

Vergleich der Wirkung eines Carbamatherbizids und von Colchicin auf die Mitose von *Allium cepa* und *Hordeum vulgare*

E. GÜNTHER und A. NASTA

Sektion Biologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald (DDR)

Investigations on the Effects of a Carbamate Herbicide and of Colchicine on Mitosis of *Allium cepa* and *Hordeum vulgare*

Summary. The marked differences in sensitivity of mitotically active root tip cells of *Hordeum* and *Allium* observed in response to a carbamate herbicide are not found in response to treatment with the spindle poison colchicine. *Hordeum* was less sensitive than *Allium*. Colchicine inhibited the spindle and caused c-mitoses and polyploidy. The carbamate herbicide inhibited the spindle and strongly affected the chromosomes; arrest of mitosis was primarily caused by stickiness and pycnosis of the chromosomes, spindle inhibition was of secondary importance.

Blakeslee und Avery fanden 1937 den polyploidisierenden Effekt des Colchicins. Levan (1938) bezeichnete den unter dem Colchicineinfluß veränderten Mitoseablauf nach seinen gründlichen Untersuchungen als C-Mitose. In der Folgezeit erweiterten zahlreiche Untersuchungen über die Colchicineinwirkung auf Pflanzen die Vorstellungen über die zytologischen Effekte dieses Alkaloids (zusammenfassende Literaturübersichten bei Tischler 1951, Tischler und Wulff 1953–1963, Deysson 1968). Experimente über die zytologischen Effekte verschiedener Carbamate ergaben, daß gewisse Analogien zum Colchicin bestehen. Vergleichende Untersuchungen mit Colchicin und Herbizid liegen von Lefèvre (1939) und Mann und Storey (1966) vor. Allgemein wird den Carbamat-herbiziden eine Störung der Mitose zugeschrieben (Literatur bei Audus 1964). Mann und Storey (1966) schlagen sogar die Verwendung von Carbamaten an Stelle von Colchicin zur Erleichterung der zytologischen Analyse vor. Unsere Untersuchungen bestätigten, daß CIPC (=Chlorpropham) ein Mitosegift ist. Neben den Übereinstimmungen zwischen CIPC und Colchicin traten aber auch Unterschiede in der zytologischen Wirkung auf, die in der vorliegenden Arbeit gegenübergestellt sind. Insbesondere interessierte die Frage, ob die selektive Wirkung, die den Einsatz von CIPC als Herbizid ermöglicht, nach Colchicin-Applikation in gleicher Weise zu finden ist. Es zeigte sich, daß unsere Testpflanzen für die Herbizidempfindlichkeit *Allium* (resistant) und *Hordeum* (sensibel) diese Unterschiede gegenüber Colchicin nicht besitzen.

Material und Methode

Als Carbamat verwendeten wir Elbanil mit 25% CIPC (Hersteller: VEB Fahlberg-List).

Gekeimte Samen und Karyopsen wurden während der ersten Zellteilungen mit Colchicin- bzw. Carbamat-Lösung behandelt. Auf Grund unserer Vorversuche haben wir für *Allium* die Konzentration 0,1% und für *Hordeum* 0,005% gewählt. Außerdem wurde *Hordeum* mit 0,1% Colchicin-Lösung behandelt. Die Behandlungsdauer betrug $\frac{1}{2}$, 1 und 3 Stunden. Anschließend wurden die Keimwurzeln von *Allium* in Carnoy-Lösung, die von *Hordeum* in Alkohol : Eisessiggemisch (3:1) fixiert.

Die 3 Stunden mit Colchicin bzw. Carbamat behandelten Varianten wurden a) sofort fixiert, b) abgespült und auf feuchtes Fließpapier in Petrischalen gegeben und nach drei Tagen fixiert.

Die Färbung erfolgte nach Feulgen und die mikroskopische Untersuchung an Quetschpräparaten. Die analysierten Wurzelspitzen stammten bei jeder Variante aus mindestens 30 Keimlingen. Von jedem Präparat wurden 20 Metaphasen und die sich auf diesem Präparatabschnitt befindenden Anaphasen untersucht.

