

<b>Zeitschrift:</b>	Mitteilungen der Naturforschenden Gesellschaft in Bern
<b>Herausgeber:</b>	Naturforschende Gesellschaft in Bern
<b>Band:</b>	15 (1957)
<b>Artikel:</b>	Experimentelle Untersuchungen über die kombinierte Wirkung eines pflanzlichen Hormons (-Indolessigsäure) und eines Antibioticums (Streptomycin) auf Pisumwurzeln und auf einige Gewebe
<b>Autor:</b>	Bandi, Peter
<b>Kapitel:</b>	II: Experimenteller Teil
<b>DOI:</b>	<a href="https://doi.org/10.5169/seals-319491">https://doi.org/10.5169/seals-319491</a>

#### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

#### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

#### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 08.01.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

seren Untersuchungen wollten wir, unter Ausschaltung der soeben besprochenen indirekten Wirkung, einen möglichen direkten Einfluß des Streptomycins als exogener Wachstumshemmstoff auf die Tätigkeit der IES aufdecken. Um das zu erreichen entschlossen wir uns, die beiden Stoffe vorerst in verschiedenen Konzentrationen einzeln auf das Längenwachstum der isolierten *Pisum*-Wurzel und auf das Nebenwurzelwachstum in steriler Kultur unter unseren Versuchsbedingungen zu testen. Aus dem Kombinationsversuch bei gleichzeitiger Einwirkung von Streptomycin und IES, erwarteten wir als Resultat einen Antagonismus, der uns die Grundlagen für weitere Experimente liefern sollte, möglicherweise unter Anwendung anderer Methoden. Die vollständige oder auch nur teilweise Aufklärung eines derartigen Antagonismus kann einen Beitrag leisten zur besseren Erfassung des Wuchshormonenmechanismus in den Pflanzen.

## II. EXPERIMENTELLER TEIL

### A. WIRKUNG VON INDOLESSIGSÄURE UND STREPTOMYCIN ALLEIN UND IN KOMBINATION AUF WURZELKULTUREN (*Pisum sativum*)

#### *Zur Methodik der Kultur isolierter Pflanzenteile unter sterilen Bedingungen*

Als Testobjekt zur Ermittlung des direkten Einflusses von Wirkstoffen auf das Wachstum, haben wir die isolierten Wurzeln von *Pisum sativum* (Sorte Maikönigin) gewählt, welche in folgender Weise präpariert wurden: Das Samenmaterial, welches für eine Versuchsreihe aus derselben Ernte stammen muß, wurde sorgfältig ausgelesen und durch Einlegen in 35 % Chlorkalklösung während 1 h. desinfiziert. Die vorbehandelten Samen werden dann zur Keimung gebracht, indem man sie (10—20 Stück) in sterile Petrischalen überträgt welche feuchte Watte mit Filterpapier bedeckt enthalten. Während 4—5 Tagen bleiben nun die Schalen im Dunkeln bei 23 ° C. Nach dieser Zeit werden die Samen und ihre Keimwurzeln mit der Lupe genau durchgemustert, um eventuelle Infektionen zu erkennen und die betreffenden Petrischalen auszuscheiden. Hierauf erfolgt das Auswählen der Wurzeln für den Versuch, die in ihrer Länge nicht allzusehr voneinander differieren sollen, um die ohnehin große Variationsbreite im Längenwachstum etwas zu reduzieren. Mit einem ab-

geflammten Skalpell, an dem eine Meßvorrichtung angebracht ist, werden genau 10 mm lange Wurzelspitzen abgeschnitten und mit einem Spatel steril in die Kulturgefäße übergeführt. Diese Arbeitsweise folgt den Richtlinien, die GAUTHERET (1942) für die Wurzelkultur vorgeschlagen hat.

Als Nährlösung wurde das Grundmilieu von BONNER verwendet:

Aqua dest.	1000,0 ccm
Ca-Nitrat	242 mg
Mg-Sulfat	42 mg
K-Nitrat	85 mg
K-Chlorid	61 mg
K-Monophosphat	20 mg
Ferritartrat	1,5 mg
Sacharose purissimum	40 g (4 %)
Aneurin	100 γ

Das pH der sterilisierten Nährlösung beträgt 4,9. Als Kulturgefäße dienten Röhren aus Jenaerglas (18/300 mm), die vorne nach oben abgebogen sind und mit Hilfe einer Klammer in liegender Stellung gehalten werden. Jede Röhre beimpft man steril mit einer 10 mm langen Wurzelspitze. Diese Kulturröhren wurden von GEIGER in die Technik eingeführt und besitzen den bedeutenden Vorteil, daß eine periodische Messung des Längenwachstums erfolgen kann, ohne daß die Wurzel aus dem Kulturgefäß entfernt werden muß. Ein gewisser Nachteil der Röhren besteht in ihrer schlechten Belüftung. Aus diesem Grunde ist die Wachstumsgeschwindigkeit auch kleiner gegenüber derjenigen in Erlenmeyern und Petrischalen.

Die Messung des Längenwachstums geschieht mit Hilfe eines Busch-Citophot-Apparates in folgender Weise: Die Kulturröhre wird auf einen Tisch gelegt und die Wurzel von oben scharf beleuchtet. Durch ein Prismensystem und über einen Spiegel wird das Bild der Wurzel in 3,75facher Vergrößerung auf einen Zeichentisch projiziert und erscheint dort weiß auf schwarzem Grund. Diese Anordnung entspricht einem Zeichenapparat für makroskopische Objekte. Mit einem Bleistiftstrich wird der Verlauf der Wurzel festgehalten, dann mit einem Kurvenmesser (wie er für die Distanzmessung auf topographischen Karten dient) die Länge des Striches gemessen und daraus die tatsächliche Länge der Wurzel umgerechnet. Auf diese Weise kann man die gleiche Wurzel im Verlauf der Zeit beliebig oft messen und erhält damit Zeit-Wachstumskurven.

Ein Vergleich von Direktmessung und Projektionsmessung ergibt Differenzen von höchsten 5 %, aber nur dann, wenn die Wurzeln stark gekrümmt wachsen und nicht in einer Ebene liegen, so daß die Projektion Verkürzungen aufweist.

Die Möglichkeit, Organe isoliert zu kultivieren, befähigte die Forschung erstmals die physiologischen Vorgänge abzuklären, welche in einem Einzelorgan oder in einer bestimmten Gewebeart vor sich gehen. Untersuchungen dieser Art sind undenkbar, solange der Zusammenhang mit dem Gesamtorganismus noch vorhanden ist. So ist es zum Beispiel unmöglich die Vitaminsynthese in der Wurzel zu erfassen, wenn dieses Organ mit den oberirdischen Teilen der Pflanze in Verbindung steht und von dort Vitamine in die Wurzel geleitet werden können. Noch schwieriger überblickbar als bei den Vitaminen sind die Verhältnisse für die pflanzlichen Hormone, die als Korrelationsträger Einfluß auf die Gestaltung und Formung der Organe haben. Auch hier kann man nicht entscheiden, ob zum Beispiel die Wurzel selbst Hormone synthetisiert und ob diese für ihr Wachstum notwendig sind, solange der Zusammenhang mit dem komplexen Stoffwechsel des Gesamtorganismus erhalten bleibt. Viele Erkenntnisse über Zelldifferenzierung, Morphogenese und die Entwicklung von Tumoren konnten erst gemacht werden, nachdem es möglich war, von meristematischem Gewebe ausgehend, Gewebekulturen zu gewinnen. Zudem ist die sterile Gewebe- und Organkultur Grundlage zur Züchtung und Überimpfung mancher Virusarten *in vitro*.

Die Technik, pflanzliche Gewebekulturen zu gewinnen, geht auf Versuche von HABERLANDT (1902) zurück. KOTTE (1922) und ROBBINS (1922) konnten dann kurzfristige Gewebe- und Wurzelkulturen erhalten. Ein unbeschränktes Wachstum war deshalb nicht möglich, weil eine Nährlösung, die dem isolierten Pflanzenteil alle Stoffe zuführt, welche er normalerweise aus dem abgetrennten Restorganismus und dem Boden bezieht, noch nicht gefunden war. Auch wurden die Versuche dieser Zeit an ungeeigneten Pflanzen durchgeführt. Erst nach einigen Jahren konnte WHITE (1934) Tomatenwurzeln während unbeschränkter Zeit in einem relativ einfachen Milieu kultivieren. Bei den Pflanzen gelang demnach die Organkultur vor der Gewebekultur, welche später von GAUTHERET (1939) eingeführt wurde, indem er zeigte, daß Kulturen aus meristematischem Gewebe (Kambium) sich unbeschränkt überimpfen lassen. Umgekehrt verhielt es sich bei den Tieren, wo schon um 1925 Gewebekulturen erzielt wurden (HARRISON und CAR-

REL), währenddem die tierischen Organkulturen erst viel später aufkamen.

Bedingung für die erfolgreiche Durchführung von Organ- und Gewebekulturen ist die richtige Zusammensetzung der Nährlösung. Der Stoffwechsel eines Gesamtorganismus kann nicht derselbe sein, wie der eines isolierten Organs oder einer bestimmten Gewebeart. Aus diesem Grunde müssen die Nährlösungen den Bedürfnissen der zu kultivierenden Objekte in jedem Fall angepaßt werden. Ein großer Vorteil besteht darin, daß es heute möglich ist ein Milieu anzuwenden, dessen Zusammensetzung genau bekannt ist, und das keine chemisch undefinierbaren Bestandteile enthält.

WHITE mußte sich allerdings noch mit einem halbsynthetischen Milieu begnügen. Er verwendete eine modifizierte Nährlösung nach USPENSKI, der er Sacharose und Wachstumsfaktoren in Form von Hefeextrakt zusetzte. Dank der Konstitutionsermittlung und Synthese des Aneurins im Jahre 1936 und der raschen Entwicklung der Vitaminforschung in den folgenden Jahren, konnte der Hefeextrakt durch chemisch reine Vitamine ersetzt werden. In einem zweiten Milieu fügte WHITE an Stelle des Hefeextraktes Spurenelemente (Fe, Mn, Zn, B, J), Glykokoll und Aneurin hinzu. ROBBINS und SCHMIDT verwendeten die PFEFFERSche Nährlösung mit Zusatz von Spurenelementen (Fe, Cu, B, Mo, Zn, Mn), Aneurin und Pyridoxin. BONNER und DEVIRIAN hielten eine kompliziert zusammengesetzte Spurenelementmischung für überflüssig und schlugen als Zusatz zum Grundmilieu lediglich Fe-Tartrat und Aneurin im sogenannten Milieu I, Aneurin und Nicotinsäure im Milieu II und Aneurin mit Pyridoxin im Milieu III vor. Die Grundmilieus aller oben erwähnten Autoren enthalten in wechselnden Mengenverhältnissen folgende Salze: Ca-Nitrat, Mg-Sulfat, K-Nitrat, K-Chlorid und K-Monophosphat. Will man Wurzelkulturen einer bestimmten Pflanze anlegen, handelt es sich darum, den für die vorliegende Art besten Vorschlag zu ermitteln. Für die Wurzel von *Pisum sativum* ist das Milieu I von BONNER vorzüglich geeignet. Seine genaue Zusammensetzung haben wir zu Beginn dieses Abschnittes dargestellt. Es enthält Aneurin, weil dieses Vitamin zum Wachstum der meisten Wurzeln unentbehrlich ist, und sie zu seiner Synthese nicht befähigt sind.

Ein Hauptvorteil der sterilen Organkultur ist der, daß die isolierte Wurzel von allen natürlichen Hormonquellen abgeschnitten ist und zudem sehr empfindlich auf künstlich zugeführte Hormone reagiert. So kann man zum Beispiel noch sehr gut zwischen der Wirkung von  $10^{-12}$

und  $10^{-10}$  molarer IES im Längenwachstum der Wurzel unterscheiden. Auch ist der Kontakt der Objekte mit dem Wirkstoff im flüssigen Milieu viel besser gewährleistet als bei der Anwendung von Wuchsstoff-pasten, wie sie zu Wachstumsversuchen etwa auch gebraucht werden.

Zu den unangenehmen Nebenerscheinungen bei der Kultur von Wurzeln gehört vor allem die große Infektionsanfälligkeit des Milieus für Pilze und Bakterien, da es stark zuckerhaltig ist (4 % Sacharose). Diese Infektionen treten auf, trotz gründlicher Desinfektion des Samen-materials und sorgfältigster Manipulation. Aus diesem Grunde fallen immer 5—10 % aller angesetzten Wurzeln aus, wobei sich gewisse Unterschiede zwischen Samen aus verschiedenen Ernten ergeben. Im wasserklaren BONNERmilieu sind aber die Infektionen leicht erkenntlich und auszuscheiden.

Die Streuung, mit der in allen biologischen Testmethoden zu rechnen ist, tritt auch bei Wurzelkulturen ziemlich stark auf. Sie ist hauptsächlich bedingt dadurch, daß meist für eine Versuchsreihe, zu der sehr viele Samen angesetzt werden müssen, kein genetisch einheitliches Material zur Verfügung steht. Es ist daher wichtig, daß zur Sicherung der Resultate die statistischen Verhältnisse untersucht werden.

### *1. Wirkung der Indolessigsäure allein auf Wurzelkulturen*

Wir haben die Wirkung der IES auf das Wachstum der isolierten Wurzel von *Pisum sativum* getestet, um unter unseren Versuchsbedingungen einen Vergleich zu den von GEIGER-HUBER und BURLET an Maiswurzeln gemachten Beobachtungen zu erhalten. Die genannten Autoren hatten erstmals eine konzentrationsabhängige Hemmung und Förderung des Wurzelwachstums durch IES festgestellt.

#### **Versuchsanordnung:**

Ausgehend vom Milieu I nach BONNER mit Zusatz von Aneurin, haben wir 8 Lösungen hergestellt, welche IES (Roche) in Konzentrationen von  $10^{-6}$  bis  $10^{-13}$  mol enthielten. Diese Lösungen wurden pro Konzentration in je 20 Kulturröhren (GEIGER) abgefüllt. In jede Röhre haben wir 10 ccm gegeben. Als Kontrolle wurde eine gleichgroße Serie ohne Zusatz von IES mitgeführt. Die Kulturgefäße wurden mit Wattestopfen versehen und dann während 15' bei  $115^{\circ}\text{C}$  im Autoklav sterilisiert. Dabei werden weder die thermostabile IES, noch das Aneurin in ihrer Ak-

tivität geschädigt. Nach dem Abkühlen haben wir jede Röhre unter sterilen Bedingungen mit einer 10 mm langen Wurzelspitze beschickt. Die isolierten Wurzeln hatten wir kurz vor dem Versuch, nach der zu Beginn des experimentellen Teils beschriebenen Technik, vorbereitet. Die Kulturen wurden dann in einen Kellerraum verbracht, wo sie im Dunkeln bei  $23^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) gehalten wurden. Das Längenwachstum der Wurzeln haben wir nach 2 und 5 Tagen Kultur mit dem Busch-Citophot nach der einleitend beschriebenen Methode gemessen.

