Stoffwechselprodukte von *Allium*-Arten als Mitosegifte

K. Keck¹ und O. Hoffmann-Ostenhof

Erstes Chemisches Laboratorium der Universität Wien, Österreich

Eingegangen am 20. Januar 1956

Vor einiger Zeit berichteten wir in einer kurzen Mitteilung (Keck und Hoffmann-Ostenhof, 1951), daß Extrakte aus den Zwiebeln von *Allium cepa* bei Einwirkung auf Wurzeln derselben Art imstande sind, Chromosomenaberrationen zu verursachen. Bei Versuchen, die chemische Natur der für diese Effekte verantwortlichen Stoffe aufzuklären, ergab es sich, daß diese mit größter Wahrscheinlichkeit Bestandteile der sogenannten Lauchöle, also schwefelhaltige Verbindungen, sein dürften und es konnte gezeigt werden, daß synthetisch hergestelltes Diallyldisulfid, das als Bestandteil der Lauchöle verschiedener *Allium*-Arten bekannt ist, Chromosomenaberrationen hervorruft, welche den von den Zwiebelextrakten verursachten Erscheinungen weitgehend analog sind (Hoffmann-Ostenhof und Keck, 1951).

Bei eingehender Untersuchung dieser Phänomene konnten wir eine Anzahl interessanter cytologischer Effekte beobachten, über welche wir an dieser Stelle berichten wollen.

Methodik

Für den *Allium*-Test verwendeten wir in allen hier beschriebenen Versuchen kleine Steckzwiebeln einer bulgarischen Rasse als Testobjekt, wobei nur eindeutig gesunde und unverletzte Zwiebeln ausgesucht wurden. Diese wurden zum Antreiben der Wurzeln in Leitungswasser getaucht und die Wurzeln bis zu einer Länge von etwa 2 cm anwachsen gelassen. In den ersten Tagen der Keimung wurde das Wasser täglich 2–3 mal gewechselt.

Die Gewebeextrakte aus den Zwiebeln von *Allium cepa* und *Allium sativum* wurden einheitlich auf folgende Weise gewonnen: 40 g frische Zwiebeln wurden nach Entfernen der äußeren trockenen Schalen mit 150 ml Leitungswasser versetzt, dieses Gemisch dann etwa 2–3 Min. im "Waring-Blendor" bei 1500 UpMin. homogenisiert und darauf filtriert. Man erhielt auf diese Weise eine nur wenig trübe Lösung; diese diente unmittelbar zur Herstellung der einzelnen Verdünnungen. Als zweckmäßig erwies sich eine Verdünnungsreihe: Unverdünnt, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 usw.

Die Fixierung der Wurzelspitzen erfolgte durch 30 Min. lange Behandlung mit La Cour's 2BD Fixiergemisch; anschließend wurde 10 Min. lang bei 60° in 1 n Salzsäure hydrolysiert, die so behandelten Wurzelspitzen der Nucle-

¹ Derzeitige Adresse: Zoological Institute, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, U.S.A.

Tabelle 1. Einwirkung von Extrakten aus *Allium cepa*-Zwiebeln auf das Wurzelspitzenmeristem derselben Art. (Der Extrakt aus großen weißschaligen Zwiebeln wird mit I bezeichnet; derjenige aus den großen braunschaligen Zwiebeln mit II und derjenige aus den kleinen braunschaligen Zwiebeln der bulgarischen Rasse als III. Vgl. dazu Text.)

Ex-trakt	Konzent-ration	Dauer der Ein-wirkung in Stdt.	Totale Spindel-hemmung ¹⁾	Partielle Spindel-hemmung ¹⁾	Restitu-tionen ¹⁾	Kontrak-tionen	Chromoso-menfrag-mente ²⁾	Total ³⁾
I	Unverdünnt	4	††	‡‡	+	—	—	461
II	Unverdünnt ⁴⁾	4	‡‡	††	+	—	—	100
III	Unverdünnt	4	‡‡	‡‡	††	—	—	454
I	Unverdünnt	24	—	—	zahlreich	—	—	3W
III	Unverdünnt	24	—	—	zahlreich	—	—	3W
I	1:1	4	(+)	+	+	—	‡‡	384
II	1:1	4	(+)	+	(+)	—	(+)	134
III	1:1	4	—	(+)	—	+	—	206
I	1:1 ⁴⁾	24	—	—	—	4	—	4W
III	1:1	24	—	—	selten	5	—	6W
I	1:2	4	—	(+)	—	—	(+)	308
II	1:2	4	—	(+)	—	—	—	214
III	1:2	4	—	—	—	(+)	—	110
I	1:2 ⁴⁾	24	—	—	—	42	—	4W
III	1:2	24	—	—	—	7	—	3W
I	1:4	4	—	—	—	—	—	307
II	1:4	4	—	—	—	—	—	183
III	1:4	4	—	—	—	(+)	—	250
I	1:4	24	—	—	—	47	—	4W
III	1:4	24	—	—	selten	—	—	4W
I	1:8	4	—	—	—	—	—	250
II	1:8	4	—	—	—	—	(+)	160
III	1:8	4	—	—	—	—	+	180
I	1:8	24	—	—	—	10	—	256
III	1:8	24	—	—	—	38	—	3W
I	1:16	4	—	—	—	—	(+)	300
II	1:16	4	—	—	—	—	—	105
III	1:16	4	—	—	—	—	††	440
III	1:16	24	—	—	—	+	+	118
III	1:32	4	—	—	—	—	+	371
III	1:32	24	—	—	—	—	+	365

¹⁾ In diesen Spalten bedeuten: unter 1%....(+)

1-10%.... +

10-25%.... ††

25-50%.... ‡‡

Die prozentuellen Angaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der analysierten Mitosen.