Ergebnisse

Die selektive herbizide Wirkung der Carbamate beruht darauf, daß bei vielen empfindlichen Unkräutern die Mitose so stark geschädigt wird, daß diese eingehen, einige Kulturpflanzen, wie z. B. *Allium*, aber unempfindlich sind. Unsere Untersuchungen hatten das Ziel zu ermitteln, ob der Effekt der Carbamate auf Pflanzen verschiedenen Empfindlichkeitsgrades vergleichbar ist mit dem Einfluß von Colchicin und demnach vorwiegend auf einer Spindelhemmung beruht.

Um den Verlauf der Mitoseschädigung erfassen zu können, war es notwendig, Konzentrationen anzuwenden, die zwar den Schadeneffekt deutlich erkennen ließen, aber keine so starken Schäden induzierten, daß die Zellen irreversibel teilungsaktiv werden. Auf Grund von Vorversuchen war bekannt, daß der Sensibilitätsunterschied gegen Elbanil zwischen *Allium* und *Hordeum* 1:200 beträgt, wenn mitotisch aktive Wurzelspitzen behandelt werden, bei Samen

Tabelle 1. Vergleich der zytologischen Wirkung von Elbanil und Colchicin bei Behandlung während der ersten Zellteilungen
Konzentration der angewandten Lösungen: *Allium cepa* — Elbanil 0,1%; Colchicin 0,1%;
Hordeum vulgare — Elbanil 0,005%; Colchicin a 0,005%; Colchicin b 0,1%

Behandlungsduer	Anzahl unters. Mitosen	% norm. Mit.	Anzahl unters. Meta.	% anom. Meta.	davon C-Mit.	>2 n	Anzahl unters. Anaph.	% anom. Anaph.	mit Brück.	mit Lagg.	— multip. Anaph.	Verhältnis Meta./Anaph.
<i>Allium</i>												
Kontrolle 1/2 Std.	1110	97	600	0,5	—	—	510	6,2	6,2	0,6	—	1,2
Elbanil	1096	95	600	3,0	2,5	—	496	7,0	5,4	2,6	—	1,2
Colchicin 1 Std.	1128	92	639	7,8	7,5	—	489	9,0	8,6	0,6	—	1,3
Elbanil	1004	89	615	20,6	14,4	1,5	489	17,6	10,9	4,5	2,4	1,2
Colchicin 3 Std.	752	27	675	80,0	76,5	2,2	77	11,7	9,1	3,9	—	8,8
Elbanil	802	37	516	61,0	14,4	10,4	286	66,4	14,2	12,8	51,0	1,8
Colchicin	668	2	668	98,0	94,0	3,2	—	—	—	—	—	—
<i>Hordeum</i>												
Kontrolle 1/2 Std.	990	99	686	0,9	—	—	304	0,6	0,6	—	—	2,3
Elbanil	594	48	594	51,3	10,7	—	—	—	—	—	—	—
Colch. a	910	99	605	0,3	—	—	305	1,6	0,6	0,3	—	2,0
Colch. b	664	86	801	11,7	—	—	63	34,9	16,0	6,4	27,2	9,2
1 Std.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Elbanil	606	49	606	51,0	4,5	—	—	—	—	—	—	—
Colch. a	896	97	607	1,0	0,9	—	289	6,0	4,1	2,9	—	2,1
Colch. b	611	72	600	28,9	16,6	—	11	100,0	27,3	10,3	90,9	54,5
3 Std.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Elbanil	600	17	600	83,4	1,7	1,7	—	—	—	—	—	—
Colch. a	780	94	528	5,3	5,2	—	252	6,0	1,6	2,0	2,4	2,1
Colch. b	600	52	600	48,5	21,6	1,2	—	—	—	—	—	—

bzw. Karyopsen 1:20. Vorwiegend wurden Konzentrationen mit einer Differenz von 1:20 appliziert. Für den Vergleich mit Colchicin wurden meistens gleiche Konzentrationen verwendet.

