

# Über die Zinkaufnahme von *Zea Mays* L. und *Aspergillus niger* v. Tiegh. in Einzelkultur und in Mischkultur

Autor(en): **Vöchting, Aja**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **63 (1953)**

PDF erstellt am: **25.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-44359>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Über die Zinkaufnahme von *Zea Mays* L. und *Aspergillus niger* v. Tiegh. in Einzelkultur und in Mischkultur

Von Aja Vöchting

(Aus der Botanischen Anstalt der Universität Basel)

Eingegangen am 21. September 1952

Inhaltsverzeichnis	Seite
Einleitung . . . . .	104
Methodischer Teil und Vorversuche . . . . .	104
1. Prinzip der Methode . . . . .	104
2. Vorbereitung der Versuche . . . . .	105
3. Aufarbeitung der Versuche . . . . .	107
4. Über eine geeignete Nährlösung . . . . .	109
5. Aufzucht und Kultur von <i>Zea Mays</i> L. . . . .	113
6. Über die Entwicklung der Maispflanzen und die Veränderung ihres Trockengewichtes unter den gewählten Bedingungen . . . . .	114
7. Kultur von <i>Aspergillus niger</i> v. Tiegh. . . . .	116
Hauptversuche . . . . .	117
I. Gehalt von <i>Zea Mays</i> an autochthonem Zink . . . . .	117
1. Zinkgehalt unbehandelter Körner . . . . .	117
2. Zinkgehalt der einzelnen Organe . . . . .	118
3. Histochemischer Nachweis des Zinks . . . . .	118
II. Zinkaufnahme von <i>Zea Mays</i> . . . . .	119
1. Zinkaufnahme der Maiskörner während der Quellung . . . . .	119
2. Zinkaufnahme während des Wachstums . . . . .	122
a) Aufnahme aus Nährlösungen mit 1 mg bzw. 2 mg Zn/l . . . . .	122
b) Aufnahme aus Nährlösungen mit 1 mg, 5 mg, 10 mg Zn/l . . . . .	125
c) Über einen Zusammenhang zwischen Zinkaufnahme und Entwicklung der Wurzeln . . . . .	128
d) Zinkaufnahme unter veränderten Bedingungen . . . . .	131
3. Verschiebung von Zink innerhalb der Organe während des Wachstums . . . . .	133
III. Zinkaufnahme von <i>Aspergillus niger</i> . . . . .	135
1. In Deckenkulturen . . . . .	136
2. In Schüttelkulturen . . . . .	139
IV. Zinkaufnahme von <i>Zea Mays</i> und <i>Aspergillus niger</i> in Mischkultur . . . . .	143
1. Vorversuche über günstige Bedingungen für das Wachstum beider Partner in Mischkultur . . . . .	143
2. Versuche über die Zinkaufnahme in Mischkultur . . . . .	149
3. Betrachtungen zu den Versuchen . . . . .	153
Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse . . . . .	155
Literaturverzeichnis . . . . .	158



## Einleitung

Schon länger ist es bekannt, daß außer den zehn Elementen von S a c h s noch andere anorganische Nährstoffe, die Mikro- oder Spurenelemente, zum normalen Wachstum der Pflanzen notwendig sind. Nach den ersten bahnbrechenden Untersuchungen von B e r t r a n d, J a v i l l i e r, M a z é und B r e n c h l e y zwischen 1905 und 1915, folgten in den nächsten Jahrzehnten unzählige Arbeiten, die die Notwendigkeit verschiedener Elemente für diesen oder jenen Organismus bewiesen, ihre Wirkungsweise in physiologischen Prozessen und ihre Anwendungsmöglichkeiten in der Landwirtschaft behandelten (s. M a z é, 1936; P i r s c h l e, 1939; S c h a r r e r, 1943; S t i l e s, 1946; P e r l m a n, 1949; H e w i t t, 1951). Obgleich nun schon so vieles bekannt ist über die Mengen an Spurenelementen, die Nährlösungen oder Böden zugesetzt werden sollen, so ist doch die Frage, wieviel davon durch die Organismen *aufgenommen*, also ganz oder teilweise gebraucht und verwertet wird, noch sehr wenig untersucht. Es war daher das Ziel meiner Arbeit, in dieser Richtung einen weiteren Vorstoß zu unternehmen; als Beispiel wählte ich die Zinkaufnahme zweier wachsender, zinkbedürftiger Organismen, *Zea Mays L.* und *Aspergillus niger v. Tiegh.* Für *Mais* wurde die Notwendigkeit von Zink seinerzeit von M a z é (1915) beschrieben, während *Aspergillus* bekanntlich eines der meist angewendeten Objekte für Studien über Spurenelemente ist.

Da man bereits Fälle einer *Konkurrenz* zwischen höheren und niederen Pflanzen kennt, in der Spurenelemente eine Rolle spielen, versuchte ich, ein solches Verhältnis, wie es im Wurzelhorizont des Bodens und in der Rhizosphäre häufig vorkommt, im Experiment nachzubilden. So wurden *Mais* und *Aspergillus niger* auch in einer *Mischkultur* gezüchtet und ihre Zinkaufnahme ebenfalls unter diesen Bedingungen untersucht.

## Methodischer Teil und Vorversuche

### 1. Prinzip der Methode

*Zea Mays* und *Aspergillus niger* wurden jeweils *einzel*n und in *Mischkultur*, stets aseptisch, auf einer Nährlösung von bekanntem Zinkgehalt wachsen gelassen. Am Ende der Versuche wurde der Zinkgehalt der Organismen bestimmt und daraus auf ihre Zinkaufnahme geschlossen. Handelte es sich um Mischkulturen, so wurden die beiden Partner zuerst in einem gegebenen Moment in der gleichen Nährlösung vereinigt und dann zur Aufarbeitung voneinander getrennt; die Bestimmung des restlichen Zinkgehaltes der Nährlösung und des Zinkgehaltes der Organismen erlaubte die Aufstellung einer Bilanz.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit gliedern sich daher in drei Teile:

1. Einzelkultur von *Zea Mays*
2. Einzelkultur von *Aspergillus niger*
3. Mischkultur von beiden

## 2. Vorbereitung der Versuche

Das Anstellen von Versuchen mit Spurenelementen, speziell mit Zink, verlangt besondere Vorsichtsmaßnahmen. Da Zink in den meisten Salzen als Verunreinigung vorkommt, ferner in manchen Gläsern, im Leitungswasser und im Laboratoriumsstaub, beschränkte ich mich auf solche Glaswaren und Chemikalien, die Zink nur in Spuren enthielten, oder ich unterzog sie zunächst einer gründlichen Reinigung. Daß außerdem die menschlichen Haare, Fingernägel und die Haut ziemlich reich an Zink sind, erwähnt *Nickerson* (1947).

### Glas

Jenaglas, auch Geräteglas 20, gibt wegen seines hohen Zinkgehaltes an jegliche Flüssigkeit Zink ab. Pyrexglas dagegen ist arm an Zink und wird von sauren und neutralen Lösungen sowie von Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff kaum angegriffen; nur Alkalien lösen etwas Zink heraus. Immerhin nimmt der Vorgang der Zinkabgabe einige Zeit in Anspruch, so daß Flüssigkeiten, die nur kurz mit einem Gerät in Berührung kommen, kein Zink daraus aufnehmen. Daher können Maßkolben und Pipetten aus irgendwelchem Glas unbedenklich gebraucht werden. Für die Kultur- und Kjeldahlkolben, Vorratsflaschen und Schütteltrichter genügte in meinen Versuchen Pyrexglas; von der Verwendung von Quarzkolben mußte des hohen Preises wegen abgesehen werden.

Zur Reinigung des Glases empfehlen *Cowling* und *Miller* (1941) chromhaltige Putzsäure, machen aber darauf aufmerksam, daß der am Glas haftende Chromfilm die Bestimmung des Zinks beeinflusst und die Gefäße daher ausgedampft werden müssen.

Die zur Veraschung und Zinkanalyse verwendeten Kolben wurden, mit kalter Chromschwefelsäure gefüllt, über Nacht stehen gelassen und dann auf eigens dafür eingerichteten Kolben während 10 bis 15 Minuten ausgedampft. Einzig die Schütteltrichter mußten mit nitrathaltiger Schwefelsäure behandelt werden, worauf sich das Ausdampfen, das den Schliffansätzen nicht bekömmlich war, erübrigte.

Bei der Vorbereitung aller Versuche, in denen der Nährlösung mindestens 1 mg Zink/Liter zugesetzt wurde, ging ich so vor, daß ich die Kulturkolben während 15 Minuten mit heißer Chrom-Putzsäure versah, darauf ausspülte und 15 Minuten lang ausdampfte. Schädigungen an Pflanzen, die einem Überrest von Chrom hätten zugeschrieben werden können (*Burlet*, 1940; *Würgler*, 1942), habe ich nie beobachtet, ebensowenig Veränderungen der Dithizonreaktion.



Handelte es sich um Versuche unter möglichst vollständigem Zinkausschluß, so war eine weitere Reinigung zur Entfernung des Zinks geboten<sup>1</sup>. Zu einer einprozentigen Lösung von Tween 80 wurde in Chloroform gelöstes Dithizon (0,04 g in 100 cm<sup>3</sup>) zugesetzt und bis zur Bildung einer grünlichen Emulsion geschüttelt. Damit wurden die Kolben zu zirka  $\frac{1}{4}$  gefüllt. Da Zinkdithizonat rot ist, zeigte die Farbe nach dem Umschütteln an, ob Zink gebunden war. Dithizon mußte so lange nachgegeben werden, bis sich die grüne Farbe erhielt. Dies war meist nach einigen Tagen der Fall. Dann spülte man die Kolben mit zinkfreiem Wasser. Allenfalls zurückbleibende Spuren von Dithizon oder Tween 80 schaden den Organismen nach Erfahrung von Rieck<sup>1</sup> nicht.

### *Chemikalien*

Die zur Veraschung und Zinkbestimmung notwendigen Substanzen wurden nach Angaben von Piper (1947) gereinigt, Säuren und Lösungsmittel durch Destillation in einer Pyrexglasapparatur, wässrige Lösungen durch Ausschütteln mit Dithizon.

Die für die Nährlösung gebrauchten Substanzen waren durchwegs von der Qualität «purissimum» oder «pro analysi». Für alle Versuche, in denen der Nährlösung mindestens 1 mg Zink/Liter zugesetzt wurde, genügte dieser Reinheitsgrad vollkommen. Wurde dagegen Wert auf «völlige» Entfernung des Zinks gelegt, so mußte die Nährlösung gereinigt werden. Die Verfahren der Adsorption von Schwermetallen an Tier- oder Medizinalkohle (Roberg, 1931; Bortels, 1927; Gollmick, 1936) wurden nicht angewendet, weil die Qualität der Kohle und damit ihr Bindungsvermögen ändert, und zudem, weil sie auch andere Ionen, wie Phosphor und Kalium, sowie Glukose adsorbiert (Roberg, 1931).

Diese Einwände können weniger gegen die Entfernung der Schwermetalle mit Calciumcarbonat (Steinberg, 1936) und Calciumphosphat (Sakamura, 1936) erhoben werden. Während diese Methoden jedoch auf eine möglichst gleichmäßige Entfernung *aller* Spurenelemente abzielen, war es in meinem Fall nur erwünscht, sämtliches Zink auszuschließen. Anhand eines Vorschlags von Piper (1947) wurde ein Verfahren<sup>1</sup> ausgearbeitet, nach dem die Nährlösung bei pH 8,3 mit Dithizon in Chloroform (Konzentration wie oben) geschüttelt wird, bis die Farbe erkennen läßt, daß Zink vollständig extrahiert ist. Dann wird die Nährlösung mit reinem Chloroform nachgewaschen; zurückbleibendes Chloroform entweicht bei der Sterilisation. Stout und Arnon (1939) verwendeten, nach Reinigung der Nährlösung mit Cal-

<sup>1</sup> Frau dipl. agr. Margot Rieck danke ich herzlich, daß sie mir diese und die folgende, von ihr im Bot. Institut Basel ausgearbeitete Methode nebst den damit gemachten Erfahrungen zur Verfügung gestellt hat.

ciumcarbonat, Dithizon in Chloroform zur Kontrolle auf völlige Entfernung der Schwermetalle.

#### *Wasser*

Anfänglich wurde in einer Duranglasapparatur destilliertes, später nur noch nach dem Ionenaustauschverfahren (Einbett-Entsalzung) gereinigtes Leitungswasser verwendet. In beiden Wasserarten konnte kein Zink nachgewiesen werden, sie enthielten also höchstens  $20 \gamma \text{ Zn/l}$ .

### 3. Aufarbeitung der Versuche

Die *Mais*pflanzen wurden aus der Nährlösung herausgehoben, abtropfen gelassen und in Wäggläschen getrocknet. Die Mycelien von *Aspergillus* wurden lebend entweder von den *Mais*wurzeln getrennt und auf entfettete, aschearme, gewogene Rundfilter gebracht oder aus Einzelkultur auf diese abgenutscht.

Erst nachdem auch die Wasserstoffionenkonzentration und der restliche Zuckergehalt bestimmt worden waren, wurde die Nährlösung absterilisiert. Damit konnte ein Zinkverlust der Pflanzen und Veränderungen des Milieus durch Kochen vermieden werden.

P i p e r gibt (1947) einmaliges *Trocknen* «über Nacht» bei  $105^{\circ} \text{C}$  an. Ich trocknete stets bis zur Gewichtskonstanz, also mindestens zweimal. Für *Mais* war ein erstes fünf- bis mehrstündiges Trocknen günstig, da das Endosperm nur langsam Wasser abgibt. Die Filterpapiere, auf denen *Aspergillus* getrocknet wurde, verloren rund 5 % ihres Gewichts.

Die nasse *Mikroveraschung* nach P i p e r (1947) wurde einer Trockenveraschung vorgezogen, da sie schneller abläuft und die Asche zum Schluß in einer Form vorliegt, die ein unverzügliches Weiterarbeiten erlaubt. Auf 1 g Trockengewicht wurden  $10 \text{ cm}^3$  konzentrierte Salpetersäure,  $2 \text{ cm}^3$  Natriumperchlorat (55prozentig) und  $1 \text{ cm}^3$  konzentrierte Schwefelsäure benötigt. Bei geringerem Trockengewicht mußte der Ansatz entsprechend abgestuft werden.

#### *Zinkbestimmung*

Gewählt wurde die photometrische Methode (two-colour-method) von C o w l i n g und M i l l e r (1941), wie sie bei P i p e r (1947) beschrieben ist. Der Auszug des Zinks aus der in Schwefelsäure gelösten Asche erfolgt mittels Dithizon bei  $\text{pH } 9,8$ . Die Wasserstoffionenkonzentration wurde gelegentlich mit einem elektrischen  $\text{pH}$ -Meter oder durch Zugabe von Thymolphthalein geprüft. Nach dem Ausscheiden anderer Metalle bleibt das Zink als rotes Dithizonat in Tetrachlorkohlenstoff übrig und kann kolorimetrisch bestimmt werden. Über die Fehler der Dithizonmethode im allgemeinen orientiert S a n d e l l (1944). Zur ersten Extraktion des Zinks aus der Asche mußte stets dieselbe Menge



Dithizon und Puffer verwendet werden, gleichgültig, wie groß die Trockenmasse gewesen war.

Einige Änderungen an der von Piper (1947) angegebenen Methode schienen mir zweckmäßig. Die Dauer, die das Ausschütteln des Zinks von einer Phase in die andere in Anspruch nimmt, hängt vom Verhältnis zwischen dem Volumen des Gefäßes und dem der darin enthaltenen Flüssigkeit ab. Die von Piper bezeichneten Zeiten waren zum Teil für meine Analysen zu kurz.

Das Natriumdiäthylthiocarbamat, das einen Teil der Schwermetalle bindet, löste sich schlecht in reinem Wasser, dagegen gut, wenn etwa 10% Aethylalkohol zugesetzt wurden; dieser konnte durch Erhitzen wieder vertrieben werden. Die Endlösung verdünnte ich nur viermal.

Zur kolorimetrischen Messung wurde ein Pulfrich-Stufenphotometer benützt und das Zinkdithizonat bei einem Filterschwerpunkt von 5300 ÅE, was dem Filter S 53 entspricht, gemessen. Cowling und Miller (1941) schreiben 5350 ÅE vor, doch verläuft die Absorptionskurve des Zinkdithizonats in Tetrachlorkohlenstoff zwischen 5300 und 5350 ÅE so flach, daß durch die 50 ÅE Unterschied keine wesentliche Verschlechterung entstehen kann.

Zur Deutung der gemessenen Werte wurde zuerst eine Eichkurve aufgestellt. Diese nützt zwischen 0 und 40  $\gamma$  bei einer Schichtdicke von 1 cm den günstigen Photometerbereich voll aus. Zur Festlegung der Kurve wurden eine Anzahl Punkte gemessen. Die mittleren Fehler ihrer Mittelwerte betragen zirka 1 bis 2% =  $\ll 1 \gamma$ , die mittleren Fehler der Einzelwerte 2  $\gamma$ . Von 40  $\gamma$  an konnte nur noch mit halber Schichtdicke gemessen werden. In diesem Bereich stieg die Eichkurve steil an, was der zunehmenden Bindung des Dithizons an Zink zuzuschreiben ist. Der mittlere Fehler der Mittelwerte belief sich hier auf zirka 1% = 0,5 bis 1  $\gamma$ , der mittlere Fehler der Einzelwerte dagegen auf 5  $\gamma$  zwischen 40 und 50  $\gamma$ , auf 7  $\gamma$  zwischen 50 und 60  $\gamma$ , obwohl die Bestimmungen überall mit derselben Genauigkeit durchgeführt wurden. Dieser Bereich wurde tunlichst vermieden. War ein Zinkgehalt von 50  $\gamma$  und mehr zu erwarten, so mußten während der Analyse von der HCl-Stufe an die Zugaben der Reagenzien verdoppelt werden.

Den aus drei Einzelbestimmungen errechneten Mittelwerten der Zinkanalysen in Pflanzen haftete ein mittlerer Fehler an von 1  $\gamma$  im Bereich von 0 bis 40  $\gamma$ , von 3  $\gamma$  zwischen 40 und 50  $\gamma$  und von 4  $\gamma$  zwischen 50 und 60  $\gamma$ . In den meist angegebenen Streuungen sind diese Fehler auch enthalten, sie konnten rechnerisch nicht davon getrennt werden und sind daher nur in besonderen Fällen neben den Streuungen angegeben.

Ein Nullwert der Zinkbestimmung wurde nur dann bestimmt, wenn zugleich der Zinkgehalt der Filter, auf denen *Aspergillus* getrocknet



worden war, ermittelt werden mußte. Der Zinkgehalt der Filter (Nullwert eingeschlossen) betrug im Mittel 1  $\gamma$ . Er wurde vernachlässigt, sobald es sich um *Aspergillus* aus Mischkulturen oder um *Mais*pflanzen handelte, deren Zinkgehalt stets mindestens 10  $\gamma$  erreichte.

#### *Aufarbeitung der Nährlösung*

Die Glukose wurde quantitativ nach G. B e r t r a n d bestimmt. Bei der Berechnung des restlichen Zuckergehaltes mußte auch die Verdunstung bzw. Wasseraufnahme der Organismen aus der Nährlösung berücksichtigt werden; sie betrug etwa  $\frac{1}{5}$  nach neun Tagen Mischkultur.

Der Glukosegehalt der Nährlösung störte die erste Extraktion in der Zinkbestimmung, die Phasen trennten sich weniger genau. Ein Veraschen der Lösung zur Vernichtung des Zuckers bewährte sich jedoch nicht.

#### 4. Über eine geeignete Nährlösung

Bei der Wahl der Nährlösung waren folgende Gesichtspunkte wichtig: Sie mußte die für *Mais* u n d *Aspergillus* notwendigen Stoffe in genügender Menge enthalten. Durch Sterilisation durfte nur ein geringer Niederschlag entstehen, der die zugegebenen Spurenelemente nicht wesentlich adsorbieren konnte. Organische Stickstoffverbindungen, deren Zusammensetzung und Bindungsvermögen für Schwermetalle eventuell wechselt, blieben ausgeschlossen.

Die ursprünglich verwendete unverdünnte K n o p s c h e Nährlösung entsprach diesen Anforderungen insofern nicht, als sie an *Mais* Entwicklungsstörungen hervorrief, die in vielen Fällen von den Pflanzen nicht überwunden werden konnten. Nach dem Durchbrechen der Koleoptile entfalteten sich die Blätter nicht, sondern blieben zusammengerollt und wurden allmählich braun und hart. Außerdem bildete sich auf Zugabe von Eisen nach der Sterilisation ein größerer Niederschlag. In noch verstärktem Maße traten die Krankheitserscheinungen beim *Mais* auf, wenn der Nährlösung Phosphatpuffer zugesetzt worden war, um in Mischkulturen die vom Pilz gebildete Säure zu neutralisieren.

Normale Entwicklung und gutes Gedeihen zeigten *Mais*pflanzen, die in Leitungswasser großgezogen wurden. Leitungswasser kam aber wegen seines undefinierten Salzgehaltes als Kulturmedium nicht in Frage.

Diese Beobachtungen führten dazu, eine möglichst salzarme Nährlösung zu suchen, die aber doch dem *Mais* ein normales Wachstum während zirka 20 Tagen gewährleistete. K n o p - Nährlösung, auf ein Drittel bis ein Zehntel verdünnt, bewährte sich. Verwendet wurde daraufhin eine Nährlösung, die ungefähr einer fünfmal verdünnten K n o p s c h e n entspricht, von folgender Zusammensetzung:

0,2 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	}	zu einem Liter gelöst
0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$		
0,05 g $\text{K}_2\text{HPO}_4$		

In dieser Kulturlösung traten beim *Mais* nur noch vereinzelt und vorübergehend Störungen auf (zirka in 5 % aller Fälle). Nach der Sterilisation bei 1 atü während 40 Minuten bildete sich nur ein ganz schwacher Niederschlag, der sich unter dem Einfluß der *Mais*wurzeln in einigen Tagen auflöste.

Diese Nährlösung wurde auch für die Mischkulturen verwendet und ferner für eine Anzahl Versuche, in denen das Verhalten von *Aspergillus niger* unter den in den Mischkulturen gewählten Bedingungen gezeigt werden sollte. In anderen Versuchen mit *Aspergillus* kam eine stärkere Nährlösung zur Anwendung, wie sie bei G o l l m i c k (1936) und M u l d e r (1940) beschrieben ist, nämlich pro Liter:

5 g $\text{KNO}_3$
2,5 g $\text{K}_2\text{HPO}_4$
1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Der Wasserstoffionengehalt der Nährlösungen bewegte sich stets zwischen pH 5,8 und 6,5. Falls nötig, wurde er mit Natronlauge oder Salzsäure in diesen in der Ausgangslösung für beide Organismen günstigen Bereich gebracht. S t e i n b e r g (1935 und 1936) stellte für *Aspergillus niger* fest, daß bei pH 8 die optimale Konzentration von Eisen, Mangan, Zink und Kupfer zwanzigmal größer ist als bei pH 7,35. Dagegen schwankt sie zwischen pH 5 und 7 nur wenig. Auch unter diesem Gesichtspunkt ist der gewählte Bereich vorteilhaft.

Die Spurenelemente *Eisen, Mangan, Zink, Kupfer* und *Molybdän* wurden aus Stammlösungen, die von «pro analysi»-Substanzen hergestellt waren, zugegeben.

Zunächst machte ich einige Versuche über die für *Mais* und *Aspergillus* günstigen Konzentrationen und über die «Notwendigkeit» der einzelnen Elemente unter den festgelegten Bedingungen.

Als Leitfaden dienten vor allem die Arbeit über die Ernährung des *Maises* von M a z é (1915) und die von S o m m e r (1928) über die Bedeutung des Zinks für das Wachstum verschiedener höherer Pflanzen, ferner G o l m i c k (1936) und M u l d e r (1940) in dem, was *Aspergillus* betraf. (Weitere Literatur siehe P i r s c h l e [1939], S c h a r r e r [1943], S t i l e s [1946], P e r l m a n [1949], H e w i t t [1951].)