²⁾ In dieser Spalte bedeuten: unter 1%....(+)

1- 2%.... +

2- 5%.... ††

5-10%.... ‡‡

alreaktion nach Feulgen unterworfen und daraus schließlich nach Bleichen mit Wasserstoffperoxyd Quetschpräparate hergestellt. Ein Teil der Präparate wurde einer Plasmagegenfärbung mit "Lichtgrün" (Grübler FS) unterworfen.

Die Mikrophotographien wurden auf Gevaert Superchromplatten (orthochromatisch) mit Grünfilter aufgenommen

Ergebnisse

1. Einwirkung von Extrakten aus *Allium cepa*-Zwiebeln auf das Wurzelspitzenmeristem derselben Art.

Es wurden Extrakte aus verschiedenen Zwiebelsorten untersucht, u.zw. Extrakte aus den bereits oben beschriebenen kleinen Steckzwiebeln einer bulgarischen Rasse, weiters Extrakte aus großen braunschaligen Zwiebeln (durchschnittlicher Durchmesser etwa 8 cm) und solche aus großen weißschaligen Zwiebeln (Durchmesser etwa 10 cm). Die beiden zuletzt genannten Sorten wurden käuflich erhalten; ihre Herkunft läßt sich nicht bestimmen. Die Extrakte aus den braunschaligen Zwiebeln zeigten bei längerem Stehen eine zunehmende Bräunung, während diejenigen aus den weißschaligen Zwiebeln unverfärbt blieben.

Die durch die verschiedenen Extrakte verursachten cytologischen Effekte sind qualitativ durchaus gleichartig, hingegen zeigte sich eine starke Verschiedenheit in der prozentuellen Häufigkeit der einzelnen Mitose-Aberrationen und auch in den Konzentrationen, welche zur Hervorrufung der Effekte erforderlich waren.

Eine Übersicht über die in einigen unserer Versuchsreihen beobachteten Effekte findet sich in Tabelle 1. Nicht in die Tabelle aufgenommen wurden die Versuchsreihen mit länger aufbewahrten Extrakten sowie die Erholungsversuche, weil diese nicht wesentlich andere Effekte ergaben.

Zu den einzelnen in der Tabelle vermerkten Effekten ist folgendes festzustellen:

a. *Effekte der höheren Konzentrationen.* In allen Fällen zeigen die höheren Konzentrationen der Extrakte eine deutliche toxische Wirkung gegenüber den Wurzeln, welche aber anscheinend mit der Fähigkeit derselben Extrakte, Mitoseaberrationen hervorzurufen, in keiner quantitativen Beziehung steht. Bei Erholungsversuchen in Leitungswasser nach 24stündiger Behandlung mit den Lösungen Unverdünn bis 1:4 kann makroskopisch ein Absterben

Die prozentuellen Angaben beziehen sich hier auf die Gesamtzahl der analysierten Anaphasen.

3) Unter "Total" wird gewöhnlich die Gesamtzahl der analysierten Mitosen angegeben; wenn aber, wie das bei 24 stündiger Einwirkung der höheren Konzentrationen der Fall ist, nur sehr wenige Mitosen beobachtet werden können, so wird anstelle der Zahl der analysierten Mitosen die Anzahl der untersuchten Wurzelspitzen angegeben und dieser Zahl zur Kennzeichnung ein *W* beigesetzt.

4) Bei diesen Konzentrationen wird auch das Auftreten von Klebrigkeit der Chromosomen ("stickiness") beobachtet.

der Wurzeln beobachtet werden.

Nach 4stündiger Einwirkung der Extrakte in den höchsten untersuchten Konzentrationen auf die Wurzeln finden sich in den Präparaten vorwiegend Mitosen mit deutlicher Spindelhemmung; daneben kann häufig das Auftreten von Klebrigkeit der Chromosomen ("stickiness") beobachtet werden. In diesen Präparaten lassen die Ruhekerne grobe netzartige Strukturen erkennen.

Die Mitosen mit Spindelhemmung zeigen in ihrem Erscheinungsbild bestimmte Abweichungen von den in der Literatur beschriebenen durch Colchicin verursachten C-Mitosen (vgl. z.B. Leven, 1938). Während frühe Metaphasen mit noch kaum erkennbarer Chromatidunterteilung noch dem Colchicin-Typus der C-Mitose des gleichen Stadiums entsprechen (Abb. 2, 5, 15), machen sich bei den späteren Stadien deutliche Abweichungen bemerkbar. Vor allem ist im Gegensatz zu den Colchicin-C-Mitosen die Zentromerdurchteilung entweder gar nicht oder nur wenig verzögert. An späteren Metaphasen lassen die wahllos über das Zellumen verteilten Chromosomen die Zentromerdurchteilung bereits deutlich erkennen. Die so häufig beschriebenen X-förmigen Chromatidpaare werden niemals beobachtet, hingegen finden sich oft bei weiter fortgeschrittener Chromatidteilung O-förmige Chromatidpaare (Abb. 8, 18). Hier stehen die Chromatiden also nur mehr terminal miteinander in Berührung, während die Zentromerregion am weitesten auseinandergewichen ist. Anaphasen dieses Typus können übrigens schon nach 2stündiger Behandlung mit einem unverdünnten Extrakt beobachtet werden.