In Tab. 1 sind die durch Elbanil und Colchicin bei *Allium* und *Hordeum* bewirkten Mitoseschäden dargestellt. Beide Mitosegifte bewirken eine mit der Zeit zunehmende Anzahl anomaler Mitosen. Zunächst treten C-Mitosen auf. Nach längerer Einwirkung zeigt sich, daß der Colchicinschaden vor allem auf Spindelhemmungen beruht (insbesondere bei *Allium*): C-Mitosen und Zellen mit mehr als 2n Chromosomen nehmen zu, Anaphasen sind nicht mehr zu finden. Die geringe C-Mitosehäufigkeit bei *Hordeum* ist darauf zurückzuführen, daß die Chromosomen sehr stark verkürzt und z. T. verklebt sind, so daß sich X- und Sk-Stadien nicht feststellen lassen.

Nach Elbanileinwirkung nimmt im Laufe von 3 Stunden die C-Mitosehäufigkeit nur auf 14% zu, bei *Hordeum* nimmt sie ab. Das Schadbild wird von anderen Metaphaseanomalien wie Stickiness und Pyknose bestimmt. Das Stagnieren der Mitose in der Metaphase geht bei Elbanileinwirkung mehr auf die Verklebung und Zusammenballung der Chromosomen zurück, nach Colchicineinwirkung vorwiegend auf die Hemmung der Spindel. Neben dieser Übereinstimmung in der Beeinflussung der beiden Objekte *Allium* und *Hordeum* durch eines der Mitosegifte gibt es Unterschiede im Verhalten der beiden Pflanzenarten. Ein Teil dieser Differenzen wird darauf zurückzuführen sein, daß beide Arten gegen gleiche

Konzentrationen der beiden Agenzien unterschiedlich empfindlich sind. Wenn man z. B. die gleiche Anzahl anomaler Anaphasen zugrundelegt, müßte man bei *Allium* 0,1% Elbanil und 0,005% Colchicin anwenden. Bei *Hordeum* treten nach Behandlung mit 0,005% Colchicin und 0,0001% Elbanil etwa mit gleicher Häufigkeit anomale Mitosen auf (Tab. 2). Gegenüber Colchicin unterscheiden sich beide Pflanzenarten nur wenig, während gegenüber Elbanil extreme Differenzen bestehen. Bei der Einschätzung der in Tab. 1 dargestellten Ergebnisse muß man daher berücksichtigen, daß sich eine 0,1%ige Colchicinlösung auf die Mitose von *Allium* viel stärker aus-

Tabelle 2. Vergleichbare Anaphaseschäden nach Einwirkung verschiedener Colchicin- oder Elbanil-Konzentrationen auf Keimwurzeln während der ersten Zellteilungen
Behandlungsduer 3—4 Std.

Variante	% anom. Anaph.			
	Anaph. mit Brücken	Anaph. mit Laggards	multipolare Anaphasen	—
<i>Hordeum</i>				
Kontrolle	0,9	0,2	0,8	—
Elbanil 0,00001%	6,7	4,6	3,2	—
Colchicin 0,005%	6,0	1,6	2,0	2,4
<i>Allium</i>				
Kontrolle	6,7	6,1	0,6	—
Elbanil 0,1%	67,6	28,9	23,7	59,6
Colchicin 0,005%	71,5	33,4	19,3	37,5

Tabelle 3. Mitosestörungen nach 3stündiger Behandlung mit Elbanil und Colchicin. 3tägige Erholung

Variante	Anzahl unders. Mitosen	% poly. Mitosen	Anzahl unders. Meta.	% C-Mit.	andere veränderte Meta.	Anzahl unders. Anaph.	% anom. Anaph.	% Anaph. mit Brücken	% Anaph. mit Lagg.	Verhältnis Meta./ Anaph.
<i>Allium</i>										
E 0,1%	886	0,5	600	12	9	509	13	11	3	1,2
Co 0,1%	661	75,0	600	21	0,5	61	7	2	5	10,0
<i>Hordeum</i>										
E 0,0005%	961	0	600	0	0,7	261	8	6	2	2,3
E 0,005%	597	0	590	59	21	—	7	28	0	84,0
Co 0,005%	989	0	623	0,3	0,5	366	1	1	0,3	1,7
Co 0,1%	580	83,0	580	0	16	—	—	—	—	—

wirkt als eine 0,1%ige Elbanillösung. Bei *Hordeum* wurde ein Konzentrationsunterschied Elbanil:Colchicin von 1:20 appliziert, die Differenz in der Empfindlichkeit beträgt aber 1:500. Elbanil muß daher extremere Schadefekte verursachen als Colchicin.