#### Ergebnisse:

Wir erkennen aus Tabelle 1, daß sich die Pisumwurzel aus den Dikotyledonen hier gegenüber IES ganz ähnlich verhält, wie die Maiswurzel der Monokotyledonen in den Versuchen von GEIGER-HUBER und BURLET. Wir finden auch hier einen konzentrationsabhängigen Übergang von Wachstumsförderung in Wachstumshemmung. Das Optimum der Förderung für die Pisumwurzel wird mit  $10^{-10}$  molarer IES erzielt, für die etwas empfindlichere Maiswurzel hingegen schon mit  $10^{-11}$  mol. Die geringere Hemmung nach 5tägiger Kultur gegenüber der 2tägigen läßt vermuten, daß die IES eventuell im Laufe der Zeit abgebaut wird. Zusammenfassend können wir also bei der Wirkung der IES auf die Pisumwurzel drei Bereiche unterscheiden. Einen für das Wachstum wirkungslosen Bereich mit  $10^{-12}$  molaren und schwächeren Konzentrationen, wobei die erzielten Wurzellängen denen der Kontrollserie entsprechen. Un-

**TABELLE 1**  
**Einfluß der IES auf isolierte Wurzeln von *Pisum sativum***  
**(Längenwachstum in % der Kontrollwurzeln)**

Pisumwurzeln		Längenwachstum in % der Kontrolle	
		nach 2 Tagen	nach 5 Tagen
Zahl Kulturen	IES-Konz. (mol)		
18	—	100	100
17	$10^{-13}$	100	104
17	$10^{-12}$	90	100
18	$10^{-11}$	110	112
16	$10^{-10}$	130	125
19	$10^{-9}$	90	96
15	$10^{-8}$	50	66
18	$10^{-7}$	20	45
17	$10^{-6}$	0	0

ter Anwendung von  $10^{-11}$  und  $10^{-10}$  molarer IES gelangt man in den fördernden Bereich, in dem das Längenwachstum der Wurzeln größer ist, als dasjenige der Kontrollen. Standen die Wurzeln unter dem Einfluß von  $10^{-9}$  molarer und stärker konzentrierter IES, so erscheinen sie gegenüber den Kontrollen zunehmend gehemmt.  $10^{-8}$  molare Lösung führt bereits zu einer 50 % Hemmung gegenüber den Kontrollwurzeln. In  $10^{-6}$  molarer IES findet überhaupt kein Wachstum mehr statt.

Wir haben zu Beginn des experimentellen Teils angedeutet, daß die Streuungsverhältnisse bei der Auswertung der Ergebnisse von Wurzelkulturen besondere Bedeutung verdienen. In Tabelle 2 sind die Mittelwerte der effektiven Wurzellängen dargestellt, welche zu den Prozentzahlen der Tabelle 1 gehören. Zu jedem Wert wurde die mittlere quadratische Streuung ( $\sqrt{s^2}$ ) nach folgender Formel berechnet.

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^N x_i^2 - \bar{x} \cdot \sum_{i=1}^N x_i}{N-1} \quad \text{nach LINDER (25)}$$

wobei:  $\sum_{i=1}^N x_i$  = Summe aller Wurzellängen einer Serie

$\bar{x}$  = Mittelwert der Wurzellängen einer Serie

$N$  = Anzahl Werte einer Serie

Die Zahlen der quadratischen Streuung zeigen uns, daß die wachstumsfördernde Wirkung von 30 % innert 2 Tagen, welche wir der  $10^{-10}$  molaren IES zugeschrieben haben, ganz knapp an der Streugrenze liegt. Eine Beeinflussung des Wachstums nach 2 Tagen ist also hier statistisch nicht einwandfrei gesichert. Hingegen bestätigt die Statistik eindeutig die 50 %ige Hemmung durch  $10^{-8}$  molare IES nach 2 Tagen. Die 25 %ige Förderung durch  $10^{-10}$  molare, sowie die 34 %ige Hemmung durch  $10^{-8}$  molare IES nach 5tägiger Kultur sind ebenfalls gesichert.

Zur allgemeinen Beurteilung von Ergebnissen aus Wurzelkulturen entnehmen wir diesen Angaben, daß Unterschiede im Längenwachstum nach 2tägiger Kultur von weniger als 30 % kaum signifikant sein können. Eine Versuchsreihe ist zudem nur dann statistisch gesichert, wenn  $\frac{2}{3}$  aller Werte innerhalb der quadratischen Streuung liegen.

TABELLE 2

Mittlere Wurzellänge in mm und mittlere quadratische Streuung  
 $\sqrt{s^2}$  zu den Prozentzahlen der Tabelle 1

Pisumwurzeln		nach 2 Tagen		nach 5 Tagen	
		Zahl der Kulturen	mol IES-Konz.	Länge (mm)	$\sqrt{s^2}$
18	—	20		$\pm 1,6$	$\pm 1,6$
17	$10^{-13}$	20		$\pm 1,4$	$\pm 1,9$
17	$10^{-12}$	19		$\pm 1,6$	$\pm 1,7$
18	$10^{-11}$	21		$\pm 1,5$	$\pm 2,0$
16	$10^{-10}$	23		$\pm 1,4$	$\pm 1,9$
19	$10^{-9}$	19		$\pm 1,5$	$\pm 1,6$
15	$10^{-8}$	15		$\pm 1,4$	$\pm 1,9$
18	$10^{-7}$	12		$\pm 1,6$	$\pm 2,1$
17	$10^{-6}$	10		K.W.	K.W.

## 2. Wirkung des Streptomycins allein auf Wurzelkulturen

Nachdem wir uns im vorhergehenden Abschnitt über die Wirkung der IES auf das Wurzelwachstum orientiert hatten, sollte uns hier eine weitere Versuchsreihe über den Einfluß des Streptomycins auf das Wachstum der isolierten Pisumwurzeln in steriler Organkultur Auskunft geben. Die Empfindlichkeit dieser Objekte gegenüber Streptomycinsulfat (Boston, New York 1949) ist nach BEIN (1951) sehr groß, indem das Antibioticum in einer Konzentration von 12,5 γ/ccm Nährlösung das Längenwachstum der Wurzeln innerhalb 10 Tagen um 50 % hemmt. BEIN hatte die Wachstumsveränderung nach 5 und 10 Tagen gemessen. Ausgehend von den Beobachtungen SCHOPFERS (1952), der allerdings in höherer Konzentration des Antibioticums schon bei 5minütiger Einwirkungsdauer eine starke Hemmung des Nebenwurzelwachstums ganzer Pisumpflanzen erhielt, wollten wir das Längenwachstum der isolierten Wurzeln bereits nach 2tägiger Kultur feststellen. Dieses Vorgehen schien uns auch gerechtfertigt durch den Umstand, daß die physiologische Aktivität des Streptomycinsulfats in wässriger Lösung bereits nach wenigen Tagen erniedrigt wird.

### Versuchsanordnung:

Das Streptomycin ist temperaturempfindlich und darf daher nicht mit dem Milieu zusammen sterilisiert werden. Deshalb wendeten wir für

die Streptomycinlösungen eine Kaltsterilisierung unter Filtrieren durch ein Bakterienfilter (Schott 11G5) an. Die Stammlösungen, welche in dieser Weise vorbereitet wurden, enthielten 50, 100, 250, 500 und 1000  $\gamma$  Streptomycinsulfat (PFIZER) pro 1 ccm destilliertem, steriles Wasser. Die Kulturröhren (GEIGER) wurden mit je 9,0 ccm Nährlösung gefüllt und während 15' bis 115°C im Autoklav sterilisiert. Dann wurde in 20 Röhren pro Serie je 1 ccm einer Streptomycininstammlösung unter sterilen Bedingungen übertragen. So gelangten wir zu folgenden Endkonzentrationen: 5, 10, 25, 50 und 100  $\gamma$  Streptomycinsulfat pro ccm Nährlösung. Von den 4—5 Tage alten Keimlingen wurden 10 mm lange Wurzelspitzen nach der oben beschriebenen Technik steril abgetrennt und in die Röhren übergeführt. Die Kultur erfolgte in einem verdunkelten Kellerraum bei 23°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Messungen des Längenwachstums der Wurzeln haben wir nach 2 und 5 Tagen, nach der bekannten Methode, mit dem Busch-Citophot vorgenommen.

### Ergebnisse:

TABELLE 3

Einfluß des Streptomycins auf isolierte Wurzeln von *Pisum sativum*  
(Längenwachstum in % der Kontrollwurzeln)

Pisumwurzeln Zahl Kulturen	Streptomycin-Konz. ( $\gamma$ /ccm)	Längenwachstum in % der Kontrolle	
		nach 2 Tagen	nach 5 Tagen
17	— (Kontrolle)	100	100
17	5	91	72
18	10	75	52
17	25	58	32
16	50	33	12
16	100	0	0

Tabelle 3 zeigt, daß in unseren Versuchen bei allen angewendeten Streptomycinkonzentrationen eine Hemmung des Wurzelwachstums gegenüber den Kontrollen aufgetreten ist. Mit steigender Antibioticumkonzentration erschienen die Wurzeln zunehmend gehemmt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von BEIN (1951), haben wir mit 10  $\gamma$  Streptomycin pro ccm Nährlösung nicht erst nach 10, sondern bereits nach 5 Tagen eine 50 %-ige Hemmung erhalten, offenbar weil wir ein anderes Streptomycinpräparat verwendeten.

### 3. Wirkung der Indolessigsäure und des Streptomycins in Kombination auf Wurzelkulturen

In den vorhergehenden Abschnitten konnten wir unter unseren Versuchsbedingungen bestätigen, daß sowohl IES als auch Streptomycin das Wachstum der Pisumwurzel stark beeinflussen. Ausgehend von den Erfahrungen, welche wir mit jedem der Stoffe einzeln gemacht hatten, wollten wir hier erstmals das Verhalten der isolierten Wurzeln in vitro unter der gleichzeitigen Wirkung von IES und Streptomycin untersuchen. Wir planten vorerst verschiedene Streptomycindosen mit IES-Konzentrationen aus dem für das Wachstum indifferenten, fördernden und hemmenden Bereich zu kombinieren. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen erwarteten wir Hinweise auf den unabgeklärten Wirkungsmechanismus der Wuchsstoffe im Zusammenhang mit der Zellstreckung. Zudem wollten wir damit versuchen, die Rolle des Streptomycins in der Natur abzuklären, wo es als Ausscheidungsprodukt von *Streptomyces griseus* vorhanden ist.

#### Versuchsanordnung:

In die Kulturröhren (GEIGER) wurden je 9 ccm Nährlösung nach BONNER mit Aneurin abgefüllt. Von jeder der vorbereiteten Stammlösungen, welche IES in Konzentrationen von  $2 \times 10^{-13}$  mol,  $2 \times 10^{-11}$  mol und  $2 \times 10^{-9}$  mol enthielten, wurden 0,5 ccm zum Milieu zugegeben, mit Wattestopfen verschlossen und während 15' bei 115 °C im Autoklav sterilisiert. Nach dem Abkühlen haben wir zu den 20 Röhren der drei IES-Konzentrationen je 0,5 ccm von vier kaltsterilisierten Streptomycinsulfatstammlösungen (100 γ, 200 γ, 500 γ und 1000 γ pro ccm steriles Wasser) beigelegt. Damit erreichten wir, daß in den Endkonzentrationen jede mögliche Kombination zwischen  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  molarer IES und 5, 10, 25, 50 γ Streptomycin pro ccm Nährlösung in je 20 Röhren pro Serie vorhanden war. Zudem haben wir als Kontrollen Röhren mitgeführt, welche die drei oben erwähnten IES-Verdünnungen und die vier Streptomycinkonzentrationen allein enthielten, sowie eine weitere Kontrollserie mit BONNERMilieu ohne Wirkstoff. Das nachfolgende Schema verdeutlicht unsere Versuchsanordnung und bietet einen Vergleich zwischen den angewendeten Molaritäten und Gewichtsmengen:

IES-Konz. 0	$10^{-12}$ mol (0,000 175 m $\gamma$ /ccm)	$10^{-10}$ mol (0,0175 m $\gamma$ /ccm)	$10^{-8}$ mol (1,75 m $\gamma$ /ccm)
-------------	---	--	---

## Streptomycin-

Konz. 0

5 m $\gamma$ /ccm	$(5,714 \times 10^{-6}$ mol)
10 m $\gamma$ /ccm	$(1,142 \times 10^{-5}$ mol)
25 m $\gamma$ /ccm	$(2,857 \times 10^{-5}$ mol)
50 m $\gamma$ /ccm	$(5,714 \times 10^{-5}$ mol)

Die Versuchsstoffe waren hier wiederum isolierte Wurzelspitzen, welche steril von 4—5 Tage alten Keimlingen abgetrennt und in die Röhren übergeführt wurden. Die Messungen des Längenwachstums erfolgten, wie in den Einzelversuchen, ebenfalls nach 2 und 5 Tagen mit dem Busch-Citophot.

## Ergebnisse:

TABELLE 4

**Einfluß der IES und des Streptomycins allein und kombiniert auf die isolierte Wurzel von *Pisum sativum* nach 2 und 5 Tagen**

Pisumwurzeln		Längenwachstum in % der Kontrolle							
		nach 2 Tagen				nach 5 Tagen			
IES-Konz. (mol)	(m $\gamma$ /ccm)	0	$10^{-12}$	$10^{-10}$	$10^{-8}$	0	$10^{-12}$	$10^{-10}$	$10^{-8}$
Streptomycin	0	100	100	127	54 * ( $\bar{x}'$ )	100	104	124	60
	5	91	91	91	81	76	80	84	60
	10	81	81	91	91 * ( $\bar{x}'$ )	56	56	60	56
	25	63	54	63	91	40	36	44	60
	50	36	45	45	63	28	24	28	28

\* Statistische Auswertung am Schluß des Abschnittes

Nach 2tägiger Kultur zeigten die Wurzeln, welche unter dem Einfluß von  $10^{-12}$  molarer IES standen, dasselbe Wachstum wie die Kontrollen ohne Wirkstoffzusatz. Ihr Längenwachstum erscheint aber gegenüber den Kontrollen gehemmt, wenn sie in der Mischung von  $10^{-12}$  molarer IES mit allen angewendeten Streptomycinkonzentrationen kultiviert wurden. Die  $10^{-12}$  molare IES vermag allein keine Wachstumsbeeinflus-

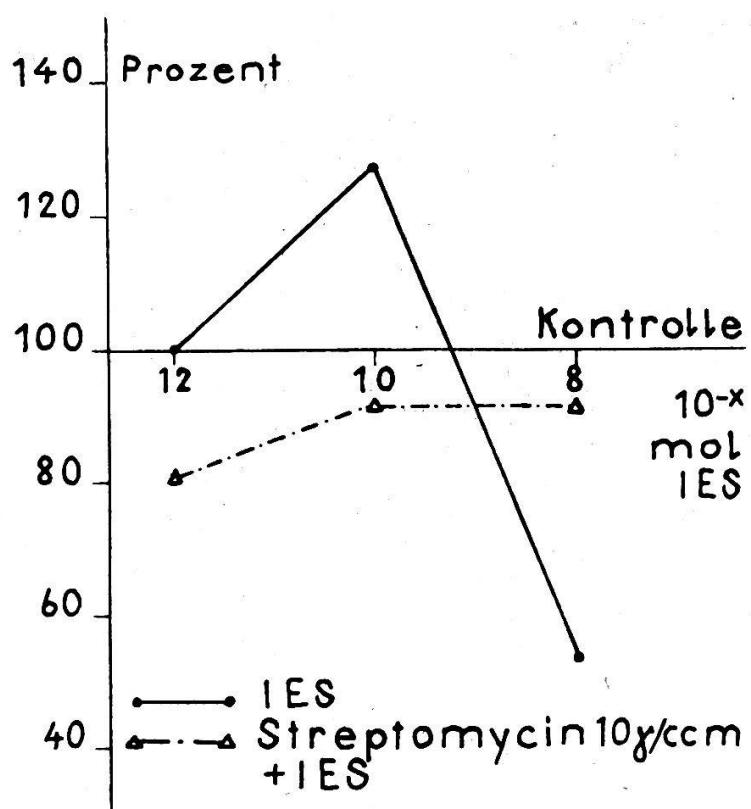
sung auszulösen und Streptomycin wirkt hier gleich wie im Einzelversuch. Die Kombination von  $10^{-10}$  molarer IES mit den vier Streptomycindosen ergaben ebenfalls kleinere Wurzellängen als in  $10^{-10}$  molarer IES allein. Das überraschendste Ergebnis erhielten wir durch Kombination des Streptomycins mit der  $10^{-8}$  molaren IES, welche auch hier allein angewendet, das Wachstum der Wurzeln um 46 % erniedrigte. In Verbindung mit Streptomycin von 5  $\gamma$ /ccm beträgt die erwähnte Hemmung nur 19 %, mit 10 und 25  $\gamma$ /ccm noch 9 % und mit 50  $\gamma$ /ccm 37 %. Die Hemmungen sind also durchwegs geringer in Kombination, als mit IES ( $10^{-8}$  mol) allein. Figur 1 stellt die Verhältnisse dar, wie sie sich nach 2 Tagen aus der Kombination von  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$  und  $10^{-8}$  molarer IES mit 10  $\gamma$ /ccm Streptomycin ergeben.