Es ist bemerkenswert, daß auch nach längerer als 4stündiger Behandlung mit den konzentrierten Lösungen keine Häufung dieser Stadien zu beobachten ist; sie treten etwa gleich oft auf wie frühe Anaphasen in unbehandelten Kontrollpräparaten. Bei der gleichen Behandlung zeigen vor allem Metaphasen und frühe Anaphasen Kernrestitutionen (Abb. 4); aber auch Prophasen und spätere Anaphasen werden gelegentlich im Stadium der Rückbildung angetroffen (Abb. 7).

Ein weiterer Effekt der höchsten und höheren Konzentrationen ist die Klebrigkeit der Matrixsubstanz, die hier sowohl an spindelgehemmten (Abb. 1) als auch an normalen Mitosen erkennbar ist. Anaphasen und Telophasen zeigen feine Verbindungsfäden oder breite chromatische Brücken, während man bei Metaphasen mit verteilten Chromosomen eine Verklebungstendenz der Chromosomenenden beobachtet. Manche Metaphasen erinnern in ihrer Form an die sogenannten "ball metaphases", wie sie von Levan (1954) bei *Allium cepa* und von Barber und Callan (1943) bei *Triton* beschrieben wurden.

Im Verlauf der Einwirkung von unverdünntem oder 1:1 verdünntem Extrakt vermindert sich progressiv der Anteil an neu anlaufenden Mitosen und sinkt schließlich nach einigen Stunden Behandlung auf Null ab ("preprophase inhibition", D'Amato, 1949). Nach 24stündiger Einwirkung dieser Konzentrationen werden überhaupt keine Teilungsstadien mehr angetroffen;

Abb. 1-13. Einfluß von Extrakten aus den Zwiebeln *Allium cepa* auf die Mitosen in den Wurzelspitzen derselben Art. 1. 4 stündige Behandlung mit unverdünntem Extrakt; Metaphase mit Spindelhemmung, "stickiness". 1400 $\times$. 2. 4 stündige Behandlung mit unverdünntem Extrakt; partielle Spindelhemmung. 1400 $\times$. 3. 24 stündige Behandlung mit Verdünnung 1:4; "überalterte Prophase". 1400 $\times$. 4. 4 stündige Behandlung mit unverdünntem Extrakt; Kernrestitution aus einer frühen Anaphase. 1400 $\times$. 5. 4 stündige Behandlung mit unverdünntem Extrakt; Metaphase mit vollkommener Spindelhemmung. 1400 $\times$. 6. 24 stündige Behandlung mit Verdünnung 1:8; Metaphase mit stark kontrahierten Chromosomen. 1250 $\times$. 7. 4 stündige Behandlung mit unverdünntem Extrakt; Stadium der Kernrestitution einer Anaphase mit Spindelstörung. 1600 $\times$. 8. 4 stündige Behandlung

neben normal aussehenden Ruhekernen wird eine große Anzahl Restitutionskernen (Abb. 9) beobachtet. Die irreversible Schädigung nach dieser Behandlung, welche in den Erholungsversuchen nach wenigen Tagen am Absterben der Wurzeln erkennbar ist, läßt sich hier manchmal cytologisch nicht leicht feststellen; die Kerne sind aber meist pyknotisch und zeigen stark vergrößerte Strukturen.

Auch bei Behandlung mit den nächstniedrigen Konzentrationen (1:2, 1:4, 1:8) kommt es nach 24stündiger Einwirkung zur Aufhebung der Mitose-tätigkeit. Während das Anlaufen neuer Mitosen hier ebenfalls unterdrückt ist, scheinen aber unter diesen Bedingungen einige Kernteilungsstadien über einen längeren Zeitraum erhalten zu bleiben. Die Chromosomen sind stark kontrahiert und innerhalb der Zelle wahllos verteilt, was auf eine Störung der Spindelfunktion schließen läßt (Abb. 6, 15, 16). Daneben finden sich auch "überalterte Prophasen" (Abb. 3).

Bei Erholungsversuchen an Wurzeln, welche mit den Konzentrationen 1:4 und 1:8 behandelt wurden, lassen sich makroskopisch kleine C-Tumoren erkennen. Die konzentriertesten Lösungen bewirken Turgorverlust und somit den Tod der Zellen.

b. *Effekte der niedrigeren Konzentrationen.* Bei der Behandlung mit den niedrigeren Konzentrationen (von 1:16 abwärts) beobachtet man verschiedene Chromosomenaberrationen, u.zw. vollständige und unvollständige Chromosomenbrüche, Zentromerfehlteilungen und Chromatiden, welche an der Anaphasebewegung nicht teilgenommen haben, also diejenigen Erscheinungen, welche zusammenfassend als radiomimetische Effekte bezeichnet werden. Hier spielt die Dauer der Einwirkung eine geringere Rolle, da sowohl nach 4stündiger als auch nach 24stündiger Behandlung die genannten Aberrationen zu beobachten sind; die Werte liegen meist nach 4stündiger Einwirkung etwas höher als nach 24 Stunden.