Ein Vergleich der Anaphaseschäden war nur bei *Allium* möglich, da bei *Hordeum* nach den hier applizierten Konzentrationen keine Anaphasen eintreten. Die nach $\frac{1}{2}$ - oder 1stündiger Einwirkung auftretenden Anomalien sind nach Colchicin- und Elbanilbehandlung ähnlich. Die Polarität der Anaphasespindel wird durch Elbanil stärker gestört als durch Colchicin. Um die Folgen einer Colchicin- bzw. CIPC-Behandlung auf die überlebenden Pflanzen beurteilen zu können, erfolgte eine 72stündige Nachbehandlung mit Wasser, eine „Erholung“. Wie aus der Tab. 3 zu ersehen ist, erweisen sich bei *Allium* nach Colchicin-Behandlung 75% der untersuchten Metaphasen als polyploid. Dagegen verursacht CIPC die Entstehung von nur 0,5% polyploiden Zellen. 12% der Zellen befinden sich bei Elbanil-Behandlung noch in C-Mitose, bei Colchicin 21%. Die Anzahl verschiedener anderer Metaphasestörungen, wie Zerstückelung, Verklebung u. a., ist bei Elbanil mit 9% erheblich größer als nach Colchicin-Behandlung, bei der nicht mehr Anomalien als bei der Kontrolle beobachtet wurden. Die Wirkung des 0,005%igen Elbanil auf Gerste ist sehr nachhaltig. Nach 3tägiger Kultur auf feuchtem Fließpapier zeigten 60% der Metaphasen das für C-Mitosen typische Bild, nur 20% andere Anomalien waren festzustellen. Wahrscheinlich konnten von den 80% Zellen mit starken Verklumpungen der Chromosomen am Ende der 3stündigen Behandlung mit Herbizid nach starkem Verdünnen des Elbanils durch Waschen und Umlegen in Wasser in einigen Zellen C-Mitosen eintreten. Nach 3tägiger Wassernachbehandlung ist der Effekt noch so stark, daß keine Anaphasen ablaufen können. Den von uns beobachteten 590 Metaphasen standen ausschließlich auf einem Präparat 7 Anaphasen gegenüber. Nach Elbanil-Behandlung waren keine polyploiden Zellen vorhanden, wenn man nach 3 Tagen auswertet.

Da die niedrige Colchicin-Konzentration kaum eine Wirkung hatte, waren nach 3tägiger Erholung keine Veränderungen zu erwarten. Bei Wurzeln, die mit der höheren Konzentration behandelt worden waren,

traten nach 3tägiger Erholung etwa 80% polyploide Zellen auf und noch keine Anaphasen.

Bei Gerste wirkt Elbanil erheblich stärker als Colchicin derselben Konzentration. Es ist zu erwarten, daß die starken Schäden erst nach längerer Zeit abklingen. Da *Hordeum* auf Grund seiner hohen Empfindlichkeit auch durch 0,005%iges Elbanil noch sehr stark geschädigt wurde, behandelten wir zum Vergleich mit 0,0005%igem Elbanil und beobachteten die Erholung. Nach dieser Behandlung traten kaum noch Spindelstörungen auf, eine Polyploidierung erfolgte nicht, und die Verklebung der Chromosomen war ebenfalls aufgehoben. Beachtlich ist der hohe Anteil anomaler Anaphasen, insbesondere der Brückebildungen.