FIGUR 1

**Einfluß der IES und der Kombination IES/Streptomycin auf isolierte Wurzeln von *Pisum sativum* nach 2 Tagen**

Abszisse: Steigende IES-Konzentrationen

Ordinate: Längenwachstum in % der Kontrolle (100 %)

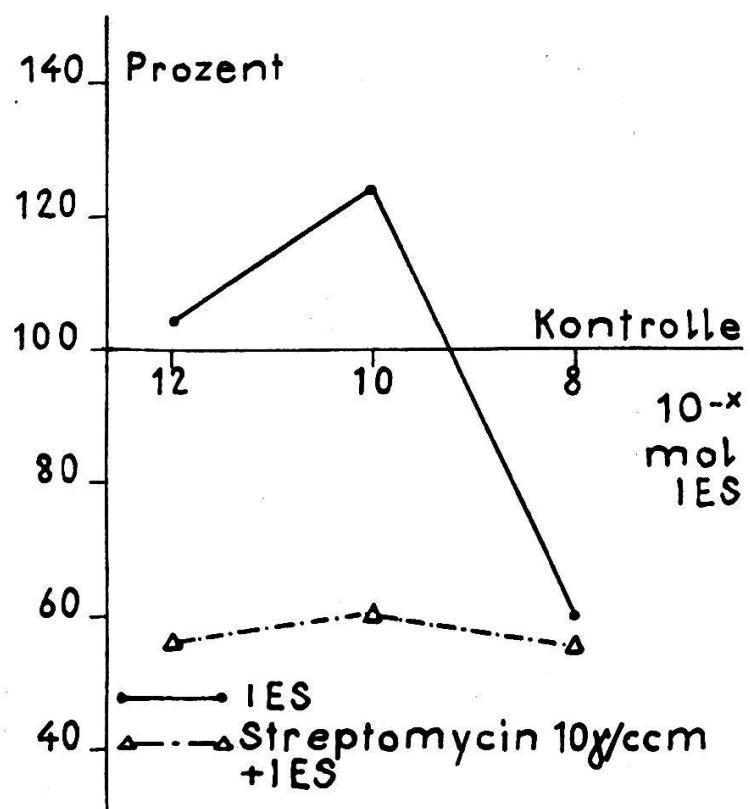


Nach 5tägiger Kultur zeigten die Objekte, welche in den Mischungen von  $10^{-12}$ , sowie  $10^{-10}$  molarer IES mit den vier Streptomycinkonzentrationen gewachsen waren, noch immer eine starke Hemmung im Längenwachstum gegenüber den Kontrollwurzeln in  $10^{-12}$  und  $10^{-10}$  molarer IES allein. Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach 2 Kulturtagen erschien die Wurzeln aus der Kombination von  $10^{-8}$  molarer IES mit Streptomycin nun nicht mehr enthemmt gegenüber denjenigen in dieser IES-Konzentration allein. In Verbindung mit 50 γ/ccm Streptomycin wurde die IES-Hemmung noch verstärkt. Figur 2 faßt die Werte zusammen, welche aus der Kombination von  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$  und  $10^{-8}$  molarer IES mit 10 γ/ccm Streptomycin hervorgingen.

FIGUR 2

**Einfluß der IES und der Kombination IES/Streptomycin auf isolierte Wurzeln von *Pisum sativum* nach 5 Tagen**

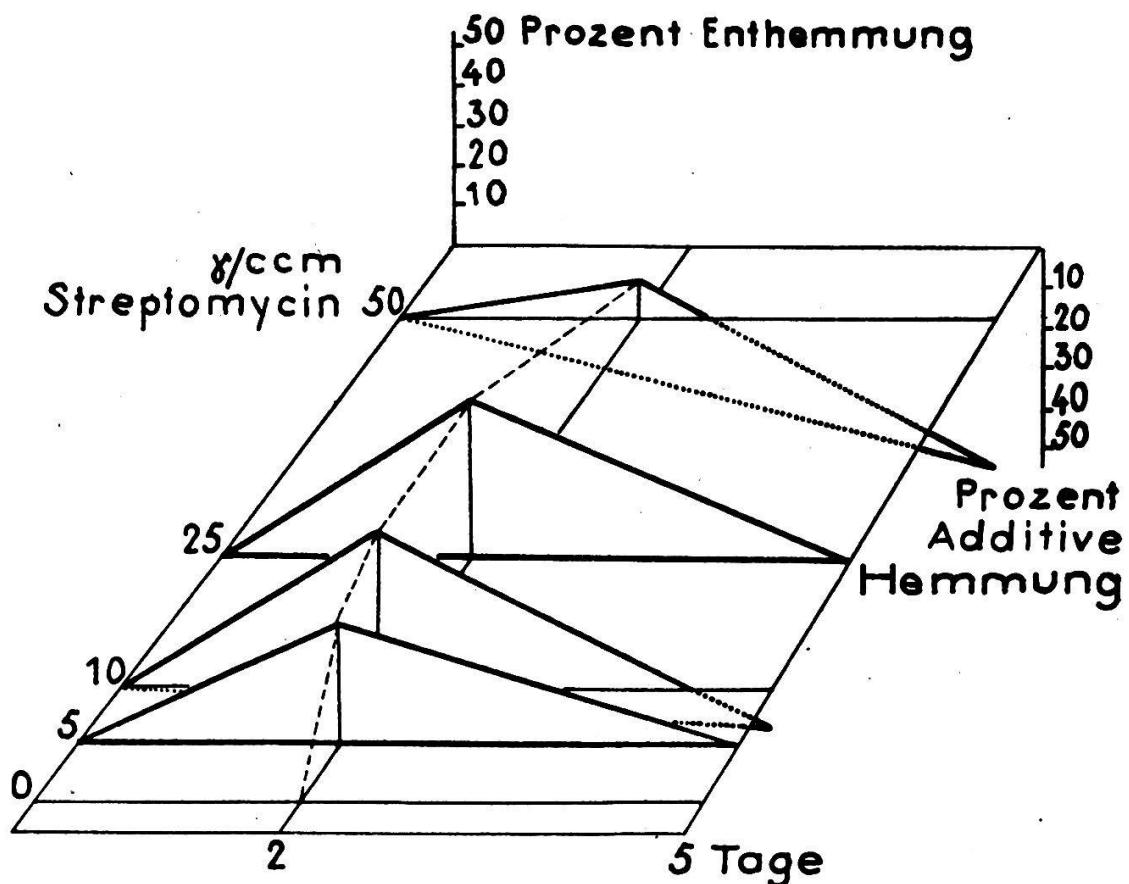
Abszisse: Steigende IES-Konzentrationen  
 Ordinate: Längenwachstum in % der Kontrolle (100 %)



FIGUR 3

**Einfluß der IES und der Kombination IES/Streptomycin auf isolierte Wurzeln von *Pisum sativum* nach 2 und 5 Tagen**

Als auffälligstes Ergebnis der Kombinationsversuche erwies sich die Enthemmung der durch  $10^{-8}$  molare IES gehemmten Wurzeln bei der Kombination der letzteren mit Streptomycin innerhalb 2 Tagen, sowie das Verschwinden dieses Effektes nach 5tägiger Kultur. Die dreidimensionale Figur 3 stellt die sich dabei ergebenden Verhältnisse zusammen. Die horizontale Grundfläche bedeutet die 50%ige Hemmung durch  $10^{-8}$  molare IES. Werte über der Fläche zeigen eine Enthemmung des Wurzelwachstums (nach 2 Tagen), unter der Fläche eine additive Hemmung der Wurzeln (nach 5 Tagen) durch die vier angewendeten Streptomycinkonzentrationen an. Wir ersehen daraus, daß eine maximale Enthemmung von 40% nur in Kombination mit einem bestimmten Konzentrationsbereich des Streptomycins ( $10-25 \gamma/\text{ccm}$ ) und nur nach 2tägiger Kultur auftritt.



**Statistik:**

Die mit Kreuzen versehenen Reihen aus der Tabelle 4, welche zu den Mittelwerten  $\bar{x}'$  bzw.  $\bar{x}''$  führten, wurden statistisch untersucht, um die Signifikanz des aufgefundenen Enthemmungseffektes nachzuweisen. Den Unterschied zwischen den beiden Durchschnitten haben wir nach

dem t-Test-Verfahren (LINDER) geprüft, und zwar unter Anwendung folgender Formeln:

$$t = \frac{\bar{x}' - \bar{x}''}{s} \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}} \quad \text{nach LINDER (1945)}$$

$$s^2 = \frac{\left[ \sum_{i=1}^{N_1} x_i'^2 - \bar{x}' \cdot \sum_{i=1}^{N_1} x_i' \right] + \left[ \sum_{i=1}^{N_2} x_i''^2 - \bar{x}'' \cdot \sum_{i=1}^{N_2} x_i'' \right]}{N_1 + N_2 - 2}$$

wobei:  $\sum_{i=1}^N x_i$  = Summe aller Wurzellängen einer Serie

$\bar{x}$  = Mittelwert der Wurzellängen einer Serie

$N$  = Anzahl Werte einer Serie

$N_1 + N_2 - 2 = n$  = Zahl der Freiheitsgrade

Unsere Werte in obige Formeln eingesetzt:

$$t = \frac{19,8 - 15,6}{1,91} \sqrt{\frac{19 \cdot 18}{19 + 18}} = 6,68$$

Aus der Tabelle im Anhang des Werkes «Statistische Methoden» von LINDER finden wir für  $n = 35$ :

zu  $P = 0,05$  :  $t = 2,030$

zu  $P = 0,01$  :  $t = 2,724$

zu  $P = 0,001$  :  $t = 3,592$

Der Wert  $t = 6,68$  liegt außerhalb der Sicherheitsschwelle. Damit kann die von uns beobachtete Enthemmungswirkung des Streptomycins ( $10 \gamma/\text{ccm}$ ) auf indolessigsäuregehemmte Wurzeln von *Pisum sativum* nach 2-tägiger Kultur als gesichert gelten.

#### a) Der Kombinationsversuch Indolessigsäure/Streptomycin und der natürliche Wuchsstoffgehalt der Wurzel

Bei der experimentellen Zufuhr von Wirkstoffen zur isolierten Wurzel, wie sie in den vorausgehenden Versuchen stattgefunden hat, haben wir den natürlichen Wuchsstoffgehalt dieser Organe nicht in Betracht ge-

zogen. Solange die Wurzel mit der Pflanze in Verbindung steht, wird Auxin in der Wurzelspitze gebildet oder aktiviert und in überoptimaler Menge an die Streckungszone abgegeben. Werden die Wurzeln vom Organismus abgetrennt, so verlieren sie nach WUERGLER (1942) ungefähr in einem Tag den größten Teil ihres Wuchsstoffes aus Mangel an dem zur Aktivierung oder Synthese erforderlichen Material. Nach OVERBEEK (1939) hingegen läßt sich der Wuchsstoff in isolierten Wurzeln viel länger nachweisen und soll sogar nach diesem Autor aus geeigneten Nährösungen synthetisiert werden können. Jedenfalls ist eine Wechselwirkung zwischen den zugeführten Wirkstoffen und dem schon vorhandenen Wuchsstoff nicht undenkbar. Wir wollten deshalb den Kombinationsversuch IES/Streptomycin an Wurzeln wiederholen, welche durch eine spezielle Technik wuchsstofffrei, oder doch sehr wuchsstoffarm gemacht wurden, um festzustellen, ob sich dabei grundlegende Unterschiede zu den vorausgegangenen Ergebnissen zeigen.

#### Versuchsanordnung:

Die Herstellung der Lösungen geschah nach dem im letzten Versuch angegebenen Verfahren. Die IES wurde wiederum mit dem Milieu nach BONNER während 15' bei 115 °C sterilisiert, dann haben wir die kaltsterilisierten Streptomycinlösungen zugegeben. In den Endkonzentrationen enthielten je 20 Röhren (GEIGER)  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$  und  $10^{-8}$  molare IES allein und kombiniert mit 10 γ/ccm Streptomycin. Mitgeführt wurden Kontrollen mit BONNERMilieu und Streptomycin 10 γ/ccm allein.

Die Wurzelspitzen, welche wir zu diesem Experiment verwendeten, hatten vorgängig zwei sogenannte Passagen durchzulaufen, und zwar in folgender Weise. Nach dem Abtrennen von den 4—5 Tage alten Keimlingen ließen wir sie im BONNERMilieu allein während einer Woche auf eine Länge von 6—7 cm auswachsen. Dann nahmen wir sie unter sterilen Bedingungen aus den Kulturgefäßen und schnitten 10 mm lange Spitzen ab, welche von neuem in eine vorbereitete Serie von Röhren mit Normalmilieu übergeführt wurden. Nach weiteren 8 Tagen trennten wir wiederum 10 mm lange Spitzen ab, welche dann den Bedingungen des Kombinationsversuches ausgesetzt wurden. Durch diese Passagen muß der natürliche Auxingehalt der Wurzeln sehr stark erniedrigt, wenn nicht sogar aufgehoben sein.

Die Kulturen wuchsen in verdunkeltem Raum bei 23 °C ( $\pm 1^\circ$  C), und das Längenwachstum wurde nach 2 und 5 Tagen mit dem Busch-Citophot ermittelt.

**Ergebnisse:**

**TABELLE 5**  
**Einfluß der IES und des Streptomycins**  
**allein und kombiniert**  
**auf isolierte, überimpfte Wurzeln von *Pisum sativum***  
**nach 2 und 5 Tagen**

Pisumwurzeln	Längenwachstum in % der Kontrolle			
	nach 2 Tagen		nach 5 Tagen	
	IES-Konz.	ohne Streptomycin	mit Streptomycin	ohne Streptomycin
0	100	80	100	45
$10^{-12}\text{mol}$	80	50	63	63
$10^{-10}\text{mol}$	120	100	71	63
$10^{-8}\text{mol}$	60	110	50	50

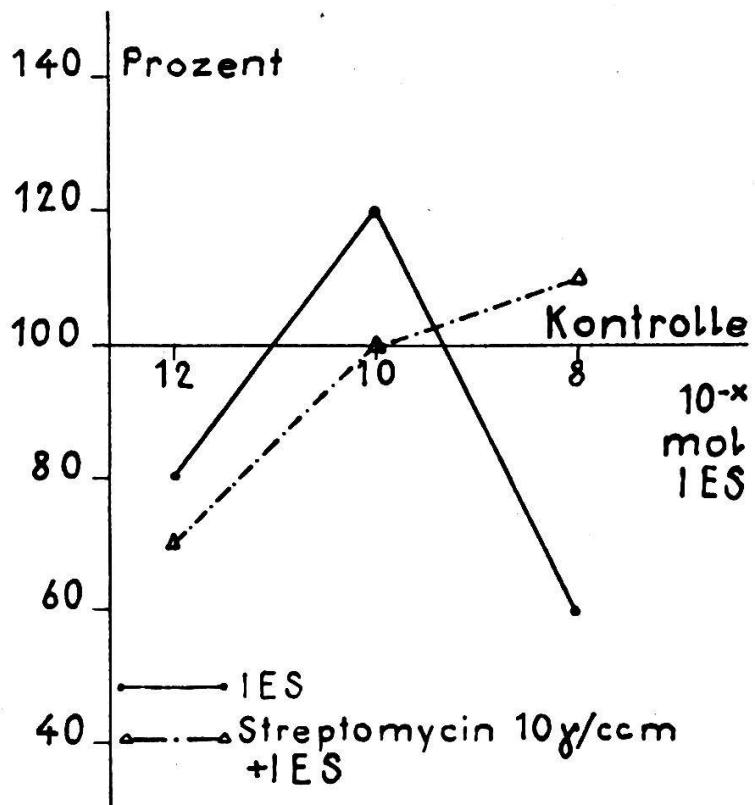
Wir stellen fest, daß die  $10^{-8}$  molare IES allein auch hier das Wurzelwachstum nach 2 Tagen um 40 % hemmen konnte, währenddem dieselbe IES-Konzentration in Kombination mit 10 γ/ccm Streptomycin in derselben Zeit zu einem 110 %igen Wachstum gegenüber den Kontrollen (100 %) führte. Die Enthemmung beträgt also 50 %. Aus den Versuchen mit nicht überimpften Wurzeln resultierte bei dieser Wirkstoffkonstellation eine Enthemmung von 40 %. Dieser Unterschied liegt jedoch im Bereich der Streuung und eine Veränderung des natürlichen Wuchsstoffgehaltes durch die Passagen kann nicht dafür verantwortlich gemacht werden.  $10^{-10}$  molare IES zeigte hier ähnliche Förderung wie bei Wurzeln, welche keine Passagen durchlaufen hatten.  $10^{-12}$  molare IES erzeugte an überimpften Wurzeln eine Hemmung im Gegensatz zu den normalen Objekten, bei welchen diese IES-Konzentration indifferente Wirkung ergab. Aus der Kombination von  $10^{-10}$  bzw.  $10^{-12}$  molarer IES mit Streptomycin (10 γ/ccm) resultierte eine zusätzliche Hemmung des Wachstums, gleich wie bei nicht überimpften Wurzeln.