Der *Eisengehalt* der Nährlösung hatte sich in bestimmten Grenzen zu halten, einmal, weil eine Gabe von 1 mg Fe/l oder weniger Chlorose der *Mais*pflanzen zur Folge hatte, und zum anderen, weil ein größerer Zusatz von Fe-III-Ionen zur Bildung eines Niederschlags in der Lösung führte.

M a z é (1915) gab 10 mg Fe/l und S o m m e r (1928) unbestimmte Mengen, je nach Bedarf, M u l d e r (1940) setzte zu der oben erwähnten Nährlösung für *Aspergillus* 10 mg Fe/l und G o l m i c k (1936) fand unter den nämlichen Bedingungen 1 und 10 mg Fe/l als geeignetste Konzentrationen.

Ich gab stets 5 mg Fe/l als  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  zu den *Mais*- und zu den *Aspergillus*kulturen. Chlorose konnte ich daraufhin nie beobachten, und das Ausflocken eines Eisenkomplexes war nur sehr gering.



Um geeignete Mengen Mangan, Kupfer, Molybdän und Bor für die Nährlösungen zu finden, wurden von jedem Element Konzentrationsreihen aufgestellt und an *Mais* und *Aspergillus* ausprobiert. Pro Konzentration wurden Trockengewicht und Entwicklung von drei Individuen untersucht; die Ergebnisse sind im folgenden etwas summarisch zusammengefaßt. Bei diesen Versuchen war mir Herr cand. phil. Heinz Schaub behilflich; es sei ihm an dieser Stelle vielmals gedankt.

Als *Mangan*zusatz in den Versuchen mit *Mais* wählte ich in der Folge 0,37 mg Mn/l, zu den Mischkulturen 3,7 mg Mn/l. Angeregt durch die bei Sommer (1928) und Mazé (1915) gefundenen Daten, 1,5 mg Mn/l für höhere Pflanzen bzw. 3,7 mg Mn/l für *Mais*, wurden 0,037, 0,37, 3,7, 37 und 370 mg Mn/l als  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  angewendet. Das Wachstum der *Mais*pflanzen war bei allen niedrigen Gaben gleichmäßig gut, nur bei den beiden höchsten etwas geringer, und es zeigten sich eine Art Dörrflecken auf den Blättern. Es läßt sich denken, daß *Mais* nicht nur auf Manganmangel, sondern auch auf Manganüberfluß mit der Bildung von Dörrflecken antwortet.

Entsprechend Mulder (1940) verabreichte ich *Aspergillus* 0,75 mg Mn/l in Einzelkultur bzw. 3,7 mg Mn/l in der Nährlösung für *Mais*, nachdem sich 0,1, 1, 10, 100, 1000 mg Mn/l in der Nährlösung für Mycel- und Sporenbildung als geeignet erwiesen hatten. Damit wurden auch die Ergebnisse Bertrands (1912) bestätigt, wonach *Aspergillus niger* über einen sehr großen Bereich von Manganzugaben gleichmäßig gut wächst.

Sommer (1928) gab 0,125 mg Kupfer pro Liter Nährlösung. Nach Versuchen mit 0,1, 0,5, 1 und 2 mg Cu/l wurde 0,1 mg Cu/l zu den Einzelkulturen von *Mais*, 1 mg Cu/l zu den Mischkulturen zugefügt.

Eine größere Reihe von Kupferkonzentrationen 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 mg/l wurde nach vorangegangener Reinigung der Gläser und der Nährlösung mit Dithizon bei pH 3 an *Aspergillus* ausprobiert. Nach der Mycelbildung, der Sporenfarbe und dem Trockengewicht zu schließen, waren 0,1, 1 und 10 mg Cu/l am günstigsten. Zu den Kulturlösungen wurde 1 mg Cu/l zugesetzt in Übereinstimmung mit Gollmick (1936), der 0,1 und 1 mg Cu/l als geeignetste Zugaben bestimmte.

*Molybdän*zusätze zu *Mais*- und *Aspergillus*kulturen (0,5 mg Mo/l für *Mais*, 0,5, 50 und 5000 mg Mo/l für *Aspergillus*) ergaben keine Förderungen gegenüber den Kontrollpflanzen, worauf auf eine Zugabe von Molybdän verzichtet wurde. Einzig die mit Dithizon speziell gereinigte Nährlösung für *Aspergillus* enthielt nach Mulders Angabe (1940) einen Zusatz von 0,5 mg Mo/l.

Da in allen Versuchen das ziemlich borreiche Pyrexglas verwendet wurde, schien es von Anfang an fraglich, ob ein Borzusatz zur Nährlösung einen Einfluß auf *Mais* haben würde. *Aspergillus* wurde hier ganz aus dem Spiel gelassen, da er nach Ansicht von Winfield (1945) und Steinberg (1945) kein Bor zu seiner normalen Entwicklung braucht.

Nachdem es sich aber auch gezeigt hatte, daß *Mais*pflanzen durch Zusatz von 1 mg Borsäure/l keine Förderung erfuhren, sah ich von der Zugabe dieses Elementes zu den Kulturen ab.

## Zink

Die Stammlösungen wurden nach Piper (1947) hergestellt, nämlich durch Lösen von analysenreinem, metallischem Zink in verdünnter Schwefelsäure.

Über den Bedarf an Zink und seine Zuträglichkeit, besonders für höhere Pflanzen, herrschten in der Literatur lange Zeit die verschiedensten Ansichten (Gračanin, 1928). Nachdem aber Zink als Bestandteil und Aktivator von Fermenten nachgewiesen worden ist (Bonner, 1950, S. 448; Brody, 1945, S. 115; Haurowitz, 1950,

S. 235; Stephenson, 1949, S. 71; Sumner-Myrbäck, 1951, S. 1257; Warburg, 1948, S. 164) und Zinkmangel-Krankheiten bei Kulturpflanzen verursacht (Chandler, 1936/37; Haas, 1936/37; Lyon, Béeson und Ellis, 1943; Stiles, 1946; Mulder, 1948; Javillier, 1948), greift doch allmählich die Überzeugung Platz, daß Zink auch im Stoffwechsel höherer Pflanzen eine wichtige Rolle spielt.

Mazé (1915) gab seinen Maispflanzen 7,6 mg Zn/l; nach Javillier (1907) waren 6 bis 40 mg Zn/l für Weizen gleichermaßen günstig; Sommer (1928) verabreichte höheren Pflanzen 0,5 mg Zn/l und Mulder (1940) 0,12 mg Zn/l in einer Nährlösung für Roggen.

Solche Divergenzen lassen sich leicht verstehen als Folge von ungleichen Versuchsbedingungen, Nährlösungen, Pflanzenrassen, -arten, -gattungen oder, nach Steinberg (1936), auch einfach durch verschiedene Anfangskonzentrationen von Wasserstoffionen in der Kulturlösung.

Erstaunlich sind die Ergebnisse von Scharrer und Schropp (1934), nach welchen Zugaben von  $10^{-8}$  und  $10^{-10}$  Milliäquivalenten Zink im Liter Förderungen des Maiswachstums erzielten. Dies ist umgerechnet 0,000 327  $\gamma$  Zn/l bzw. 0,000 003 27  $\gamma$  Zn/l; man kann sich fragen, wie nahe diese Werte bereits der sogenannten «Allgegenwartskonzentration» von Zink kommen. Da die Autoren keine spezielle Reinigung ihrer Chemikalien und Gefäße angeben<sup>1</sup>, ist anzunehmen, daß der hunderttausend- bis millionenfache Betrag der Zinkmenge, mit der sie eine Förderung erreichten, stets schon in ihren Kulturen vorhanden war.

Weniger auseinandergehend sind die Angaben über die Zinkzusätze zu Nährlösungen von *Aspergillus niger*. Gollmick (1936) fand 1 mg Zn/l am förderlichsten unter den von ihm gewählten Bedingungen, Roberg (1928) 1 und 10 mg Zn/l, und Mulder (1940) verabfolgte 4,5 mg Zn/l.

Daß 1 mg Zn/l sowohl für *Mais* als auch für *Aspergillus niger* ungefähr im günstigen Bereich liegt, scheint aus den oben erwähnten Arbeiten hervorzugehen. Es war nun ferner interessant, die Wirkung höherer Zinkkonzentrationen auf die beiden Pflanzen zu untersuchen und zu erfahren, wieviel des gebotenen Zinks jeweils aufgenommen wurde. In der Folge wurden die drei Konzentrationen 1, 5 und 10 mg Zn/l (= 1, 5 und 10  $\gamma/\text{cm}^3$  =  $1,53 \cdot 10^{-5}$ ,  $7,65 \cdot 10^{-5}$  und  $1,53 \cdot 10^{-4}$  molar Zink) ausgewählt und den Nährlösungen zugesetzt. In einigen Versuchen mit Einzelkulturen von *Aspergillus niger* wurde die Zinkaufnahme aus niedrigeren ( $\leq 1$  mg Zn/l) Konzentrationen der Nährlösung bestimmt.

<sup>1</sup> Es fehlen zudem alle statistischen Betrachtungen über den Grad der Signifikanz.



Endgültige Zusammensetzung der Nährlösungen. Alle Angaben pro Liter

	Mais-Nährlösung	Mischkultur und Aspergillus in Mais-Nährlösung	Aspergillus-Nährlösung <sup>1</sup>
KNO <sub>3</sub> . . . . .	—	—	5 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,2 g	0,2 g	—
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0,05 g	0,05 g	2,5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,05 g	0,05 g	1 g
Fe . . . . .	5 mg	5 mg	5 mg
Mn . . . . .	0,37 mg	3,7 mg	0,75 mg
Cu . . . . .	0,1 mg	1 mg	1 mg
Mo . . . . .	—	—	0,5 mg

Es ist hier noch zu bemerken, daß die als geeignet befundenen Mengen von Spurenelementen für *Aspergillus* der Nährlösung von Gollmick (1936) und Mulder (1940) zugegeben waren, und nicht der in den Mischkulturen verwendeten, rund 25mal schwächeren. Es ist daher denkbar, daß die in den Mischkulturen angewendeten Zugaben etwas zu hoch waren oder zum mindesten nicht im Gleichgewicht mit den «Makroelementen» standen. Da jedoch mit einer Konkurrenz um die Spurenelemente von seiten der Maispflanzen zu rechnen war, schienen mir die verhältnismäßig hohen Zusätze doch gerechtfertigt.

### 5. Aufzucht und Kultur von *Zea Mays* L.

Aus 2 Kilogramm *Saatmais*, Sorte *Weißer Rheintaler*, Haba 1949, wurden möglichst gleich große, normal gestaltete und gesunde Körner ausgelesen. Trotzdem schwankte das Trockengewicht der für einen Versuch gewählten Körner oft um 25 bis 30 %. Da die Versuchsdauer und die Zusammensetzung der Nährlösung so beschaffen waren, daß die Pflanzen an Trockenmasse nur ab-, aber niemals zunahmen, machten sich solche Unterschiede bis zum Ende der Kultur geltend.

Da durch Mikroben unkontrollierbare Veränderungen der Nährlösung und der Pflanzen entstehen, und durch Staub Zinkverbindungen eindringen konnten, wurden alle Versuche unter *aseptischen* Bedingungen durchgeführt. Das Sterilisieren und keimfreie Quellen geschah nach Bulet (1940). Vorversuche zeigten, daß *Mais* aus dem Quellwasser Zink aufnehmen kann, es wurde daher nur mit schwermetalldreiem Wasser und einer Pyrexglasapparatur gearbeitet.

Nach 48stündiger Quellung in durchlüftetem Wasser bei rund 20° C wurden die Körner in sterilisierte Petrischalen geschüttet und im Dunkeln bei 25° C keimen gelassen. Darauf setzte ich sie in Gefäße mit Nährlösung und ließ sie ohne Licht bei 25° C wachsen. Durch Infektionen und abnormale Keimung fielen bis zu 25 % der Pflanzen aus. Nach drei bis fünf Tagen hatten sie eine genügende Größe erreicht, um ins Gewächshaus ins Licht gebracht zu werden, wo (im Sommer 1951) eine Temperatur von 20 bis 30° C herrschte.

<sup>1</sup> Nährlösung nach Gollmick (1936) und Mulder (1940).



Zur Aufzucht der gequollenen Körner wurden zwei Verfahren benutzt:

1. eine Methode, die Professor A. V i r t a n e n , Helsinki, anwendet und von ihm selbst in Basel erläutert wurde. Die Körner werden in Reagenzgläser gesteckt, die in der Mitte verengert sind. Ein Filterpapierstreifen versorgt das Korn, das über der Verengung sitzt, mit Nährlösung ( $2 \text{ cm}^3$ ). Ist die Koleoptile so lang, daß sie an den Wattezapfen stößt, so versetzt man die Pflanze in keimfreiem Raum in einen Kolben, indem ihr oberirdischer Teil in den aus einer doppelten Watteschicht gedrehten Stopfen eingewickelt wird;
2. ein in der Mitte gequetschtes Röhrchen von 16 cm Länge und 1,4 cm innerer Weite wird durch einen Wattestopfen im Halse eines Erlenmeyerkolbens von  $250\text{--}300 \text{ cm}^3$  festgehalten. Durch ein Filterpapier wird die Nährlösung zu dem in der Quetschung steckenden Korn transportiert. Sobald die Koleoptile im Röhrchen emporgewachsen ist, entfernt man den Wattestopfen des Röhrchens und legt sterilisierte Watte so um die Pflanze herum, daß weder Staub noch Keime an die unterirdischen Organe gelangen können. Die Nährlösung ist in diesem Fall von Anfang an dieselbe. Eine ähnliche Anordnung findet sich bei J a v i l l i e r (1908) für Weizenpflanzen.

Beide Wege wurden ungefähr gleich oft beschritten. Der zweite hat gegenüber dem ersten den Nachteil, daß mehr Kolben und Nährlösung angesetzt werden müssen, als für den Versuch brauchbar sind, da stets eine Anzahl wegfällt wegen abnormaler Entwicklung der Keimlinge. Immerhin treten weniger Infektionen auf, wenn die Pflanzen nicht versetzt werden müssen, wie V i r t a n e n s Methode dies verlangt.

#### 6. Über die Entwicklung der Maispflanzen und die Veränderung ihres Trockengewichtes unter den gewählten Bedingungen

Die Veränderung des Trockengewichts wurde während 25 Tagen studiert. Da die Körner vor der Quellung nicht einzeln gewogen und markiert werden konnten, ging ich von möglichst einheitlichem Material aus. Zu diesem Zweck wurden 38 Körner, deren Gewicht zwischen 0,41 und 0,43 g lag, ausgesucht. Das durchschnittliche Gewicht betrug 0,418 g, die beiden als Grenzen gesetzten Werte waren also höchstens um 3 % davon verschieden. Nachdem der Fruchtsiel abgeflammt war (zur Sterilisation nach der Vorschrift von B u r l e t [1940]), wogen die Körner noch 0,416 g im Mittel. Darauf wurden sie quellen gelassen und dann in mit Keimröhrchen versehenen Kulturkolben, die mit je  $50 \text{ cm}^3$  Nährlösung beschickt waren, großgezogen. Alle fünf Tage, von der vollendeten Quellung an gerechnet, wurde das Trockengewicht von drei Pflanzen bestimmt, und zugleich deren Entwicklungszustand festgehal-

ten, indem die Länge des längsten Blattes und die der längsten Wurzel, beide vom Korn an, gemessen wurde. Selbstverständlich lieferten diese Längenmessungen nur Anhaltspunkte für die Ausbildung der Pflanzen, doch zeigte die Erfahrung, daß sie meistens mit der allgemeinen Entwicklung in Einklang standen.

Am dritten Tag nach der Quellung waren die Pflanzen ins Gewächshaus gestellt worden, wo sie bei mäßigem Licht (November) und rund 25° C Lufttemperatur bis zum 25. Tag verblieben. Bei Versuchsende war noch zirka 1/4 der Nährlösung in den Kolben übrig.

Zu der folgenden Tabelle 1 ist zu bemerken, daß die Streuung  $\sigma_M$  des Mittelwertes sich nach folgender Formel berechnet:

$$\sigma_M = \sqrt{\frac{\sum (X - M)^2}{n(n-1)}}$$

wobei  $X$  die Meßwerte,  $M$  den Mittelwert und  $n$  die Zahl der Messungen bezeichnet.

Unter  $p$  wird die nach dem  $t$ -Test (Fisher, 1946) berechnete Wahrscheinlichkeit verstanden; betrug  $p$  zwischen zwei miteinander verglichenen Mittelwerten weniger als 2%, so wurden diese als signifikant verschieden angesehen.

Tabelle 1  
Mais, Entwicklung und Abnahme des Trockengewichts während 25 Tagen. Übliche Nährlösung mit 1 mg Zn/l

Alter in Tagen nach der Quellung	Entwicklungszustand allgemein	Sproßlänge in cm <sup>1</sup>	Wurzellänge in cm <sup>1</sup>	Trockengewicht in g <sup>1</sup>	$p$ in %	$n$ Freiheitsgrade	Abnahme des Trockengewichts in % bez. auf	
							Frischgewicht ungequollener Körner	Trockengewicht ungequollener Körner
0	Ungequollene Körner .....	—	—	0,380 ± 0,0018	10-20	4	8,5	0
0	Gequollene Körner .....	—	—	0,377 ± 0,00057	1-2	4	9,5	1
5	Keimlinge ohne Blätter ..	7	17	0,360 ± 0,0044	≤ 1	4	13,5	5
10	3 Blätter .....	22	33,5	0,304 ± 0,0004	40-50	4	27	20
15	4 Blätter .....	30	49	0,294 ± 0,0124	10-20	4	29,5	22,5
20	4 Blätter .....	42	54	0,315 ± 0,004	5-10	5	24,5	17
25	5 Blätter .....	45 <sup>2</sup>	74 <sup>2</sup>	0,299 <sup>2</sup> ± 0,0064			28	21

<sup>1</sup> = Mittel aus drei Messungen, <sup>2</sup> = aus vier

Man sieht sogleich, daß das Trockengewicht in 25 Tagen nur *abnimmt*, nicht aber wieder ansteigt. Die Abnahme während der Quellung ist praktisch gleich Null; offenbar ist die Atmung der Körner in diesem Stadium sehr gering, so daß nur wenig Reservestoffe verbraucht werden. Auch in den ersten fünf Tagen verringert sich das Trockengewicht nur unbedeutend, obwohl der durchschnittliche Zuwachs der Hauptwurzeln 17 cm beträgt. Die Wurzeln tauchen schon etwa vom dritten Tag an in die Nährlösung ein und sind vermutlich zur Stoffaufnahme fähig, die Blätter hingegen entfalten sich erst zwischen dem fünften und zehnten Tag. In dieser Zeit des vermehrten Teilungs- und Streckungswachstums werden die Vorräte des Endosperms hauptsächlich angegriffen, was sich in dem starken Absinken des Trockengewichts geltend macht. Erst nach dem zehnten Tag scheint sich ein Gleichgewicht zwischen dem Substanzverlust des Endosperms durch Dissimilation und der Substanzvermehrung durch Stoffaufnahme und Assimilation einzustellen; das Trockengewicht bleibt von da an konstant.

Es fiel manchmal auf, wengleich es in diesem Versuch nur bei einem einzigen Individuum deutlich zum Ausdruck kam, daß geringe Wurzellänge und hohes Trockengewicht Hand in Hand gingen. Da die Organe am Anfang aus den im Endosperm gespeicherten Stoffen aufgebaut werden, ist dies nicht verwunderlich: Je schwächer Sproß und Wurzel ausgebildet sind, desto weniger Material mußte dem Korn entzogen werden. Diese Interpretation war wegweisend in späteren Versuchen, die von Körnern mit unbekanntem Frischgewicht ausgingen. Hatte eine Pflanze nach 21 Tagen Kultur ein Trockengewicht von z. B. 0,36 g, so bedeutete dies, daß sie bei normaler Entwicklung aus einem Korn von 0,5 g Frischgewicht hätte entstehen müssen. Derartig schwere Körner fanden sich aber nicht häufig unter meinem Saatgut. In einem solchen Fall durfte aus der großen Trockenmasse viel eher auf eine Störung des normalen Wachstums, z. B. durch Infektion, geschlossen werden. Darauf deutete dann meist auch eine schwach ausgebildete Wurzel. Aus diesem Grund wurde der Ausdruck «Zinkgehalt pro Gramm Trockengewicht» bei *wachsenden Maispflanzen* nie angewendet, weil es sinnlos wäre, Schlüsse daraus zu ziehen.

#### 7. Kultur von *Aspergillus niger* v. Tiegh.

Der aus den Arbeiten von Galli (1946) und Sarasin (1953) bereits bekannte Stamm A<sub>2</sub> wurde auch in diesen Versuchen benützt.

Die Stammkulturen wuchsen bei 20 bis 22° C im Dunkeln auf 1,5prozentigem Agar, dem auf 1/3 verdünnte Bierwürze zugesetzt war. Zeitweise wurde der Pilz auf Tomatenagar gezogen, um ihn zur vermehrten Sporenbildung anzuregen.

Für die Versuche wurde nur von Bierwürzeagar abgeimpft. Dabei ging ich folgendermaßen vor: Wie Gollmick (1936) klopfte ich die Sporen vom Mycel auf die freie Wand des Kulturröhrchens ab. Dann ließ ich einige Tropfen keimfreien, destillierten Wassers, das 0,1 % Tween 80 enthielt, der Wand entlang einlaufen und goß sie mit den Sporen gleich wieder zurück in das für die Suspension bestimmte Gefäß. Dies geschah unmittelbar vor dem Beimpfen der Kolben. Nach den Erfahrungen von Rieck hat Tween 80 in dieser Verdünnung keinerlei schädliche Folgen für *Aspergillus niger*.



## Hauptversuche

### I. Gehalt von *Zea Mays* an autochthonem Zink

#### 1. Zinkgehalt unbehandelter Körner

Die Körner wurden entweder zu mehreren getrocknet und dann in Portionen von 1 g verascht und analysiert; aus der in 1 g Trockengewicht ermittelten Zinkmenge konnte der Zinkgehalt eines Korns *abgeschätzt* werden. Oder der Zinkgehalt von einzelnen Körnern wurde bestimmt und auf 1 g Trockengewicht *umgerechnet*. Ergebnisse in Tabelle 2.

Tabelle 2

Zinkgehalt von ungequollenen *Mais*körnern.

Angaben in  $\gamma$ . Mittel aus je drei Bestimmungen. Streuung der Einzelwerte berechnet

Zinkgehalt pro 1 g Trockengewicht gemessen	Zinkgehalt pro Korn abgeschätzt	Zinkgehalt pro Korn bestimmt	Zinkgehalt pro 1 g Trockengewicht berechnet
$30 \pm 3$	10-12	$11 \pm 1$	$26 \pm 4,5$

Während der Quellung der Körner in Ionenaustauscherwasser und in einer Apparatur aus Pyrexglas, also in zinkfreiem Milieu, sollte sich der Zinkgehalt nicht verändern. Daß wirklich keine Veränderung eintrat, zeigen die Ergebnisse der Tabelle 3.

Tabelle 3

Zinkgehalt von gequollenen *Mais*körnern.

Angaben in  $\gamma$  Zink. Mittel aus je drei Bestimmungen. Streuung des Einzelwerts berechnet

Zinkgehalt pro 1 g Trockengewicht gemessen	Zinkgehalt pro Korn abgeschätzt	Zinkgehalt pro Korn bestimmt	Zinkgehalt pro 1 g Trockengewicht berechnet
$28 \pm 3$	10	$11,7 \pm 2$	$29 \pm 1$

Als mittlerer Zinkgehalt eines *Mais*korns geht aus diesen Messungen 11  $\gamma$  hervor. Galt es in den folgenden Versuchen, die *Zinkaufnahme* von *Mais*pflanzen zu berechnen, so mußte dieser Betrag jeweils von ihrem Zinkgehalt abgezogen werden.

