sterblichkeit festgestellt. Aus der Differenz zwischen Anzahl der schliesslich entstehenden Imagines und der aus den bestrahlten Zygoten geschlüpften Larven wurde die (auf die geschlüpfte Larvenzahl bezogene) postembryonale Sterblichkeit errechnet.

Die in die Legeapparatur gebrachten Wildtyp-♀♀ besitzen 2 normale X-Chromosomen. Das einzige X-Chromosom der Muller 5-♂♂ (neuerdings werden sie auch Base-♂♂ genannt) enthält den unvollständig dominanten Faktor Bar (Bandäugig) und das rezessive Augenfarballel apricot (aprikosenfarben), ausserdem austauschender Inversionen.

Die von den Fliegen gelieferten  $F_1$ -Zygoten, die wir bestrahlen, sind zur Hälfte weiblich, nämlich heterozygot  $+/M5$ , zur Hälfte männlich, nämlich hemizygot  $+/Y$ . Mit den aus diesen Zygoten entstehenden überlebenden  $F_1$ -Fliegen werden Einzelpärchenzuchten angesetzt. Die erhaltenen  $F_2$ -Geschwisterschaften sollten zu gleichen Teilen aus  $+/+ - ♀♀$ ,  $+/M5 - ♀♀$ ,  $+/Y - ♂♂$  und  $M5/Y - ♂♂$  bestehen. Fehlt die eine oder die andere  $♂♂$ -Sorte, so besagt dies, dass durch die Bestrahlung der betreffenden heterozygoten  $F_1$ -Mutter als Zygote in dem normalen bzw. dem Muller 5-X-Chromosom eine rezessive Letalmutation erzeugt worden war. Der Prozentsatz der  $F_2$ -Geschwisterschaften, in denen eine der beiden  $♂♂$ -Sorten fehlt, ergibt, durch 2 dividiert, die Rate der rezessiv-geschlechtsgebundenen Letalmutationen. Unbestrahlte, nur mit Luft überströmte  $F_1$ -Zygoten dienten als Kontrollen.

#### VERSUCHE UND ERGEBNISSE

In einer grossen Anzahl Versuche wurden  $F_1$ -Zygoten mit abgestuften Dosen von 200—1400 r bestrahlt. An einem Tag wurde jeweils in einer Reihe von Bestrahlungen nur eine der Dosen angewendet. Versuche mit höheren Dosen als 1400 r sind wegen der dann zu hoch werdenden embryonalen und postembryonalen Sterblichkeit unbrauchbar.

Die für jede Dosis summierten Resultate sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Embryonale und postembryonale Sterblichkeit, auf die wir hier nicht näher eingehen wollen, nehmen mit steigender Strahlendosis zu (siehe hierzu die nachfolgende Arbeit von WÜRGLER 1960).

TABELLE 1

Röntgenbestrahlung von  $F_1$ -Zygoten aus der Kreuzung Wildtyp ♀ × Muller 5-♂ von *Drosophila melanogaster*. Embryonale und postembryonale Sterblichkeit sowie Rate rezessiv-geschlechtsgebundener Letalmutationen in Abhängigkeit von der Strahlendosis.

Ver-suchs-serie	Dosis in r	Ver-suchs-zygoten	Zygo-ten pro Auf-zucht-röhren	Sterblichkeit % ± 2 σ		Ge-prüfte X-Chro-mosomen	Letalmutationen		
				embryonal	postembryonal		Anzahl	%	95%ige Sicher-heits-grenzen
1+2	0 (Kon-trolle)	11 782	200	13,52 ± 0,6	10,20 ± 0,6	3638	17	0,47	0,27 0,75
1	200	6 900	400	35,36 ± 1,70	21,46 ± 1,23	2828	41	1,45	1,04 1,96
1	400	3 420	600	56,11 ± 1,70	26,12 ± 2,27	784	16	2,04	1,15 3,33
1	600	11 714	700	71,29 ± 0,84	39,76 ± 1,96	1646	74	4,50	3,53 5,64
1	800	8 140	800	82,35 ± 0,85	42,31 ± 2,61	682	34	4,99	3,45 6,97
1	1000	34 749	900	88,78 ± 0,34	48,34 ± 1,90	2052	136	6,63	5,65 7,75
2	1400	80 200	3000	94,99 ± 0,15	63,66 ± 1,52	1204	103	8,55	7,01 10,40
1	1200	23 470	1000	90,63 ± 0,38	68,67 ± 1,98	546	26	4,76	3,11 6,98
1	1400	29 200	1000	92,32 ± 0,31	78,21 ± 1,74	386	19	4,92	2,95 7,69

Wie bereits früher in dieser Zeitschrift (ULRICH 1958) für homozygote Wildtyp-Zygoten gezeigt wurde, besteht bei halblogarithmischer Darstellung zwischen Strahlendosis und embryonaler Sterblichkeit eine annähernd lineare Beziehung. Es wurde damals gleichzeitig demonstriert, dass durch Sauerstoffausschluss während der Bestrahlung mittels Stickstoff die embryonale Sterblichkeit im gesamten Dosisbereich gesenkt wird, und zwar so, dass die lineare Beziehung erhalten bleibt.