Das Maximum der Aberrationen wird bei den Extrakten aus braunschaligen Zwiebeln durch die Verdünnungen 1:16 und 1:32 bewirkt; unter diesen Bedingungen werden Spindelhemmungen nicht beobachtet. Die Versuchsserie mit den Extrakten aus weißschaligen Zwiebeln ergab allerdings ganz andere Ergebnisse: hier findet sich der Maximalwert der Chromosomenaberrationen bei der Konzentration 1:1 und man beobachtet normale Mitosen und spindelgehemmte Mitosen nebeneinander, wobei Fragmentationen ausschließlich an Chromosomen normaler Mitosen vorkommen.

Allgemein werden Fragmente fast nur in Anaphasen und Telophasen gefunden; ihr Vorkommen in Metaphasen ist sehr selten (Abb. 11). Die

mit unverdünntem Extrakt; frühe Anaphase mit Spindelhemmung. 1400 $\times$. 9. 24 stündige Behandlung mit unverdünntem Extrakt; Restitutionskern. 1400 $\times$. 10. 4 stündige Behandlung mit Verdünnung 1:1; kleines Chromatiddoppelfragment. 1250 $\times$. 11. 4 stündige Behandlung mit Verdünnung 1:2; angehängtes Fragment. 1400 $\times$. 12. 24 stündige Behandlung mit Verdünnung 1:16; kleines freies Fragment. 1400 $\times$. 13. 4 stündige Behandlung mit Verdünnung 1:1; dizentrisches Chromosom. 1250 $\times$.

Abb. 14–27. Einfluß von Extrakten aus den Zwiebeln von *Allium cepa* und von Diallyldisulfid auf die Mitosen in den Wurzelspitzen von *Allium cepa*. 14. 4 stündige Behandlung mit unverdünntem *Allium*-Extrakt; Metaphase mit Spindelhemmung. 1600 $\times$. 15. 21 stündige Behandlung mit *Allium*-Extrakt Verdünnung 1:4; Spindelhemmung und starke Chromosomenkontraktion. 1400 $\times$. 16. 24 stündige Behandlung mit *Allium*-Extrakt Verdünnung 1:4; Anaphase mit Spindelhemmung und Chromosomenkontraktion. 1400 $\times$. 17. 4 stündige Behandlung mit *Allium*-Extrakt Verdünnung 1:2; Anaphase und Metaphase mit Spindelhemmung. 950 $\times$. 18. 4 stündige Behandlung mit unverdünntem *Allium*-Extrakt; frühe Anaphase mit Spindelhemmung. 1600 $\times$. 19. 24 stündige Behandlung mit *Allium*-Extrakt Verdünnung 1:16; zwei knopfförmige Fragmente. 1250 $\times$. 20. 24 stündige Behandlung

Länge der Fragmente beträgt etwa $2-4\mu$; ihre Anzahl pro Anaphase übersteigt niemals 4. In den meisten Fällen (etwa bei 80% der beobachteten Fragmentationen) finden sich zwei freie Chromatidfragmente pro Anaphase, deren Auftreten und Erscheinungsbild bestimmte Regelmäßigkeiten aufweisen. Beide Fragmente sind nämlich gleich lang und stehen insofern in einer engen räumlichen Beziehung miteinander, als sie entweder in einem geringen Abstand voneinander parallel liegen (Abb. 10), oder aber, wie es häufiger der Fall ist, an einem Ende aneinander haften und somit ein V-förmiges Paar bilden (Abb. 23). Dabei stehen sie aber anscheinend nur an einem Punkt ihrer Oberfläche miteinander in Berührung. In den Telophasen liegen die Fragmente in einem größeren Abstand voneinander in der Äquatorialebene und sind hier oft durch einen feinen chromatischen Faden verbunden. Zwei derartige Fragmentpaare treten niemals in einem Mitosestadium auf; gelegentlich finden sich aber neben einem Fragmentpaar noch 1 oder 2 angehängte Fragmente ("attached fragments").

Wie bereits erwähnt, verursachen die gleichen Konzentrationsbereiche auch, wenngleich seltener, das Auftreten von Zentromerfehlteilungen, die zu Kreuzbrücken ("criss-cross bridges") führen (Abb. 13); ebenso werden Chromatide beobachtet, welche nicht an der Anaphasebewegung teilgenommen haben (Abb. 22).

2. Einwirkung von Extrakten aus *Allium sativum*-Zwiebeln auf das Wurzelspitzenmeristem von *Allium cepa* und *Allium sativum*.

Extrakte aus Knoblauchzwiebeln, welche in analoger Weise hergestellt wurden wie diejenigen aus Speisezwiebeln, zeigen in den höheren Konzentrationen (Unverdünnt bis 1:4) eine starke Toxizität gegenüber den Wurzelspitzenmeristemen der beiden Testobjekte. Diese ist vor allem durch den Austritt des Chromatins aus den Ruhekernen der Wurzelzellen charakterisiert, welcher sowohl nach 4stündiger als auch nach 24stündiger Behandlung beobachtet werden kann (vgl. dazu Keck, Frisch-Niggemeyer, Ascher und Hoffmann-Ostenhof, 1951; Keck und Hoffmann-Ostenhof, 1954). Unter diesen Bedingungen sind die Mitosestadien zu formlosen Chromatinklumpen verschmolzen; die Wurzeln sterben bei den Erholungsversuchen ab.