Bertrand und Benson (1929) fanden 20 mg Zink pro Kilogramm *Mais*körner.

Ferner ist hier die Feststellung Berghs (1948) von Interesse, daß der Zinkgehalt von Getreidekörnern nur wenig schwankt im Vergleich zu dem der Halme und Wurzeln von Pflanzen, die in Böden oder Lösungen ganz verschiedenen Zinkgehaltes gewachsen sind. Es war demnach nicht zu befürchten, daß sich unter dem Saatgut Körner von wesentlich anderem als dem einmal bestimmten Zinkgehalt finden würden.

## 2. Zinkgehalt der einzelnen Organe

Da das Endosperm allgemein als das Speicherorgan der jungen Pflanze gilt, lag die Vermutung nahe, daß sich darin auch der größte Teil des im *Mais*korn vorhandenen Zinks befindet. Diese Annahme bestätigte sich jedoch nicht, wie Tabelle 4 zeigt, indem nur zirka ein Viertel der gesamten Zinkmenge sich im Endosperm nachweisen ließ. *McHargue* (1925) fand ebenfalls im Endosperm nur wenig Zink, dagegen im Embryo 103  $\gamma$ /g Trockengewicht <sup>1</sup>.

Tabelle 4

Gehalt an autochthonem Zink von Endosperm, Scutellum und Embryo ungequollener und in zinkfreiem Wasser gequollener *Mais*körner.

Mittel aus zwei bis fünf Bestimmungen.  $\sigma_M$  berechnet

	Ungequollene Körner		Gequollene Körner	
	Zinkgehalt in $\gamma$		Zinkgehalt in $\gamma$	
	absolut	pro g Trockengewicht	absolut	pro g Trockengewicht
Endosperm	2,75 $\pm$ 0,25	8,5 $\pm$ 0,02	2,4 $\pm$ 0,22	7,5 $\pm$ 0,7
Scutellum	7,7 $\pm$ 0,7	174,5 $\pm$ 4,5	7,25 $\pm$ 0,25	156 $\pm$ 16
Embryo	0,2 $\pm$ 0,1	34,2 $\pm$ 19,8	0,44 $\pm$ 0,06	115 $\pm$ 30

## 3. Histochemischer Nachweis des Zinks

Nachdem durch Analyse der einzelnen Organe festgestellt war, daß das im *Mais*korn vorhandene Zink zum größten Teil im Embryo und im Scutellum lokalisiert ist, wurde versucht, dies mittels einer Farb-reaktion auf Zink in Gewebeschnitten zu bestätigen. Die einzige in der Literatur gefundene Methode ist die von *Mendel* und *Bradley* (1905), die *Glick* (1945) ebenfalls angibt. Hiernach läßt man Natriumnitroprussiat auf Schnitte einwirken, spült dann mit Leitungswasser (!) das überschüssige lösliche Prussiat weg und gibt Kaliumsulfid zu, worauf sich eine Purpurfärbung überall da einstellen soll, wo Zink gebunden ist.

An Handschnitten von frisch gequollenen und an Mikrotomschnitten von in Paraffin eingebetteten *Mais*körnern probierte ich dieses Verfahren aus, gelangte aber niemals zum Erfolg. Wohl trat eine violette Färbung auf, doch war sie unregelmäßig über die Flächen verteilt und ebenso häufig im Endosperm wie im Embryo oder auch außerhalb der Schnitte anzutreffen.

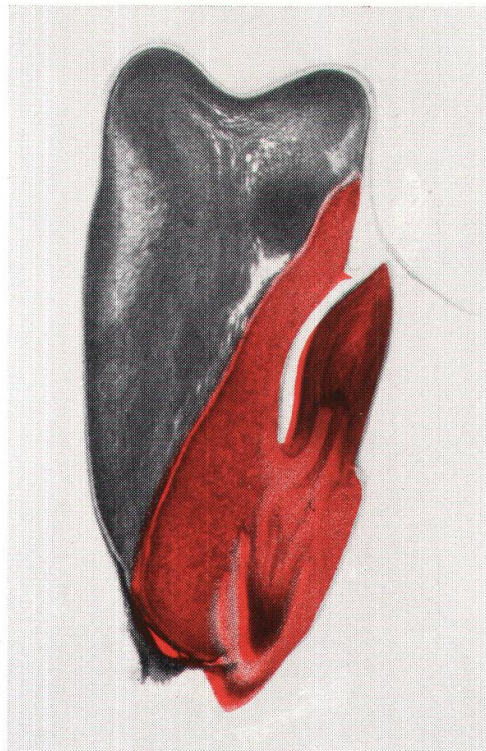
<sup>1</sup>In der soeben erschienenen *Ann. Rev. of Plant Phys.* 3, 1952, erwähnen:

A. *Ulrich* in «Physiological bases for assessing the nutritional requirements of plants» unveröffentlichte Angaben von *Stout* und *Pearson*, nach denen sich Zink vor allem in den embryonalen Teilen jüngerer und älterer *Mais*pflanzen fand. Ein radioautographisches Bild (S. 211) zeigt Zink in jungen Ähren, ohne jedoch eine genaue Lokalisation in einzelnen Organen zu erlauben.

G. W. *Leeper* in «Factors affecting availability of inorganic nutrients in soils with special reference to micronutrient metals» Arbeiten von *Millikan* (1942) sowie von *Jones* und *Tio* (1948) über eine Konkurrenz um Spurenelemente.



# Tafel I



Figur 1

Schnitt durch gequollenes *Maiskorn* (Pferdezahnmais). Die zinkhaltigen Gewebe durch Dithizon rot gefärbt.  
Vergrößerung zirka sechsfach

Darauf legte ich mit dem Handmikrotom hergestellte Schnitte von gequollenen Körnern während einer Stunde in Chloroform ein, versah sie dann auf einem Objektträger mit einigen Tropfen Dithizon in Ammoniumcitratpuffer (Reagens für die Zinkbestimmung nach Cowling und Miller, 1941), worauf sich die embryonalen Gewebe leuchtend rot von Zinkdithizonat färbten, wogegen das Endosperm farblos blieb (Figur 1 [Tafel I]). Diese Reaktion ist zwar nicht ganz spezifisch, doch geht bei pH 9,8 (pH des Puffers) hauptsächlich Zink die Verbindung mit Dithizon ein. Übrigens geben auch Mendel und Bradley an, daß ihre Farbreaktion sowohl Zink als auch Kupfer anzeige. Das Ergebnis der Farbreaktion deckte sich jedenfalls mit dem der Analysen.

Daß sich dieser Nachweis von Zink auch für andere Früchte und Samen eignet (*Weizen, Ricinus, Cucumis, Vicia Faba*), zeigte Herr cand. phil. E. Pedretti am Botanischen Institut Basel (unveröffentlicht).

## II. Zinkaufnahme von *Zea Mays*

### 1. Zinkaufnahme der Maiskörner während der Quellung

Ein Vorversuch hatte gezeigt, daß die Körner während der Quellung aus Leitungswasser Zink aufnehmen.

Je ein Versuch mit reinem Wasser und mit einem Ionengemisch (der üblichen Nährlösung), zu beiden Zink in den Konzentrationen 1, 5 und 10 mg/l zugesetzt, sollte erweisen, ob sich von der Art des Milieus bedingte Unterschiede in der Zinkaufnahme ergeben würden.

Es wurden nun je sechs Körner in 200 cm<sup>3</sup> durchlüftetem Quellwasser, das 200, 1000 und 2000  $\gamma$  Zink pro Kolben enthielt, 48 Stunden lang quellen gelassen, bei einer Temperatur, die beide Male 20° C betrug und einer Wasserstoffionenkonzentration von pH 6. Als Gefäße dienten diesmal nicht Apparaturen nach Bulet (1940), sondern drei Erlenmeyerkolben von 500 cm<sup>3</sup> Inhalt (Tabelle 5).

Man erkennt, daß kein signifikanter Unterschied zwischen Zinkgehalt resp. Zinkaufnahme aus Ionenaustauscherwasser und der aus Nährlösung stammenden Körner besteht. Dies spricht für einen Diffusionsvorgang. Die Maiskörner nehmen Zink in einer bestimmten Menge auf, gleichgültig, ob es ihnen allein oder im Verein mit anderen Ionen geboten wird. Diese Zinkmengen stehen zwar nicht in dem bei einem Diffusionsvorgang theoretisch geforderten Verhältnis 1 : 5 : 10, sondern verhalten sich bei reiner Zinklösung wie 1 : 3,0 : 9,3 bzw. beim Ionengemisch wie 1 : 1,4 : 5,8. Immerhin nimmt der Zinkgehalt der Körner zu mit steigender Zinkkonzentration im Quellwasser.

Merkwürdig mutet die absolut und prozentual geringe Zinkaufnahme der Körner bei 5 mg Zn/l an. Es läßt sich denken, daß zwischen 5 und 10 mg Zn/l ein «Schwellenwert», etwa der Zinkkonzentration an der Kornoberfläche, überschritten werden muß, damit die Körner einen von dem bei 1 mg Zn/l deutlich größeren Zinkgehalt zeigen.

Tabelle 5

Zinkgehalt von *Mais*körnern nach 48stündiger Quellung. Sechs Körner in 200 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit. Mittel aus drei Bestimmungen. Streuung des Einzelwertes berechnet

	Ionenaustauscherwasser			Nährlösung		
	1	5	10	1	5	10
mg Zink/Liter . . . .	1	5	10	1	5	10
γ Zink/Gefäß (200 cm <sup>3</sup> , 6 Körner)	200	1000	2000	200	1000	2000
γ Zink <i>einem</i> Korn im Kolben zur Verfügung . . . . .	33	167	333	33	167	333
Zinkgehalt/Korn gemessen in γ ..	13,3±1	18 ±2	32,3±4	13,7±2,4	14,7±2,4	26,7±6
Zinkaufnahme pro Korn in γ ..	2,3±1	7,0±2	21,3±4	2,7±2,4	3,7±2,4	15,7±6
Zinkaufnahme in % bezogen auf die einem Korn zur Verfügung ste- hende Zinkmenge in der Lösung ..	7,0	4,2	6,4	8,2	2,2	4,8
Zinkaufnahme pro 1 g Trockenge- wicht in γ . . . . .	7,3±2	21,7±7	55 ±13	4,7±4	5,3±2,4	35,3±9

Die Zinkaufnahme ist sicher ein von der Größe der Kornoberfläche abhängiger Vorgang. Da diese schwierig zu bestimmen gewesen wäre, wurde die Zinkaufnahme auf das Trockengewicht bezogen. Erfahrungsgemäß stehen Trockengewicht und Oberfläche von *Mais*körnern in positiv korrelativem Zusammenhang; daher sollte das Trockengewicht hier an die Stelle der Oberfläche treten können. Betrachtet man die in der Tabelle 5 angegebenen Zahlen unter Zinkaufnahme/g Trockengewicht, so erkennt man wiederum ein Ansteigen der Werte mit zunehmender Zinkkonzentration des Quellwassers. Eine statistische Berechnung schloß zwar einen Diffusionsvorgang noch nicht aus, doch sind die Streuungen so groß, daß keine sinnvolle Beziehung zwischen Trockengewicht und Zinkaufnahme erblickt werden kann. Ob man daraus schließen darf, daß auch die gesamte Oberfläche keine geeignete Bezugseinheit wäre, kann hier nicht entschieden werden. Es ist immerhin möglich, daß nur ein Teil der Karyopse, zum Beispiel Scutellum und Embryo, Zink aufnimmt.

Ein nächster Versuch sollte zeigen, ob der an autochthonem Zink reiche Embryo während der Quellung in zinkhaltiger Lösung mehr Zink aufnimmt als das Endosperm, so wie dies oben vermutet wurde.



Dazu wurden vier Erlenmeyerkolben von 500 cm<sup>3</sup> Inhalt mit je 20 Maiskörnern und 250 cm<sup>3</sup> Zinksulfatlösung der Konzentrationen 100, 1000, 10 000 und 100 000 mg Zink/l versehen und während 51 Stunden bei einer Temperatur von 20 bis 25° C Luft hindurchgesogen. Die Lösungen stellte ich aus Zinksulfatsalz (Analar, pro analysi) und Ionenaustauscherwasser her; das pH betrug in allen Kolben 5,1 bis 5,2.

Nach den 51 Stunden zeigte es sich, daß die Körner mit 100 mg Zn/l normal gequollen und gekeimt waren, die mit 1000 und 10 000 mg Zn/l nur gequollen und teilweise hart geblieben waren; endlich aber hatten die Körner mit der höchsten Zinkkonzentration nur wenig Wasser aufgenommen, und ihre Embryonen schienen äußerlich geschrumpft.

Nach der Rotfärbung der Querschnitte mit Dithizon zu schließen, hatten die Embryonen der Körner aller Zinkkonzentrationen mehr Zink gespeichert als die Endosperme, die nur mit einer stark rot gefärbten Aleuronschicht hervortraten, im übrigen aber schwach rosa erschienen. Unterschiede in der Intensität der Färbung, die auf entsprechend den Konzentrationen der Quellösungen verschiedene Zinkaufnahmen hätten hindeuten können, wurden nicht beobachtet.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse, die Endosperme und Embryonen (Scutellum und Embryo) getrennt erfaßte, sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6

Verteilung des aus Quellösungen (je 250 cm<sup>3</sup>) verschiedenen Zinkgehalts aufgenommenen Zinks auf Endosperm und embryonales Gewebe von Maiskörnern. Mittel aus drei bis vier Bestimmungen.  $\sigma_M$  berechnet. Embryonen einzeln verascht, jedoch nicht einzeln gewogen

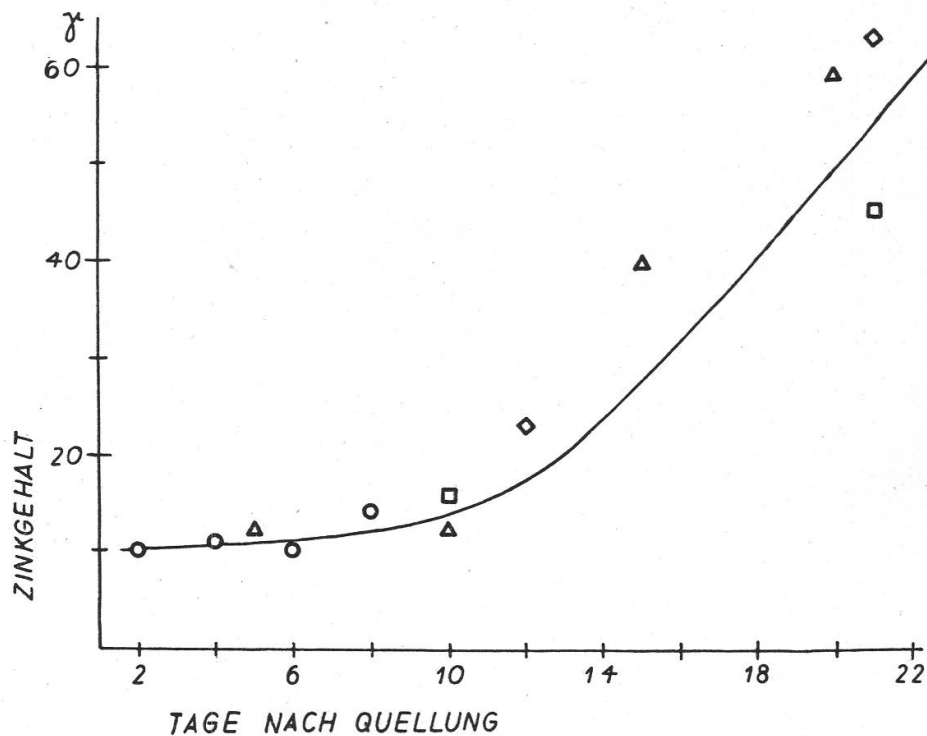
Zinkkonzentration in mg Zn/l	Trockengewicht in g		Zinkgehalt absolut, in $\gamma$		Zinkgehalt pro g Trockengewicht, in $\gamma$	
	Endosperm	Embryo	Endosperm	Embryo	Endosperm	Embryo
100	0,283 ± 0,007	0,037	29 ± 0,58	26,7 ± 4,7	105 ± 1,8	722
1 000	0,306 ± 0,058	0,0445	42,2 ± 6,1	30,3 ± 4,1	133 ± 19,6	671
10 000	0,299 ± 0,021	0,045	86,7 ± 6,5	48,7 ± 0,09	291 ± 26	1081
100 000	0,308 ± 0,077	0,049	237 ± 27	94 ± 8	777 ± 85	1919

Während also der Zinkgehalt des Endosperms mit dem des Quellwassers ansteigt, zeigt sich das embryonale Gewebe weniger empfindlich gegen die Zinkkonzentration der Lösung, jedenfalls nimmt sein Zinkgehalt nur wenig zu. Auf das Trockengewicht bezogen, enthalten allerdings die Embryonen stets mehr Zink als das Nährgewebe (zirka drei- bis siebenmal mehr), woraus sich die verschieden starke Rotfärbung der Gewebe in den Querschnitten erklärt, da diese Konzentrationen anzeigt. Die Vorstellung, daß die Zinkaufnahme nicht gleichmäßig über die ganze Kornoberfläche erfolge, sondern im embryonalen Gewebe stärker sei, erweist sich damit als richtig.

## 2. Zinkaufnahme während des Wachstums

### a) Aufnahme aus Nährlösungen mit 1 mg bzw. 2 mg Zink im Liter

Maispflanzen wurden in Röhrcchen nach *Virtanen* in der üblichen Nährlösung mit 2 mg Zn/l (= 4  $\gamma$  pro Röhrcchen) aufgezogen. Alle zwei Tage nach der Quellung wurden Länge von Sproß und Wurzel, Trockengewicht und Zinkgehalt von drei Pflanzen gemessen. Etwa vom dritten Tag an tauchte die Wurzel in die Nährlösung ein, und am vierten



Figur 2

Zinkgehalt von *Maiskeimlingen*. Alter 2—21 Tage  
Nährlösung mit 1 mg/Zn/l bzw. 2 mg Zn/l (Versuch 52)

○—○ Versuch 52    △—△ Versuch 53  
◇—◇ Versuch 83    □—□ Versuch 90

Tag mußten die Wattestopfen über den Koleoptilen entfernt und die Pflanzen ans Licht gebracht werden (Versuchsnummer 52, Tabelle 7, Figur 2).

Dann wurden Trockengewicht, Sproß- und Wurzellänge sowie der Zinkgehalt von Pflanzen bestimmt, die in Keimröhrcchen in Kolben mit 50 cm<sup>3</sup> Nährlösung und 1 mg Zn/l (= 50  $\gamma$  pro Kolben) gewachsen waren, und zwar im Abstand von fünf Tagen, vom Einsetzen an gerechnet (Versuchsnummer 53, Tabelle 7, Figur 2).

In einem dritten Fall wurden die Keimlinge vom dritten oder vierten Tag an in einem Wasserbad von 30° C geschüttelt; die sie enthaltenden Kolben standen in einem Drahtkorb, der, durch einen Motor



angetrieben, 87 Vollschrwingungen in der Minute mit einer Amplitude von 2,25 cm machte. Das Schütteln wirkte sich durchaus nicht nachteilig auf die Pflanzen aus. Im Gegenteil entwickelten sie sich bei der gleichmäßigen, verglichen mit der sonst im Gewächshaus herrschenden, höheren Temperatur und durch die Versorgung der Nährlösung mit Luft, besonders am Anfang, etwas rascher als ruhende Kulturen (Versuchsnummern 83 und 90, Tabelle 7, Figur 2. Zinkgehalt der Nährlösung: 1 mg Zn/l = 50  $\gamma$  pro Kolben).

Tabelle 7  
Zinkgehalt von Maiskeimlingen von 2—21 Tagen  
Nährlösung mit 1 bzw. 2 (Nr. 52) mg Zn/l  
Mittelwerte des Zinkgehaltes aus 2—4 Einzelwerten  
Streuung des Mittelwertes  $\sigma_M$  berechnet

Versuchsnummer	Alter in Tagen	Sproßlänge in cm	Wurzellänge in cm	Trockengewicht in g	Zinkgehalt in $\gamma$
52	2	1-1,5	3-5	0,436	10 $\pm$ 0,58
	4	5-7	10-16	0,371	11 $\pm$ 1
	6	8-11	12-16	0,283	10,3 $\pm$ 0,58
	8	7-10	11-15	0,310	14 $\pm$ 1,7
53	5	10,7	18	0,383	12 $\pm$ 1
	10	17	16	0,314	12 $\pm$ 1
	15	28,5	34,5	0,338	39,5 $\pm$ 1,5
	20	39	47	0,416	59 $\pm$ 3
83	12	20	15,5	0,258	22,7 $\pm$ 3
	21	37	67	0,210	62,9 $\pm$ 1
90	10	17	12,7	0,254	15,7 $\pm$ 0,9
	21	40	45	0,255	45 $\pm$ 3

Im ersten Versuch nahmen die Pflanzen kein Zink auf bis zum sechsten Tag, erst am achten Tag ist ihr Zinkgehalt um durchschnittlich 3  $\gamma$  erhöht, wobei allerdings dieser Unterschied nicht als signifikant betrachtet werden kann ( $p = 10\%$  nach dem  $t$ -Test bei vier Freiheitsgraden).

Im zweiten Versuch ist die Zinkaufnahme am zehnten Tag immer noch gleich Null. Sie beginnt erst nachher und steigt dann in der Weise an, daß der Zinkgehalt der Pflanzen sich bis zum 20. Tag verfünffacht. Ein Zinkgehalt von 59  $\gamma$  nach 20 Tagen kam jedoch, wie spätere Versuche zeigten, nur selten vor; er mag besonders günstigen Verhältnissen für die Entwicklung der Pflanzen zuzuschreiben gewesen sein. Im allgemeinen erreichte er in 21 Tage alten Pflanzen einen Wert von 40 bis 50  $\gamma$ .

Bei den *Mais*pflanzen aus Schüttelkultur verläuft die Zinkaufnahme nicht wesentlich anders.

In allen vier Versuchen fällt es auf, daß in den ersten acht bis zehn Tagen nach meiner Methode *kein Zink*, oder doch nur sehr wenig, aus der Nährlösung aufgenommen wird, obwohl die Wurzeln schon am dritten Tag eintauchten und daher nicht mehr auf die Zufuhr von Nährstoffen und Wasser durch den Filterpapierstreifen angewiesen waren. Zudem hatten sie am fünften bzw. sechsten Tag dieselbe durchschnittliche Länge wie am zehnten bzw. achten Tag. Wie in einem späteren Abschnitt dargelegt werden wird, nehmen die Keimlinge wohl in der allerersten Zeit Zink auf, aber nicht aus der Nährlösung, sondern aus dem Scutellum.