Diskussion

Die Möglichkeit, Mitosegifte als Herbizide einzusetzen, beruht auf der unterschiedlichen Sensibilität verschiedener Pflanzen gegen diese Herbizide. In der vorliegenden Arbeit interessierte, wieweit Unterschiede in der Herbizid-Sensibilität von *Hordeum* und *Allium* durch den Einfluß auf die mitotische Spindel beider Pflanzen bedingt sind. Um zur Beantwortung dieser Frage beitragen zu können, wurde die Wirkung von CIPC mit der Wirkung von Colchicin verglichen.

Während *Hordeum* je nach Entwicklungszustand gegen Elbanil 20–200mal empfindlicher ist als *Allium*, erwies sich *Hordeum* gegen Colchicin nur etwa $\frac{1}{2}$ mal so empfindlich wie *Allium*, wenn man die Anzahl anomaler Meta- und Anaphasen als Vergleichsmaßstab wählt. Die hohe Empfindlichkeit von *Hordeum* gegen CIPC beruht aber nicht auf einer besonders großen Zahl von C-Metaphasen, die nach den klassischen Colchicin-Versuchen als typisch für die Spindelgiftwirkung angesehen werden. Es treten zwar bei Einwirkung sehr schwacher Konzentrationen für sehr kurze Zeit keine Anaphasen mehr auf; die anomalen Metaphasen sind aber größtenteils Pyknosen.

Aus den zahlreichen Arbeiten über den Einfluß des Colchicins ist hinreichend bekannt, daß neben der Spindelhemmung andere Giftwirkungen zu beobachten sind. Wieweit Spindelhemmungen und wie weit andere Giftwirkungen auftreten, scheint ebenfalls von Objekt zu Objekt unterschiedlich zu sein. Bei *Allium* z. B. bewirkt Colchicin fast ausschließlich Spindelstörungen; bei *Hordeum* sind bei Anwendung

gleicher Konzentrationen nur etwa 50% der anomalen Metaphasen Spindelhemmungen. Nach CIPC-Einwirkung dagegen sind auch bei *Allium* nur etwa 25% der Metaphaseanomalien Spindelhemmungen.

Neben der Störung der Spindel, die insbesondere auch aus der teilweisen Verhinderung des Eintritts in die Anaphase zu ersehen ist, bewirken andere Anomalien eine Zellteilungshemmung. Nach CIPC-Applikation sind das vorwiegend Stickiness bzw. Pyknosen, seltener eine Fragmentierung der Chromosomen. Nach längerer Erholung findet man stark zerstückelte Chromosomen; das Chromosom behält zwar seine Individualität, es erscheint aber wie von Gaps unterbrochen. Trotz des etwas unterschiedlichen Verhältnisses von Spindelhemmung: sonstiger Giftwirkung auf die Mitose bei *Allium* und *Hordeum* kann man einschätzen, daß Colchicin bei beiden Objekten einen größeren Anteil an Spindelhemmungen bewirkt als CIPC. Dieser Unterschied hat zur Folge, daß nach Colchicin-Behandlung nach 3tägiger Erholung >75% polyploide Mitosen bzw. Mitosen mit einer Chromosomenzahl >2n gefunden wurden. Nach Elbanileinwirkung werden dagegen kaum Mitosen mit >2n gefunden. In der auf die Behandlungsgeneration folgenden Generation wurden ebenfalls keine polyploiden Pflanzen ermittelt.

Nach Bauch (1948) werden die in die Verdopplung der Zellen eingreifenden Gifte in 3 Gruppen unterteilt: 1. Spindelgifte, 2. Chromosomengifte, 3. Zellteilungsgifte. Die auf diesem Gebiet angewendeten Verbindungen greifen oft in alle 3 Prozesse ein, wobei ein Angriffsort meistens bevorzugt ist. Während Colchicin vor allem als Spindelgift anzusehen ist, daneben aber auch andere Effekte hervorrufen kann (D'Amato 1948), ist CIPC mehr als Chromosomengift anzusehen, das wie etwa die Akriderfarbstoffe in der Pro- und Prometaphase die Chromosomen zusammenballt. Tischler und Wulff (1953—1963, S. 191) halten die Carbamidsäureester für Ruhekerngifte.