Bei Anwendung niedriger Konzentrationen zeigt sich eine deutliche Ver-

mit *Allium*-Extrakt Verdünnung 1:16; ein freies und ein angehängtes Fragment. $1250\times$. 21. 24 stündige Behandlung mit *Allium*-Extrakt Verdünnung 1:16; zwei große angehängte Fragmente. $1250\times$. 22. 4 stündige Behandlung mit *Allium*-Extrakt Verdünnung 1:2; Anaphase mit einem in der Äquatorialebene zurückgebliebenen Chromatid. $1400\times$. 23. 4 stündige Behandlung mit *Allium*-Extrakt Verdünnung 1:1; Chromatiddoppelfragment. $1250\times$. 24. 24 stündiges Behandlung mit 10^{-5} -molarer Lösung von Diallyldisulfid; ein an einem Ende aneinander haftendes Chromatidpaar. $1600\times$. 25. 4 stündige Behandlung mit $5\cdot 10^{-5}$ -molarer Lösung von Diallyldisulfid; symmetrisch an den Tochterchromatiden angehängte Fragmente. $1600\times$. 26. 24 stündige Behandlung mit 10^{-5} -molarer Lösung von Diallyldisulfid; Anaphase mit drei Paaren von Chromatidfragmenten. $1600\times$. 27. 4 stündige Behandlung mit $2\cdot 10^{-4}$ -molarer Lösung von Diallyldisulfid; symmetrisch an den Tochterchromatiden auftretender unvollständiger Chromatidbruch. $1600\times$.

schiedenheit zwischen den beiden Testobjekten. Bei der Einwirkung dieser Lösungen auf die Wurzeln von *Allium sativum* konnten keine Mitoseaberrationen beobachtet werden. Es wurden insgesamt etwa 500 Anaphasen analysiert, ohne daß jemals Fragmentationen gefunden wurden. Die Extrakte von *Allium sativum* besitzen somit keine automutagene Wirkung.

Im Gegensatz dazu haben dieselben Extraktverdünnungen bei Einwirkung auf die Wurzeln von *Allium cepa* eine starke mutagene Wirkung, welche in Tabelle 2 illustriert wird.

Tabelle 2. Einwirkung von Extrakten aus *Allium sativum*-Zwiebeln auf das Wurzelspitzenmeristem von *Allium cepa*.

Konzentration	Zahl der analysierten Anaphasen	Anaphasen mit Aberrationen in Prozenten
1:32	100	2
1:64	80	14.5
1:128	118	7.7
1:256	108	1

Während eine 1:16 verdünnte Lösung nach 4stündiger Einwirkung das Auftreten typischer C-Mitosen induziert, finden sich bereits unter dem Einfluß von 1:32 verdünntem Extrakt neben einer Klebrigkeit der Chromosomen häufig Anaphasen und Telophasen mit Chromatinbrücken, sowie seltener Zentromerfehlteilungen. Das Maximum an Mitoseaberrationen wird in dieser Versuchsreihe durch die Verdünnung 1:64 induziert. Dabei treten hier freie und angehängte Fragmente etwa gleich häufig auf; pro Anaphase finden sich 1 bis 3 Fragmente. Auch hier können wieder häufig symmetrisch an den Tochterchromatiden auftretende, unvollständige Brüche beobachtet werden.

3. Einwirkung von Diallyldisulfid und Diallylmonosulfid auf das Wurzelspitzenmeristem von *Allium cepa*.

Zur Anwendung gelangten wäßrige Suspensionen bzw. Lösungen von Reinpräparaten von Diallyldisulfid und Diallylmonosulfid, welche in unserem Laboratorium hergestellt wurden.

Die höchstkonzentrierte Lösung von Diallyldisulfid, welche zur Anwendung gelangte, war 10^{-3} -molar. Sie bewirkte nach 4tündiger Einwirkung das Auftreten von C-Mitosen, welche hier aber dem Colchicin-Typus entsprechen; die Chromatidpaare sind also im Gegensatz zu den Effekten der Speisezwiebel-extrakte meist X-förmig und niemals O-förmig. Nach 24stündiger Einwirkung beobachtet man Turgorverlust und Tod der Zellen; die Wurzeln werden weich.

Die niedrigeren Konzentrationen von Diallyldisulfid (10^{-4} bis 10^{-6} -molar) sind selbst nach längerer Einwirkung nicht toxisch; auch werden keine C-Mitosen mehr beobachtet. Die damit behandelten Wurzelspitzen zeigen aber in den Mitosen zahlreiche Chromosomenfragmentationen und andere Aber-

rationen, welche am stärksten nach Einwirkung einer 10^{-5} -molaren Lösung der Substanz beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen finden sich bis zu 20% aberrante Anaphasen (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3. Einwirkung von wäßrigen Lösungen von Diallyldisulfid auf das Wurzelspitzenmeristem von *Allium cepa*.