FIGUR 4

**Einfluß der IES und der Kombination IES/Streptomycin auf überimpfte Wurzeln von *Pisum sativum* nach 2 Tagen**

Abszisse: Steigende IES-Konzentrationen

Ordinate: Längenwachstum in % der Kontrolle (100 %)



Nach 5tägiger Kultur ergab sich eine Hemmung des Wurzelwachstums gegenüber den Kontrollen auch in  $10^{-10}$  molarer IES allein. Diese Erscheinung haben wir bei nicht überimpften Wurzeln nie angetroffen. Die Vereinigung mit Streptomycin vermochte aber, wie an normalen Wurzelspitzen, auch hier keine Enthemmung mehr auszulösen.

Die experimentell wuchsstofffrei gemachten Wurzeln reagieren demnach in einigen Punkten verschieden auf IES und Streptomycin. Hingegen ist die Abschwächung der IES-Hemmung durch Streptomycin nach 2 Tagen auch bei überimpften Wurzeln aufgetreten.

*b) Wirkung der nachträglichen Streptomycinzugabe zu indolessigsäuregehemmten Wurzeln*

In den vorausgehenden Experimenten hatten wir mehrmals festgestellt, daß die isolierten Wurzeln nach 2 Kulturtagen in einer Kombination von  $10^{-8}$  molarer IES mit Streptomycin (10—25 γ/ccm) zu einem be-

deutend stärkeren Wachstum gelangten als in  $10^{-8}$  molarer IES und auch in Streptomycinlösungen der erwähnten Konzentrationen allein. Um die Wechselwirkung zwischen den beiden Wirkstoffen besser erfassen zu können, wollten wir hier untersuchen, ob eine Enthemmung der IES-gehemmten Wurzeln auch dann eintritt, wenn das Streptomycin erst nachträglich zugegeben wird.

#### Versuchsanordnung:

Je 20 Röhren mit Nährlösung nach BONNER, welche IES in Konzentrationen von  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$  und  $10^{-8}$  mol enthielten, wurden zusammen mit einer Kontrollserie ohne Wuchsstoff während 15' bei  $115^{\circ}\text{C}$  sterilisiert. Die 10 mm langen Wurzelspitzen trennten wir steril von den 5 Tage alten Keimlingen ab und führten sie in die vorbereiteten Röhren über. Diese Wurzeln wurden darauf während 5 Tagen in einem verdunkelten Raum bei  $23^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) dem Wachstum überlassen. In diesem Zeitpunkt erfolgte eine erste Messung des Längenwachstums mit dem Busch-Citophot. Zugleich fügten wir unter sterilen Bedingungen jeder Röhre mit IES soviel kaltsterilisierte Streptomycinlösung zu, daß sich eine Endkonzentration von  $10 \gamma/\text{ccm}$  Streptomycin ergab. Am 7. Kulturtag, nachdem die Wurzeln während 2 Tagen unter Streptomycineinfluß standen, wurden die Wurzellängen erneut ermittelt, ebenso am 10. Kulturtag nach 5tägiger Streptomycineinwirkung.

#### Ergebnisse:

Die Resultate dieses Versuchs sind in Tabelle 6 und Figur 5 zusammengestellt.

TABELLE 6

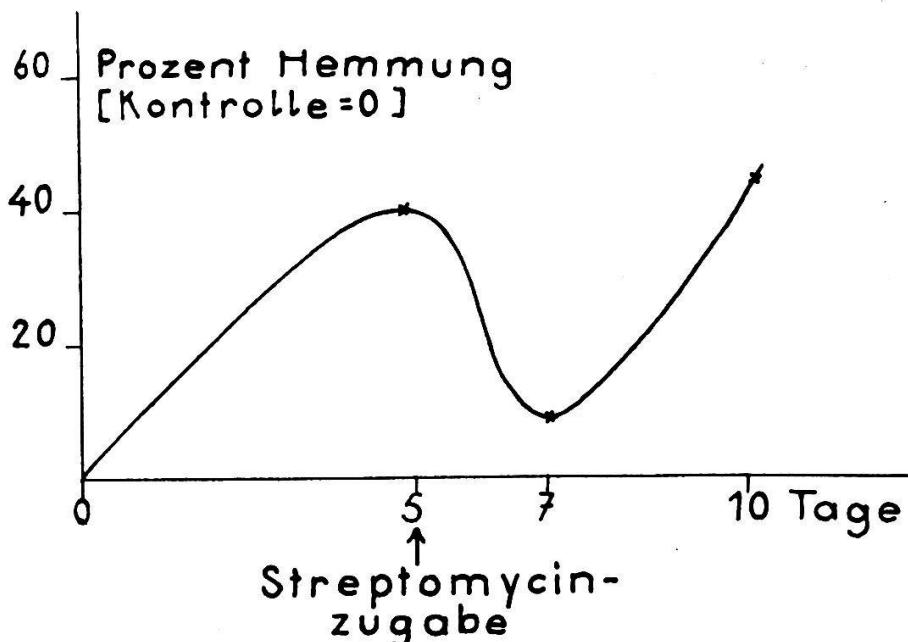
**Wirkung des Streptomycins ( $10 \gamma/\text{ccm}$ )  
auf das Wachstum indolessigsäurebehandelter Wurzeln  
von *Pisum sativum***

Pisumwurzeln		Längenwachstum in % der Kontrolle			
		0	$10^{-12}$	$10^{-10}$	$10^{-8}$
Kulturtag	5.	100	104	128	60
					← Streptomycinzugabe ( $10 \gamma/\text{ccm}$ )
	7.	100	86	96	92
	10.	100	60	66	58

FIGUR 5

Veränderung des Hemmungsgrades  
indolessigsäurebehandelter Wurzeln ( $10^{-8}$  molare IES)  
durch eine Streptomycinzugabe ( $10\gamma/\text{ccm}$ )  
am 5. Kulturtag

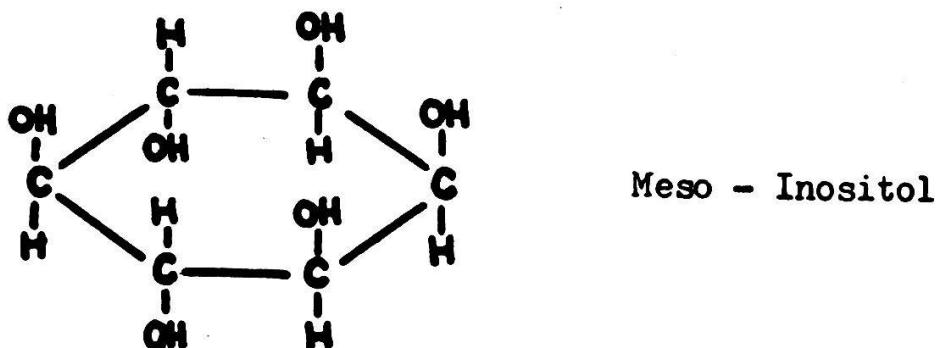
Abszisse: Zeit (Tage)  
Ordinate: Hemmung in % der Kontrolle (0 %)



Die erste Messung, nachdem IES während 5 Tagen allein gewirkt hatte, zeigte eine 40 %ige Hemmung mit  $10^{-8}$ , eine 28 %ige Förderung mit  $10^{-10}$  und indifferente Wirkung mit  $10^{-12}$  molarer IES. Zu dieser Ausgangslage wurde nun Streptomycin in oben beschriebener Weise zugefügt. Nach zwei weiteren Tagen ergab die Messung, daß die Objekte in  $10^{-12}$  bzw.  $10^{-10}$  molarer IES durch diesen Eingriff im Wachstum gehemmt wurden, daß aber die Wurzeln, welche vor der Streptomycinzugabe in  $10^{-8}$  molarer IES eine 40 %ige Hemmung aufwiesen, jetzt nur noch 8 %ig gegenüber den Kontrollen ohne Wirkstoff gehemmt erschienen. Somit ist in dieser Reihe eine 32 %ige Enthemmung eingetreten. Drei Tage später stellten wir fest, daß die Wachstumshemmung aller drei Reihen etwa 40 % erreichte. Dies bedeutet, daß die oben erwähnte Enthemmung in der betreffenden Reihe wieder rückgängig gemacht worden ist. Die kurzfristige Enthemmung indolessigsäuregehemmter Wurzeln kann also auch durch nachträgliche Streptomycinzugabe hervorgerufen werden.

c) *Meso-Inositol und die Abschwächung der Indolessigsäurehemmung durch Streptomycin bei isolierten Wurzeln*

1951 berichtete SCHOPFER (1951) über die Rolle des m-Inositols in der Biologie, daß es sich bei diesem Stoff um einen Wachstumsfaktor für eine beschränkte Anzahl von Pilzen handelt, der von Bakterien nicht verlangt wird. Es verstärkt mehrheitlich als Komplementärfaktor die Effekte des Aneurins, des Biotins oder beider Vitamine zugleich und wirkt quantitativ. Als essentieller Faktor zeigt sich die Substanz für *Trichophyton discoides* und für die künstliche Mutante *Neurospora inositolless*. Die Wirkung des m-Inositols als vitaminischer Faktor ist strikte an seine bestimmte Konfiguration gebunden, wie die Untersuchung seiner Isomeren zeigt, um deren Herstellung sich POSTERNAK (1942) und DANGSCHAT (1942) verdient gemacht haben. Meso-Inositol besteht aus einem 6-Ring, wobei an jedem C ein H-Atom und eine OH-Gruppe sitzen.



Meso - Inositol

Einzig das m-Inositol mit drei benachbarten OH-Gruppen in cis-Stellung ist biologisch voll wirksam, während seine Isomeren nicht oder nur sehr wenig wachstumsfördernd sind, oder sogar hemmen. In den Arbeiten von FLEURY, DEYSSON G. und DEYSSON M. (1952) und DEYSSON G. und DEYSSON M. (1952) vergleichen die Autoren die Wirkung verschiedener Inositole auf das pflanzliche Wachstum. Sie gelangen zum Schluß, daß die Wirkung des m-Inositols dabei konzentrationsabhängig ist, indem es in Verdünnungen von weniger als  $10^{-3}$  mol das Wachstum von Pisumpflanzen hemmt und im Bereich von  $10^{-3}$  bis  $10^{-7}$  mol eine Förderung mit einem Maximum bei  $10^{-6}$  mol erzeugt. Isomeren des m-Inositols sind auch hier wirkungslos. In eigenen Versuchen an Wurzelkultu-

ren konnten wir keine einwandfreie Konzentrationsabhängigkeit des m-Inositol feststellen. Parallelversuche mit gleichen Konzentrationen ergeben stark unterschiedliche Resultate, offenbar weil die Testobjekte bei Versuchsbeginn verschiedene Mengen natürlichen Inositol enthalten. Die chlorophyllhaltigen Pflanzen sind inositolautotroph. RHYNER, WALLACE, BYERS und CARTER (1947) haben aus Gehirnsubstanz Lipositol extrahiert, eine Substanz, welche aus m-Inositol kombiniert mit Phosphor, Galactose, Fettsäuren und Weinsäure zusammengesetzt ist. Mit Lipositol konnten sie die Hemmung des Streptomycins für das Wachstum von *Staphylococcus aureus* aufheben. Die Autoren vermuten, daß bei der Wirkung des m-Inositol auf das Streptomycin die Inositolähnlichkeit der Cyclohexangruppe in dessen Streptidinanteil von Bedeutung ist. Bei der Untersuchung der Streptomycinderivate hatten wir festgestellt, daß Streptidin ebenfalls in der Lage ist, die IES-Hemmung abzuschwächen. Es interessierte uns deshalb die Frage, ob m-Inositol einen Einfluß auf Streptomycin ausübt in bezug auf die Abschwächung der IES-Hemmung durch das Antibioticum.

#### Versuchsanordnung:

Serien von 20 Röhren (GEIGER) enthielten im BONNERMILIEU Streptomycin ( $10 \gamma/\text{ccm}$ ), m-Inositol  $750 \gamma/\text{ccm}$  ( $4,125 \times 10^{-3} \text{ mol}$ ) und Streptomycin mit m-Inositol vereinigt in Kombination mit  $10^{-8}$  molarer IES. Zudem wurden gleichgroße Serien vorbereitet mit Streptomycin, m-Inositol und Streptomycin/m-Inositol in oben erwähnten Konzentrationen ohne IES. Als Kontrollen dienten Serien mit  $10^{-8}$  molarer IES und mit BONNERMILIEU allein. Die Kulturlösungen mit BONNERMILIEU, IES und m-Inositol wurden während 15' bei  $115^\circ\text{C}$  im Autoklav sterilisiert. Die kaltsterilisierten Streptomycinlösungen wurden nachträglich den betreffenden Röhren zugegeben.

Wurzelspitzen haben wir wieder von 4—5 Tage alten Keimlingen abgetrennt und steril in die vorbereiteten Röhren übergeführt.

Die Kultur erfolgte in einem verdunkelten Kellerraum bei  $23^\circ\text{C}$  ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Messungen des Längenwachstums der Wurzeln haben wir nach 2 und 5 Tagen mit dem Busch-Citophot vorgenommen.

## Ergebnisse:

TABELLE 7

**Wirkung der  $10^{-8}$  molaren IES in Kombination  
mit Streptomycin und m-Inositol  
auf das Wachstum der isolierten Wurzel von *Pisum sativum*  
(Längenwachstum in % der Kontrolle)**

Pisumwurzeln IES-Konz.	Längenwachstum in % der Kontrolle			
	nach 2 Tagen		nach 5 Tagen	
	0	$10^{-8}$	0	$10^{-8}$
Kontrolle	100	54	100	71
+ Streptomycin ( $10 \gamma/\text{ccm}$ )	81	126	62	65
+ m-Inositol ( $750 \gamma/\text{ccm}$ )	90	54	111	85
+ Streptomycin und m-Inositol	36	54	71	68

Nach 2 Kulturtagen führte die  $10^{-8}$  molare IES allein, wie in früheren Versuchen, zu einer etwa 50 %igen Hemmung des Wurzelwachstums. In Kombination mit  $10 \gamma/\text{ccm}$  Streptomycin ist hier die stärkste Enthemmung aller unserer Experimente aufgetreten (etwa 70 %). Meso-Inositol ( $750 \gamma/\text{ccm}$ ) allein ergab gleiches Wachstum wie die Kontrollen ohne Wirkstoff. Ein direkter Einfluß des m-Inositsols auf das Wurzelwachstum kann deshalb hier ausgeschlossen werden. Meso-Inositol mit  $10^{-8}$  molarer IES zusammen führten, wie mit letzterer allein, zu einer 50 %igen Hemmung. Streptomycin ( $10 \gamma/\text{ccm}$ ) und m-Inositol ( $750 \gamma/\text{ccm}$ ) vereinigt erzeugten in Kombination mit  $10^{-8}$  molarer IES ebenfalls eine etwa 50 %ige Hemmung. Die Abschwächung der IES-Hemmung durch Streptomycin ist also durch dessen Kombination mit m-Inositol hinfällig geworden.