Für dieses beim *Mais* im Jugendstadium auftretende Ausschließungsvermögen, das den Pflanzen sonst allgemein abgesprochen wird (Frey-Wyssling, 1945, S. 57), sind verschiedene Erklärungen möglich:

1. Es könnte sein, daß die Zinkaufnahme mit einer bestimmten Ausbildung, einer Art innerer Reife der Pflanzen in Beziehung steht, was mit dem Auftreten der Seitenwurzeln, die sich am dritten Tag zu zeigen beginnen und vom sechsten Tag an teilweise die Nährlösung erreichen, zusammenfallen könnte. Der Keimling würde erst allmählich in einen aufnahmefähigen Zustand gelangen. Olsen (1950) erwähnt z. B., daß seine Versuchspflanzen, *Kohl* und *Roggen*, bis zum 35. Tag nur geringe und erst danach größere und konstante Mengen von Salzen aufnahmen.
2. Betrachtet man die oberirdischen Teile der Pflanze, so bemerkt man, daß mit dem Beginn der Zinkaufnahme die Entfaltung der ersten Blätter und die Hauptabnahme des Endosperms an Trockengewicht (siehe S. 116) zusammengeht. Es liegt nahe, dem in Fermenten wirksamen Zink eine Rolle in der Umsetzung der Reserve- in Baustoffe zuzuschreiben. Der Bedarf an Zink wäre in dieser Zeit erhöht und könnte nicht mehr vom Scutellum allein gedeckt werden.
3. Stellt man sich die Stoffaufnahme als Ionenaustausch vor, so erhebt sich die Frage, ob die Pflanze schon genügend Ionen zur Verfügung hat, die als «Tauschobjekt» gegen Zink dienen können. Diese Erklärung scheint aber nicht stichhaltig, da zum mindesten durch die Atmung reichlich Wasserstoff- und Bikarbonationen vorhanden sein sollten.
4. Dieser Gedankengang kommt dem von Nr. 3 nahe. Biedermann und Müller (1951) fanden, daß die schädliche Wirkung von Kupferionen auf Pilzsporen durch Anwesenheit von Kalium-, Calcium- und Wasserstoffionen teilweise aufgehoben wurde. Zur Erklärung nehmen sie an, daß die genannten Ionen die Sporenoberfläche bedecken, an den Haftstellen der Zellmembran sitzen

und damit das Eindringen der Kupferionen verhindern. — Dasselbe wäre an der Oberfläche der Wurzelhaare von *Mais* denkbar. Das Verhältnis von Kaliumionen zu Zinkionen betrug anfangs in der Nährlösung 11 : 1 (: 2 bei Versuch 52) und das der Calciumionen zu Zinkionen 33 : 1 (: 2 bei Versuch 52). Es stehen somit in 50 cm<sup>3</sup> Nährlösung mit 1 mg Zn/l zirka 70 Calcium- und Kaliumionen einem Zinkion gegenüber (nämlich:  $3,24 \cdot 10^{19}$  Ca + K, gegenüber  $4,59 \cdot 10^{17}$  Zn). Im Laufe der Entwicklung der Pflanzen kann natürlich eine Verschiebung auftreten, indem die für den Aufbau der Organe notwendigen Calcium- und Kaliumionen in großer Menge absorbiert werden, worauf dann die Haftstellen allmählich frei werden für weniger wichtige Ionen, wie z. B. Zink. In der Tat nehmen *Weizenkeimlinge* nach *Lundegårdh* (1932) schon in den ersten Tagen Kalium auf.

b) *Aufnahme aus Nährlösungen mit 1 mg, 5 mg und 10 mg Zink im Liter*

Es wurden zwei Versuche durchgeführt mit Pflanzen von 7 und 21 Tagen Alter.

Der erste Versuch umfaßte elf Pflanzen, die in Röhren nach *Virtanen* mit je 2 cm<sup>3</sup> Nährlösung, der 2  $\gamma$ , 10  $\gamma$  oder 20  $\gamma$  Zink zugegeben waren, aufgezogen wurden. Es sollte sich hier zeigen, ob die Keimlinge fähig waren, sich auch größerer Zinkmengen in der Nährlösung zu enthalten (Tabelle 8).

Tabelle 8

Zinkgehalt von *Maiskeimlingen* nach 7 Tagen Kultur

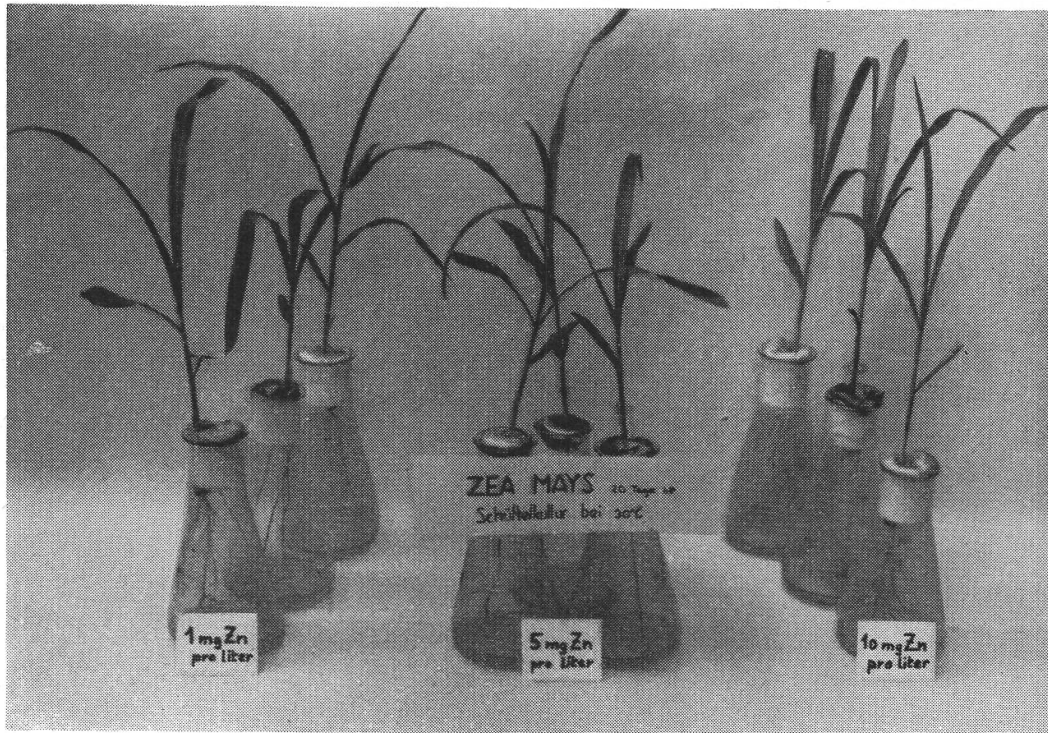
Mittelwerte aus 3—5 Einzelmessungen. Streuung  $\sigma_M$  des Mittelwertes berechnet

Zinkkonzentration in der Nährlösung in mg Zn/l	Sproßlänge in cm	Wurzellänge in cm	Trockengewicht in g	Zinkgehalt in $\gamma$
1	8,8	18,7	0,313	$12 \pm 2,1$
5	8,3	13,3	0,355	$13 \pm 1$
10	8,1	13,2	0,340	$11 \pm 0,84$

Es zeigt sich bei höheren Zinkkonzentrationen in der Nährlösung dasselbe Bild: Die Pflanzen haben bis zum siebten Tag nach der Quellung kein Zink aufgenommen.

Darauf wurden neun Pflanzen von 21 Tagen Alter, die vom zwölften Tag an in der Schüttelapparatur gewesen waren, untersucht. Wie man der Figur 3 entnehmen kann, war gegen Versuchsende äußerlich kein Unterschied zwischen den in verschiedenen Zinkkonzentrationen gewachsenen Pflanzen erkennbar. Alle hatten vier bis fünf Blätter von normaler Farbe und Gestalt. Aus der Tabelle 9 ersieht man dagegen,





Figur 3  
 Maispflanzen von 20 Tagen Alter in Nährlösung von verschiedenem Zinkgehalt.  
 Ergebnisse in Tabelle 9

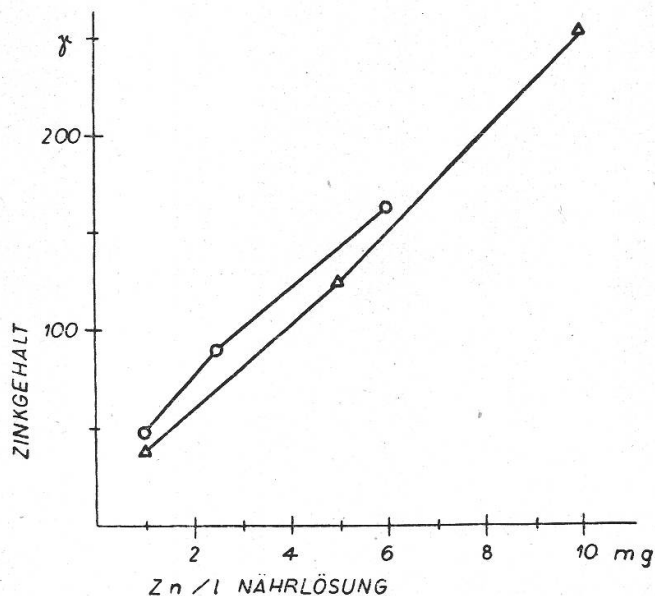
Tabelle 9  
 Zinkgehalt und Wurzellänge von Maispflanzen nach 21 Tagen Kultur. 3 Pflanzen pro  
 Konzentration.  $\sigma_M$  berechnet. Mittelwerte kursiv gedruckt

Zinkkonzentration in der Nährlösung	Sproß- länge in cm	Wurzel- länge in cm	Trocken- gewicht der Pflanzen in g	Zink- gehalt der Pflanzen in $\gamma$	Zinkaufnahme		Zinkgehalt / Wurzellänge in $\gamma/cm$
					in $\gamma$	in % be- zogen auf Zinkgehalt der Nähr- lösung	
50 $\gamma/50\text{ cm}^3$ (1 mg/l)	35	75	0,247	48	27,3	55	0,64
	35	80	0,253	37			0,46
	35	67	0,310	30			0,45
				38,3			<i>0,52 ± 0,06</i>
250 $\gamma/50\text{ cm}^3$ (5 mg/l)	29*	40*	0,367*	102*	113	45	2,55*
	33	45	0,234	120			2,67
	42	53	0,278	150			2,83
				124			<i>2,68 ± 0,08</i>
500 $\gamma/50\text{ cm}^3$ (10 mg/l)	34	24	0,237	120	242	48	5,0
	30	42	0,236	290			6,9
	36	50	0,262	350			7,0
				253			<i>6,3 ± 0,65</i>

\* Infiziert (s. S. 127).

daß die Längen der Wurzeln und der Zinkgehalt der Pflanzen ziemlich verschieden sind.

Es fällt auf, daß je eine Pflanze pro Zinkkonzentration «aus der Reihe tanzte», d. h. sich in Trockengewicht, Wurzellänge und Zinkaufnahme anders verhielt als die beiden andern. Eine dieser drei unterentwickelten Pflanzen hatte eine Schimmelpilzinfektion, in Tabelle 9 mit \* bezeichnet, die das schlechte Gedeihen mitverursacht haben mochte. Es sind daher alle Mittelwerte der Zinkaufnahmen kleiner, als sie bei normal und gleichmäßig entwickelten Pflanzen gewesen wären.



Figur 4

Zinkgehalt von *Mais*pflanzen

- Δ — Δ Nach 21 Tagen mit 1, 5, 10 mg Zn/l
- — ○ Nach 17 Tagen mit 1, 2,5, 6 mg Zn/l

Trotz der großen Streuungen der Mittelwerte ( $p$  beträgt nach dem  $z$ -Test etwa 10 %) deuten die Resultate darauf hin, daß die Zinkaufnahme mit der in der Nährlösung enthaltenen Zinkmenge ansteigt (Figur 4). Sie folgt ihr fast proportional, nämlich im Verhältnis 1 : 4,14 : 8,86. Die Zinkaufnahme, bezogen auf den Zinkgehalt der Nährlösung, ist in allen Fällen ungefähr gleich, nämlich rund 50 %.

Javillier (1908), der die Zinkaufnahme von *Weizen* nach zwei Monaten Kultur bestimmte, fand kein proportionales Ansteigen mit dem Zinkgehalt der Kulturlösung. Während seinen Nährlösungen Zink im Verhältnis 3 : 5 : 20 : 30 zugegeben war, enthielten die darin gewachsenen Pflanzen Zink im Verhältnis 1,02 : 1,06 : 1,94 : 2,11. Es scheint, als ob eine Sättigung der Pflanzen mit Zink innerhalb der zwei Monate eingetreten sei.

c) *Über einen Zusammenhang zwischen Zinkaufnahme und Entwicklung der Wurzeln*

Die geringe Wurzellänge der in der Entwicklung zurückgebliebenen Pflanzen des zuletzt beschriebenen Versuchs legte die Vermutung nahe, daß zwischen der Ausbildung der Wurzeln und der Zinkaufnahme eine Korrelation bestehe. Streng genommen müßte die Oberfläche der in die Nährlösung eintauchenden Wurzeln mit der Zinkaufnahme in Beziehung gebracht werden. Da diese schwierig und nur ungenau zu bestimmen gewesen wäre, wurden einmal Quotienten aus Zinkgehalt und Wurzellänge gebildet (Tabelle 9).

Berechnet man aus den Quotienten  $p$  nach dem  $z$ -Test, so ergibt sich ein Wert von weniger als 0,1 %. Es besteht in diesem Versuch also ein nicht zu leugnender Zusammenhang zwischen der Zinkkonzentration der Nährlösung und dem pro Wurzellänge in den *Mais*pflanzen enthaltenen Zink.

Trotzdem überzeugte die Länge der Hauptwurzel als Bezugseinheit nicht ganz. Gerade bei Gramineen stellt die Keimwurzel ihr Längenwachstum oft schon frühzeitig ein. So kann das Wurzelwerk von *Mais*pflanzen kurz und doch normal und kräftig ausgebildet sein. Es war nun der Zweck eines nächsten Versuches, das Trockengewicht der Wurzeln als weitere Bezugsgröße für die Zinkaufnahme heranzuziehen und ferner eine gewisse Kontrolle für die im obigen Versuch gefundenen Resultate zu liefern.

Tabelle 10

Trockengewicht und Zinkaufnahme von ganzen Pflanzen, Zinkgehalt von Sproß und Wurzel von *Zea Mays*. Kultur 17 Tage. Mittel aus je drei Einzelbestimmungen  $\sigma_M$  berechnet

Zinkkonzentration in der Nährlösung in mg Zn/l	Trockengewicht (ganze Pflanze) in g	Zinkgehalt des Sprosses in $\gamma$	Zinkgehalt der Wurzel in $\gamma$	Zinkgehalt der ganzen Pflanze in $\gamma$	Zinkaufnahme	
					in $\gamma$	bezogen auf Zinkgehalt der Nährlösung in %
1	0,235	26 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1,5	47 $\pm$ 1,2	36	72
2,5	0,242	44,7 $\pm$ 0,9	45 $\pm$ 1,5	89,7 $\pm$ 2,4	78,7	63
6	0,390	71 $\pm$ 12	90,7 $\pm$ 0,7	161,7 $\pm$ 12	150,7	50

Es wurden diesmal 17 Tage alte Pflanzen analysiert, die sich vom dritten Tag nach der Quellung in der Schüttelapparatur befunden hatten. Der Zinkgehalt der Nährlösung war 50, 125 und 300  $\gamma$  pro Kolben (= 1, 2,5 und 6 mg Zn/l). Die Pflanzen gediehen in allen Konzentrationen gut, nur zeigten sich am Korn einer *Mais*pflanze (mit <sup>1</sup> bezeichnet in Tabelle 11) in den letzten Tagen des Versuchs Infektionen. Diese hatte denn auch weniger lange Wurzeln als die keimfrei gebliebenen und außerdem etwas welke Blätter.



Die Wurzeln wurden vom Korn getrennt und gesondert getrocknet, verascht und analysiert. Daneben wurde der Sproß mit dem Scutellum und dem Endosperm zusammen untersucht (Tabelle 10, Figur 4).

Tabelle 11  
Zinkgehalt der Maispflanzen bezogen auf Länge und Gewicht ihrer Wurzeln  
Alter 17 Tage

Zinkkonzentration in der Nährlösung	Wurzel- länge in cm	Trockengewicht der Wurzel in g	Zinkgehalt pro Pflanze in $\gamma$	Zinkgehalt Wurzellänge in $\gamma/\text{cm}$	Zinkgehalt Wurzelgewicht in $\gamma/\text{g}$
1 mg Zn/l = 50 $\gamma/50 \text{ cm}^3$	63	0,042	45	0,72	1071
	80	0,045	47	0,59	1044
	44 <sup>1</sup>	0,038 <sup>1</sup>	49 <sup>1</sup>	1,11 <sup>1</sup>	1289 <sup>1</sup>
2,5 mg Zn/l = 125 $\gamma/50 \text{ cm}^3$	52	0,050	85	1,63	1700
	60	0,072	91	1,52	1264
	70	0,058	93	1,33	1603
6 mg Zn/l = 300 $\gamma/50 \text{ cm}^3$	74	0,052	183	2,48	3519
	62	0,038	159	2,56	4184
	67	0,076	143	2,14	1881

<sup>1</sup> Infiziert (s. S. 128).

Auch in diesem Versuch besteht ein signifikanter Einfluß des Zinkgehaltes der Nährlösung auf den Zinkgehalt von *Mais*, und zwar in dem Sinn, daß die Zinkaufnahme mit der Konzentration in der Lösung ansteigt. Nach dem *z*-Test beträgt *p* zirka 0,1 %.

Im Vergleich zum vorhergehenden Versuch ist der Zinkgehalt bei 1 mg Zn/l um rund 25 % höher, was dem besseren Gedeihen der Pflanzen zuzuschreiben ist. Der Zinkgehalt bei 5 mg Zn/l (Tabelle 9) und bei 6 mg Zn/l (Tabelle 10) ist nicht sehr verschieden, was man auch der Figur 4 entnehmen kann. Ebenso wenig ergeben die Quotienten Zinkgehalt/Wurzellänge bei 1 mg Zn/l und 5 bzw. 6 mg Zn/l in der Nährlösung stark abweichende Werte in den beiden Versuchen (Tabellen 9 und 11). Auch in dem 17 Tage alten *Mais* zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Wurzellänge und Zinkgehalt der Pflanze: Berechnet man die Streuungen für die gebildeten Quotienten (Streuungen ihrer Mittelwerte)

$$\begin{aligned} \text{bei } 1 \text{ mg Zn/l} & 0,81 \pm 0,16 \\ \text{bei } 2,5 \text{ mg Zn/l} & 1,49 \pm 0,088 \\ \text{bei } 6 \text{ mg Zn/l} & 2,39 \pm 0,129 \end{aligned}$$

so geht daraus hervor, daß diese, in Prozent ausgedrückt, nur bei 6 mg Zn/l kleiner ist als die Streuung des mittleren Zinkgehaltes derselben Pflanzen.

Für das Auftreten ziemlich großer Streuungen bei 1 mg Zn/l Nährlösung findet man leicht eine Erklärung. Wie auf Seite 128 erwähnt,

hatte eine Pflanze der niedrigsten Konzentration, infolge einer Infektion am Korn oder anderer ungünstiger Umstände, eine kürzere Wurzel. Deren Zinkgehalt war nun aber nicht, wie erwartet, geringer, sondern gleich hoch wie jener der beiden gesunden Pflanzen. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als es zeigt, daß je nach dem Zeitpunkt des Befalls durch Schimmelpilze, die *Mais*-Pflanzen verschieden stark geschädigt werden. In diesen Fällen trat die Infektion erst so spät ein, daß die Zinkaufnahme nicht mehr beeinflußt werden konnte. Dagegen haben wir im vorhergehenden Versuch (Tabelle 9) ein Beispiel, wie ungünstig sich die Anwesenheit eines Pilzes in Entwicklung und Zinkgehalt von *Mais* geltend machen kann. Mit diesem hier nur kurz gestreiften Problem des Zusammenlebens von «Wirt» und «Parasit» werde ich mich im Kapitel über Mischkultur noch ausführlicher befassen. Es sei nur darauf hingewiesen, daß diese «ontogenetische Verschiebung der Krankheitsbereitschaft» (G ä u m a n n, 1951, S. 473) eine über das ganze Pflanzen- und Tierreich verbreitete Erscheinung ist.

Als zweite Bezugseinheit stand nun neben der Wurzellänge noch das Trockengewicht der Wurzel zur Verfügung. Daß die Wurzelgewichte ziemlich verschieden sind und daß sie auch mit den zugehörigen Längen in keinem aus diesen Zahlen ersichtlichen Zusammenhang stehen, zeigt die Tabelle 11.

Aus den Quotienten Zinkgehalt der Pflanze und Wurzeltrockengewicht läßt sich nur der Schluß ziehen, daß das Wurzelgewicht sich nicht als Bezugsgröße eignet, ebensowenig wie das Trockengewicht der ganzen Pflanze (siehe S. 116). Da in Schüttelkulturen sehr viele Wurzeln gebildet werden, die in der feuchten Luft hängen und die Lösung gar nicht erreichen, schätzungsweise die Hälfte bis zwei Drittel der gesamten Wurzelmasse, so ist dies zu verstehen.

Die in Prozent ausgedrückte, auf den Zinkgehalt der Nährlösung bezogene, mittlere Zinkaufnahme nimmt in diesem Versuch mit steigender Zinkkonzentration in der Lösung ab (Tabelle 10). Dasselbe fand auch J a v i l l i e r (1908) mit *Weizen*. Aus den in Tabelle 7 genannten Werten war dies nicht hervorgegangen, betrug doch die prozentuale Zinkaufnahme dort überall zirka 50 %.

Wiederum steigen die mittleren Zinkaufnahmen fast proportional mit dem Zinkgehalt der Nährlösung an, nämlich im Verhältnis 1 : 2,18 : 4,19 (Nährlösung 1 : 2,5 : 6) (siehe auch S. 127 für den vorhergehenden Versuch).

Es fällt auf, daß die absoluten Zinkmengen in Sproß und Wurzel nicht groß voneinander abweichen. Bei J a v i l l i e r (1908) dagegen war das Verhältnis des Zinkgehaltes der oberirdischen zu dem der unterirdischen Teile von *Weizen*-Pflanzen nach zwei Monaten Kultur ganz verschieden, aber in keinem Zusammenhang mit der Zinkkonzentration der Nährlösung stehend. In allen Fällen enthielt der Sproß

mengenmäßig mehr Zink als die Wurzel. Daß aber, auf ein Gramm Trockengewicht bezogen, die Wurzel stets viel zinkreicher ist als der Sproß, geht klar aus J a v i l l i e r s und meinen Messungen hervor.

#### d) Zinkaufnahme unter veränderten Bedingungen

In Anbetracht des Planes, *Mais* und *Aspergillus niger* in Mischkultur wachsen und Zink aufnehmen zu lassen, mußten verschiedene Bedingungen, die für das Gedeihen des Pilzes notwendig sind, in ihrer Wirkung auf *Mais* ausprobiert werden. Als erste kam ein Zusatz von Glukose zur Nährlösung in Frage, auf den *Aspergillus* keinesfalls verzichten kann. Da Vorversuche gezeigt hatten, daß der Pilz sich nur dann neben *Mais* entwickeln konnte, wenn die Bedingungen für sein Wachstum möglichst günstig waren, wurden ziemlich hohe Glukosekonzentrationen angewendet, nämlich 2,5 ‰, 5 ‰, 7,5 ‰ und 10 ‰.

*Mais*pflanzen wurden nun aseptisch in Röhrchen nach V i r t a n e n herangezogen und vom dritten bis fünften Tag nach der Quellung in die glukosehaltige Nährlösung versetzt, der 1 mg Zn/l beigegeben war, und bis zum 21. Tag in der Schüttelapparatur weiter wachsen gelassen. Zu Beginn entwickelten sich die Pflanzen normal, die Blätter entfalteten sich wie gewöhnlich, doch zeigten die Wurzeln bald einen gewissen Wachstumsstillstand; in die 10 ‰ Glukose enthaltende Lösung tauchten sie überhaupt kaum ein. Auch waren die Pflanzen einer erhöhten Infektionsgefahr ausgesetzt und machten am Ende des Versuchs einen schwächlichen Eindruck (Tabelle 12).