Konzentration	Dauer der Einwirkung in Stdn.	Anaphasen mit Aberrationen ¹⁾ ; andere Effekte
10^{-3} -molar	4	Spindelhemmung
10^{-3} -molar	24	abgestorben
2×10^{-4} -molar	4	+
2×10^{-4} -molar	24	++
1×10^{-4} -molar	4	+
1×10^{-4} -molar	24	++
5×10^{-5} -molar	4	+
5×10^{-5} -molar	24	+
1×10^{-5} -molar	4	++
1×10^{-5} -molar	24	+++

¹⁾ In dieser Spalte bedeuten: unter 1%.... (+)

1- 2%.... +

2- 5%.... ++

5-15%.... +++

15-25%.... ++++

Auch hier zeigt sich wiederum häufig das Auftreten von freien oder angehängten Fragmenten symmetrisch an den Tochterchromatiden. Wir finden entweder, wie das schon bei den Versuchen mit den Speisezwiebel-extrakten beobachtet wurde, ein freies Fragmentpaar (Abb. 24), oder die beiden Tochterchromatiden zeigen bei unvollständigem Bruch an den gleichen Stellen Einschnürungen (Abb. 25, 27). Seltener kann man auch mehrere freie Fragmentpaare beobachten; Abb. 26 zeigt eine Anaphase mit 6 freien Fragmenten, von denen je zwei ihrer Größe und räumlichen Anordnung nach als zusammengehörig angenommen werden können (zwei Fragmente überschneiden sich optisch!). Gelegentlich werden auch symmetrische Brüche am kurzen Schenkel des SAT-Chromosoms gefunden.

Zentromerfehlteilungen treten in diesem Konzentrationsbereich in einem geringen Prozentsatz sowohl nach 4stündiger als auch nach 24stündiger Behandlung auf. Es handelt sich hier vorwiegend um dizentrische Chromosomen, welche in der Anaphase Kreuzbrücken bilden.

Im Gegensatz zu dieser starken Wirksamkeit des Diallyldisulfids hat Diallylmonosulfid bei gleichartiger Testung kaum irgend eine Aktivität. Wohl kann man bei Anwendung der höchsten Konzentration (10^{-3} -molar) das Auftreten weniger C-Mitosen beobachten; [die niedrigeren Konzentrationen zeigen sich aber als praktisch wirkungslos. Obwohl einige wenige Chromosomenfragmentationen gezählt wurden, genügt ihr Anzahl nicht, um eine

mutagene Wirkung der Substanz statistisch zu sichern.

Diskussion

Unsere seinerzeitige Mitteilung über die mutagene Wirkung von Speisewiebelextrakten auf die Mitosen im Wurzelmeristem derselben Pflanze (Keck und Hoffmann-Ostenhof, 1951) war, soweit wir wissen, der erste Bericht über einen automutagenen Effekt in Pflanzen. Selther sind einige weitere, ähnliche Befunde erhoben worden. So berichtete kurz nach uns Resende (1951) über eine automutagene Wirkung von Extrakten aus alten trockenen Schalen der Speisewiebel; nach Pereira (1952) soll für diesen Effekt Protocatechusäure verantwortlich sein, während die von uns beobachtete Wirkung sicher durch Bestandteile der sogenannten Lauchöle, also durch schwefelhaltige aliphatische Verbindungen vom Typus des Diallyldisulfid, ausgelöst werden (Hoffmann-Ostenhof und Keck, 1951). In Versuchen mit Extrakten aus den Samen von *Allium fistulosum* beobachtete Katô (1954) eine mutagene Wirkung gegenüber den Mitosen in derselben Pflanze.

Die Beobachtungen automutagener Effekte sind aber nicht nur auf *Allium*-Arten beschränkt. Gisquet, Hitier, Izard und Mounat (1951) fanden, daß ölige Extrakte, welche durch Auspressen gealterter Samen von *Nicotiana tabacum* erhalten wurden, in derselben Pflanze Chromosomenaberrationen und Mutationen hervorrufen. In unserem Laboratorium (Keck und Hoffmann-Ostenhof, 1952) konnte ein ähnlicher Befund bei *Phaseolus vulgaris* erhoben werden; die ungünstigen Chromosomenverhältnisse machten uns allerdings die Beobachtung von Chromosomenaberrationen bei dieser Art unmöglich.

Auf die mögliche biologische Bedeutung automutagener Substanzen in Pflanzen soll an dieser Stelle nicht ausführlicher eingegangen werden, da diese in einem Übersichtsreferat (D'Amato und Hoffmann-Ostenhof, 1956) ausführlich behandelt wurde (vgl. dazu auch D'Amato, 1954).

Die Beobachtung, daß ein pflanzlicher Extrakt gegenüber einer anderen Pflanze als derjenigen seines Ursprungs eine mutagene Wirkung hat, bedeutet aber noch durchaus nicht, daß er auch automutagen aktiv ist, also auch Mutationen in der Pflanze seines Ursprungs auslösen kann. Ein Beispiel für ein derartiges Verhalten ist der Befund von Marquardt (1953), daß Extrakte aus gealterten Samen von *Oenothera* wohl eine beträchtliche mutagene Wirkung gegenüber der Meiose von *Paeonia tenuifolia* ausübten (vgl. Marquardt, 1949), die Meiosechromosomen von *Oenothera* selbst aber völlig unbeeinflusst ließen. Unsere Beobachtungen über die Wirkungen von Extrakten aus den Zwiebeln von *Allium sativum* auf die Wurzelspitzenmitosen von *Allium cepa* und *Allium sativum* sind, wie wir schon an anderer Stelle festgestellt haben (Keck und Hoffmann-Ostenhof, 1956), dem Befund von Marquardt (1953) völlig analog. In diesen und ähnlichen Fällen kann man vermuten, daß die Pflanze Schutzmechanismen gegen die von ihr selbst produzierten mutagenen Substanzen besitzt.