Die Halbwertsdosis für die embryonale Sterblichkeit betrug in dem Versuch, dessen Resultate graphisch dargestellt wurden (Rev. Suisse de Zool. 65, p. 447, Abb. 1), bei Bestrahlung in Luft ca. 270 r, bei Bestrahlung in Stickstoff ca. 580 r, nicht, wie im Text p. 446 irrtümlich angegeben wurde, 400 bzw. 850 r.

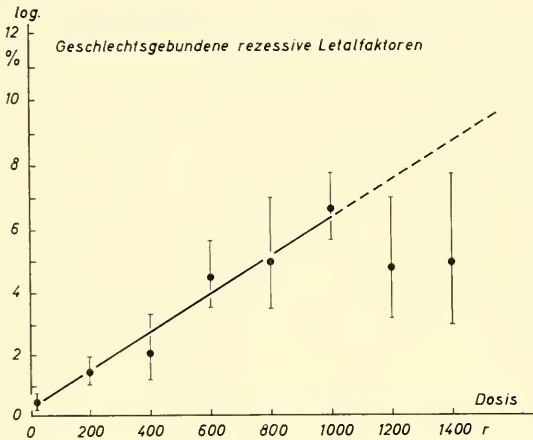


ABB. 2.

Abhängigkeit der Rate rezessiv-geschlechtsgebundener Letalmutationen von der Strahlendosis bei Röntgenbestrahlung von  $F_1$ -Zygoten aus der Kreuzung Wildtyp-♀  $\times$  Muller 5-♂ von *Drosophila melanogaster*. Ergebnisse der 1. Versuchsserie. Die eingezeichnete Regressionsgerade ist die gleiche wie in Abb. 3 und aus den dort dargestellten Werten errechnet.

Die in der ersten Versuchsserie (Tabelle 1, Versuchsserie 1) mit insgesamt rund 120.000 bestrahlten Zygoten erhaltenen Raten bestrahlten Zygoten erhaltenen Raten rezessiv-geschlechtsgebundener Letalmutationen sind mit den Grenzen für 95% ige Sicherheit (nach STEVENS 1942, LAMOTTE 1957) in Abb. 2 graphisch im halblogarithmischen Raster dargestellt. Es zeigt sich, dass für die Dosen von 200 bis 1000 r die Mutationsraten geradlinig ansteigen, dass die Raten für 1200 und 1400 r dann aber eindeutig tiefer als der 1000 r-Wert liegen.

Wie ist dieses starke Abweichen von der Geradlinigkeit im Bereich der höchsten angewendeten Dosen zu erklären? Wir dachten u. a. an folgende Möglichkeit:

Wir hatten die bestrahlten Zygoten in Aufzuehröhrchen gebracht, in denen die schlüpfenden Larven zu Imagines heran-



wuchsen. Wir gaben umso mehr Zygoten in ein Röhrchen, je höher die Strahlendosis war, um auf diese Weise die unterschiedliche embryonale Sterblichkeit zu kompensieren und eine leidlich gleichmässige Besetzung aller Röhrchen mit Larven zu erreichen. Bei den beiden höchsten Dosen von 1200 und 1400 r waren jeweils 1000 bestrahlte  $F_1$ -Zygoten in ein Röhrchen gebracht worden; das ist eine hohe Anzahl, die aus mehreren einzelnen Bestrahlungen gesammelt werden musste. Da jedoch die embryonale Sterblichkeit bei diesen hohen Dosen mehr als 90% beträgt und auch die postembryonale Sterblichkeit sehr hoch liegt, ist trotz der grossen eingebrachten Zygotenzahl die larvale Besetzung gering. Unterbesetzte Aufzuchtröhrchen bieten aber schlechte Bedingungen. Somit waren die Aufzuchtbedingungen für die überlebenden  $F_1$ -Larven bei den höchsten Dosen schlechter als bei den tieferen. Könnte hierauf das Abfallen der Mutationsraten bei den höchsten Dosen beruhen? Darauf nämlich, dass schlechte Aufzuchtbedingungen für die als Zygoten bestrahlten  $F_1$ -Larven und die dadurch erhöhte postembryonale Sterblichkeit bevorzugt solche  $F_1$ -♀♂ ausmerzt, die heterozygot für eine strahleninduzierte rezessive Letalmutation sind, so dass auf diese Weise die registrierte Mutationsrate gegenüber der ursprünglich induzierten Rate stark gesenkt wird?