Tabelle 12

Wurzellänge und Zinkgehalt von *Mais* nach 21 Tagen. Nährlösung mit 1 mg Zn/l Mittelwerte aus drei Einzelbestimmungen. Streuung des Mittelwertes  $\sigma_M$  berechnet

Glukose- gehalt der Nährlösung in ‰	Wurzel- länge in cm	Trocken- gewicht in g	Zinkgehalt von Mais in $\gamma$	Zinkaufnahme		Zinkgehalt Wurzellänge in $\gamma/cm$
				in $\gamma$	bezogen auf Zinkgehalt der Nähr- lösung in ‰	
0	66,7	0,211	63 $\pm$ 1,1	52,0	100	0,94
2,5	45,3	0,281	23,7 $\pm$ 4,7	12,7	26	0,52
5	30,7	0,297	29,7 $\pm$ 7,5	18,7	38	0,97
7,5	22,0	0,347	29,3 $\pm$ 6,4	18,3	36	1,33
10	ca. 10	0,289	15 $\pm$ 2	4,0	8	1,5

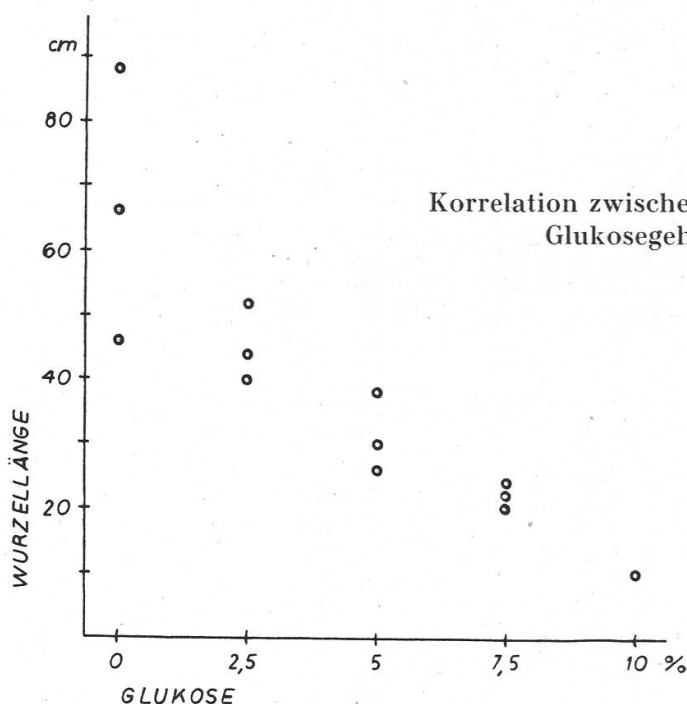
Trägt man die Wurzellänge in Abhängigkeit vom Glukosegehalt der Nährlösung auf, so ergibt sich eine eindeutige, negative Korrelation (Figur 5). Es zeigt sich, daß mit steigendem Glukosegehalt der Nährlösung das Längenwachstum der Wurzeln eingeschränkt ist, was vermutlich auf ungünstige osmotische Verhältnisse zurückzuführen ist.



Weit weniger deutlich ist hier der Zusammenhang zwischen Wurzellänge und Zinkgehalt, was aus den in Tabelle 12 berechneten Quotienten zu entnehmen ist. Der Zinkgehalt sollte gerade in diesem Versuch auf die Länge der in die Nährlösung eintauchenden Spitzen aller Wurzeln bezogen werden können und nicht auf die Gesamtlänge der Hauptwurzel.

Eines geht klar hervor, nämlich daß Glukose in jeder der angewendeten Konzentrationen einen hemmenden Einfluß auf die Zinkaufnahme des *Maises* hat.

Wie auch van Andel, Arisz und Helder (1950) berichten, hatten 2 % Glukose im Licht wie in Dunkelheit einen fördernden Ein-



fluß auf die Phosphataufnahme von 16 bis 21 Tage altem *Mais*, einen leicht hemmenden dagegen auf das Sproßwachstum. Der mittlere Zinkgehalt und die auf den Zinkgehalt der Nährlösung bezogene Zinkaufnahme der 21 Tage alten Pflanzen ist bedeutend geringer als die von glukosefrei aufgezogenen; es zeigt dies Tabelle 12. Vergleicht man die Zinkgehalte bei 2,5 %, 5 % und 7,5 % Glukose untereinander nach dem *t*-Test, so ergeben sich nur zufällige Unterschiede, *p* beträgt 50—60 %, dagegen bestehen sichere Unterschiede zwischen dem Zinkgehalt der drei niederen Glukosekonzentrationen und dem bei 10 %, *p* ist dann 1 bis 1,5 %.

Dieser Versuch ergibt aber kein getreues Abbild der Verhältnisse in Mischkultur, indem *Mais* mit *Aspergillus niger* am zwölften Tag in derselben Nährlösung vereinigt wurde, also erst dann in ein glukosehaltiges

Milieu gelangte. Um festzustellen, wieviel dies auf die Zinkaufnahme ausmachte, wurden Keimlinge am zwölften Tag nach der Quellung unter aseptischen Bedingungen in 10 % Glukose und 1 mg Zn/l enthaltende Nährlösung versetzt und in der Schüttelapparatur bis zum 21. Tag kultiviert. Zur gleichen Zeit angesetzter *Mais* enthielt am zwölften Tag  $15,7 \pm 0,9 \gamma$  Zink.

Das Gedeihen des bei 10 % Glukose wachsenden *Maises* war im Vergleich zu dem der Kontrollpflanzen schlecht: Die Wurzeln schienen nicht mehr weiter zu wachsen und wurden allmählich braun. Die Blätter waren bei Versuchsende verfärbt und merkwürdig steif. Über den Zinkgehalt gibt Tabelle 13 Auskunft.

Tabelle 13

Zinkgehalt von *Mais* nach 21 Tagen Kultur in Nährlösung mit 1 mg Zn/l  
Mittelwerte aus 3—4 Einzelbestimmungen. Streuung des Mittelwertes  $\sigma_M$  berechnet

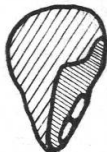
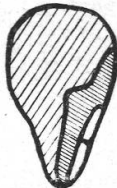




Glukosekonzentration der Nährlösung in %	Wurzellänge in cm	Trockengewicht in g	Zinkgehalt des <i>Maises</i> in $\gamma$	Zinkaufnahme pro Pflanze in $\gamma$	Zinkaufnahme bez. auf Zinkgehalt der Nährlösung in %
10	44,3	$0,678 \pm 0,035$	$42,3 \pm 4,3$	31,3	62,6
0	45	$0,255 \pm 0,017$	$45 \pm 2,1$	34	68

In diesem Versuch ist kein die Zinkaufnahme hemmender Einfluß der Glukose zu bemerken, trotz dem eigentümlichen Äußern und dem abnormal hohen Trockengewicht der Pflanzen. Schädete Glukose in der höchsten Konzentration, erst am zwölften Tag zugegeben, der Zinkaufnahme des *Maises* nicht, so durfte ich annehmen, daß die niedrigeren Konzentrationen ebenfalls ohne Wirkung auf den Zinkgehalt sein würden.

Zum zweiten sollte untersucht werden, ob der für *Aspergillus* erwünschte höhere Mangan- und Kupferzusatz zur Nährlösung der Mischkulturen die Zinkaufnahme von *Mais* beeinflussen würde. Daß weder Mangan noch Kupfer in der angewendeten Konzentration (3,7 mg Mn/l und 1 mg Cu/l an Stelle von 0,37 mg Mn/l und 0,1 mg Cu/l) sich in der äußeren Erscheinung des *Maises* bemerkbar machten, hatten bereits die Vorversuche gezeigt (siehe S. 111). Der Zinkgehalt 21 Tage alter Pflanzen betrug auf höheren Manganzusatz  $45,3 \pm 1,8 \gamma$  und auf höheren Kupferzusatz  $46 \pm 1 \gamma$ , was als normal betrachtet werden kann.

### 3. Verschiebung von Zink innerhalb der Organe während des Wachstums

Es stellte sich die Frage, wie sich das in *Mais*pflanzen gefundene Zink, das ursprünglich darin enthaltene und das aus der Nährlösung aufgenommene, auf die verschiedenen Organe verteilte. Die Ergebnisse der bei Karyopsen einerseits und bei Keimlingen von 3, 6, 12 und

	UNGEQUOLLEN	GEQUOLLEN	3 TAGE	6 TAGE	12 TAGE	21 TAGE
						
ENDOSPERM	2,75 ± 0,25 (8,5 ± 0,02)	2,4 ± 0,22 (7,5 ± 0,7)	~ 2,5 —	2,5 ± 0,35 (12 ± 0,5)	1 ± 0,3 (72 ± 13)	1,3 ± 0,33 (73,5 ± 13,0)
SCUTELLUM	7,7 ± 0,7 (174,5 ± 4,5)	7,25 ± 0,25 (156 ± 16)	4,6 ± 0,4 (138 ± 13)	4,7 ± 0,3 (139 ± 4)	3,0 ± 0,52 (103 ± 9,9)	1,5 ± 0,5 (86 ± 15)
SPROSS	0,2 ± 0,1 (34,2 ± 19,8)	0,44 ± 0,06 (115 ± 30)	1,5 ± 0,66 (89 ± 11)	3,7 ± 0,24 (88 ± 12,5)	16,1 ± 5,0 (114 ± 28)	29 ± 5,7 (240 ± 44)
WURZEL			0,9 ± 0,1 (103 ± 17)			21,5 ± 3,2 (402,5 ± 18,5)
TOTAL	10,65	10,09	~ 9,5	10,9	20,07	53,3

Figur 6 und Tabelle 14

Zinkgehalt der einzelnen Organe von *Mais*körnern und -keimlingen bis zu 21 Tagen Alter. Mittel aus zwei bis fünf Bestimmungen,  $\sigma_M$  berechnet. Angaben in  $\gamma$  pro Organ; in Klammern in  $\gamma$  pro Gramm Trockengewicht.

Weit schraffiert: Endosperm. Eng schraffiert: Scutellum  
Leer: Embryo bzw. Keimpflanze



21 Tagen Alter andererseits gemachten Bestimmungen sind in Tabelle 14 und Figur 6 wiedergegeben. Das Quellwasser war zinkfrei; die Nährlösung enthielt 1 mg Zn/l.

Wie schon in Abschnitt 1 (Seite 118) dargelegt, ist die im *Mais*korn enthaltene Zinkmenge zur Hauptsache auf den Embryo konzentriert.

Vom sechsten Tag an fängt das Trockengewicht des Endosperms an stark abzunehmen, und zu derselben Zeit beginnt auch eine Verschiebung seines Zinks in den Keimling. Anders beim Scutellum, dessen Trockengewicht in 21 Tagen kaum kleiner wird, bei dem dagegen gleich nach der Quellung ein bedeutender Teil des anfänglich in ihm enthaltenen Zinks in den Embryo abwandert, so daß am Versuchsende nur noch rund 20 % der ursprünglichen Menge darin zurückbleiben.

Der gesamte Zinkgehalt der Pflanzen ergibt bis zum sechsten Tag 9 bis 11 %, was, nach früheren Bestimmungen (siehe S. 117 ff.), dem autochthonen Gehalt des Korns entspricht.

Am zwölften Tag sind die Pflanzen in einem Entwicklungsstadium, in dem sie aus der Nährlösung bereits Zink aufgenommen haben. Die große Streuung des Zinkgehaltes deutet darauf hin, wie verschieden die Zinkaufnahme in diesem Zeitpunkt sein kann, je nach der Entwicklung der Keimlinge. Noch gar kein Zink hatten Pflanzen aufgenommen, die in Röhrrchen nach *Virtanen*, in die aseptisch mehrmals frische Nährlösung gegeben worden war, aufgewachsen waren.

Obwohl die Pflanzen etwa vom zehnten Tag an Zink aus der *Außenlösung* aufnehmen, wird doch weiterhin dem Scutellum und dem Endosperm Zink entzogen und in die wachsenden Organe übergeführt. Das aus dem Scutellum und das aus der Nährlösung aufgenommene Zink verteilt sich fast gleichmäßig auf Sproß und Wurzel, was für 21 Tage alte Pflanzen auch schon Tabelle 10 zu entnehmen ist. Es könnte verwundern (siehe auch S. 130), daß in grünen und in nichtassimilierenden Organen dieselben Zinkmengen angetroffen werden, ginge nicht aus Messungen von *Whately, Ordín und Arnón* (1951) hervor, daß in Blättern von *Zuckerrüben* mehr Zink außerhalb als in den Chloroplasten enthalten ist.

Aneurin, ein ebenfalls katalytisch wichtiger Stoff, befindet sich gleichermaßen innerhalb des *Mais*korns zur Hauptsache im Scutellum. Doch ist sein Verhalten insofern von dem des Zinks verschieden, als kein Transport in die wachsende Pflanze stattfindet (*Yen*, 1950).

### III. Zinkaufnahme von *Aspergillus niger*

Im Gegensatz zu *Mais*, der schon am Anfang jedes Versuchs in seinem Korn einen Zinkgehalt aufweist, was beim Berechnen der Zinkaufnahme berücksichtigt werden muß, darf bei *Aspergillus niger* die Zinkaufnahme gleich dem Zinkgehalt am Ende der Kultur gesetzt wer-

den. Der Zinkgehalt des Impfgutes ist kleiner als der berechnete Meßfehler ( $= 2 \gamma$ ), was daraus hervorgeht, daß in zinkfrei aufgezogenen Mycelien jeweils  $1 \gamma$  Zink gefunden wurde.

### 1. In Deckenkulturen

Die folgenden Versuche sollten die Zinkaufnahme aus einer für *Aspergillus* geeigneten Nährlösung zeigen, nämlich der von G o l l m i c k (1936) und M u l d e r (1940), der nur kleine Mengen Zink zugegeben waren. Sie mußte daher, wie auch die Kulturkolben, der auf Seite 106 beschriebenen Reinigung mit Dithizon unterworfen werden. Auf einen Kolben kamen  $25 \text{ cm}^3$  Nährlösung, woraus sich eine Schichtdicke von zirka  $1/2 \text{ cm}$  ergab. Damit war das Konzentrationsgefälle der Nährstoffe zwischen unteren und oberen Teilen der Lösung gering, und die Mycelien waren fast vollständig benetzt und umspült.

Die angewendeten Glukosekonzentrationen waren 2 ‰, 1 ‰ und 0,5 ‰, mit der Nährlösung zum Liter gelöst. Zink wurde zugegeben pro Kolben  $0 \gamma$ ,  $10 \gamma$  ( $= 0,4 \text{ mg/l}$ ) und 20, 25 oder  $30 \gamma$  ( $= 0,8$ , 1 oder  $1,2 \text{ mg Zn/l}$ ) je nach Versuch, wie aus der Tabelle 15 zu ersehen ist. Zwei Kolben enthielten jeweils dieselbe Zink- und Glukosekonzentration.

Zunächst wurde je ein Versuch mit einer Glukose- und drei Zinkkonzentrationen angestellt. Um die Ergebnisse zu sichern und Vergleichsmöglichkeiten zu schaffen, wurde der Versuch mit 0,5 ‰ Glukose wiederholt und dazu aus den Versuchen mit 1 und 2 ‰ Glukose je eine Zinkkonzentration herausgegriffen, nämlich  $0,4 \text{ mg Zn/l}$ .

Nach dem Beimpfen mit der Sporensuspension stellte ich die Kolben in einen Thermostaten, wo sie bei  $30^\circ \text{ C}$  während mehrerer Tage blieben. Nach der Ernte wurde die Nährlösung auf ihre Wasserstoffionenkonzentration und mittels der F e h l i n g - Reaktion auf das Vorhandensein von Glukose geprüft.

Die Kulturen zeigten folgendes Bild: Ohne Zinkzugabe entwickelte sich eine dünne, weiße Pilzdecke ohne oder doch mit sehr wenig Sporen. Enthielt die Nährlösung Zink, so bildete sich das Mycel entsprechend dem Glukosegehalt der Nährlösung aus und war ganz mit braunschwarzen Konidien bedeckt. Die Nährlösung war am Ende der Versuche stets gelblich; es wurde wahrscheinlich gemacht, daß diese Färbung durch Laktoflavin hervorgerufen wurde, welches unter bestimmten Umständen von *Aspergillus niger* ausgeschieden wird (S a r a s i n , 1953).

Wie die Tabelle 15 zeigt, waren die Trockengewichte der mit Zinkzusatz gezogenen Pilze bei 1 und 2 ‰ Glukose größer als die der zinkfrei kultivierten. Dieser Unterschied glich sich aus bei Zugabe von nur 0,5 ‰ Glukose; hier war das Vorhandensein von Zink in der Nährlösung einzig an der Sporenbildung zu erkennen.

Die Zinkaufnahme richtete sich merkwürdigerweise nur danach, ob die Nährlösung Zink enthielt oder nicht. War kein Zink geboten, so war die Aufnahme der Mycelien praktisch gleich Null, im übrigen aber immer ungefähr gleich groß, unabhängig von der Zink- und der Glukosekonzentration der Nährlösung. Dabei wurde bei weitem nicht alles zur Verfügung stehende Zink aufgenommen, sondern von 10  $\gamma$  nur zirka die Hälfte und von höheren Zinkgaben etwa ein Fünftel.

Diese schwache Zinkaufnahme, sei sie nun auf ein geringes Absorptionsvermögen oder auf ein kleines Zinkbedürfnis unter den gewählten Bedingungen zurückzuführen, läßt sich in Zusammenhang bringen mit dem Kohlehydratstoffwechsel von *Aspergillus* (Tabelle 16).

Tabelle 15

Zinkaufnahme von *Aspergillus niger* A<sub>2</sub> in Deckenkultur, bei 30° C

Versuch 49: 6 Tage Kultur. Mycelien aus Nährlösung mit 0  $\gamma$  Zink gemeinsam aufgearbeitet, sonst Mittelwerte aus zwei Einzelbestimmungen und  $\sigma_M$  berechnet

Versuch 50: ebenso, aber 7 Tage Kultur

Versuch 51: 9 Tage Kultur, je zwei Mycelien gemeinsam aufgearbeitet

Versuch 91: 9 Tage Kultur, Mittelwerte aus zwei Einzelbestimmungen,  $\sigma_M$  berechnet

Ver- suchs- nummer	Glukose- konzentration in ‰	$\gamma$ Zink pro Kolben (25 cm <sup>3</sup> Nähr- lösung)	Trocken- gewicht in g	Zinkgehalt in $\gamma$	Zinkgehalt g Trockengewicht in $\gamma$	Zinkaufnahme bez. auf Zink- gehalt der Nähr- lösung in ‰
49	2	0	0,065	0,5	7,7	0
		10	0,163 $\pm$ 0,014	6,0 $\pm$ 1,5	37,8 $\pm$ 12,4	65
		25	0,151 $\pm$ 0,008	4,25 $\pm$ 0,25	28 $\pm$ 3	17,5
50	1	0	0,034	1	29	0
		10	0,0665 $\pm$ 0,0025	5 $\pm$ < 1,4	74,5 $\pm$ 3,5	50
		30	0,068 $\pm$ 0,005	5 $\pm$ 1,5	72,5 $\pm$ 21,5	16
51	0,5	0	0,033	1	30	0
		10	0,029	4	138	40
		20	0,027	3,5	130	17,5
91	0,5	0	0,045 $\pm$ 0,001	1,25 $\pm$ 0,25	28 $\pm$ 6	0
		10	0,038 $\pm$ 0,001	3,5 $\pm$ 0,5	91 $\pm$ 10	35
		20	0,037 $\pm$ 0,001	3,5 $\pm$ 0,5	94 $\pm$ 11	17,5
		1	0,085 $\pm$ 0,0025	2,5 $\pm$ 0,5	30 $\pm$ 7	25
		2	0,1525 $\pm$ 0,0005	4 $\pm$ < 1,4	26 $\pm$ < 1,4	40

Da die Quotienten Glukoseaufnahme pro Zinkaufnahme und Zinkaufnahme pro Gramm Trockengewicht für jede Glukose- und jede Zinkkonzentration verschieden, die Zinkaufnahmen aber (sofern die Nährlösung Zink enthielt) überall mehr oder weniger dieselben sind, darf daraus geschlossen werden, daß das absorbierte Zink weder zur Glukoseaufnahme noch zur Bildung der Trockenmasse in unmittelbarer Beziehung steht.



Tabelle 16

Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration und Glukoseaufnahme im Zusammenhang mit der Zinkaufnahme von *Aspergillus niger* A<sub>2</sub>

Versuchsnummer	Zink in $\gamma$ pro Kolben (25 cm <sup>3</sup> Nährlösung)	Glukosekonzentration in g/100 cm <sup>3</sup>	End-pH	Fehling-Reaktion	Glukoseaufnahme Zinkaufnahme in g in 100 cm <sup>3</sup> / $\gamma$
49	0	2	3,6	+	0,33
	10		6,7	Spur	
	25		6,7	Spur	
50	0	1	4,8	+	0,2
	10		6,7	—	
	30		6,5	—	
51	0	0,5	4,8	Spur	0,5
	10		6,4	—	0,125
	20		6,4	—	0,143

Die Ergebnisse des koordinierenden Versuchs (Tabelle 15, Nr. 91) waren nicht wesentlich anders, außer daß dort sämtliche Glukose in allen Kolben verbraucht worden war.

Wie der Tabelle 16 zu entnehmen ist, bildete der Pilz aber nur bei *Zinkmangel* Säuren, bei Zinkzusatz baute er die Glukose vollständig ab, was beweist, daß Zink hier beim Abbau der Glukose eine Rolle spielen muß.

Es wäre aber falsch, diesen Schluß zu verallgemeinern. Schon M o l l i a r d (1922) führte Säurebildung in Kulturen von *Aspergillus niger* auf Nährstoffmangel zurück, und ebenso zeigten C h e s t e r s und R o l i n s o n (1950), daß Säurebildung nicht spezifisch für Zinkmangel sei, sondern gerade so gut bei Magnesium-, Phosphor-, Kalium-, Eisen- oder Kupfermangel auftrete oder nach G a l l i (1946) bei Salz- mangel überhaupt.

Nimmt man in den hier beschriebenen Versuchen eine Beteiligung des Zinks am Glukoseabbau an, so fällt es auf, daß gleich viel Zink aufgenommen wurde, um 2, 1 oder 0,5 % Glukose in Wasser und Kohlensäure zu zerlegen. Es scheint, als ob Zink noch eine andere Funktion zukomme. Nach Ansicht von F o s t e r und D e n i s o n (1950) wird Zink von *Aspergillus niger* in eine hochmolekulare, eventuell wachstumshemmende Substanz eingebaut und wird auch zur Synthese oder als Bestandteil von Fermenten gebraucht. Das bei 0,5 und 1 % Glukosegehalt der Nährlösung im «Überfluß» aufgenommene Zink könnte auf diese Weise verwendet werden.

Im Gegensatz dazu berichten K a u f f m a n n - C o s l a und B r ü l l (1939), daß *Aspergillus niger* um so mehr Glukose resorbierte, je mehr Zink die Nährlösung enthielt, und selbst in hohen Zinkkonzentrationen ein normales Trockengewicht ausbildete, wenn ihm entsprechend viel

Glukose geboten wurde. Dies zeigt die Lebensnotwendigkeit von Zink. So schreibt auch P o r g e s (1932), daß *Aspergillus niger* mit Zink bedeutend mehr Zucker umsetzte und mehr Bau- und Reservestoffe bildete als ohne Zink. Es beweist aber noch nicht, daß Zink wirklich zur Glukoseassimilation gebraucht wird.

R o l i n s o n (1951) fand bei *Aspergillus niger* ein mit der Glukosekonzentration ansteigendes, minimales Zinkbedürfnis. Zink war für das Wachstum auf allen ausprobierten Kohlenstoffquellen notwendig, und zwar für deren *Abbau*, was mit den in Tabelle 15 und 16 dargelegten Versuchen übereinstimmt. R o l i n s o n glaubt dem Zink eine Rolle bei den auf die Bildung der Triosephosphate folgenden Abbaureaktionen zuweisen zu dürfen.

J a v i l l i e r (1908) gab 4,6 % Zucker und 500  $\gamma$  bzw. 1000  $\gamma$  Zink pro Kolben und 250 cm<sup>3</sup> R a u l i n - Nährlösung. Nach vier Tagen hatte *Aspergillus niger* bei 30° C sämtliches Zink aufgenommen. Demnach bestand auch in seinen Versuchen kein Zusammenhang zwischen Zink- und Glukoseaufnahme des Pilzes.