Was die chemische Natur der für die Wirkungen der Extrakte verantwortlichen Substanzen betrifft, so zeigen sowohl die chemische Analyse (Hoffmann-Ostenhof und Keck, 1951) als auch die Tatsache, daß das als wichtiger Bestandteil der Lauchöle bekannte Diallyldisulfid weitgehend analoge Wirkungen hervorruft, mit genügender Sicherheit, daß schwefelhaltige Lauchölbestandteile zumindest einen Teil der beschriebenen Effekte hervorrufen. Auf Grund verschiedener Beobachtungen, wie z.B. der Tatsache, daß in den meisten Fällen entweder Spindelhemmung oder Chromosomenaberrationen zu finden sind, während in der Versuchsserie mit den Extrakten aus weißschaligen Zwiebeln beide Erscheinungen nebeneinander vorkommen, kann man aber jedenfalls annehmen, daß nicht eine einzige Substanz sondern mehrere für die von den Speisezwiebel- oder Knoblauchextrakten verursachten Effekte verantwortlich sind. In die gleiche Richtung weist auch die Beobachtung, daß die durch Zwiebelextrakt induzierten C-Mitosen sich im Typus wesentlich von denjenigen unterscheiden, welche nach Behandlung mit Lösungen von Diallyldisulfid auftreten.

Da sich das Vorkommen aliphatischer schwefelhaltiger Substanzen, wenn wir von den schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein, Cystin, Homocystein und Methionin absehen, welche sicher nicht mutagen sind, auf wenige Pflanzenklassen beschränkt, automutagene Wirkungen aber andererseits auch bei anderen Pflanzenklassen beobachtet wurden, muß mit Sicherheit angenommen werden, daß in verschiedenen Pflanzenarten automutagen wirksame Substanzen verschiedener chemischer Natur vorkommen können.

Im Folgenden soll noch kurz auf die Mechanismen der einzelnen cytologischen Effekte eingegangen werden, obwohl wir wissen, daß hier eine sichere Deutung wohl nur selten möglich ist.

Die Anaphasen mit vollständiger Spindelhemmung können kaum als Weiterentwicklung von Metaphasen des gleichen Typus aufgefaßt werden. Es dürfte sich hier vielmehr um frühe Anaphasen handeln, welche vom Agens "überrascht" wurden, wobei neben der Hemmung des Spindelapparats auch die sonst selbständige Teilungsfähigkeit der Chromosomen unterdrückt wird. Diese Auffassung wird auch dadurch unterstützt, daß man in den gleichen Präparaten zahlreiche Restitutionsstadien früherer Phasen beobachtet.

Die abweichende Form der spindelgehemmten Mitosen von den üblicherweise beobachteten C-Mitosen des Colchicintypus findet ihre Parallele in einer Beobachtung von Peters (1946). Dieser Autor untersuchte die Wirkung von Sulfanilamid im *Allium*-Test und berichtete, daß die induzierten C-Mitosen nur selten X-Paare bilden, während ein paralleles Auseinanderweichen die Regel darstellte. Auch er beobachtete eine vor der Chromatidspaltung häufig auftretende Restitutionstendenz.

Die von uns besonders häufig beobachtete bevorzugte Bildung kleiner Chromatiddoppelfragmente dürfte als die Folge von Isochromatidbrüchen (vgl. Marquardt, 1950) aufzufassen sein, d.h. daß das zur Zeit der Bruchentstehung

bereits verdoppelte Chromosom infolge Ausbreitung des primären Bruchs auf beide Spalthälften vollständig durchtrennt wird. Eine Entstehung dieser Fragmentpaare aus einem sogenannten "Pseudochiasma" ist hingegen sicher auszuschließen, da unter diesen Bedingungen die Fragmente erst durch die Anaphasebewegung der Chromosomen entstehen könnten. Wir konnten aber freie Fragmentpaare in sehr frühen Anaphasen und auch solche außerhalb der Äquatorialebene in der Nähe eines Spindelpoles beobachten. Weiters besteht zwischen Fragmenten und Chromatiden niemals eine fadenförmige Verbindung, wie das bei Ursprung aus dem Pseudochiasma zu erwarten wäre. Schließlich konnten wir in allen unseren Versuchen niemals ein Pseudochiasma erkennen.

Eine bevorzugte Bildung von kleinen Chromatiddoppelfragmenten in Mitosen bei *Allium cepa* wird übrigens auch von Mota (1952) berichtet.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden cytologische Effekte beschrieben, welche durch Einwirkung von Extrakten aus den Zwiebeln von *Allium cepa* und *Allium sativum* sowie von Lösungen von Diallyldisulfid, einem Bestandteil der Lauchöle, in den Mitosen des Wurzelspitzenmeristems von *Allium cepa* verursacht werden.

Die mit kaltem Wasser gewonnenen Extrakte aus Zwiebeln von *Allium cepa* bewirken in den Mitosen der Wurzelspitze derselben Pflanzenart in höheren Konzentrationen vor allem Spindelhemmungen und manchmal auch "stickiness", während die niedrigeren Konzentrationen verschiedene radio-mimetische Effekte, darunter vor allem Chromosomenfragmentationen, hervorrufen.