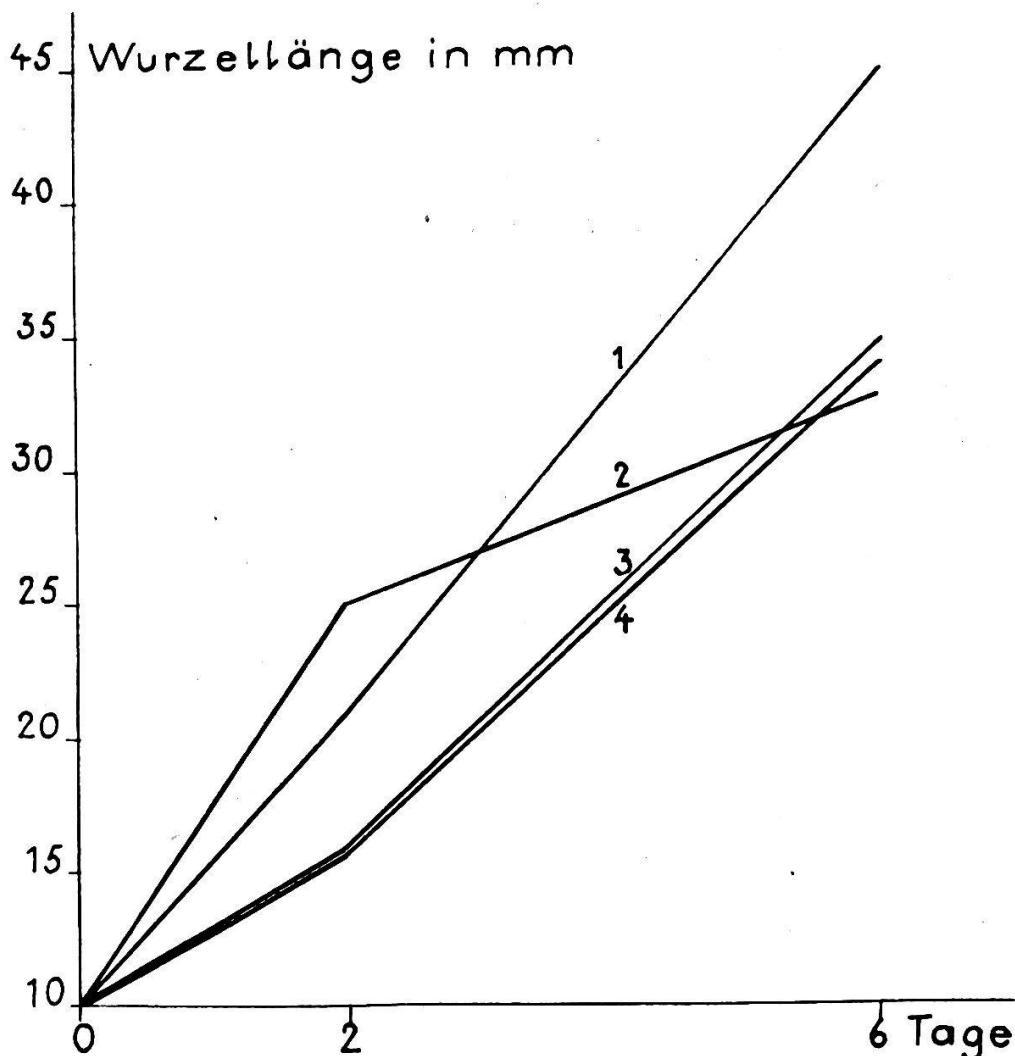
Nach 5 Kulturtagen zeigte sich, wie wir bereits mehrfach beobachtet haben, keine Beeinflussung der IES-Hemmung durch Streptomycin. Die Wurzeln aus Kulturlösungen, welche Wirkstoffe oder deren Kombination enthielten, erscheinen nun deutlich gehemmt gegenüber den Kontrollen (Figur 6).

FIGUR 6

Wirkung von  $10^{-8}$  molarer IES in Kombination  
mit Streptomycin und m-Inositol  
auf das Wachstum der isolierten Wurzel von *Pisum sativum*  
(Wurzellänge in mm)

Abszisse: Zeit (Tage)

Ordinate: Wurzellänge in mm (Ausgangslänge 10 mm)



Legende: 1 Kontrolle ohne Wirkstoff

2 IES ( $10^{-8}$  mol) + Streptomycin ( $10 \gamma/\text{ccm}$ )

3 IES ( $10^{-8}$  mol)

4 IES ( $10^{-8}$  mol) + Streptomycin ( $10 \gamma/\text{ccm}$ )  
+ m-Inositol ( $750 \gamma/\text{ccm}$ )

*d) Wirkung der Indolessigsäure und des Streptomycins  
auf das Nebenwurzelwachstum von Pisumpflanzen  
(Nebenwurzeltest)*

Wir wollten in diesem Abschnitt die Frage abklären, ob die Abschwächung der IES-Hemmung durch Streptomycin, welche wir bis jetzt an isolierten Wurzeln beobachtet hatten, auch in dem von SCHOPFER entwickelten «Nebenwurzeltest» mit ganzen Pisumpflanzen zum Ausdruck kommt. Dieser Test ermöglicht uns anhand von Trockengewichtsbestimmungen und Zählung der gebildeten Nebenwurzeln den Einfluß von Wirkstoffen auf das Wachstum zu untersuchen. SCHOPFER (1952) berichtete, daß bereits ein kurzfristiger Kontakt von 10 Minuten der Pisumpflanzen mit dem Streptomycin (50 mg/20 ccm) das Trockengewicht der Nebenwurzeln um 50 % erniedrigt, währenddem eine Antibioticumkonzentration von 200 mg/20 ccm schon bei 5minütiger Einwirkungsdauer das Nebenwurzelwachstum vollständig aufhebt. Über die Wirkung der IES auf das Nebenwurzelwachstum standen uns keine Angaben zur Verfügung. Es war jedoch zu erwarten, daß wie bei den isolierten Wurzeln mit stärkeren Konzentrationen ebenfalls eine Hemmung auftreten würde.

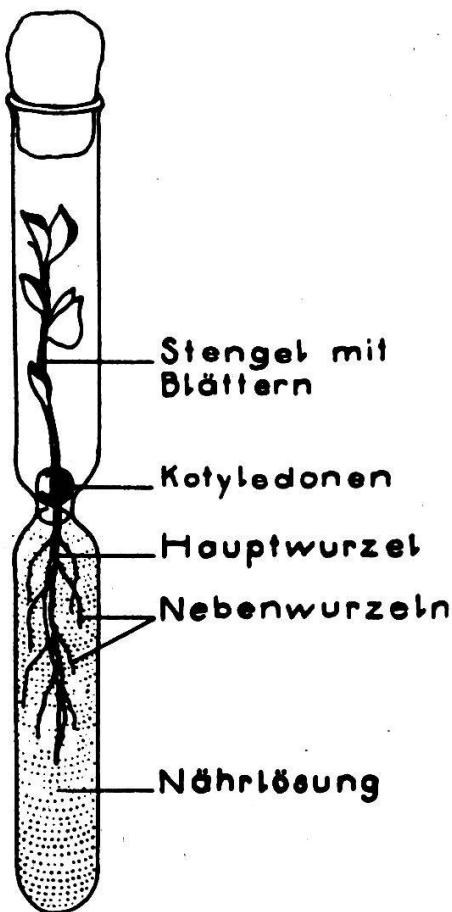
**Versuchsanordnung:**

Die zum Experiment ausgelesenen Samen von *Pisum sativum* (Sorte Maikönigin), wurden durch Einlegen in 35 % Chlorkalklösung während einer Stunde desinfiziert und dann in sterilen Petrischalen über feuchter Watte und Filterpapier zur Keimung gebracht. Nach 4—5tägiger Kultur im Dunkeln bei 23 °C ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) haben wir die Keimwurzeln und ihre Kotyledonen mit der Lupe genau nach Infektionen durchgemustert. Objekte gleicher Länge wurden ausgelassen und in sterile Röhren aus Jenaerglas übergeführt, welche in der Mitte eine Verengung aufweisen. Die Wurzel ragt in den untern Teil der Röhre, währenddem die Keimblätter über der Verengung festgehalten werden.

Der untere Teil der Röhre ist gefüllt mit dem Milieu nach KNOP, wie es für Pflanzenkulturen gebräuchlich ist. Es weist folgende Zusammensetzung auf:

Aqua dest.	1000 ccm
K-Nitrat	0,25 g
K-Monophosphat	0,25 g
Mg-Sulfat	0,25 g
Ferriphosphat	Spuren

FIGUR 7  
Kulturgefäß für den Nebenwurzeltest mit ganzen Pisum pflanzen



Dieses Grundmilieu wurde in unseren Versuchen auf  $\frac{1}{3}$  verdünnt angewendet. Jedes Kulturgefäß faßt 25 ccm Milieu. Die vier Serien, welche wir vorbereiteten, enthielten KNOP-Nährösung allein und kombiniert mit  $10^{-6}$  mol,  $10^{-8}$  mol,  $10^{-10}$  mol IES. Die abgefüllten Röhren sterilisierten wir während 15' bei  $115^{\circ}\text{C}$  im Autoklaven.

Um die Wirkung des Streptomycins zu ermitteln, wurden die Pflanzen vor dem Einführen in die Röhren während bestimmter Zeit mit den Wurzeln in die Antibioticumlösung (2,5 mg/1 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  dest.) getaucht. Dabei verwendeten wir ein Spezialgefäß, in welchem die Kotyledonen geschützt unter einem Deckel, über einem Sieb, festgehalten werden und nur die Wurzeln mit der Antibioticumlösung in Berührung kommen. Die letzteren wurden hier 1' bzw. 10' dem Einfluß des Streptomycins ausgesetzt. Nach diesen Vorbereitungen haben wir die Pflanzen mit einer sterilen Pinzette in die Kulturgefäße übertragen. Bis zur Verengung steckten die Röhren in einem Kasten, unter Abschirmung der Wur-

zel vom Licht. Den restlichen Teil der Pflanzen setzten wir bei Zimmertemperatur dem natürlichen Tagesrhythmus von Licht und Dunkelheit aus. Die Messung erfolgte nach 8tägiger Kultur. In diesem Zeitpunkt wurden die Nebenwurzeln mit einem Rasiermesser von der Hauptwurzel abgetrennt und gezählt. Dann haben wir sie während 4 h. im Heizschrank ( $110^{\circ}\text{C}$ ) getrocknet und gewogen.

TABELLE 8

**Wirkung der IES auf das Nebenwurzelwachstum  
von Pisumpflanzen mit und ohne Streptomycinvorbehandlung  
(1' bzw. 10')**

(Trockengewicht in % der Kontrolle und Zahl der Nebenwurzeln)

Pisumpflanzen Serie: 15 Pflanzen		Trockengewicht der Nebenwurzeln in % nach 8 Tagen pro Pflanze in Klammer: Zahl der Nebenwurzeln pro Pflanze		
IES-Konz.		ohne Streptomycin- vorbehandlung	mit 1' Streptomycin- vorbehandlung (2,5 mg/ccm)	mit 10' Streptomycin- vorbehandlung (2,5 mg/ccm)
0 (Kontr.)		100 (10)	72 (9)	26 (3)
$10^{-6}\text{mol}$		24 (4)	93 (9)	54 (10)
$10^{-8}\text{mol}$		100 (10)	120 (11)	105 (9)
$10^{-10}\text{mol}$		110 (10)	50 (6)	60 (6)

Die  $10^{-8}\text{molare}$  IES, welche das Wachstum der isolierten Pisumwurzeln um 50 % hemmt, hatte keinen Einfluß auf die Nebenwurzelbildung ganzer Pisumpflanzen, indem sich hier gleiche Entwicklung wie bei den Kontrollen im KNOPmilieu allein ergab. Die stärkere  $10^{-6}\text{molare}$  IES-Konzentration vermag das Trockengewicht der Nebenwurzeln innert 8 Tagen um 70 % herabzusetzen. Ebenso wird deren Zahl um 60 % vermindert. Werden nun die Pflanzen mit ihren Wurzeln vor Versuchsbeginn in eine Streptomycinlösung von 2,5 mg/ccm getaucht und dann erst in IES übergeführt, weisen die Nebenwurzeln nach 8tägiger Kultur eine bedeutend schwächere Hemmung in Trockengewicht und Zahl auf als diejenigen, welche in  $10^{-6}\text{molarer}$  IES allein gezüchtet wurden. Das beste Resultat ergab sich durch 1minütige Streptomycinvorbehandlung. Dabei betrug die Enthemmung 69 %, währenddem bei 10minütiger Vorbehandlung mit dem Antibioticum nur mehr 30 % erzielt wurden.  $10^{-10}\text{molare}$  IES erzeugte keine wesentliche Beeinflussung der Nebenwurzelentwicklung. Die Streptomycinvorbehandlung führte bei dieser IES-Konzentration zu einer 50 %igen Hemmung.

Die Ausfälle in den Versuchsserien, bedingt durch Infektionen, waren beim zuckerlosen KNOPmilieu viel geringer, als beim BONNERmilieu für die Wurzelkulturen.

e) *Zuckerverbrauch, Längenwachstum und Trockengewicht von isolierten Wurzeln unter dem Einfluß von Indolessigsäure und Streptomycin*

Die isolierte Wurzel verhält sich wie ein heterotropher Organismus. Alle lebensnotwendigen Nähr- und Wirkstoffe, die sie in der Natur aus dem Boden (z. B. Mineralien) und der Restpflanze (z. B. Kohlenhydrate) bezieht, müssen ihr im Milieu der Organkultur geboten werden, um ein Wachstum zu ermöglichen. Die Methode der Organkultur bietet den Vorteil, daß man über die zur Verfügung gestellten Stoffmengen genau orientiert ist. Wir konnten deshalb hier untersuchen, ob die am Wurzelwachstum festgestellten Veränderungen unter dem Einfluß von IES und Streptomycin ihren Ausdruck auch in einem unterschiedlichen Verbrauch der Sacharose aus der Nährlösung finde. Zudem sollte das Experiment einen Vergleich zwischen Wurzellängen- und Trocken gewichtsbestimmungen ergeben.

**Versuchsanordnung:**

Um die Zucker- und Trockengewichtsbestimmungen nach 2- und 5tägiger Kultur durchzuführen, mußten wir die gewohnte Versuchstechnik abändern. Als Kulturgefäße wählten wir Erlenmeyer (100 ccm), weil die bisher verwendeten Röhren in diesem Fall unzweckmäßig sind. Es wurden Serien von 40 Stück pro Punkt vorbereitet, wobei für die 2 Messungen je die Hälfte einer Serie aufgehoben werden konnte. Die IES stand für dieses Experiment im BONNERmilieu in Konzentrationen von  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$  und  $10^{-8}$  mol allein und kombiniert mit Streptomycin ( $10 \gamma/ccm$ ) zur Verfügung. Als Kontrollen diente eine Serie mit BONNERmilieu allein. Jedes Kulturgefäß enthielt 10 ccm Milieu. Die Erlenmeyer, welche IES im BONNERmilieu enthielten, wurden während 15' bei  $115^\circ C$  im Autoklav sterilisiert und die kaltsterilisierte Streptomycinlösung wurde nachträglich den betreffenden Gefäßen zugegeben.

Von 5 Tage alten Keimlingen haben wir 10 mm lange Testwurzeln abgetrennt und steril in die Erlenmeyer übergeführt.