## 2. In Schüttelkulturen

Die folgenden Untersuchungen liefern keine Vergleichswerte zu den bereits beschriebenen Ergebnissen mit Deckenkulturen, sondern sie stellen Kontrollversuche über die Zinkaufnahme von *Aspergillus* unter den für die Mischkulturen gewählten, mit Rücksicht auf *Mais* zum Teil nicht optimalen Bedingungen dar.

Die Versuchsanstellung war folgende: Die Kolben mit 50 cm<sup>3</sup> der auf S. 113 als Nährlösung für Mischkultur bezeichneten Kulturflüssigkeit wurden mit dem Impfmateriale versehen, in die schon früher erwähnte Schüttelapparatur gebracht und darin während neun Tagen (Zeit des Zusammenlebens mit *Mais* in Mischkultur) bei 30° C geschüttelt. Die Frequenz war schon für *Mais* auf die von K l u y v e r und P e r q u i n (1933) als für Pilze günstig bezeichnete Zahl, zirka 80 Vollschwingungen pro Minute, eingestellt worden. Das Licht wechselte dabei mit den normalen Tageszeiten. Am dritten und sechsten Tag nach dem Impfen wurde die Wasserstoffionenkonzentration stichprobenweise und am Ende des Versuchs in allen Kolben bestimmt. Dann wurde auch der restliche Zuckergehalt der Nährlösung in einzelnen Kolben gemessen. Pro Versuch wurde stets eine Glukosekonzentration und alle drei Zinkkonzentrationen (1, 5, 10 mg Zn/l) angewendet, je drei Kolben erhielten die gleiche Zinkmenge. Ein weiterer Kolben mit 1 mg Zn/l wurde während jedes Versuchs im Thermostaten bei 30° C gehalten, um wenigstens einen Eindruck zu bekommen, was in Entwicklung und Stoffwechsel einer Deckenkultur anders verlaufen könnte als in Schüttelkulturen.

*Aspergillus* bildete die als «Reiskornmycel» bekannten Hyphenklumpen aus. Diese waren von verschiedener Form, kleine und große Kugeln, Schlangen und unregelmäßige Zusammenballungen. Ihre Zahl

Tabelle 17

Zinkaufnahme von *Aspergillus niger* A<sub>2</sub> in Schüttelkultur. Streuung des Mittelwertes berechnet,  $\sigma_M$ . Mittelwerte kursiv gedruckt

Zinkkonzentration der Nährlösung in mg/l	Glukosekonzentration der Nährlösung in ‰	Aussehen des Mycels (K = Körner)	Trockengewicht Mittel aus drei in g	Zinkgehalt in $\gamma$	Zinkgehalt in $\gamma$ g Trockengewicht
1	5	10 bis 15 K .....	0,062 ± 0,003	7	115
		große .....		8	119
		bräunl. weiße .....		5	87
				<i>6,7 ± 0,9</i>	<i>107 ± 10</i>
5		viele kleine .....	0,066 ± 0,001	10,5	164
		viele kleine .....		11,5	177
		kl. + 2 Würste ....		13,5	198
				<i>11,8 ± 0,6</i>	<i>179 ± 10</i>
10		—	0,058 ± 0,004	—	—
		viele kleine .....		24	387
		9 große K .....		28	518
				<i>26 ± 2</i>	<i>452 ± 66</i>
1	7,5	weiß, mittelgroß ...	0,064 ± 0,0015	3	48
		weiß, mittelgroß ...		5	51
		weiß, mittelgroß ...		5	75
				<i>4,3 ± 0,7</i>	<i>58 ± 8,5</i>
5		mittelgroß .....	0,062 ± 0,01	10	141
		klein, weiß .....		6	76
		klein, weiß .....		8	182
				<i>8 ± 1,15</i>	<i>133 ± 30</i>
10		8 große K .....	0,061 ± 0,002	28	440
		25 große K .....		23	384
		viele kleine .....		14	240
				<i>21,7 ± 4</i>	<i>354 ± 60</i>
1	10	6 große K .....	0,043 ± 0,002	4	89
		20 mittlere .....		3	65
		viele kleine .....		2	50
				<i>3 ± 0,6</i>	<i>68 ± 11</i>
5		ca. 20 mittlere K ..	0,043 ± 0,0013	3	72
		ca. 20 mittlere K ..		9	195
		ca. 20 mittlere K ..		8	190
				<i>6,7 ± 1,8</i>	<i>152 ± 40</i>
10		13 große K .....	0,037 ± 0,0035	15	484
		16 große K .....		14	326
		viele kleine .....		8	216
				<i>12,3 ± 2,2</i>	<i>342 ± 78</i>



pro Kolben nahm mit ihrer Größe ab. Die Farbe spielte von bräunlich bis zu rein weiß. Es konnte indessen weder bei Form noch Farbe eine Beziehung mit der Zink- oder Glukosekonzentration der Nährlösung erkannt werden. Die Beschaffenheit des Mycels ist jeweils in der vorstehenden Tabelle 17 auch angegeben.

Auf den ersten Blick scheinen die Trockengewichte der Tabelle 17 sehr gering, da doch der Zuckergehalt der Nährlösung ziemlich hoch war. Indessen enthielt die Nährlösung nur kleine Mengen an anorganischen Salzen; Stickstoff war vermutlich im Minimum. Die Zinkkonzentrationen üben keinen Einfluß auf das Trockengewicht aus, und die Unterschiede, die darin durch die verschiedenen Glukosegaben (5 und 7,5 % einerseits und 10 % andererseits) auftraten, scheinen mir nur zufällig entstanden zu sein, wiewohl  $p$  nach dem  $t$ -Test immerhin 1,7 % beträgt. Jedenfalls steigt das Trockengewicht nicht mit der Glukosekonzentration an, wie dies bei den Deckenkulturen der Fall war (Tabelle 15).

Auch die Zinkaufnahmen nehmen nicht im gleichen Sinn zu wie die Glukosekonzentrationen, dagegen sind sie abhängig vom Zinkgehalt der Nährlösung. Um die statistische Sicherheit der Ergebnisse zu prüfen, wurde der  $z$ -Test auf alle drei Versuche angewendet. Es ergab sich folgendes:

$A =$ Streuungen zwischen Einzelmessungen . . . . .	$= 10,35$	$n = 17$	
$B =$ Streuung durch Zinkkonzentrationen hervorgerufen . . . . .	$= 471,52$	$n = 2$	$p = \ll 1 \%$
$C =$ Streuung durch Glukosekonzentrationen hervorgerufen oder durch Unterschiede zwischen den Versuchen . . . . .	$= 123,10$	$n = 2$	$p = 1 \%$
$D =$ Rest, Wechselbeziehungen . . . . .	$= 18,435$	$n = 4$	$p = 20 \%$

Mit  $n$  sind die Freiheitsgrade, mit  $p$  die Wahrscheinlichkeit bezeichnet für ein zufälliges Eintreten solcher Ergebnisse.

Der Einfluß der Zinkkonzentration der Nährlösung auf den Zinkgehalt der Mycelien ist somit erwiesen. Wie groß der Einfluß der Glukosekonzentration auf die Zinkaufnahme ist, kann nicht entschieden werden, da ja unter die Streuung  $C$  nicht nur die auf verschiedenen Glukosegaben beruhenden, sondern auch die auf ungleiche Versuchsanstellung zurückzuführenden Unterschiede fallen (zum Beispiel Sporenmaterial).

Die Veränderung des Wasserstoffionen- und des Glukosegehaltes der Nährlösung ist in Tabelle 18 dargestellt.

Das  $pH$  sank in den ersten drei Tagen am stärksten (Anfangs- $pH$  6,2), vom dritten Tag an bis zum Ende nur noch wenig, was sich ver-

stehen läßt als Folge der ebenfalls bei Versuchsbeginn rasch, später langsam anwachsenden Zahl von Zellen, die aus Zucker Säuren bilden. Der Endwert der Wasserstoffionenkonzentration liegt zwischen pH 2 und 3; wie weit er mit der Menge der verbrauchten Glukose in Beziehung gebracht werden kann, ist nicht festzustellen wegen des geringen Zahlenmaterials.

Tabelle 18

*Aspergillus niger* A<sub>2</sub> in Schüttelkultur. Abnahme des pH und des Glukosegehaltes der Nährlösung in neun Tagen. Stichproben und Einzelbestimmungen

Zinkkonzentration der Nährlösung in mg/l	Glukosekonzentration der Nährlösung in g/100 cm <sup>3</sup>	Wasserstoffionenkonzentration in pH-Einheiten			Glukosegehalt der Nährlösung 9. Tag in g/100 cm <sup>3</sup>	Vom Pilz resorbierte Glukose in g/100 cm <sup>3</sup>	Glukoseaufnahme Zinkaufnahme in g in 100 cm <sup>3</sup> /γ
		3. Tag	6. Tag	9. Tag			
1	5	3,5	3,4	3,0	3,6	1,4	0,21
5		3,5	—	2,7	3,5	1,5	0,125
10		3,2	3,5	2,9	3,5	1,5	0,058
1	7,5	—	2,2	2,0	5,1	2,4	0,32
5		—	2,2	2,1	4,8	2,7	0,21
10		—	3,4	2,5	5,1	2,4	0,06
1	10	3,4	2,8	2,7	8,9	1,1	0,37
5		3,4	2,8	2,5	8,4	1,6	0,24
10		6,2	3,3	2,6	9,0	1,0	0,081

Aus den Quotienten Glukoseaufnahme pro Zinkaufnahme läßt sich nur das bestätigen, was auch aus der Tabelle hervorgeht, daß nämlich der Zinkgehalt der Nährlösung zwar einen Einfluß auf die Zinkaufnahme der Pflanzen, nicht aber auf ihre Glukoseresorption hat. Daher werden die Quotienten in jedem Versuch mit wachsender Zinkkonzentration in der Nährlösung kleiner. Auch in diesen Versuchen, sowenig wie in den schon erwähnten mit Deckenkulturen, konnten die Folgerungen von K a u f f m a n n - C o s l a und B r ü l l (1939) als richtig erkannt werden; Glukoseverbrauch und Zinkaufnahme stehen in keiner Beziehung zueinander.

Wie eingangs erwähnt, war das Aussehen der «Reiskörner» von großer Mannigfaltigkeit, ohne irgendwie an Zink- oder Glukosegehalt der Nährlösung gebunden zu sein. In vielen Fällen traf es sich aber, daß innerhalb einer Serie in großen Klumpen mehr Zink gefunden wurde als in vielen kleinen Kügelchen. Besonders in dem auf das Trockengewicht bezogenen Zinkgehalt der Mycelien kam dieser Zusammenhang zum Vorschein. Als Beispiel mögen hier die in Tabelle 17 aufgeführten Pilze Nrn. 1, 2, 6, 9 bei 5 % Glukose, Nrn. 7 und 8 bei 7,5 % Glukose, Nrn. 7 und 8 bei 10 % Glukose dienen.

Hierher gehört auch die Betrachtung der Deckenkulturen, die, obgleich in Einzahl pro Versuch, doch ein im ganzen einheitliches Bild liefern, wie die Tabelle 19 zeigt.

Tabelle 19

Zinkaufnahme von *Aspergillus niger* A<sub>2</sub>. Deckenkulturen auf der «Maisnährlösung» als Vergleich zu den Schüttelkulturen (siehe Tabelle 17). Einzelbestimmungen

	Zinkkonzentration der Nährlösung in mg/l	Glukosekonzentration der Nährlösung in ‰	Trockengewicht in g	Zinkgehalt in γ	Zinkgehalt g Trockengewicht in γ
Deckenkultur	1	5	0,048	8,5	177
	1	7,5	0,043	9	209
	1	10	0,042	15	357
Schüttelkultur	1	5	0,062	6,7	107
	1	7,5	0,064	4,3	58
	1	10	0,043	3	68

In allen Fällen hatten die Pilzdecken mehr Zink aufgenommen als die unter sonst gleichen Bedingungen geschüttelten Mycelien. Dies gibt immerhin zu denken, da doch in Schüttelkulturen weit günstigere Verhältnisse für den Stoffwechsel vorliegen, indem die Zellen mit Nährstoffen und Luft gleichmäßiger versorgt werden als in ruhenden Kulturen. Man könnte zur Erklärung annehmen, daß unter der Einwirkung eines gewissen Sauerstoffmangels im Innern der größeren «Reiskörner» und auf der Unterseite der Pilzdecke eben mehr Zink benötigt wird, um eine bestimmte Reaktion ablaufen zu lassen. Es ist nach den oben genannten Werten nicht ausgeschlossen, daß bei Deckenkultur von *Aspergillus*, auch unter Verwendung der «Maisnährlösung», mit steigendem Glukosegehalt der Nährlösung die Zinkaufnahme, auch pro Gramm Trockengewicht berechnet, zunähme.

Wohl die meisten der bisher gemachten Untersuchungen über das Zinkbedürfnis von *Aspergillus niger* bei verschiedenen Kohlenstoffquellen (R o l i n s o n , 1951) oder bei verschiedenem Glukosegehalt der Nährlösung (K a u f f m a n n - C o s l a und B r ü l l , 1939), ferner die Studien S t e i n b e r g s , R o b e r g s und anderer, waren an Deckenkulturen ausgeführt. Möglicherweise hätten diese Forscher mit Schüttelkulturen von ihren bisherigen Versuchen abweichende Resultate erzielt.

#### IV. Zinkaufnahme von *Zea Mays* und *Aspergillus niger* in Mischkultur

##### 1. Vorversuche über günstige Bedingungen für das Wachstum beider Partner in Mischkultur

Die Zahl der Vorversuche ist groß. Ihre Ergebnisse können hier nicht einzeln dargestellt werden, dagegen wird im folgenden versucht, die Schwierigkeiten, die sich allmählich herauskristallisierten, aus ihrem Zusammenhang zu lösen und zu zeigen, wie sie abgeklärt oder umgangen werden konnten. Die Frage nach der Zinkaufnahme der beiden



Organismen wurde zunächst ganz in den Hintergrund gedrängt von dem Problem, *Mais* und *Aspergillus* in gemeinsamer Kultur wachsen zu lassen.

### Nährlösung

Damit *Mais* gut wuchs, mußte die verdünnte Nährlösung (siehe S. 113) angewendet werden. In unverdünnter K n o p scher Nährlösung litten die Pflanzen verhältnismäßig oft an den genannten Entwicklungsstörungen (S. 109) und konnten sich bei Anwesenheit des Pilzes nie davon erholen.

### Wasserstoffionenkonzentration

*Aspergillus* bildet im allgemeinen aus dem ihm zur Verfügung stehenden Zucker Säure. Die Wasserstoffionenkonzentration verschiebt sich in wenigen Tagen von pH 6 bis pH 3; pH 4 ist aber für die *Mais*-wurzeln bereits nicht mehr günstig. Es wurde versucht, dem Abhilfe zu schaffen:

1. durch Pufferzusatz zur Nährlösung. Aus früher erwähnten Gründen kamen alle organische Stoffe enthaltenden Puffer nicht in Frage. Phosphatpuffer nach S ö r e n s e n wurde  $m/15$  bei 2 % Saccharose und  $m/45$  bei 0,25 % Glukose angewendet. Wohl blieb das pH nun während zirka drei Wochen konstant, doch schadete noch  $m/45$  Phosphatpuffer dem *Mais*, so daß von dessen Verwendung ganz abgesehen wurde (S. 109);
2. durch Zugabe von wenig Zucker (0,25 %) zur Nährlösung. *Aspergillus niger* wurde in Einzelkultur einerseits auf P f e f f e r - R o b b i n s - Nährlösung mit 0,25 % Saccharose gezogen: das pH sank in sieben Tagen von 7 auf 6; andererseits in auf ein Drittel verdünnter K n o p - Nährlösung mit 0,25 % Glukose, worauf die Wasserstoffionenkonzentration in 18 Tagen unverändert blieb. Dagegen ging das pH in der auf ein Fünftel und ein Zehntel verdünnten K n o p schen Nährlösung in einer Mischkultur von *Aspergillus* und *Mais* innert 14 Tagen von 6,5 auf 3,6 hinunter.

*Mais* ist also schuld an der Säureproduktion des Pilzes, da er selbstverständlich einen Teil der Nährsalze aufnimmt und das Gleichgewicht zwischen Glukose und anorganischen Stoffen verändert (M o l l i a r d , 1922).

### Wachstum von *Aspergillus niger*

Je älter die *Mais*pflanzen waren, in deren Nährlösung *Aspergillus niger* wachsen sollte, desto ungünstiger gestalteten sich die Verhältnisse für sein Gedeihen. Wuchs der Pilz bei 5 % Glukose in der Nährlösung neben drei- bis siebentägigem *Mais* ausgesprochen gut, so kam er neben 18 Tage altem *Mais* kaum mehr auf. Mit 0,25 % Glukose gedieh er als

Partner von sechs bis sieben Tage altem *Mais* in manchen Fällen gar nicht oder nur sehr mäßig.

Dies mochte seinen Grund darin haben, daß durch Atmung und Stoffaufnahme der Wurzeln die keimenden Sporen unter Sauerstoff- oder Nährstoffmangel litten oder auch in der Ausscheidung eines das Pilzwachstum hemmenden Stoffs durch die höhere Pflanze. Seiler (1951) wies nach, daß *Mais*wurzeln Stoffe ausscheiden, die ihr eigenes Wachstum hemmen.

Die Nährlösung wurde daher vor dem Impfen von *Aspergillus* erneuert, so daß sie frei von eventuellen Wurzelausscheidungen war und beiden Pflanzen zu Beginn des Zusammenlebens der unverminderte Gehalt an Ionen und Sauerstoff zur Verfügung stand. Die Glukosegabe betrug immer mindestens 5 %.

#### *Zeitpunkt des Beginns der Mischkultur*

Bei der Wahl des Zeitpunktes war einerseits auf den Beginn der Zinkaufnahme von *Mais*, andererseits auf das S. 144/145 bereits Gesagte Rücksicht zu nehmen.

Nachdem einmal feststand, daß *Mais* in den ersten sieben Tagen bei einem Angebot von 1 bis 10 mg Zn/l kein Zink aufnahm und erst vom achten bis elften Tag einen höheren Zinkgehalt aufwies, als dem des Korns allein entsprach, wurde der Beginn der Mischkultur auf den zwölften Tag, nach vollendeter Quellung des *Maises*, verlegt. Von diesem Zeitpunkt an befanden sich beide Organismen im Stadium der Zinkaufnahme. Alles andere war nun danach zu richten, daß *Aspergillus* dann noch neben *Mais* gedeihen konnte.

#### *Versorgung des Mycels mit Luft und Nährlösung*

Die Nährlösung sollte beide Organismen gleichmäßig umspülen. *Aspergillus* setzte sich jedoch auf den *Mais*wurzeln fest, umwuchs und verschleimte sie und stieg auch im Keimrohr hoch bis zum Korn. Die Nährstoffe gelangten so nur durch «Vermittlung» des Pilzes an den *Mais*.

Andererseits bestand die Gefahr, daß die Wurzeln selbst auf der vor dem Impfen erneuerten Nährlösung binnen weniger Stunden fast allen Sauerstoff aufnahmen, so wie dies Schmucki (1949) für *Weizen*wurzeln zeigte. *Aspergillus* würde dann am Anfang unter einem Mangel leiden, bis er, nach Bildung einer auf der Nährlösung liegenden Decke, die Wurzeln von der Zufuhr frischer Luft abschnitt.

Alles bisher Gesagte bezieht sich auf Deckenkulturen. Abhilfe konnte hier durch Schütteln der Kolben geschafft werden. Auf diese

Weise kam ständig frischer Sauerstoff in die Nährlösung, und *Aspergillus* bildete keine Decke, sondern z. T. ein Reiskornmycel.

#### *Dauer der Versuche und Wachstum des Mais*

Die Dauer der Mischkultur wurde auf neun Tage festgesetzt, der *Mais* war dann bei Versuchsende 21 Tage alt. In dieser Zeit konnten beide Organismen sich entwickeln und ihren Zinkgehalt so weit erhöhen, daß er deutlich verschieden war von dem zu Beginn der Mischkultur. Dies war den Ergebnissen zu entnehmen, die die Versuche mit Einzelkulturen gezeitigt hatten.

Es war jedoch nicht zu übersehen, daß *Aspergillus niger* einen ungünstigen Einfluß auf *Mais* ausübte und daß die Schädigung weder einem Sauerstoff- noch einem Nährstoffmangel noch dem hohen Wasserstoffionen- oder Glukosegehalt der Nährlösung allein zuzuschreiben war. In erster Linie mußte dafür ein Antibiotikum verantwortlich gemacht werden, das in Form eines Welkestoffes auf *Mais* einwirkte. In Mischkultur mit *Aspergillus niger* zeigte sich neben dem Welken der Blätter vor allem ein großer Anthocyanreichtum: Blätter und Stengel wurden weinrot. Dasselbe beobachteten R e e d und B e c k (1939) neben Chlorose an *Mais*, der unter Zinkmangel litt. Während *Aspergillus flavus* eine infektiöse Chlorose an *Mais*pflanzen hervorrufen soll (K o e h l e r und W o o d w o r t h , 1938), fanden dieselben Autoren keine Krankheit nach Infektion mit *Aspergillus niger*. Ebenso wenig konnte Gill-C a r e y (1949) eine antibiotische Wirkung von *Aspergillus niger* auf verschiedene, für den Menschen pathogene Bakterien feststellen. S e i l e r (1951, S. 655 und Figur 25) zeigte dagegen im hiesigen Institut und mit der von mir verwendeten *Mais*-Rasse und *Aspergillus niger*, daß die Wurzeln von zwei bis vier Tage altem *Mais* in Nährlösung, auf der *Aspergillus niger* kultiviert worden war, ihr Wachstum ganz einstellten. Überdies wird nach B u s t i n z a und C a b a l l e r o (1947) die Keimung von *Raphanus*-Samen unter dem Einfluß von Antibiotika stark gehemmt.

Welken und Verfärbung fingen meist am sechsten bis siebenten Tag nach dem Impfen an, der *Mais* vegetierte dann weiter bis zum neunten Tag. Die jüngsten Blätter blieben stets gesund und grün und Neubildung und Wachstum von Wurzeln außerhalb der Nährlösung hörten bis zuletzt nicht auf.

#### *Endgültige Anordnung für die Versuche*

Der gequollene *Mais* wurde in eine Nährlösung versetzt, die die Spurenelemente bereits in der für die Mischkultur richtigen Konzentration enthielt, dagegen stets nur 1 mg Zink im Liter. Nach zwölf Tagen wurden die zwölf besten Pflanzen ausgesucht, ihre Kolben nummeriert und dabei darauf gesehen, daß in den beiden Gruppen 1—6



und 7—12 gleich viele gut entwickelte Individuen waren. Die alte Nährlösung wurde dann in einem keimfreien Raum und unter aseptischen Bedingungen gegen neue vertauscht. Diese, welche sowohl Zink als auch Glukose in der gewünschten Konzentration enthielt und in einem Vorratskolben sterilisiert worden war, wurde nun 50-cm<sup>3</sup>-weise aus einem sterilisierten Maßgefäß auf die Kolben verteilt. Da dies rasch zu geschehen hatte, konnten die 50 cm<sup>3</sup> nur mit einer Genauigkeit von etwa 5 % abgefüllt werden, damit war auch die Zinkkonzentration nur auf 5 % genau. Die Infektionsgefahr schien bei dieser Prozedur ziemlich groß, trotzdem traten fast nie Infektionen auf. Die Sporenzahl des Impfgutes war in allen Fällen größer als die eines zufällig eingedrungenen Fremdorganismus.

Es wurden 8 bis 10 Tropfen der Sporensuspension zu jedem Kolben gegeben. Das Keimrohr wurde zugleich so weit herausgezogen, daß es von Spritzern der geschüttelten Nährlösung nicht erreicht werden konnte und also die Sporen auch nicht fähig waren, sich darin zu entwickeln; seine Verengerung steckte dann mitten im Wattestopfen.