Auf gleiche Weise erhaltene Extrakte aus *Allium sativum* zeigen gegenüber den Wurzelspitzenmitosen von *Allium cepa* weitgehend gleichartige Wirkungen; sie sind aber in den entsprechenden Verdünnungen nicht imstande, in den Wurzelspitzen der Ursprungsart Chromosomenaberrationen hervorzurufen, haben also keine automutagene Wirkung.

Das als Bestandteil der Lauchöle bekannte Diallyldisulfid induziert in den Wurzelspitzenmitosen von *Allium cepa* Effekte, welche denjenigen sehr ähnlich sind, die von den Extrakten aus *Allium cepa* bewirkt werden, woraus geschlossen werden kann, daß Substanzen dieses Typus teilweise für die von den Extrakten verursachten Effekte verantwortlich sind. Die Analogien gehen allerdings nicht so weit, daß man Diallyldisulfid als einzig wirksames Agens in den *Allium*-Extrakten bezeichnen darf.

Literatur

- Barber, H. N. und H. G. Callan, 1943. The effects of cold and colchicine on mitosis in the newt. Proc. Roy. Soc., Ser. B. 131: 258-270.
D'Amato, F. 1949. Preprophase inhibition of mitosis in root meristems. Caryologia 1:

109-121.

- D'Amato, F. 1954. Di alcuni aspetti fisiologici e genetici dell'invecchiamento dei semi. Contributo al problema della senescenza e della mutabilità spontanea nei vegetali. *Caryologia* 6: 217-240.
- D'Amato, F. und O. Hoffmann-Ostenhof, 1956. Metabolism and spontaneous mutations in plants. *Advances in Genetics* 8 1-28.
- Gisquet, P., H. Hitier, C. Izard und A. Mounat, 1951. Mutations naturelles observées chez *N. tabacum* L. et mutations expérimentales provoquées par l'extrait à froid de graines vieilles prématurément. *Ann. inst. exptl. Tabac Bergerac* 1: No. 2, 1-31.
- Hoffmann-Ostenhof, O. und K. Keck, 1951. Pflanzliche Stoffwechselprodukte als Mitosegifte. II. Diallyldisulfid, ein Bestandteil der Lauchöle als mitosestörende Substanz. *Monatsh. Chem.* 82: 562-564.
- Katô, Y. 1954. Descriptive and experimental cytology in *Allium*. II. Chromosome breakage in the seedlings of *Allium*. *Bot. Mag. (Tokyo)* 67: 122-128.
- Keck, K., W. Frisch-Niggemeyer, D. Ascher und O. Hoffmann-Ostenhof, 1951. Inhaltsstoffe des Knoblauchs und ihre Wirkungen. I. Über Substanzen, welche den Austritt des Chromatins aus Zellkernen im Wurzelmeristem von *Allium*-Arten bewirken. *Monatsh. Chem.* 82: 755-758.
- Keck, K. und O. Hoffmann-Ostenhof, 1951. Pflanzliche Stoffwechselprodukte als Mitosegifte. I. Mitosehemmende und -störende Substanzen in wäßrigen Auszügen aus *Allium cepa* (Speisezwiebel). *Monatsh. Chem.* 82: 559-562.
- Keck, K. und O. Hoffmann-Ostenhof, 1952. Chromosome fragmentation in *Allium cepa* induced by seed extracts of *Phaseolus vulgaris*. *Caryologia* 4: 289-294.
- Keck, K. und O. Hoffmann-Ostenhof, 1954. Über den chemisch induzierten Chromatinaustritt aus pflanzlichen Zellkernen. *Exptl. Cell Res.* 7: 111-124.
- Keck, K. und O. Hoffmann-Ostenhof, 1956. Inhaltsstoffe des Knoblauchs und ihre Wirkungen. III. Die mutagene Wirkung von Knoblauchextrakten. *Monatsh. Chem.* 87: 240-242.
- Levan, A. 1938. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas* 24: 471-486.
- Levan, A. 1945. Cytological reactions induced by inorganic salt solutions. *Nature* 156: 751.
- Marquardt, H. 1949. Mutationsauslösung durch Putrescin-Hydrochlorid und Kaltextrakt aus überalterten Oenotherasamen. *Experientia* 5: 401-403.
- Marquardt, H. 1950. Neuere Auffassungen über einige Probleme aus der Pathologie der Kernteilung. *Naturwissenschaften* 37: 416-424.
- Marquardt, H. 1953. Abbauprodukte körpereigener Stoffe als mutagene Agentien. *Proc. 7th internat. Congr. Botany, Stockholm 1950.* pp. 219-220.
- Mota, M. 1952. The action of seed extracts on chromosomes. *Arquiv. patol. (Lisbon)* 24: 336-357.
- Pereira, A. 1952. Agentes modificadores do metabolismo celular. II. Isolamento e identificação da substância perturbadora da mitose existente nas escamas de *Allium cepa* L. *Rev. port. farm.* 2: 72-79.
- Peters, J. 1946. Cytological effects of sulfanilamide on *Allium cepa*. *Bot. Gaz.* 107: (3) 390.
- Resende, F. 1951. Agentes modificadores do metabolismo celular. I. Accao de neutrões, tripaflavina e extractos vegetais nas mitoses dos vértices vegetativos da raíz. *Bol. soc. port. ciênc. nat.* 3: 181-211.