Wir prüften diese Hypothese, indem wir insgesamt rund 80.000  $F_1$ -Zygoten mit 1400 r bestrahlten und von ihnen nunmehr je 3000 — statt 1000 — zusammen in ein Aufzuchtröhrchen brachten. So erhöhten wir die larvale Besetzungsdichte auf das Dreifache und boten damit bessere Aufzuchtbedingungen, die ähnlich denen für die mit niedrigen Dosen bestrahlten Individuen in den vorhergehenden Versuchen waren.

Wie aus Tabelle 1 (Versuchsserie 2) und Abbildung 3 zu ersehen ist, erhielten wir jetzt bei dieser höchsten Dosis eine Mutationsrate, die sehr gut auf einer Geraden mit den vorher bei 200 bis 1000 r gewonnenen Raten liegt. Unsere Hypothese, dass die unerwartet niedrigen Mutationsraten bei den beiden höchsten Dosen in Versuchsserie 1 auf einer Selektionswirkung gegen für induzierte Letalfaktoren heterozygote  $F_1$ -♀♂ beruhte, scheint sich also zu bestätigen.

Zur Sicherung führten wir einen weiteren, speziellen Versuch durch, vorerst nur einmal und mit relativ geringem Material, so dass das Resultat als vorläufig anzusehen ist. Wir bestrahlten rund

18.000  $F_1$ -Zygoten mit 1000 r und brachten sie je zu 300, 900 oder 3000 in Aufzucht­röhrchen (Tabelle 2). Infolge der strahlenbedingten embryonalen Sterblichkeit, die bei 1000 r etwa 88% betrug und in allen Röhrchen — unabhängig von deren Besetzungsdichte —

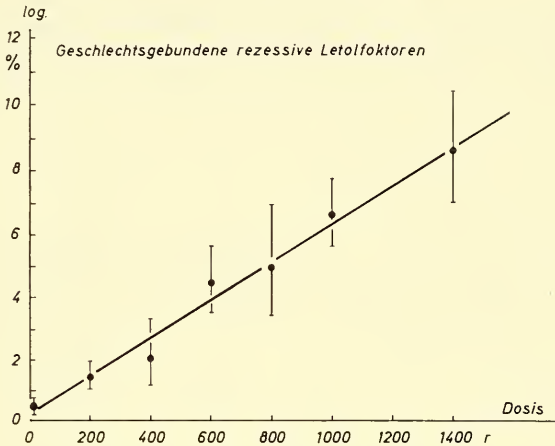


ABB. 3.

Abhängigkeit der Rate rezessiv-geschlechtsgebundener Letalmutationen von der Strahlendosis bei Röntgenbestrahlung von  $F_1$ -Zygoten aus der Kreuzung Wildtyp-♀ × Muller 5-♂ von *Drosophila melanogaster*. Ergebnisse der 1. Versuchsserie, aber ohne Werte für 1200 und 1400 r, ausserdem Ergebnis der 2. Versuchsserie (neuer Wert für 1400 r). Die eingezeichnete Regressionsgerade ist aus den in dieser Abb. dargestellten 7 Werten errechnet.

natürlich etwa dieselbe war, waren die 300er-Röhrchen mit Larven unterbesetzt, die 900er-Röhrchen normal besetzt, während die 3000er-Röhrchen überbesetzt waren. Dementsprechend war die postembryonale Sterblichkeit in den 300er- und 3000er-Röhrchen höher als in den 900er-Röhrchen. Umgekehrt war die Mutationsrate, welche durch Kreuzung überlebender  $F_1$ -Fliegen aus 900er-Röhrchen gewonnen wurde, am höchsten.

In Übereinstimmung mit unserer Hypothese wurde durch Über- und Unterbesetzung, also durch ungünstige Aufzuchtbedingungen, welche die postembryonale Sterblichkeit erhöhen, die registrierte Mutationsrate gesenkt, zweifellos infolge selektiver Sterblichkeit der für induzierte Letalmutationen heterozygoten

$F_1$ -♀♀. Diese Letalmutationen sind offenbar nicht völlig rezessiv und vermindern wenigstens teilweise die Vitalität der für sie heterozygoten ♀♀.