Dann wurden die Kolben in die Schüttelapparatur gebracht, wo sie in sogenannter idealer Unordnung aufgestellt wurden. Das Wasser des Bades (Temperatur = 30° C) stand etwas höher an den Kolben als die Nährlösung innen. Die Lufttemperatur betrug 20 bis 30° C. Das Schütteln wurde unterbrochen, um in einzelnen Kolben am dritten und sechsten Tag das pH zu messen.

*Aspergillus* setzte sich an den Wurzeln fest, die in die Nährlösung reichten, und bildete dort einige Sporen, wo er nicht ständig überspült war. Waren die Wurzeln jedoch kurz, so bildete er «Reiskörner», wie es der Figur 7 zu entnehmen ist.

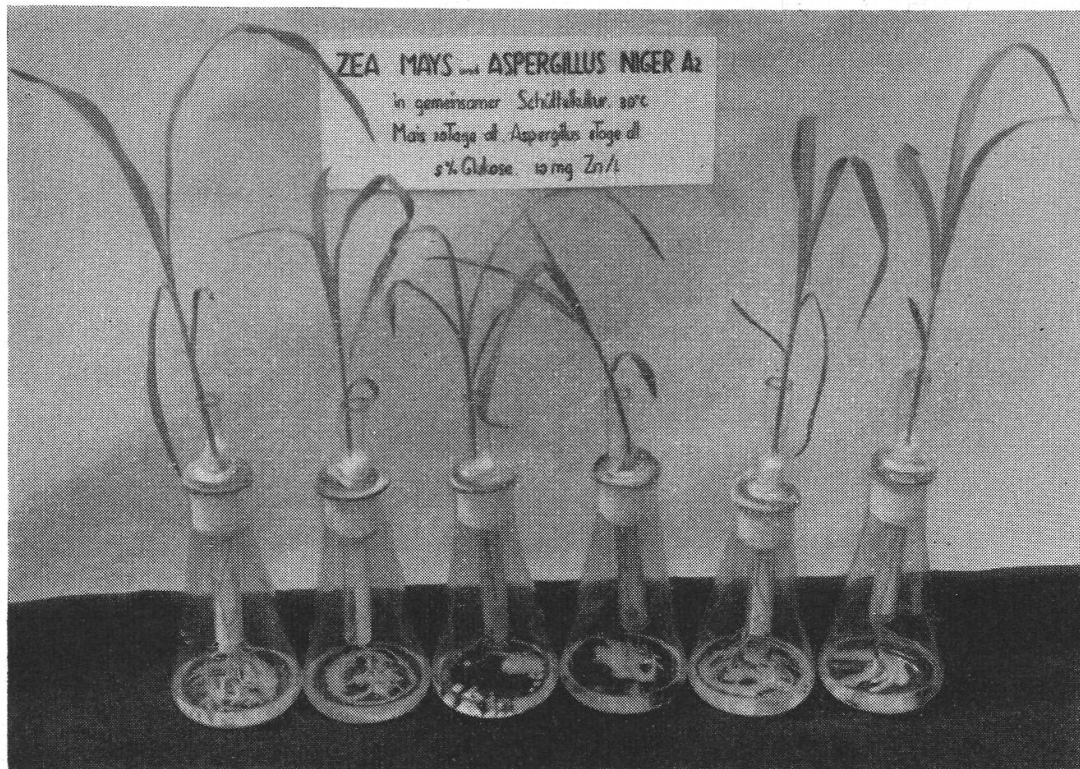
Aus allem bisherigen kann man erkennen, daß es sich meist nicht um eine völlige Lösung der oben genannten Probleme handelte, sondern um Kompromisse zwischen den Ansprüchen der beiden Konkurrenten, die aber in jedem Fall zu einer Versuchsanordnung führten, die diesen gerade noch Leben und Wachstum gewährleistete und ein bloßes Hinsiechen vermied.

Den großen Schwierigkeiten, die sich dieser «Vergesellschaftung» in den Weg stellten, ist es zuzuschreiben, daß nur ziemlich wenig Versuche ausgeführt und die Ergebnisse einem geringen Zahlenmaterial entnommen wurden. Ich beschränkte mich auch darauf, die Zinkaufnahme der Organismen aus Nährlösungen mit *genügend* Zink zu studieren, und ließ den Fall einer Konkurrenz um *wenig* Zink weg.

Die Versuche umfaßten wiederum die drei Glukosekonzentrationen 5, 7,5 und 10 % und die drei Zinkkonzentrationen 1, 5 und 10 mg Zink im Liter. Sie wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

		Zink in mg/l		
		1	5	10
Glukose in ‰	5	e	b	e
	7,5	a	a	d
	10	c	b	c

Es wurden also pro Versuch zwei Kombinationen von Zink und Glukose herausgegriffen, wobei entweder die Zink- oder die Glukosekonzentration in beiden dieselbe war.



Figur 7

*Zea Mays* und *Aspergillus niger* in gemeinsamer Schüttelkultur. Die sehr unterschiedliche Ausbildung der Maispflanzen und die verschiedenen Mycelformen von *Aspergillus* nach achttägigem Zusammenleben sind zu erkennen

Da nach den Versuchen mit Einzelkultur von *Aspergillus niger* und erst recht unter dem Einfluß des *Maises* nur kleine Trockengewichte zu erwarten waren, wurden die Mycelien von je drei Kolben zusammen getrocknet und aufgearbeitet. Aus den sechs mit gleichen Zink- und Glukosemengen versehenen Kulturen ergaben sich auf diese Weise je zwei Werte für Trockengewicht und Zinkgehalt, die, durch drei geteilt, die einem einzigen Pilz entsprechenden Mittelwerte lieferten.

Bei *Mais* wurde so vorgegangen, daß von den sechs in der gleichen Nährlösung gewachsenen Pflanzen je die zwei schwächeren gemeinsam und die zwei stärkeren einzeln behandelt wurden. Der endgültige Mittelwert setzte sich dann aus zwei Einzel- und zwei Mittelwerten zusammen.

Die Zinkbestimmung in der Nährlösung gestaltete sich außerordentlich schwierig (siehe S. 109), sie wurde daher pro Serie nur in ein bis zwei Kolben durchgeführt.

## 2. Versuche über die Zinkaufnahme in Mischkultur

Am Ende jedes Versuches bestand folgende Beziehung zwischen den Organismen: War der *Mais* gut gediehen und hatte er sich gesund und kräftig erhalten bis zum 21. Tag, so war die Ausbildung des Mycels

Tabelle 20

Mischkultur von *Mais* und *Aspergillus niger* A<sub>2</sub>. Trockengewicht und Zinkgehalt. Je drei Mycelien zusammen verarbeitet; *Mais*pflanzen entweder einzeln oder zu zweien (1<sup>x</sup>) verarbeitet. Zusammenfassung aller neun Versuche. 9 Tage Mischkultur bei 30° C

Zinkkonzentration der Nährlösung in mg/l	Glukosekonzentration der Nährlösung in ‰	<i>Zea Mays</i>		<i>Aspergillus niger</i>		
		Trockengewicht in g	Zinkgehalt in ‰	Trockengewicht in g	Zinkgehalt in ‰	Zinkgehalt g/Trockengewicht in ‰
1	5	0,319	51	0,092	5,7 ± 0,3	60,5 ± 1,5
		0,348 <sup>1</sup>	28 <sup>1</sup>			
		0,434	42			
		0,306 <sup>1</sup>	29 <sup>1</sup>			
5		0,189 <sup>1</sup>	35 <sup>1</sup>	0,091	12,5 ± 0,5	138 ± 5
		0,326	67			
		0,330 <sup>1</sup>	67 <sup>1</sup>			
		0,249	38			
10		0,434	63	0,081	20,8 ± 1,5	265 ± 26
		0,306 <sup>1</sup>	37 <sup>1</sup>			
		0,296 <sup>1</sup>	48 <sup>1</sup>			
		0,242	34			
1	7,5	0,267	23	0,14	6,2 ± 0,1	44 ± 1
		0,401 <sup>1</sup>	20 <sup>1</sup>			
		0,250 <sup>1</sup>	19,5 <sup>1</sup>			
		0,236	20			
5		0,256 <sup>1</sup>	9 <sup>1</sup>	0,109	16,2 ± 1,8	151 ± 32
		0,207	21			
		0,210	23			
		0,394 <sup>1</sup>	20 <sup>1</sup>			
10		0,300 <sup>1</sup>	21 <sup>1</sup>	0,139	36,7 ± <0,5	266 ± 20
		0,305	17			
		0,274 <sup>1</sup>	22 <sup>1</sup>			
1	10	0,374 <sup>1</sup>	44 <sup>1</sup>	0,192	11,7 ± 1,7	61 ± 7
		0,287	18			
		0,314	22			
		0,350 <sup>1</sup>	19 <sup>1</sup>			
5		0,235 <sup>1</sup>	33,5 <sup>1</sup>	0,153	20,2 ± 0,8	132 ± 2
		0,235	54			
		0,287	54			
		0,262 <sup>1</sup>	46 <sup>1</sup>			
10		0,294 <sup>1</sup>	32 <sup>1</sup>	0,174	40,0 ± 3,3	231 ± 30
		0,262	26			
		0,225	42			
		0,336 <sup>1</sup>	41 <sup>1</sup>			



gering, starb der *Mais* dagegen nach einigen Tagen Mischkultur ab, so entwickelte sich *Aspergillus* um so üppiger. Es ist schwer, diese Beobachtung mit Zahlen zu belegen, da die Vorherrschaft einer Pflanze über die andere von Kolben zu Kolben wechselte und die Unterschiede sich ausglich, indem je drei Mycelien miteinander verarbeitet wurden. Sicher ist es, daß der Pilz da unterlegen war, wo der *Mais* normal (verglichen mit der Einzelkultur) oder doch verhältnismäßig viel Zink aufnahm, zum Beispiel Nrn. 1, 4, 9, 10, 13, 16, 45, 46, 47 (Tabelle 20).

Betrachtet man in Tabelle 20 zuerst einmal den Zinkgehalt von *Mais*, so überrascht es, wie ungleich und in keiner Beziehung zur Zinkkonzentration der Nährlösung stehend, noch mit ihr ansteigend, wie in Tabelle 9, er bei den einzelnen Pflanzen ist. Es fällt ferner auf, daß die Trockengewichte im allgemeinen sehr hoch sind; da die Hauptwurzeln bei Gegenwart des Pilzes kaum mehr wuchsen, sondern die am zwölften Tag erreichte Länge (10 bis 30 cm) beibehielten, darf ich hier an das auf Seite 116 Gesagte erinnern.

In Tabelle 21 ist der Vergleich der Zinkaufnahme von *Mais* in Einzel- und Mischkultur zu finden. Außer Nrn. 1, 2, 4, 37 und 38 brachte keine einzige *Mais*pflanze ihren Zinkgehalt auf die in Einzelkultur bestimmte Höhe. Bei 5 und 10 mg Zn/l Nährlösung schwanken die Zinkaufnahmen in Mischkultur zwischen  $\frac{1}{2}$  und  $\frac{1}{10}$  des Betrages in Einzelkultur, was auch in der auf den Zinkgehalt der Nährlösung bezogenen prozentualen Zinkaufnahme deutlich wird.

Tabelle 21

Vergleich der Zinkaufnahme von *Mais* in Einzel- und Mischkultur. Einzelkultur: Mittelwerte aus Tabelle 9. Mischkultur: Pflanzen einzeln oder zu zweien (\*) verarbeitet. Zinkaufnahme in Prozent bezogen auf Zinkgehalt der Nährlösung

Zinkkonzentration in der Nährlösung in mg/l	Zinkaufnahme von <i>Mais</i> in Einzelkultur		Zinkaufnahme von <i>Mais</i> in Mischkultur Bei Glukosegehalt der Nährlösung von					
	in $\gamma$	in %	in $\gamma$	5% in %	in $\gamma$	7,5% in %	in $\gamma$	10% in %
1	27,3	55	40*	80*	12*	24*	33*	66*
			17	34	9	18	7	14
			31	62	8,5	17	11	22
			18*	36*	8,5*	17*	8*	16*
5	113	45	24*	9,6*	0*	0*	22,5*	9*
			56	21,6	10	4	43	17,2
			56*	21,6*	12	4,8	43	17,2
			27	10,8	9*	3,6*	35*	14*
10	242	48	52*	10,4*	12*	2,4*	21*	4,2*
			26	5,2	6	1,2	15	3,0
			37*	7,4*	—	—	31	6,2
			8	1,6	—	—	—	—
			23	4,6	12	2,4	30*	6,0*

Die Anwesenheit von *Aspergillus niger* in der Nährlösung verhindert *Mais* an einer, verglichen mit Einzelkultur, normalen Zinkaufnahme. Die Ursache dafür wurde nicht weiter untersucht, sie liegt vermutlich darin, daß der Pilz in der Nährlösung Bedingungen schafft, die dem *Mais* die Zinkaufnahme verunmöglichen (Antibiotikaausscheidung), wie sie auch sein Wachstum im allgemeinen beeinträchtigen. Daß *Aspergillus* die Stoffaufnahme direkt unterbindet, indem er auf den Wurzeln sitzt und einen Filter bildet, durch den nur noch ein Teil der Ionen zum *Mais* vordringen kann, ist weniger wahrscheinlich.

Wenn die Zinkaufnahme von *Mais* nicht nur gering, sondern auch noch innerhalb einer Serie ganz unregelmäßig ist, so hängt dies nicht allein mit dem bereits über die Wechselbeziehung *Mais*—Pilz (S. 150) Gesagten zusammen. Die am zwölften Tag mit dem Pilz vereinigten Pflanzen waren weder in allen Kolben noch in allen Versuchen in genau demselben Zustand der Zinkaufnahme oder der Bereitschaft dazu. Äußerlich war dies den einzelnen Individuen freilich kaum anzusehen. Aus Bestimmungen in Einzelkulturen ging hervor, daß gut entwickelter *Mais* am zwölften Tag schon einen Zinkgehalt von zirka 20  $\gamma$  aufweisen kann. Dürfte man dies als die Regel annehmen, so hätten viele der mit *Aspergillus* kultivierten Pflanzen in Mischkultur überhaupt kein Zink aufgenommen!

Geht man nun zu *Aspergillus* über, so bemerkt man ein Ansteigen des Trockengewichts mit der Glukosekonzentration und ein Ansteigen des Zinkgehaltes mit der Zinkkonzentration der Nährlösung, dagegen ist das Ansteigen des Zinkgehaltes mit der Glukosekonzentration nur beim Gegenüberstellen der Werte bei 5 und 10 % Glukose statistisch erwiesen.

Zum Vergleich der Verhältnisse in Einzel- und Mischkultur, wie sie Tabelle 22 wiedergibt, werden aus Trockengewicht, absoluter und auf das Trockengewicht bezogener Zinkaufnahme von Einzel- und Mischkultur Quotienten gebildet; deren Mittelwerte werden nach dem *t*-Test mit der Zahl Eins verglichen, welche, als Quotient betrachtet, Gleichheit von Zähler und Nenner bedeutet. Ergäben die folgenden Quotienten eins, so würde kein Unterschied zwischen Einzel- und Mischkultur bestehen. So berechnet sich:

	Quotienten		Wahrscheinlichkeit <sup>1</sup>
für das Trockengewicht .	2,58 $\pm$ 0,44	<i>n</i> = 8	<i>p</i> = < 0,01 = < 1 %
für den Zinkgehalt bei			
5 und 10 mg/l Nähr-			
lösung . . . . .	2,54 $\pm$ 0,395	<i>n</i> = 5	<i>p</i> = 0,012 = 1,2 %
für den Zinkgehalt auf 1 g			
Trockengewicht bezo-			
gen . . . . .	1,36 $\pm$ 0,096	<i>n</i> = 8	<i>p</i> = < 0,01 = < 1 %

<sup>1</sup> Für zufälliges Auftreten solcher Quotienten.

Tabelle 22

Vergleich des Trockengewichts, der Zinkaufnahme und der auf 1 g Trockengewicht bezogenen Zinkaufnahme von *Aspergillus niger* A<sub>2</sub>. Einzelkultur: Siehe Tabelle 17.  
Mischkultur: Mittelwerte aus zwei Einzelbestimmungen

Glukosekonzentration der Nährlösung in ‰	Zinkkonzentration der Nährlösung in mg/l	Mischkultur			Einzelkultur		
		Trockengewicht in g	Zinkgehalt in γ	Zinkgehalt/Trockengewicht in γ	Trockengewicht in g	Zinkgehalt in γ	Zinkgehalt/Trockengewicht in γ
5	1	0,092	5,7	60,5	0,062	6,7	107
	5	0,091	12,5	138	0,066	12,0	179
	10	0,081	20,8	265	0,058	26	152
7,5	1	0,14	6,2	44	0,064	4,3	58
	5	0,109	16,2	151	0,062	8	133
	10	0,139	36,7	266	0,061	21,7	354
10	1	0,192	11,7	61	0,043	3,0	68
	5	0,153	20,2	152	0,043	6,7	152
	10	0,174	40,0	231	0,037	12,3	342

Der Zinkgehalt der Mischkulturen bei 5 und 10 mg Zn/l in der Nährlösung und das Trockengewicht bei allen drei Zinkkonzentrationen ist demnach signifikant größer als in Einzelkulturen. Das bedeutet, daß die Anwesenheit des Maises auf Bildung von Trockenmasse und Zinkaufnahme von *Aspergillus niger* unter den gewählten Bedingungen einen fördernden Einfluß hat.

Tabelle 23

Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration und des Glukosegehaltes in den Nährlösungen von Mischkulturen, unter dem Einfluß von *Aspergillus niger* A<sub>2</sub> in neun Tagen. Stichproben und Einzelbestimmungen

Zinkkonzentration der Nährlösung in mg/l	Glukosekonzentration der Nährlösung in g/100 cm <sup>3</sup>	Wasserstoffionenkonzentration in pH-Einheiten			Vom Pilz resorbierte Glukose in g/100 cm <sup>3</sup>	Glukoseaufnahme/Zinkaufnahme in g in 100 cm <sup>3</sup> /γ
		3. Tag	6. Tag	9. Tag		
1	5	—	1,9	1,6	2,3	0,40
		3,5	2,8	2,1	2,0	0,10
		—	2,8	1,9	2,1	0,10
1	7,5	—	2,6	2,2	1,7	0,27
		—	2,0	2,0	3,5	0,22
		4,8	2,4	2,2	1,7	0,046
1	10	3,4	2,8	1,8	3,0	0,26
		3,5	2,5	2,1	2,2	0,13
		2,8	2,5	1,8	1,6	0,065

Unter einem anderen Gesichtspunkt zeigt sich hier wiederum, daß Trockengewichtsbildung und Zinkaufnahme des Pilzes in keiner nahen Beziehung zueinander stehen (siehe S. 139), da der auf das Trocken-



gewicht bezogene Zinkgehalt in Einzelkultur signifikant höher ist als in Mischkultur.

Die Zunahme der Wasserstoffionen verläuft ähnlich wie in Einzelkulturen von *Aspergillus*. Am dritten Tag betrug sie noch pH 3—4, am sechsten Tag hatte sie meist schon den Endwert erreicht. Auch der Glukoseverbrauch war nicht wesentlich von dem der Tabelle 18 (Schüttelkulturen) verschieden (Tabelle 23). Daß auch in diesen Versuchen aus den Quotienten Glukoseaufnahme pro Zinkaufnahme keine Beziehung zwischen den beiden Größen erkannt werden kann, zeigt ebenfalls Tabelle 23.

Tabelle 24

Beispiele von Bilanzen zwischen Anfangs- und Endzinkgehalt in den Versuchen mit Mischkultur. Kursiv: Zinkgehalt in ‰

	Glukosegehalt der Nährlösung in ‰						
	5		7,5			10	
Zinkgehalt der Nährlösung in $\gamma$ /Kolben	250	500	50	250	500	250	500
	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>
Vom <i>Mais</i> aufgenommenes Zink in $\gamma$ ...	24	30	12	0	11	43	26
	<i>9,6</i>	<i>6,09</i>	<i>24</i>	<i>0</i>	<i>2,2</i>	<i>17,2</i>	<i>5,2</i>
Vom Pilz aufgenommenes Zink in $\gamma$ .....	12	43,3	6	18	36,7	21	19,3
	<i>4,8</i>	<i>8,66</i>	<i>12</i>	<i>7,2</i>	<i>7,3</i>	<i>8,4</i>	<i>3,86</i>
Restl. Zinkgehalt der Nährlös. in $\gamma$ /Kolben	202	405	28	208	405	212	460
	<i>80,8</i>	<i>81</i>	<i>56</i>	<i>83,2</i>	<i>81</i>	<i>84,8</i>	<i>92</i>
Summe alles wiedergefundenen Zinks in $\gamma$	238	478,3	46	226	452,7	276	506,3
	<i>95,2</i>	<i>95,66</i>	<i>92</i>	<i>90,4</i>	<i>90,5</i>	<i>110,4</i>	<i>101,27</i>
Überschuß oder Fehlbetrag in $\gamma$ .....	-12	-21,7	-4	-24	-47,3	+26	+6,3
	<i>-4,8</i>	<i>-4,34</i>	<i>-8</i>	<i>-9,6</i>	<i>-9,56</i>	<i>+10,4</i>	<i>+1,27</i>

In Tabelle 24 sind Bilanzen des zu Beginn eines Versuchs vorhandenen und des am Ende eines Versuchs durch Bestimmungen wiedergefundenen Zinks dargestellt. Der restliche Zinkgehalt der Nährlösung, der Zinkgehalt des *Maises* und die Zinkaufnahme von *Aspergillus* sollten zusammen gleich viel Zink ergeben wie die der Nährlösung ursprünglich zugeführte Menge. Diesem Ziel kamen die Bestimmungen hier im Mittel bis auf etwa 7 ‰ nahe.

### 3. Betrachtungen zu den Versuchen

Es wird im folgenden unternommen, das mit den Mischkulturen erzielte Hauptergebnis, daß nämlich *Aspergillus Mais* an der Zinkaufnahme verhindern kann, mit in der Landwirtschaft gemachten Erfah-

rungen und Beobachtungen anderer Autoren in Zusammenhang zu bringen.

Nur wenige Arbeiten haben sich bis jetzt mit den durch Mikroorganismen verursachten Mangelkrankheiten von höheren Pflanzen beschäftigt; es sind dies solche von Chandler, Hoagland und Hibbard (1932), Hoagland, Chandler und Stout (1936), Ark (1937), Chandler (1937/38), Gerretsen (1937), Mulder (1938 und 1940), Steinberg (1947 und 1950), Steinberg, Bowling und McMurtrey (1949), Bromfield und Skerman (1950), Timonin (1950). Siehe auch Anmerkung S. 118. Vor allem bot die Publikation Arks Anregung zur vorliegenden Studie.

Bevor noch die allen Arbeiten gemeinsamen Züge hervorgehoben werden, ist es nützlich, die Unterschiede zu meinen Versuchen deutlich werden zu lassen und kurz auf die Ergebnisse der verschiedenen Forscher einzutreten.

Die Untersuchungen der genannten Botaniker erstreckten sich auf *Bodenbakterien* und auf Kulturpflanzen, die unter dem Einfluß dieser Mikroorganismen an Krankheiten litten, deren Ursache zumeist im *Mangel* an einem Spurenelement zu suchen war (Ausnahme: Steinberg). In meinem Fall handelte es sich um einen zinkbedürftigen, auch im Boden lebenden *Schimmelpilz*, in dessen Gegenwart *Mais* unter Störungen litt, die *nicht* mit einem Zinkmangel identisch waren, obwohl *Mais* weit weniger Zink aufnahm als normal. Jedenfalls befand sich eine für beide Organismen genügende Menge Zink in der Nährlösung.