Die Kultur erfolgte im Dunkeln bei  $23^\circ C$  ( $\pm 1^\circ C$ ), und Messungen nahmen wir am zweiten und fünften Kulturtag vor.

Das Längenwachstum ermittelten wir nach dem Herausnehmen der Wurzeln aus den Erlenmeyern mit dem Maßstab. Zur Trockengewichtsbestimmung wurden die Wurzeln einer Serie vereinigt, im Heizschränk ( $110^{\circ}$ ) während 4 h. getrocknet und dann gewogen. Der Zuckerverbrauch der Wurzeln ergab sich aus der Bestimmung der Restsacharose in der Nährösung und wurde nach der BERTRAND-Methode durchgeführt. Aus der Vereinigung aller Nährösungen einer Serie wurde der Mittelwert des Verbrauchs pro Wurzel mit doppelter Nachkontrolle bestimmt. Der Wasserverlust, welcher während der Kultur im Milieu entsteht, wurde in der Messung berücksichtigt. Bei Versuchsbeginn standen jeder Wurzel 400 mg Sacharose zur Verfügung.

TABELLE 9

**Wirkung der IES und des Streptomycins ( $10 \gamma/\text{ccm}$ ) auf den Sacharoseverbrauch, das Längenwachstum und Trockengewicht isolierter Wurzeln von *Pisum sativum***  
 (Sacharoseverbrauch in mg, Längenwachstum und Trockengewicht [TG] in % der Kontrolle)

Pisumwurzeln	Längenwachstum und Trockengewicht in % der Kontrolle Sacharoseverbrauch pro Kultur in mg					
	nach 2 Tagen					
IES-Konz.	ohne Streptomycin			mit Streptomycin ( $10 \gamma/\text{ccm}$ )		
	Länge	TG	Sacharoseverbr. in mg pro Kultur	Länge	TG	Sacharoseverbr. in mg pro Kultur
0	100	100	5,5 (100 %)	90	85	4,5 (82 %)
	100	100	5,5 (100 %)	92	85	4,5 (82 %)
	120	111	12,5 (227 %)	93	85	8,5 (155 %)
	68	82	1,5 (27 %)	90	85	10,5 (191 %)
nach 5 Tagen						
$10^{-12}\text{mol}$	100	100	(—)	62	76	(—)
	110	100	6,0	97	96	10,5
	124	115	12,0	97	96	6,0
	78	83	8,0	51	83	8,0

$10^{-8}$  molare IES erzeugte nach 2 Kulturtagen eine Hemmung des Längenwachstums der Wurzeln um 32 %. Durch die Kombination mit  $10 \gamma/\text{ccm}$  Streptomycin trat hier eine Abschwächung der IES-Hemmung

von 22 % auf. Die übrigen Wurzellängen nach 2 und 5 Tagen entsprachen denjenigen, welche wir bereits vorher aus der Einwirkung von IES und Streptomycin erhalten haben. Das Trockengewicht wurde durch die Wirkstoffe ähnlich verändert wie die Wurzellängen.  $10^{-8}$  molare IES beeinflußte das Trockengewicht weniger als das Längenwachstum. Die Zuckerbestimmungen ergaben folgendes Bild: Unter der Wirkung der wachstumshemmenden  $10^{-8}$  molaren IES verbraucht eine Wurzel innert 2 Tagen nur 1,5 mg Sacharose. Bei Kombination dieser IES-Konzentration mit Streptomycin (10 γ/ccm) nehmen die Objekte aber 10,5 mg Sacharose aus der Nährlösung auf. Das Streptomycin vermag demnach nicht nur die IES-Hemmung ( $10^{-8}$  mol) auf das Wachstum abzuschwächen, sondern fördert auch die Zuckeraufnahme aus dem Milieu, welche dadurch den 7fachen Betrag erreicht. Die Wurzeln, welche 5 Tage in  $10^{-8}$  molarer IES gewachsen waren, nahmen in dieser Zeit 8 mg Sacharose auf. Denselben Wert erhielten wir aus der Kombination von  $10^{-8}$  molarer IES mit Streptomycin (10 γ/ccm). Nach 5tägiger Kultur tritt also keine Verbesserung der Sacharoseaufnahme durch Streptomycin auf. Auch die Wurzellängen erschienen bekanntlich nicht mehr enthemmt in der Kombination von  $10^{-8}$  molarer IES mit Streptomycin. Beim Vergleich der Resultate dieses Experimentes ist zu berücksichtigen, daß es sich für die 2- und 5tägige Kultur um zwei verschiedene Wurzelserien handelt.

## B. WIRKUNG DER INDOLESSIGSÄURE UND DES STREPTOMYCINS AUF DIE PERMEABILITÄT EINIGER GEWEBE

### *1. Einfluß der Indolessigsäure und des Streptomycins allein und in Kombination auf den Wasseraustausch von Speichergeweben (*Daucus carota*, *Solanum tuberosum*)*

Aus den Sacharosebestimmungen des vorausgehenden Abschnittes geht hervor, daß die angewendeten Wirkstoffe in der Lage sind, die Aufnahmefähigkeit isolierter Wurzeln für gelöste Kohlenhydrate zu verändern. Als Erklärung dieser Erscheinung vermuteten wir eine Beeinflussung der Zellpermeabilität und versuchten nun mit einer anderen Methode näher auf das Problem einzugehen.

Die Wirkung der IES auf den Wasseraustausch der pflanzlichen Zelle ist seit längerer Zeit Objekt eingehender Untersuchungen. REINDERS

(1942) machte die Beobachtung, daß die aerobe Wasseraufnahme von Kartoffelparenchym durch schwache IES-Konzentrationen merklich gesteigert wird. Man erkannte bald, daß die Aufklärung der Ursachen dieses Phänomens das Verständnis der physiologisch bedeutungsvolleren Wirkung der IES auf das Streckungswachstum erleichtern würde. Als mögliche Erklärung nahm REINDERS selbst eine Mehrproduktion von osmotischer Substanz an, verursacht durch eine auxininduzierte Steigerung der Atmung. In Ergänzung dazu erwog er eine Erhöhung der Wanddehnbarkeit. Alle späteren Untersuchungen anderer Forscher haben die Grunderscheinung eindeutig bestätigt, gingen aber in ihrer Auslegung verschiedene Wege. COMMONER (1944) sah den Primäreffekt ebenfalls in einer Atmungsstimulation, die auf dem Wege einer Förderung der Salzabsorption zu einer gesteigerten Wasseraufnahme führen soll. Eine Mitbeteiligung der Plastizitätserhöhung der Zellwand dagegen hielt er für unwahrscheinlich. OVERBEEK (1944) konnte jedoch feststellen, daß sich der Auxineffekt auch in destilliertem Wasser entwickelt, und daß im Zellsaft des auxinbehandelten Gewebes keine Zunahme der osmotischen Konzentration nachzuweisen ist. Deshalb lehnt OVERBEEK die COMMONERSche Hypothese ab und kommt zum Schluß, daß als alleinige Faktoren der IES-Wirkung eine Herabsetzung der Wandspannung und eine Erhöhung der sogenannten anomalen Komponente der Saugspannung (active absorption), beeinflußt durch das Auxin, in Erwägung zu ziehen seien. LEVITT (1948) konnte das Ergebnis von OVERBEEK bestätigen, wonach der osmotische Wert im Zellsaft der Auxinproben nicht ansteigt. Eine Reihe von Untersuchungen, neben thermodynamischen Erwägungen, führte ihn aber zum Schluß, daß auch eine Mitbeteiligung einer aktiven Absorption ausgeschlossen werden muß. Nach Eliminierung der erwähnten Möglichkeiten folgert LEVITT, daß nur eine Erhöhung der Zellwandplastizität die Steigerung der Wasseraufnahme durch schwache IES-Konzentration befriedigend erklären kann. BRAUNER und HASMANN (1949), denen wir die neuesten Ansichten über dieses Gebiet verdanken, machen ihren Vorgängern den Vorwurf, daß sie einmal der Beeinflussung der Wasserpermeabilität des Protoplasten durch IES und dann auch den Konzentrationsverhältnissen derselben zu wenig Beachtung geschenkt hätten. Mit einer von den beiden genannten Autoren entwickelten Technik der gravimetrischen Messung von Saugpotentialen, welche wir weiter unten im Zusammenhang mit eigenen Versuchen beschreiben werden, konnten sie tatsächlich nachweisen, daß ein direkter Einfluß der IES auf das Wasserdurchlässigkeitsvermögen der lebenden

Plasmagrenzschichten vorhanden sein muß. Sie machten darüber folgende Angaben: IES von  $10^{-5}$  mol und schwächer konzentriert vermag die Dehnbarkeit und Permeabilität der Zellwände erheblich zu verstärken, während IES-Konzentrationen von  $10^{-4}$  mol an das Gegenteil bewirken. Die konzentrationsabhängige Wirkung wurde hier, ähnlich wie bei den Untersuchungen über die Wachstumsbeeinflussung durch IES, erst im Laufe der Forschung aufgedeckt.

Ausgehend von diesen Beobachtungen sollten unsere Versuche Aufschluß darüber geben, wie das Streptomycin auf den Wasseraustausch der Zelle wirkt und inwiefern der am Wachstum festgestellte Antagonismus zur Auxinwirkung hier zum Ausdruck kommt.

#### Versuchsanordnung:

Für die Wasseraustauschversuche wendeten wir das Verfahren von BRAUNER und HASMAN (1949) an. Dabei wird das gewichtsmäßige Verhalten von wirkstoffvorbehandelten Gewebestücken in einer Glucosekonzentrationsreihe untersucht. Als Objekte wählten wir in einer ersten Serie Rübengewebe (Querschnitte von etwa 3 mm Dicke aus der mittleren Partie von gelben Rüben, *Daucus carota*) und in der zweiten Serie Kartoffelgewebe (Kartoffelparenchymzylinder von 1 cm Ø und 0,5 cm Höhe ausgestanzt aus unbeschädigten Kartoffeln, *Solanum tuberosum* Var. Bintje). Diese Gewebeproben wurden während 15' in fließendem Wasser gespült, dann haben wir sie je zur Hälfte während 5 h. in dest. Wasser bzw. in der Wirkstofflösung vorbehandelt, deren Einfluß auf den Wasseraustausch untersucht werden sollte. Nach der Vorbehandlung trockneten wir die Proben mit Löschblättern und ermittelten das Gewicht jedes Stückes auf der Analysenwaage. Dann brachten wir die Objekte zu je 30 in mehrere hyper- und hypotonische Glucosekonzentrationen. Nach 18—24 h. haben wir die Proben wiederum mit Löschblättern sorgfältig von anhaftender Flüssigkeit befreit, ohne aber durch diese Manipulation zusätzliches Wasser aus dem Gewebe zu entfernen. Die erneute Wägung der Proben ergab Gewichtszunahmen im hypotonischen und Gewichtsabnahmen im hypertönischen Milieu, wobei verschiedene Grade erreicht wurden, je nachdem die Objekte in dest. Wasser oder in Wirkstofflösung vorbehandelt worden waren.

## Ergebnisse mit Rübengewebe:

TABELLE 10

**Einfluß einer 5 h. Vorbehandlung  
in Streptomycinlösung (1 mg/ccm) auf den Wasseraustausch  
von Rübenschichten  
in einer Glucosekonzentrationsreihe (0—0,5 mol)**  
(Mittlere Gewichtsunterschiede von 30 Proben pro Punkt nach 24 h.)

Rübenschichten Serie: 30 Stück	Gewichtsunterschiede pro Stück in mg nach 24 h.	
Molarität (Glucose)	ohne Streptomycin- vorbehandlung	mit Streptomycin- vorbehandlung (1mg/ccm)
0 ( $H_2O$ dest.)	+ 100	+ 196
0,1 mol	+ 81	+ 119
0,3 mol	- 30,5	- 56,0
0,5 mol	- 81,6	- 114,6

Mit der oben beschriebenen Technik untersuchten wir hier den Einfluß des Streptomycins auf den Wasseraustausch von Rübengewebe. Die Gewichtsunterschiede zwischen der ersten und der zweiten Messung zeigen, daß die Rübenschichten, welche 5 h. in einer Streptomycinlösung (1 mg/ccm) vorbehandelt wurden, in hypotonischen Glucosekonzentrationen durchwegs mehr Wasser aufgenommen und im hypertonischen Milieu mehr Wasser abgegeben haben, als die Kontrollen, welche in dest. Wasser vorbehandelt wurden. Das Streptomycin hat also eine Erhöhung des Wasseraustausches bewirkt. Von Bedeutung ist auch der Verlauf der betreffenden Kurven (Figur 8). Solange sie geradlinig verlaufen, ist ein Gleichgewicht zwischen Turgorspannung und Dehnbarkeit der Zellwände vorhanden, wie das normalerweise nach dem Gesetz von HOOKE der Fall ist. Beginnt die Kurve sich gegen die Abszisse zu krümmen, muß man annehmen, daß bei steigender Turgorspannung die Dehnbarkeit der Zellwände abgenommen hat. In diesem Bereich hat demnach das HOOKEsche Gesetz seine Gültigkeit verloren. Eine Krümmung gegen die Abszisse zu zeigt in unserem Fall die Kurve der Proben, welche in dest. Wasser vorbehandelt wurden. Die graphische Darstellung der Werte aus streptomycinvorbehandelten Objekten hingegen ergibt eine Gerade im hypotonischen Bereich. Hier hat demnach die Dehnbarkeit der Zellwände unter dem Streptomycineinfluß über das Normalmaß hinaus zu-

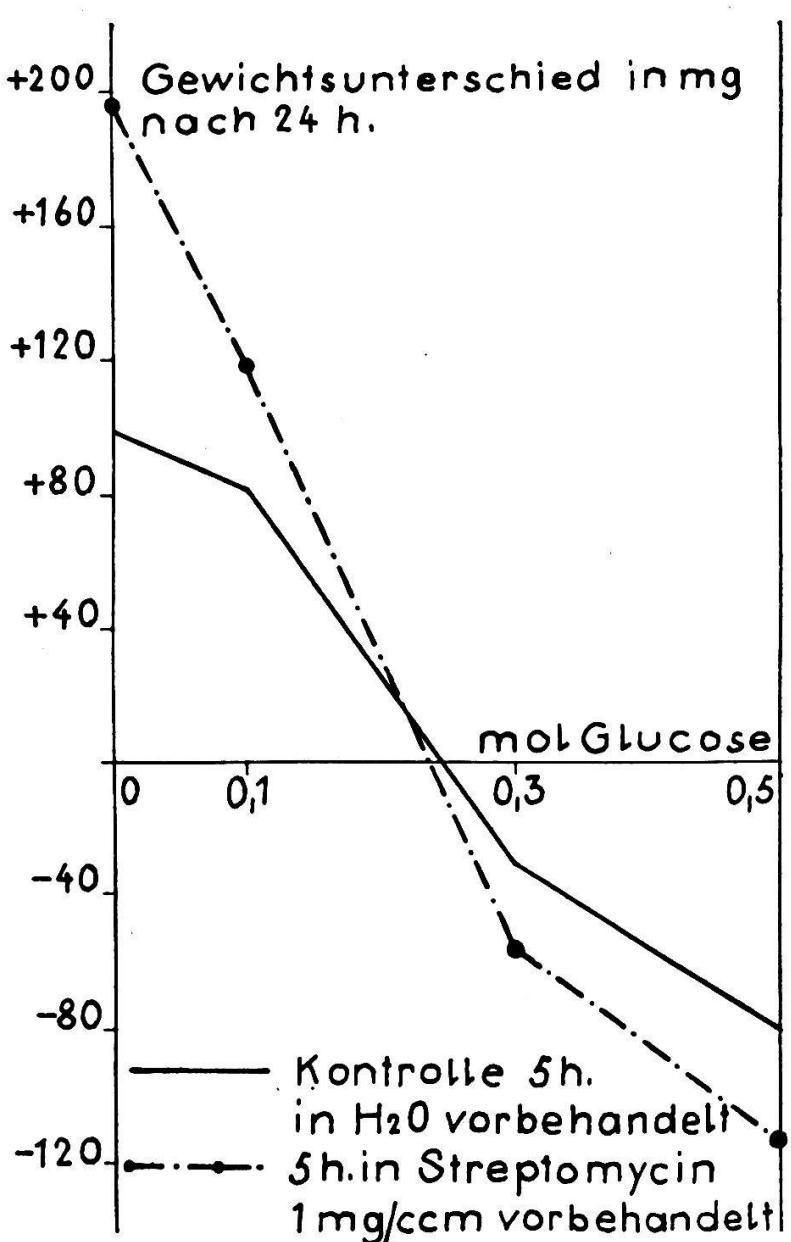
genommen. Diese Verringerung des Wanddrucks führt indirekt zu einer Steigerung des Saugpotentials, welche sich in einem erhöhten Wasseraustausch in der Konzentrationsreihe äußert.