TABELLE 2

*Röntgenbestrahlung mit 1000r von  $F_1$ -Zygoten aus der Kreuzung Wildtyp ♀ × Muller 5 - ♂ von Drosophila melanogaster. Einfluss der Besetzungsdichte der Aufzuchttröhrchen für die  $F_1$ -Individuen auf postembryonale Sterblichkeit und Rate rezessiv-geschlechtsgebundener Letalmutationen.*

Zygoten pro Aufzuchttröhrchen	300	900	3000
Anzahl Aufzuchttröhrchen . .	10	3	4
Embryonale Sterblichkeit . %	88,07	87,63	88,12
Postembryonale Sterblichkeit %	42,74	34,73	42,99
Geprüfte X-Chromosomen . .	174	198	688
Letalmutationen . . . . %	2,87	7,07	4,80

Wir können auf Grund der geschilderten Versuche annehmen, dass bei Zygotenbestrahlung die induzierte Mutationsrate entsprechend der klassischen Vorstellung geradlinig mit der Strahlendosis ansteigt. Ein zuerst gefundenes Abweichen der registrierten Raten von dieser linearen Beziehung liess sich auf Selektionswirkung zurückführen. Unsere Versuche demonstrieren gleichsam modellmässig, auf welche Weise Abweichungen von der Geraden zustandekommen können. Jedenfalls sollte bei allen Mutationsexperimenten mit der Möglichkeit einer durch Selektion bewirkten Differenz zwischen registrierter und induzierter Mutationsrate gerechnet werden.

## LITERATUR

- LAMOTTE, M. 1957. *Initiation aux méthodes statistiques en biologie.* Masson et Cie, Paris. 144 pp.
- MULLER, H. J. 1927. *Artificial transmutation of the gene.* Science 66: 84.
- MULLER, H. J., I. H. HERSKOWITZ, S. ABRAHAMSON and I. I. OSTER. 1954. *A nonlinear relation between X-ray dose and recovered lethal mutations in Drosophila.* Genetics 39: 741-749.



- OLIVER, C. P. 1930. *The effect of varying the duration of X-ray treatment upon the frequency of mutation.* Science 71: 44-46.
- STEVENS, W. L. 1942. *Accuracy of mutation rates.* J. Genet. 43: 301-307.
- ULRICH, H. 1958. *Die mutagene Röntgenstrahlenwirkung auf das ungefurchte Drosophila-Ei und ihre Sauerstoffabhängigkeit.* Rev. suisse Zool. 65: 442-448.
- WÜRGLER, F. E. 1960. *Die Sauerstoffabhängigkeit der Abtötungs- und Mutationsrate bei Röntgenbestrahlung von Drosophila-Zygoten.* Rev. suisse Zool. 67: 295-302.

N<sup>o</sup> 24. **Friedrich E. Würgler**, Zürich. — Die Sauerstoffabhängigkeit der Abtötungs- und Mutationsrate bei Röntgenbestrahlung von *Drosophila*-Zygoten.<sup>1</sup> (Mit 3 Textabbildungen.)

Zoologisches Institut der E. T. H.

Die Strahlenwirkungen auf verschiedenste Objekte lassen sich durch zahlreiche chemische und physikalische Milieufaktoren beeinflussen. Für das Verständnis der Mutagenese bei höheren Organismen ist der Sauerstoff-Effekt von besonderem Interesse. Bei *Drosophila* war die Untersuchungsmethode meistens die folgende: Wildtyp ♂♂ wurden als Puppen oder Imagines in verschiedenen Gasatmosphären bestrahlt, mit ♀♀ eines Teststammes ausgekreuzt und die Nachkommen in der F<sub>2</sub> auf rezessive Letalfaktoren geprüft. Um die einzelnen, auf verschiedenen Stadien der Spermatogenese bestrahlten Keimzellen getrennt auf Mutationen zu prüfen, paarte man die ♂♂ in bestimmten Zeitabständen mit neuen, virginen ♀♀. Als Resultat schien sich folgendes abzuzeichnen:

- a) die verschiedenen Stadien der Spermatogenese sind verschieden empfindlich für die Sauerstoffkonzentration in der Umgebung während der Bestrahlung (OSTER 1958);
- b) der Sauerstoffeffekt ist dosisabhängig und nimmt mit steigender Dosis ab (H. FRITZ-NIGGLI 1959 a, b).

<sup>1</sup> Ausgeführt mit Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.