Chandler et al. (1932) erwähnen in «Little-Leaf»-verseuchten Böden chromogene Bakterien, welche für höhere Pflanzen toxische Substanzen ausschieden. Diese Gifte konnten durch Zink- und andere Metallsalze gefällt und unschädlich gemacht werden. In der gleichen Bahn bewegten sich Hoagland, Chandler und Stout (1936) und Ark (1937), der sowohl an *Mais*, *Baumwolle* und anderen Gewächsen Zinkmangel hervorrufende Bakterien isolierte, als auch aus «kranker» Erde einen Stoff herauslöste, der die gleiche Wirkung auf höhere Pflanzen hatte. Es liegt auf der Hand, in diesem Stoff eine Ausscheidung der Bakterien zu sehen und dieser eine Rolle in den Zinkmangelerscheinungen zuzuschreiben. Daß dieser Stoff thermolabil war, sei nur nebenbei bemerkt.

1936/37 hatte Chandler bereits erkannt, daß Zinkmangel von Wurzelschädigungen herrührte.

Gerretsen (1937) entdeckte den Zusammenhang zwischen Manganbedürfnis und «Grey-Speck-Disease» von *Hafer*. Bei einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration des Bodens wird Mangan durch Bakterien gefällt und ist dann höheren Pflanzen unzugänglich, worauf diese Störungen an den Wurzeln und andere Krankheitssymptome zei-

gen. Auch hier scheint es sich um ein von Mikroben ausgeschiedenes Stoffwechselprodukt, das letzten Endes am Manganmangel des *Hafers* schuld ist, zu handeln. Berichtigt und ergänzt wurden Gerretsen's Angaben durch Bromfield und Skerman (1950) und Timonin (1950).

Ferner ließ Mulder (1938 und 1940) in einem Versuch schwefelwasserstoffbildende Bakterien und *Gerste* in derselben Nährlösung wachsen und fand, daß die Bakterien Kupfer in einer für *Gerste* unassimilierbaren Form festlegten, ihr im übrigen aber keinen Schaden zufügten. Es war dabei nicht von Kupfersulfid, sondern von einer komplizierter gebauten Substanz die Rede.

Von großem Interesse sind endlich die neueren Arbeiten Steinbergs (1947, 1950), Steinberg et al. (1949). Durch Einwirkung von verschiedenen organischen Stoffen und Ausscheidungen von Bodenbakterien wiesen aseptisch in Agar aufgezogene *Tabakkeimlinge* Veränderungen auf, die eine gewisse Ähnlichkeit mit Spurenelement-Mangelkrankheiten hatten. In anderen Versuchen riefen zu große Gaben von Aminosäuren oder Mangel an Nährionen in aseptischen Kulturlösungen charakteristische Schädigungen, «Frenching», an *Tabakpflanzen* hervor, indem vor allem die Blätter freie Aminosäuren speicherten. Da viele Ionen in den Proteinstoffwechsel eingreifen, hat ihr Fehlen dieselbe Wirkung wie ein Überschuß an Eiweißbausteinen. Steinberg et al. (1949) warnen daher davor, eine bestimmte Krankheitserscheinung einfach auf einen Mineralstoffmangel zurückzuführen.

Aus allen bisher zitierten und den eigenen Untersuchungen komme ich zur Überzeugung, daß weder in der Natur noch im Experiment eine Konkurrenz um ein Spurenelement zwischen höheren und niederen Pflanzen stattfindet, daß also ein «Wegfangen» der Zink-, Kupfer- oder Manganionen durch einen Partner als Ursache für Mangelkrankheiten des andern nicht in Frage kommt, wiewohl Hoagland (1948) und Leeper (1952) (s. Anmerkung S. 118) dies für möglich halten. Vielmehr bedingen Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen Veränderungen in der Rhizosphäre des Bodens oder in der Nährlösung, durch die für das Wachstum höherer Pflanzen notwendige Ionen in unassimilierbarer Form festgelegt oder die Wurzeln durch solche Stoffe geschädigt werden, so daß ihr Aufnahmevermögen für diese Ionen sinkt oder unterbunden wird.

## Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

### *Methode*

1. Der Zinkgehalt von *Zea Mays L.* und *Aspergillus niger v. Tiegh.* wurde unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht. Die Zinkbestimmung erfolgte nach einer photometrischen Methode mit Hilfe von Dithizon.



2. *Mais* und *Aspergillus* wurden aseptisch in Einzel- und Mischkultur gezüchtet.
3. Es wurde die Zinkaufnahme aus Nährlösungen mit bekanntem und unter den gewählten Bedingungen für die Pflanzen genügendem Zinkgehalt studiert.
4. Um die Zinkaufnahme aus Mischkultur zu studieren, wurde eine Sporensuspension von *Aspergillus niger* mit zwölf Tage altem *Mais* in einer Nährlösung vereinigt.
5. Es wurde eine Methode ausgearbeitet, um Zink in Gewebeschnitten mit Dithizon nachzuweisen.

### *Feststellungen*

6. Die Körner der verwendeten *Mais*sorte enthielten im Mittel 11  $\gamma$  Zink (d. h. zirka 29  $\gamma$  pro Gramm Trockengewicht). Sie nahmen während der Quellung in reiner Zinksulfatlösung oder in zinkhaltiger Nährlösung Zink auf und zwar in mit dem Zinkgehalt der Lösung ansteigenden Mengen.
7. In den ersten sieben bis zehn Tagen nach der Quellung nahmen die *Mais*keimlinge kein Zink aus der Nährlösung auf.
8. Vom 8. bis 21. Tag nahmen die *Mais*pflanzen Zink auf, und zwar mehr oder weniger proportional der in der Nährlösung gebotenen Menge.
9. Wurden *Mais*pflanzen am dritten Tag in glukosehaltige Nährlösung versetzt, so war die Länge ihrer Hauptwurzeln und ihr Zinkgehalt am 21. Tag deutlich geringer als in der glukosefreien Nährlösung. Dieser Unterschied trat dagegen nicht auf, wenn die Pflanzen erst am zehnten Tag in das glukosehaltige Milieu gebracht wurden.
10. Das im *Mais*korn enthaltene autochthone Zink befindet sich zu einem Viertel im Endosperm, zu drei Vierteln im Embryo; die Farbreaktion in Schnitten zeigt Zink im Scutellum und im übrigen Embryo.
11. Während der Keimung wandert Zink aus dem Scutellum aus, und zwar zu fast gleichen Teilen nach Sproß und Wurzel.
12. Auch das aus der Nährlösung aufgenommene Zink verteilt sich fast gleichmäßig auf ober- und unterirdische Organe.
13. In Deckenkulturen von *Aspergillus niger* auf zinkhaltiger Nährlösung war die Zinkaufnahme unabhängig vom Zink- und Glukosegehalt der Nährlösung. Es wurden keine organischen Säuren gebildet.
14. Deckenkulturen auf zinkfreier Nährlösung bildeten keine oder nur ganz wenig Sporen, dagegen aus der Glukose organische Säuren.

15. Die Zinkaufnahme von *Aspergillus niger* in Schüttelkulturen und in einer *Mais* zusagenden Nährlösung (unter den für die Mischkultur geeigneten Bedingungen) stieg mit dem Zinkgehalt der Nährlösung an. Die Mycelformen waren sehr unregelmäßig, Sporenbildung unterblieb. Aus Glukose wurden Säuren gebildet.
16. In den Mischkulturen war eine antagonistische Beziehung zwischen *Mais* und *Aspergillus niger* zu beobachten, die dem einen Partner jeweils nur auf Kosten des andern eine normale Entwicklung erlaubte.
17. Die Zinkaufnahme von *Mais* in Mischkultur war gering und unregelmäßig, entsprechend dem allgemein schlechteren Gedeihen der Pflanzen im Vergleich zur Einzelkultur.
18. *Aspergillus niger* bildete in Mischkultur mehr Trockenmasse und nahm gleich viel oder mehr Zink auf als in Einzelkultur.

#### *Folgerungen*

19. Der *Mais*keimling hat bis zum Alter von zirka zehn Tagen ein Ausschließungsvermögen für in der Nährlösung vorhandenes Zink; trotzdem scheint in dieser Zeit Zink für sein Wachstum von Wichtigkeit zu sein (für Fermentaufbau?), da er es dem Scutellum entnimmt.
20. Das von *Aspergillus niger* in Decken- oder Schüttelkulturen aufgenommene Zink steht in keiner unmittelbaren Beziehung zu seinem Trockengewicht noch zur Glukoseaufnahme; dagegen spielt Zink möglicherweise im Zuckerabbau eine Rolle, und zwar in einem Prozeß, in dem die Bildung organischer Säuren verhindert wird oder eben gebildete weiter zerlegt werden.
21. Die Menge des von *Mais* aufgenommenen Zinks kann mit der Länge der Hauptwurzel in Beziehung gebracht werden, nicht dagegen mit dem Gewicht der gesamten Wurzelmasse oder dem der ganzen Pflanze.
22. In Mischkultur hemmt *Aspergillus niger Zea Mays* in Entwicklung und Zinkaufnahme, vermutlich indem er in die Nährlösung Stoffe ausscheidet, die *Mais* an der normalen Aufnahme oder Assimilation des Zinks hindern.
23. In Mischkultur fördert die Anwesenheit von *Mais* den Pilz in der Bildung von Trockenmasse und bei höherem Zinkgehalt der Nährlösung auch in der Zinkaufnahme.

Die vorliegende Arbeit entstand im *Botanischen Institut der Universität Basel* unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber. Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber für die Anregung zu dieser Arbeit und sein Interesse während der Untersuchungen, sowie für die mir zur Verfügung gestellten Mittel des Institutes, herzlichen Dank zu sagen.

Ferner bin ich Herrn Dr. H. Huber für seine wertvolle Hilfe bei statistischen Berechnungen sehr verpflichtet.

## Literaturverzeichnis

- van Andel, O. M., Arisz, H. W., und Helder, R. I., 1950. Influence of light and sugar on growth and salt intake by *maize*. Proc. Sect. Scie., Kkl. Akad. van Wetenschappen **53**, 159—171.
- Ark, P. A., 1937. Little-leaf or rosette of fruit trees VII. Soil microflora and little-leaf or rosette disease. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. **34**, 216—221.
- Bergh, H., 1948. Sink som Plantenaering og Plantegift. Kgl. Norske Videnskab. Selskabs Skrifter. 1942—1945, Nr. 3, 66.
- Bertrand, G., 1905. Sur l'emploi favorable du manganèse comme engrais. C. R. hebdomadaire de l'Acad. Sci. Paris, **141**, 1255—1257.
- und Javillier, M., 1911. Influence combinée du zinc et du manganèse sur le développement de l'*Aspergillus niger*. C. R. hebdomadaire de l'Acad. Sci. Paris **152**, 900—902.
- — 1912. Action du manganèse sur le développement de l'*Aspergillus niger*. Ann. Inst. Pasteur **26**, 241, 515, 773.
- und Benson, B., 1929. Sur la teneur en zinc des principaux aliments d'origine végétale. Ann. Inst. Pasteur **43**, 386—393.
- Bibliography of the literature on the minor elements and their relation to plant and animal nutrition. 4. Aufl., Bd. 1. Chilean Nitrate Educational Bureau, New York 1948.
- Biedermann, W., und Müller, E., 1951. Die Inaktivierung des gelösten Kupfers-II in Fungiziden. Phytopath. Ztschr. **18**, 307—338.
- Bonner, James, 1950. Plant Biochemistry. Acad. Press Inc. Publ., New York.
- Bortels, H., 1927. Über die Bedeutung von Eisen, Zink und Kupfer für Mikroorganismen. Biochem. Ztschr. **182**, 301—358.
- Brenchley, W. E., 1910. The influence of Copper Sulphate and Manganese Sulphate upon the growth of *barley*. Ann. Bot. **24**, 571—583.
- Brody, S., 1945. Bioenergetics and growth. Reinhold Publ. Corp.
- Burlet, E., 1940. Über die pflanzliche Organkultur und ihre Anwendung bei physiologischen Untersuchungen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **50**, 519—544. Diss. Basel.
- Bustanza Lachiondo, F., und Caballero López, A., 1947. Preliminary tests in the study of the influence of antibiotics on the germination of seeds. IV. Intern. Congr. for Microbiology, Copenhagen 1947, Report of proceedings.
- Chandler, W. H., Hoagland, D. R., und Hibbard, P. L., 1932. Little-leaf or rosette of fruit trees II. Amer. Soc. Hort. Sci. Proc. **29**, 255—263<sup>1</sup>.
- 1936/37. Zinc as a nutrient for plants. Bot. Gaz. **98**, 625—646.
- Chesters, C. G. C., und Rolinson, G. N., 1950. Role of zinc in metabolism. Nature **165**, 851.
- — 1951. The role of zinc in plant metabolism. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. **26**, 239—252.
- Cowling, H., und Miller, E. J., 1941. Determination of small amounts of zinc in plant materials. (A photometric dithizone method.) Ind. Eng. Chem. **13**, 145—149.
- Foster, J. W., 1949. Chemical activities of fungi. Acad. Press Inc. Publ. New York.
- und Denison, F. W., 1950. Role of zinc in metabolism. Nature **166**, 833—834.
- Fisher, R. A., 1946. Statistical methods for research workers. 10. Aufl. Oliver & Boyd, London.
- Frey-Wyssling, A., 1945. Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze. Büchergilde Gutenberg, Zürich.

<sup>1</sup> Herr Dr. W. H. Chandler, Los Angeles, war so liebenswürdig, mir einen Mikrofilm dieser in schweizerischen Bibliotheken nicht erhältlichen Arbeit zu besorgen.



- G ä u m a n n , E., 1951. Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Birkhäuser, Basel.
- G a l l i , A., 1946. Über die Bildung der Ascorbinsäure und ihre Stellung im Stoffwechsel von *Aspergillus niger*. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **56**, 113—174. Diss. Basel.
- G e r r e t s e n , F. C., 1937. Manganese deficiency of oats and its relation to soil bacteria. Ann. Bot. N. S. **1**, 207—230.
- G i l l - C a r e y , D., 1949. Antibiotics from *Aspergilli*. Brit. J. of Exp. Path. **30**, 114—118.
- G l i c k , D., 1949. Techniques of histo- and cytochemistry. Interscience Publ. New York.
- G o l l m i c k , F., 1936. Der Einfluß von Zink, Eisen, Kupfer und deren Kombination auf das Wachstum von *Aspergillus niger*. Cb. Bakt. II. Abt. **93**, 421—442.
- G r a č a n i n , M., 1928. Ein Beitrag zur Zinkfrage in der Pflanzenbiochemie. Biochem. Ztschr. **194**, 214—230.
- H a a s , A. R. C., 1936/37. Zinc relation in mottle-leaf of *Citrus*. Bot. Gaz. **98**, 68—86.
- H a u r o w i t z , F., 1950. Chemistry and Biology of Proteins. Acad. Press Inc. Publ., New York.
- H a w k e r , L. E., 1950. Physiology of fungi. Univ. of London Press Ltd.
- H e w i t t , E. J., 1951. The role of the mineral elements in plant nutrition. Ann. Rev. of Plant Phys. **2**, 25—52.
- H o a g l a n d , D. R., C h a n d l e r , H. W., and S t o u t , P. R., 1936. Little-leaf or rosette of fruit trees VI. Further experiments bearing on the cause of the disease. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. **34**, 210—212.
- 1948. Lectures on the inorganic nutrition of plants. Waltham, Mass.
- J a v i l l i e r , M., 1908. Recherches sur la présence et le rôle du zinc chez les plantes. Diss. Fac. Sci. Paris.
- 1908. Le zinc chez les plantes. Recherches sur sa présence et son rôle. Ann. Inst. Past. **22**, 720—727.
- 1948. Les carences zinquiques chez les plantes cultivées. C. R. Acad. d'Agric. de France, 176.
- K a u f f m a n n - C o s l a , O., and B r ü l l , R., 1939. Essais sur la pharmacodynamie de la résorption cellulaire. Action du zinc. Arch. intern. de pharmacodynamie et de thérapie **63**, 326—335.
- K l u y v e r , A. J., and P e r q u i n , L. H. C., 1933. Zur Methodik der Schimmelstoffwechseluntersuchung. Biochem. Ztschr. **266**, 68—81.
- K o e h l e r , B., and W o o d w o r t h , C. M., 1938. Corn-seedling virescence caused by *Aspergillus flavus* and *A. tamaritii*. Phytopathology **28**, 811—823.
- L i l l y , V. G., and B a r n e t t , H. L., 1951. Physiology of the fungi. McGraw Hill Book Comp. Inc. 1. Aufl. New York.
- L u n d e g å r d h , H., 1932. Die Nährstoffaufnahme der Pflanze. Fischer, Jena.
- L y o n , C. B., B e e s o n , K. C., and E l l i s , G. H., 1943. Effects of micronutrient deficiencies on growth and vitamin content of the *Tomato*. Bot. Gaz. **104**, 495—514.
- M a c H a r g u e , J. S., 1925. The occurrence of copper, manganese, zinc, nickel and cobalt in soils, plants and animals and their possible function as vital factors. J. of Agr. Res. **30**, 193—196.
- M a z é , P., 1914. Recherches de physiologie végétale. Influences respectives des éléments de la solution minérale sur le développement du *maïs*. Ann. Inst. Past. **28**, 21—68.
- 1915. Détermination des éléments minéraux rares nécessaires au développement du *maïs*. C. R. Acad. Sci. Paris **160**, 211—214.
- 1936. The role of special elements (B, Cu, Zn, Mn, etc.) in plant nutrition. Ann. Rev. Biochem. **5**, 525.
- M e n d e l , L. B., and B r a d l e y , H. C., 1905. Experimental studies on the physiology of *Molluscs*. Paper II. Amer. J. Physiol. **14**, 313—327.

- Molliard, M., 1922. Sur une nouvelle fermentation acide produite par le *Sterigmatacystis nigra*. C. R. hebdomadaire Acad. Sci. Paris **174**, 881—883.
- Mulder, E. G., 1938. Over de beteekenis van koper voor de groei van planten en microorganismen. Diss. Landbouwhoogeschool, Wageningen.
- 1940. Über den Kupfermangel als Ursache der Urbarmachungskrankheit. Ztschr. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz **50**, 230—272.
- 1948. Carences zinquiques chez des arbres fruitiers en Europe. C. R. Acad. d'Agric. de France **177**.
- Nickerson, W. J., 1947. Biology of pathogenic fungi. Waltham, Mass.
- Olsen, C., 1950. The significance of concentration for the rate of ion absorption by higher plants in water culture. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim., **27**, 291—306.
- Perlman, D., 1949. Effects of minor elements on the physiology of fungi. Bot. Rev. **15**, 195—220.
- Piper, C. S., 1947. Soil and plant analysis. Univ. of Adelaide, Adelaide.
- Pirschle, K., 1935. Vergleichende Untersuchungen über die physiologische Wirkung der Elemente nach Wachstumsversuchen mit *Aspergillus niger*. Planta **23**, 177—224. Planta **24**, 649—710.
- 1939. Die Bedeutung der Spurenelemente II. Ergebnisse der Biologie **17**, 255—413.
- Porges, N., 1932. Chemical composition of *Aspergillus niger* as modified by zinc sulfate. Bot. Gaz. **94**, 197—205.
- Reed, H. S., und Beck, J. V., 1939. The effect of zinc on the growth process. Growth **3**, 1—7.
- Roberg, M., 1928. Über die Wirkung von Eisen-, Zink- und Kupfersalzen auf *Aspergillen*. Cb. Bakt. II. Abt. **74**, 333—370.
- 1931. Weitere Untersuchungen über die Bedeutung des Zinks für *Aspergillus niger*. Cb. Bakt. II. Abt. **84**, 196—230.
- 1932. Ein Beitrag zur Stoffwechselphysiologie der Grünalgen. II. Über die Wirkung von Eisen-, Zink- und Kupfersalzen. Pringsheim, Jb. wiss. Bot. **76**, 311—332.
- Rolinson, G. N., 1951. Zinc requirements of *Aspergillus niger*. Nature **168**, 210.
- Sakamura, T., 1936. Über einige für die Kultur von *Aspergillen* notwendige Schwermetalle und das Befreiungsverfahren der Nährlösung von ihren Spuren. J. Fac. Sci. Hokkaido, Imp. Univ., Ser. V, **4**, 99—116.
- Sandell, E. B., 1944. Colorimetric determination of traces of metals. Interscience Publ. Inc., New York.
- Sarasin, A., 1953. Untersuchungen über die Laktoflavinbildung durch *Aspergillus niger*. Diss. Basel. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **63**. (Im Druck.)
- Scharrer, K., 1941. Biochemie der Spurenelemente. Parey, Berlin 1941. Edwards Broth. Inc., Michigan 1943, Photo-Lithoprint. Reprod.
- und Schropp, W., 1934. Sand- und Wasserkulturversuche über die Wirkung des Zink- und Cadmiumions. Ztschr. Pflern., Dü., Bo.kunde **34 a**, 14—29.
- Schmucki, S., 1949. Über die Veränderungen der Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration in Nährlösungskulturen. Diss. phil. II, Univ. Zürich.
- Seiler, L., 1951. Über das Wurzelwachstum und eine Methode zur quantitativen Untersuchung des Einflusses von Wirkstoffen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **61**, 622—663. Diss. Basel.
- Sommer, A. L., 1928. Further evidence of the essential nature of zinc for the growth of higher green plants. Plant Physiol. **3**, 217—222.
- Steinberg, R. A., 1935. The nutritional requirements of the fungus *Aspergillus niger*. Bull. Torrey Bot. Club **62**, 81—90.
- 1936. Some effects of the heavy metals essential for the nutrition of *Aspergillus niger* upon its growth. Amer. J. Bot. **23**, 227—231.

- Steinberg, R. A., 1945. Use of microorganisms to determine essentiality of minor elements. *Soil Sci.* **60**, 185—189. (Zit. nach Bibl. of the lit. on the minor elements, 1948.)
- 1947. Growth responses of *Tobacco* seedlings in aseptic culture to diffusates of some common soil bacteria. *J. Agr. Res.* **75**, 199 ff.
- 1950. The relation of certain soil bacteria to frencing symptoms of *Tobacco*. *Bull. Torrey Bot. Club* **77**, 38—44.
- Bowling, J. D., und MacMurtrey, J. E., 1949. A possible explanation of symptom formation in *Tobacco* with frencing and mineral deficiencies. *Science* **110**, 714—715.
- Stephenson, M., 1949. *Bacterial metabolism*. Longmans, Green, London, 3. Aufl.
- Stiles, W., 1946. *Trace elements in plants and animals*. Univ. Press, Cambridge.
- Stout, P. R., und Arnon, D. J., 1939. Experimental methods for the study of the role of copper, manganese and zinc in the nutrition of higher plants. *Amer. J. Bot.* **26**, 144—149.
- Sumner, J. B., und Myrbäck, K., 1951. *The enzymes. Chemistry and mechanism of action*. Bd. 1, Teil 2. Acad. Inc. Press Publ., New York.
- Thaysen, A. C., 1950. Antibiotics in the soil. *Nature* **166**, 93—94.
- Wallace, T., 1950. Trace elements in plant physiology. Rothamsted Symposium on trace elements. Waltham, Mass.
- 1951. The diagnosis of mineral deficiencies in plants. His Majesty's Stationery Office, London.
- Warburg, O., 1948. *Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten*. Saenger, Berlin.
- Whatley, F. R., Ordín, L., und Arnon, D. J., 1951. Distribution of micro-nutrients in leaves and chloroplast fragments. *Plant Physiol.* **26**, 414—418.
- Winfield, M. E., 1945. The role of boron in plant metabolism. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **23**, 267—272.
- Wood, J. G., und Sibey, P. M., 1950. The distribution of zinc in *oat* plants. *Austr. J. Sci. Res., Ser. B*, **3**, 14—27. In den schweizerischen Bibliotheken leider nicht vorhanden.
- Würgler, W., 1942. Über das Wachstum der Wurzeln von *Zea Mays* in Organ-kultur und seine Beeinflussung durch Wirkstoffe. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **52**, 239—271. Diss. Basel.
- Yen, C. C., 1950. Study of thiamine and its relation to the germination of *Zea Mays*. Diss. Basel. Verkürzte deutsche Fassung im Druck.