FIGUR 8

Einfluß einer 5 h. Vorbehandlung  
in Streptomycinlösung (1 mg/ccm) auf den Wasseraustausch  
von Rübenschäiben  
in einer Glucosekonzentrationsreihe  
(s. Tab. 10)

Abszisse: Steigende Glucosekonzentrationen

Ordinate: Gewichtsunterschied pro Stück in mg nach 24 h.



### Ergebnisse mit Kartoffelparenchymgewebe:

TABELLE 11

Einfluß einer 5 h. Vorbehandlung mit  $10^{-3}$  molarer IES und mit der Kombination  $10^{-3}$  molare IES/Streptomycin ( $200 \gamma / \text{ccm}$ ) auf den Wasseraustausch von Kartoffelparenchymzylindern in einer Glucosekonzentrationsreihe ( $0 - 0,125 \text{ mol}$ )  
(Mittlere Gewichtsunterschiede von 30 Proben pro Punkt nach 18 h.)

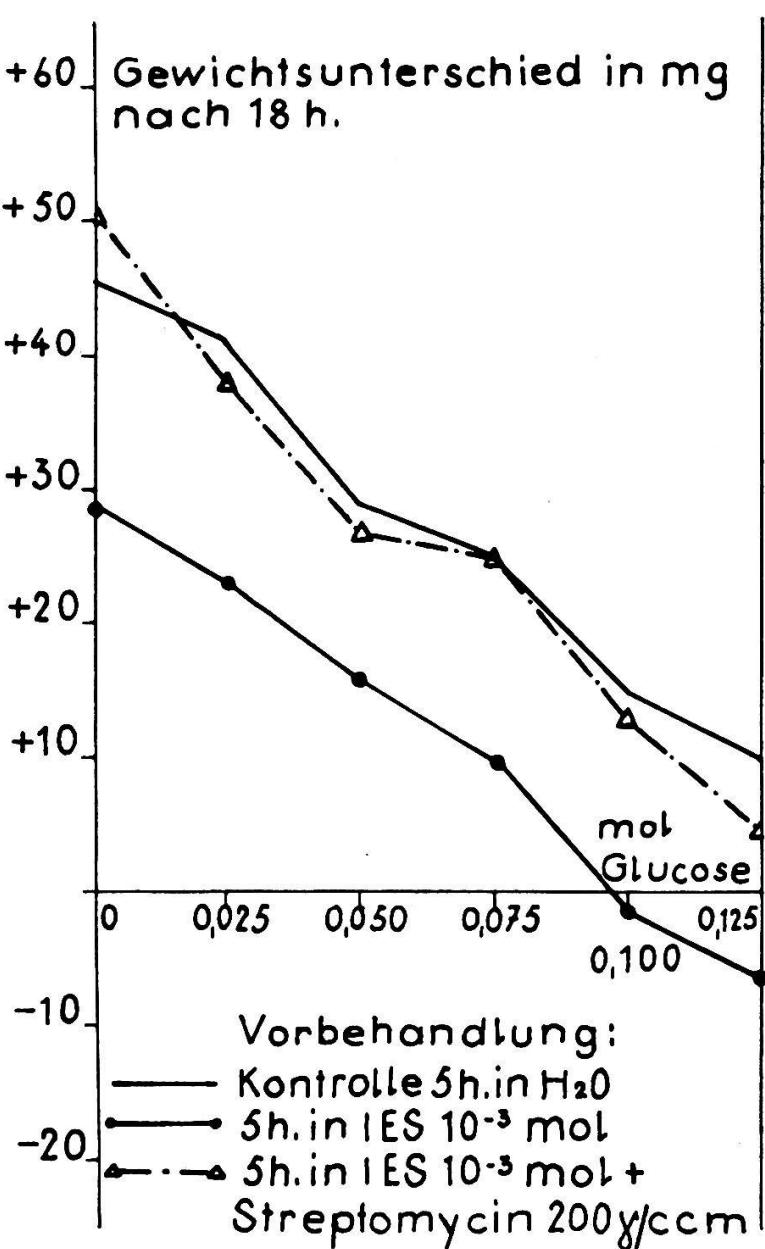
Kartoffelparenchymzylinder Serie: 30 Stück	Gewichtsunterschiede pro Stück in mg nach 18 h.		
	in $\text{H}_2\text{O}$ dest. vorbehandelt	in IES $10^{-3}$ mol vorbehandelt	in IES $10^{-3}$ mol + Streptomycin ( $200 \gamma / \text{ccm}$ ) vorbehandelt
0 ( $\text{H}_2\text{O}$ dest.)	+ 46	+ 28	+ 51
0,025 mol	+ 41	+ 23	+ 34
0,050 mol	+ 29	+ 13	+ 27
0,075 mol	+ 25	+ 5	+ 25
0,100 mol	+ 15	- 1	+ 13
0,125 mol	+ 10	- 6	+ 4

Die Resultate aus Tabelle 11 zeigen, daß die Proben vorbehandelt in  $10^{-3}$  molarer IES nach 18 h. in den hypotonischen Konzentrationen von 0 bis  $0,075 \text{ mol}$  Glucose etwa 20 mg weniger Wasser aufgenommen haben, als die in reinem Wasser vorbehandelten Kontrollen. Die Konzentrationen  $0,100 \text{ mol}$  und  $0,125 \text{ mol}$  sind für die IES-Proben bereits hypertonisch, währenddem sie für die Kontrollen noch deutlich hypotonisch wirken. Diese Beobachtungen sind Beweise dafür, daß der Wasseraustausch durch die IES-Behandlung stark erniedrigt worden ist. Betrachtet man die Kurve (Figur 9) der in einer Kombination von  $10^{-3}$  molarer IES und  $200 \gamma / \text{ccm}$  Streptomycin vorbehandelten Gewebestücke, zeigt sich, daß diese ganz ähnlich wie die Kontrollkurve verläuft. Das Streptomycin hat also die Wirkung der IES auf den Wasseraustausch in der Verbindung der beiden Wirkstoffe aufgehoben.

FIGUR 9

Einfluß einer 5 h. Vorbehandlung mit  $10^{-3}$  mol IES und mit der Kombination  $10^{-3}$  molare IES/Streptomycin (200 γ/ccm) auf den Wasseraustausch von Kartoffelparenchymzylindern in einer Glucosekonzentrationsreihe  
(s. Tab. 11)

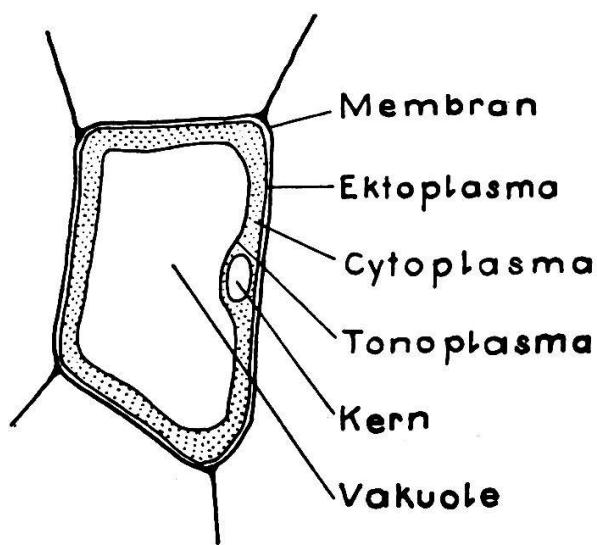
Abszisse: Steigende Glucosekonzentrationen  
Ordinate: Gewichtsunterschied pro Stück in mg nach 18 h.



**2. Wirkung von Indolessigsäure und Streptomycin allein  
und in Kombination auf den Anthozyanaustritt aus Zellen der roten Rübe  
(*Beta vulgaris*)**

Die Wasseraustauschversuche an Rüben- und Kartoffelgewebe des vorliegenden Abschnittes hatten indirekt gezeigt, daß Streptomycin und IES das Durchlässigkeitvermögen der Plasmagrenzschichten verändern können. Wir versuchten im Folgenden mit einem anderen Objekt den Einfluß der Wirkstoffe direkt sichtbar zu machen. Die Zellen der roten Rübe (*Beta vulgaris*, Rande) enthalten den roten Farbstoff Anthozyan. Wenn lebende Gewebeproben dieser Pflanze in dest. Wasser gebracht werden, tritt kein Anthozyan in das Milieu aus, der Farbstoff wird durch das Tonoplasma in der Vakuole zurückgehalten. Tonoplasma und Ektoplasma sind lebende Grenzschichten, welche nur für Wasser voll permeabel, für gelöste Stoffe aber nur begrenzt durchlässig sind. Diese Erscheinung wird als Semipermeabilität bezeichnet. Im Gegensatz dazu sind das lebende Cytoplasma zwischen den Grenzschichten und die tote Zellmembran voll- oder holopermeabel für gelöste Stoffe.

FIGUR 10  
Bau einer pflanzlichen Zelle (schematisch)



Bringt man Gewebe der roten Rübe in eine Chloroformlösung, werden die Plasmagrenzschichten strukturell verändert, die Semipermeabilität wird in Holopermeabilität umgewandelt und das Anthozyan tritt aus der Vakuole in das Milieu aus, wobei letzteres rot gefärbt wird (BRAUNER 1932). Wir gingen bei unseren Experimenten von der Vermutung aus, daß das Streptomycin, von bestimmten Konzentrationen an, ebenfalls Anthozyanaustritt aus Randengewebe erzeugen könnte. Damit wäre der Nachweis erbracht, daß die beobachtete Permeabilitätserhöhung durch das Antibioticum nicht nur auf einer Verbesserung der Dehnbarkeit der Membran, sondern auch auf einer direkten Beeinflussung der Plasmagrenzschichten beruht. Auch die Wirkung einer Kombination von IES und Streptomycin sollte im sogenannten «Randentest» untersucht werden.

#### Versuchsanordnung:

Aus einer frischen roten Rübe (*Beta vulg.*, Rande) haben wir Gewebezylinder von 1 cm Ø und 0,5 cm Höhe ausgestanzt. Damit alle Proben eines Versuchs gleichen Anthozyangehalt aufweisen, müssen sie aus derselben Rübe stammen und im gleichen Abstand von der Mitte aus geschnitten werden. Die Zylinder wurden dann während 1 h. im fließenden Wasser gespült, um den Farbstoff der angeschnittenen Zellen zu entfernen. Darauf brachten wir je 10 Stück pro Serie in Reagenzgläser mit 2 ccm Lösung und ließen sie 24 h. bei Zimmertemperatur stehen. Nach dieser Zeit haben wir die Lösung in bezug auf die ausgetretene Farbstoffmenge gegen einen Standard im Hellige-Kolorimeter getestet. Da sich Anthozyan nach einigen Tagen am Licht zersetzt und verfärbt, konnten wir es nicht als Standard im Kolorimeter verwenden. Als Ersatz wurde eine lichtbeständige Mischung von Säurefuchsin, Neutralrot und Kongo-rot in anthozyanähnlicher Farbe hergestellt. Die Messung im Hellige-Kolorimeter erfolgte durch Vergleich des Farbwertes der Testlösung mit dem Standard, der in einem Keil neben der Testlösung, unter Veränderung seines Farbwertes, vertikal verschoben werden kann. Eine Skala am Kolorimeter gibt die Schichtdicke des Keils für die betreffende Einstellung in mm an.

Wir bereiteten die Streptomycinlösungen, deren Einfluß im «Randentest» untersucht werden sollte, in Konzentrationen von 0,6—20 mg/ccm dest. Wasser vor. IES stand in Verdünnungen von  $10^{-3}$ — $10^{-11}$  mol zur Verfügung.

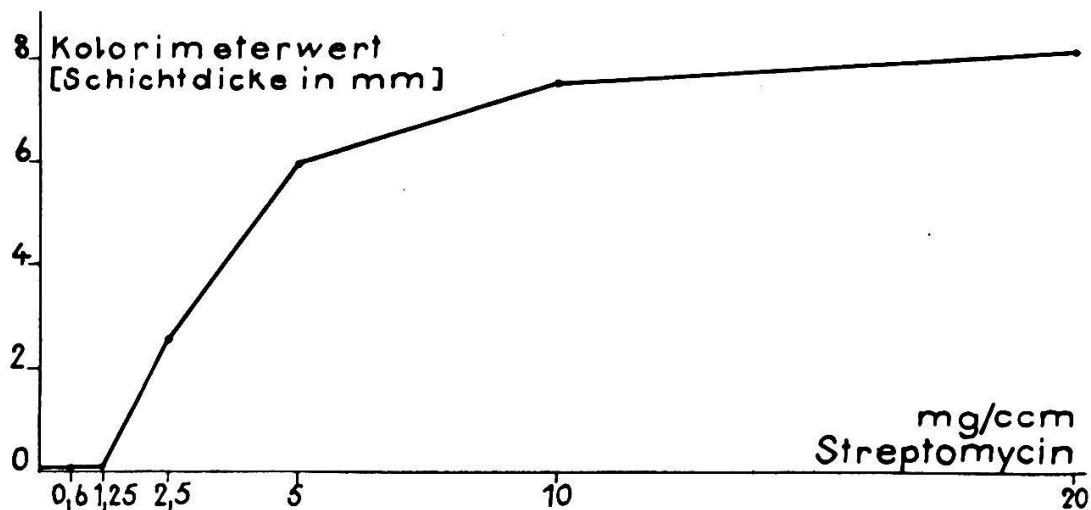
**Ergebnisse:****TABELLE 12**

**Wirkung des Streptomycins nach 24 h. auf den Anthozyanaustritt aus Gewebezylindern der roten Rübe**  
**(Kolorimeterwert = Schicht des Keils in mm)**

Randengewebezylinder Serie: 10 Stück	Kolorimeterwerte nach 24 h. (Schichtdicke des Keils in mm)
<b>Streptomycinkonzentration</b>	
0 (H <sub>2</sub> O dest.)	0
0,62 mg/ccm H <sub>2</sub> O dest.	0
1,25 mg/ccm H <sub>2</sub> O dest.	0
2,5 mg/ccm H <sub>2</sub> O dest.	2,6
5 mg/ccm H <sub>2</sub> O dest.	6,0
10 mg/ccm H <sub>2</sub> O dest.	6,5
20 mg/ccm H <sub>2</sub> O dest.	8,2

**FIGUR 11**  
**Anthozyanaustritt aus Gewebezylindern der roten Rübe**  
**unter Streptomycineinfluß nach 24 h.**  
(s. Tab. 12)

Abszisse: Steigende Streptomycinkonzentrationen  
Ordinate: Kolorimeterwerte (Schichtdicke des Keils in mm)



Eine erste sichtbare Rotfärbung des Milieus entstand bei den Proben, welche 24 h. in einer Verdünnung von 2,5 mg (=  $2,8 \times 10^{-3}$  mol) Streptomycin/ccm dest. Wasser verbracht hatten. Mit steigender Antibiotikumkonzentration nahm auch die Menge des ausgetretenen Anthozyans

zu und erreichte ein Maximum mit 20 mg Streptomycin/ccm dest. Wasser ( $= 2,2 \times 10^{-2}$  mol). In Konzentrationen von  $2,8 \times 10^{-3}$  mol an (Schwellenwert) vermag demnach das Antibioticum das Durchlässigkeitvermögen der Plasmagrenzschichten zu verändern, wie aus den obigen Ergebnissen hervorgeht. Der Farbstoffaustritt beruht hier nicht auf einer letalen Schädigung der Plasmastruktur, dies geht schon daraus hervor, daß die Färbung des Milieus bei unterschiedlichen Antibiotikumkonzentrationen verschiedene Grade aufweist und sehr langsam vor sich geht. Eine letale Schädigung z. B. durch Chloroformeinwirkung führt innerhalb kürzester Zeit zum Austritt des gesamten Anthozyanvorrates aus der Vakuole. Überdies konnten wir anhand der Plasmolysefähigkeit nach den Versuchen feststellen, daß sich die Zellen in lebendem Zustand befanden.