In der folgenden Übersicht wird versucht, die Effektivität von Colchicin oder Elbanil auf verschiedene Prozesse darzustellen:

Wirkungstypen	Colchicin	Elbanil
1. Spindelhemmung	+++	++
C-Mitose/Polyplloidie	+++	+
Spindelpaltung/Teilspindel	++	+++
2. Chromosomengift	++	+++
Stickiness/Pyknose	+	+++
Verkürzung	++	++
3. Zellteilung	+	+
4. Chromatidenaberrationen	+	+
5. Genmutationen		+

Trotz der groben Klassifizierung in 3 Typen (+ = schwacher Effekt, +++ = starker Effekt) gilt diese Einschätzung nur für einen bestimmten Konzentrationsbereich und variiert von Objekt zu Objekt.

Die Unterschiede in der Wirkungsweise von Colchicin und Elbanil erklären auch die unterschied-

lichen Sensibilitätsdifferenzen zwischen *Allium* und *Hordeum*. Colchicin hemmt vorzugsweise die Spindel und führt über C-Mitosen zu Polyploiden, CIPC ballt die pro- und prometaphasischen Chromosomen zusammen, die pyknotischen Mitosen werden meistens eliminiert, oder sie durchlaufen nach der Erholung eine normale Mitose und die Zellen bleiben diploid. Ursache dafür, daß keine Anaphasen auftreten, ist oft nicht nur das Fehlen der Spindel, sondern die starke Verklumpung in der Pro- und Prometaphase, so daß keine Spindel wirksam werden kann.

Demnach ist CIPC nicht nur als Spindelgift, sondern mehr noch als Chromosomengift zu betrachten. Die Unterschiede in der Sensibilität beruhen weniger auf der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Spindel als vielmehr auf der der Chromosomen.

Zusammenfassung

Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung eines Carbamatherbizids und von Colchicin auf die Mitose von teilungsaktiven Wurzelspitzenzellen von *Hordeum* und *Allium* ergaben, daß die großen Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen *Hordeum* und *Allium* gegen das Carbamat in bezug auf das Spindelgift Colchicin nicht vorliegen, im Gegenteil, *Hordeum* ist weniger empfindlich als *Allium*.

Colchicin wirkt vorzugsweise auf die Spindel und führt über C-Mitosen zur Polyploidie. Das Carbamat übt neben dem Einfluß auf die Spindel einen starken Effekt auf die Chromosomen aus, indem es zu Verklebungen und Zusammenballungen führt.

Literatur

1. Audus, L. J. (Ed.): The Physiology and Biochemistry of herbicides. London and New York: Academic Press 1964.
- 2. Bauch, R.: Irreversible Chromosomen-schädigungen durch Trypaflavin. *Planta* **35**, 536—554 (1948).
- 3. Blakeslee, A. F., Avery, A.: Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. *J. Hered.* **28**, 393—411 (1937).
- 4. D'Amato, F.: The effect of colchicine and ethyleneglycol on sticky chromosomes in *Allium*. *Hereditas* **34**, 83—103 (1948).
- 5. Deysson, G.: Anti-mitotic substances. *Internat. Rev. Cytol.* **24**, 99—149 (1968).
- 6. Lefèvre, J.: Similitude des actions cytologiques exercées par le phenyluréthane et la colchicine sur des plantules végétales. *C.R. Acad.* **208**, 301—304 (1939).
- 7. Levan, A.: The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas* **24**, 470—486 (1938).
- 8. Mann, J. D., Storey, W. B.: Rapid action of carbamate herbicides upon plant cell nuclei. *Cytologia* **31**, 203—207 (1966).
- 9. Tischler, G.: Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. II, Berlin 1951.
- 10. Tischler, G., Wulff, H. D.: Allgemeine Pflanzenkaryologie. In: *Hdb. d. Pflanzenanatomie, Angewandte Pflanzenkaryologie*. Berlin 1953—1963.

Eingegangen am 5. November 1971
Angenommen durch H. Stubbe

Frau Prof. Dr. Elisabeth Günther
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald, Sektion Biologie
Jahnstr. 15a
22 Greifswald (Germany/DDR)
Dr. A. Nasta
Institut für Agronomie
Bucuresti (Rumänien), Marasti Nr. 59