TABELLE 13

**Wirkung der IES und der Kombination IES/Streptomycin nach 24 h.  
auf den Anthozyanaustritt  
aus Gewebezylindern der roten Rübe**  
(Kolorimeterwert = Schichtdicke des Keils in mm)

Randengewebezylinder Serie: 10 Stück		Kolorimeterwerte nach 24 h. (Schichtdicke des Keils in mm)	
IES-Konz.	pH	ohne Streptomycin	mit Streptomycin (10 mg/ccm, $1,1 \times 10^{-2}$ mol)
0 ( $H_2O$ dest.)	7,15	0	13
$10^{-11}$ mol	7,05	0	12,5
$10^{-9}$ mol	6,75	0	11,5
$10^{-7}$ mol	6,50	0	10,2
$10^{-5}$ mol	5,15	0	
$10^{-3}$ mol	3,2	2,3	

Der Farbstoffaustritt in  $10^{-3}$  molarer IES ist bedingt durch das niedrige pH 3,2 dieser Konzentration. Säurelösungen unter pH 3 erzeugten allgemein eine Veränderung der Plasmabeschaaffenheit, welche zum Anthozyanaustritt führte. Die IES-Konzentrationen von  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$  und  $10^{-11}$  mol besitzen pH-Werte über 6 und verursachen allein keinen Anthozyanaustritt. Mit IES konnten wir an Kartoffelgewebe eine starke Hemmung des Wasseraustausches und die Aufhebung dieser Hemmung in Kombination mit Streptomycin beobachten. Eine Verdichtung der

Plasmagrenzschichten unter dem Einfluß der IES kommt im Randentest naturgemäß nicht zum Ausdruck, die Milieus bleiben farblos. Hingegen erzeugte Streptomycin (10 mg/ccm) allein angewendet wiederum starken Anthozyanaustritt (13 mm). Die Verbindung Streptomycin (10 mg/ccm) mit IES ( $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  mol) führte ebenfalls zum Farbstoffaustritt, und zwar in abnehmendem Maße mit steigender IES-Konzentration. Die Ergebnisse des Kombinationsversuches lassen vermuten, daß Streptomycin die Plasmagrenzschichten im Sinne einer Permeabilitätserhöhung verändert, während IES in steigender Konzentration zunehmend das Gegenteil bewirkt.

### *3. Streptomycinwirkung auf die Deplasmolysegeschwindigkeit von Zellen der roten Rübe in Harnstoff*

Wenn pflanzliche Zellen in 4 molare (24 %ige) Harnstofflösung gebracht werden, so tritt in ihnen durch Wasserverlust nach dem hyper tonischen Außenmilieu sofort vollständige Plasmolyse ein. Dabei hebt sich der Protoplast von der Zellwand ab und folgt der Verkleinerung der Vakuole. Nach einer gewissen Zeit kommt es zur Endosmose der kleinen Harnstoffmoleküle (Mol. Gew. 60). Dies ist zudem ein Beweis für die nicht absolute Semipermeabilität der Plasmagrenzschichten. Durch das Eindringen des Harnstoffes wird die Innenkonzentration der Zellen wieder erhöht. Darauf folgt eine Wiederaufnahme von Wasser, welche zur Deplasmolyse führt, in deren Endpunkt der kontrahierte Protoplast wieder in seinen Normalzustand zurückkehrt. Wir gingen bei unseren Experimenten von der Überlegung aus, daß man eine Veränderung der Durchlässigkeit der Plasmagrenzschichten durch Streptomycin auch an einer Beeinflussung der Deplasmolysegeschwindigkeit in Harnstoff erkennen könnte.

#### **Versuchsanordnung:**

Gewebezylinder von 1 cm Ø und 0,5 cm Höhe aus roten Rüben aus gestanzt, wurden je zur Hälfte in dest. Wasser und in einer Streptomycinlösung (10 mg/ccm) während 24 h. vorbehandelt. Dann stellten wir aus dem Innern der Proben dünne Schnitte her, und brachten sie auf einem Objektträger unter das Mikroskop, wo sie sogleich mit einem Tropfen 4 molarer Harnstofflösung und einem Deckglas bedeckt wurden. Wir hielten die Zeiten fest, welche vom Auf tropfen bis zur vollständigen

Plasmolyse und dann bis zur Deplasmolyse von 90—100 % aller Zellen des Blickfeldes vergingen. Die Mittelwerte stellen Durchschnitte von über 100 Zeitmessungen dar. Von den entscheidenden Phasen des Versuchs haben wir mit dem Busch-Citophot Mikroaufnahmen gemacht.

### Ergebnisse:

TABELLE 14

**Wirkung der Streptomycinvorbehandlung (24 h.) auf die Deplasmolysegeschwindigkeit von Zellen der roten Rübe in Harnstofflösung (4 mol.)**  
(Deplasmolysezeit in Minuten)

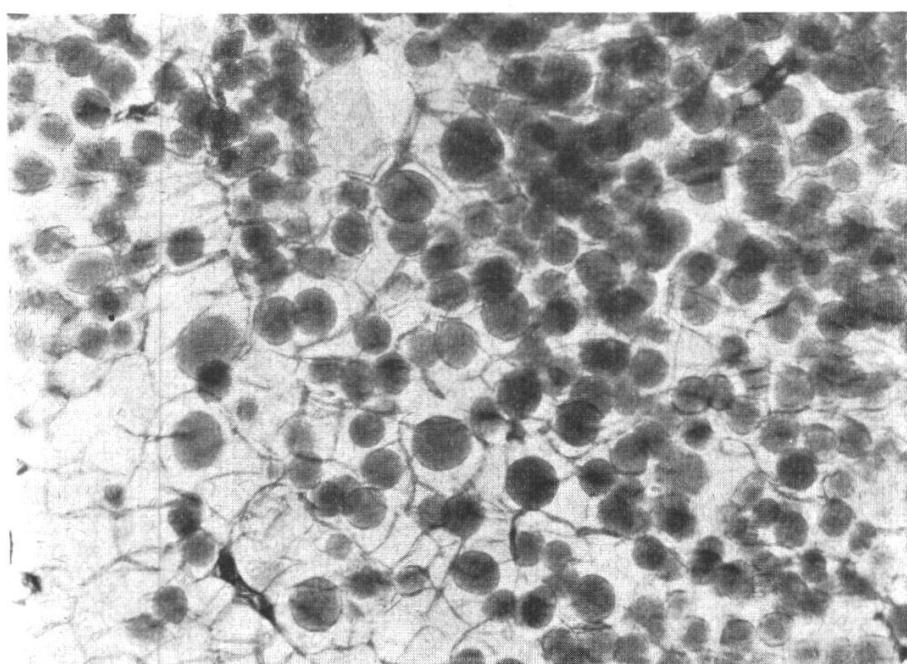
Randengewebezellen Serien gleicher Versuchsanordnung	Deplasmolysezeit in Minuten	
	Kontrollen in H <sub>2</sub> O dest. vorbehandelt	in Streptomycin (10 mg/ccm) vorbehandelt
1	31'	10'
2	34'	12'
3	28'	8'
4	21'	8'
5	28'	10'
Mittelwert aller Serien	28,4'	9,6'

Die mikroskopische Beobachtung ergab, daß nach 1 Minute die Zellen von streptomycin- und wasservorbehandelten Proben in 4 molarer Harnstofflösung alle kugelig konvex plasmoliert waren. Ein Unterschied zeigte sich erst in der Deplasmolysezeit. Während die Zellen streptomycinvorbehandelter Gewebe durchschnittlich nach 10 Minuten zu 90—100 % deplasmoliert erschienen, brauchten die Zellen wasser-vorbehandelter Gewebe etwa 30 Minuten, um diesen Zustand zu erreichen. Unter der Wirkung des Streptomycins ist die Durchlässigkeit der Plasmagrenzschichten für die Harnstoffmoleküle derart verbessert worden, daß die Wiederaufnahme des Wassers in den mit dem Antibioticum vorbehandelten Zellen 3mal schneller als in Normalzellen vor sich gehen konnte.

Die folgenden Mikroaufnahmen dokumentieren die Vorgänge, welche sich während dem Versuch abgespielt haben:

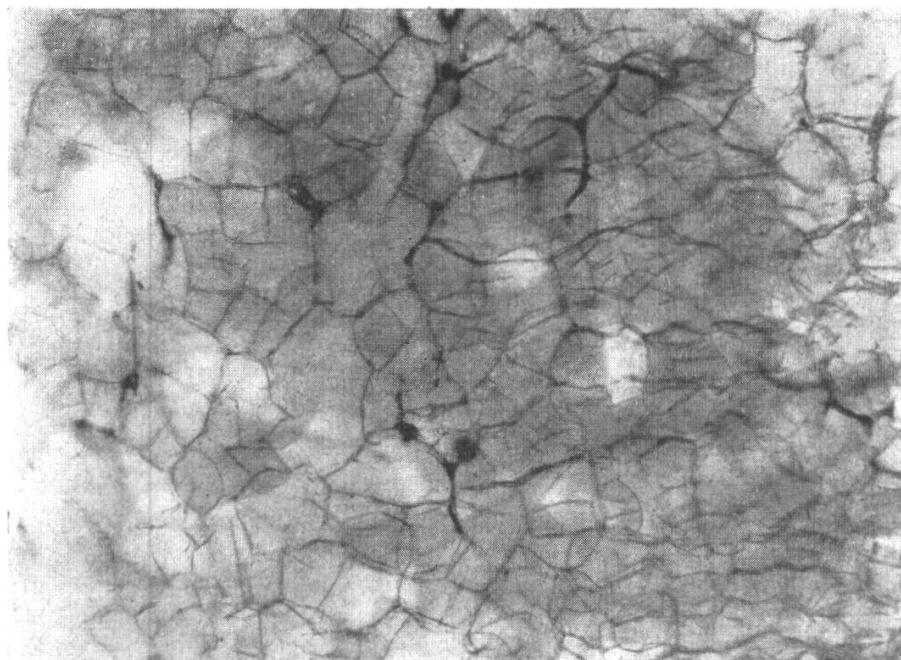
Figur 12: zeigt Zellen aus dem Gewebe der roten Rübe, welches während 24 h. in Streptomycin vorbehandelt wurde und im Moment der Aufnahme 1 Minute in 4 molarem Harnstoff zugebracht hat. Alle Zellen sind hier plasmoliert.

FIGUR 12



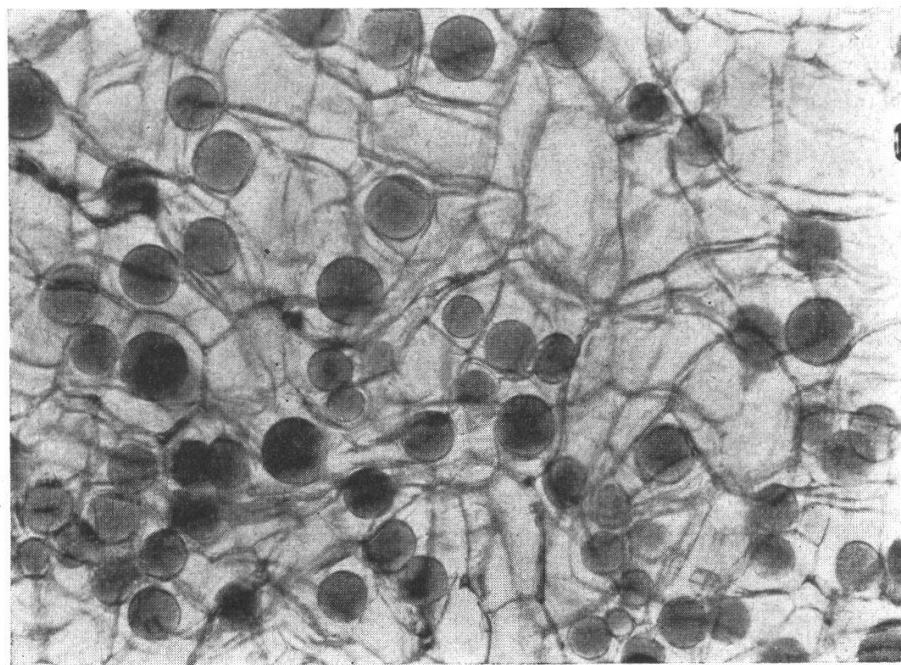
Figur 13 : Zeigt das Gesichtsfeld von Figur 12 nach 8 Minuten. Alle Zellen des streptomycinvorbehandelten Gewebes sind bereits deplasmolyisiert.

FIGUR 13



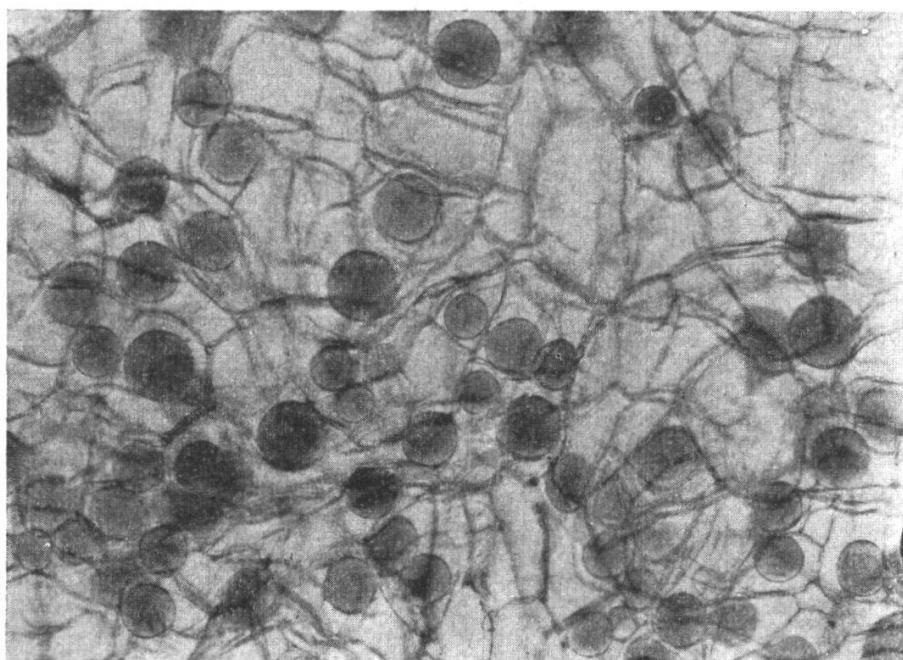
Figur 14: Alle Zellen des Gewebes, welches während 24 h. in dest. Wasser vorbehandelt wurde, weisen nach 1 Minute in 4 molarem Harnstoff, gleich wie die streptomycinvorbehandelten im gleichen Zeitpunkt, vollständige Plasmolyse auf.

FIGUR 14



**Figur 15:** Nach 8 Minuten sind aber beim wasservorbehandelten Gewebe noch keine Zellen deplasmolysiert. Die Deplasmolyse beginnt bei wenigen Zellen, wie wir durch vergleichende Messungen an Figur 14 festgestellt haben.

FIGUR 15



**Figur 16:** Erst nach 24 Minuten ist bei wasservorbehandeltem Gewebe vollständige Deplasmolyse eingetreten.

FIGUR 16

