

# Technik

Objektyp: **Chapter**

Zeitschrift: **Mitteilungen der Naturforschenden Gesellschaft in Bern**

Band (Jahr): **8 (1951)**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

## **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.

faktoren, wie dies **B o n n e r** und **D e v i r i a n** [59] sowie **R o b b i n s** und **S c h m i d t** [60] zeigten. Die Wurzel weist in bezug auf den Vitaminstoffwechsel ganz ähnliche Verhältnisse auf wie die Mikroorganismen. Wir unterscheiden auch hier Vitamine als Hauptfaktor wie Aneurin, oder als Zusatzfaktor. Die Ergebnisse von **B o n n e r** [61, 62] über die Wirkungsspezifität der Vitamine bei der Kultur isolierter Wurzeln zeigen auch hier keine Unterschiede gegenüber Tier und Mikroorganismen. Die Wurzel ist also auxoheterotroph für ein oder mehrere Vitamine, und sie bezieht diese fehlenden Wirkstoffe einerseits aus den oberirdischen Pflanzenteilen, andererseits aus dem Boden.

## TECHNIK

All unsere Versuche wurden mit der frisch isolierten Wurzelspitze, also ohne Ueberimpfung, gemacht. Es hat den einzigen Nachteil, daß der Einfluß der Kotyledonen nicht vollständig ausgeschaltet ist, da ja noch in der isolierten Wurzelspitze Stoffe aufgespeichert sein können, die das Wurzelmeristem nicht selber synthetisiert hat, sondern eben noch aus den Kotyledonen stammen. Ich glaube aber nicht, daß unsere Versuchsergebnisse anders lauten würden, wenn wir die Wurzelspitzen durch fortlaufende Passagen zuerst von jeglichen nicht eigenen Wirkstoffen befreit hätten. Höchstens in quantitativer Hinsicht, denn die durch mehrere Passagen vollständig auxoheterotrophe Wurzelspitze ist gegenüber einer Substanz, wie sie die Sulfonamide darstellen, sicher empfindlicher geworden.

Zu unseren Versuchen verwendeten wir die Wurzeln von *Solanum lycopersicum*, *Foeniculum dulce* und *Pisum sativum* (Sorte Maikönigin). Das Samenmaterial wurde durch eine 3,5% Chlorkalklösung vor der Keimung sterilisiert. Bei *Solanum lycopersicum* wurden die Samen vor der Chlorkalksterilisation 2—3 Stunden in Wasser gelegt, um sie schon vorher ein wenig aufquellen zu lassen. Die Einwirkungsdauer in der Chlorkalklösung war für *Solanum lycopersicum* 1½—2 Stunden, während für *Foeniculum dulce* und *Pisum sativum* etwa 1 Stunde genügte. Nun wurden mit einer sterilen, abgeflamten Gabel diese Samen direkt aus der Chlorkalklösung in sterile Petrischalen gebracht, deren Boden mit gut genäster Watte und Filtrierpapier versehen war. Die Petrischalen enthielten pro Stück ungefähr 10—15 Samen und wurden für 4—5 Tage in einem Warmraum von 23° im Dunkeln gelassen. Jede Schale wird mit der Lupe genau kontrolliert, um eventuelle Infektionen auszuschalten. Nun werden gekeimte Wurzeln ausgewählt, die ungefähr gleich lang sind, damit der großen Variationsbreite im Längenwachstum der Wurzeln schon am Anfang

Rechnung getragen wird. Die etwa 10 mm langen Wurzelspitzen werden mit einem sterilen Skalpell geschnitten und mit einem Spatel in die Kulturgefäße gebracht. Die Technik bleibt also im Prinzip die von Gautheret [63] für die Wurzelkultur vorgeschlagene.

Als Kulturgefäße wurden Röhren aus Jenaerglas 18/300 mm verwendet, die an der Oeffnung aufgebogen sind und mit Hilfe von «Wäscheklammern» liegend aufgestellt werden. Die Röhren werden mit 10 cm<sup>3</sup> Nährlösung versehen, mit einem Wappetropfen verschlossen und im Autoklav für 15 Minuten bei 115° sterilisiert. In jede Röhre wird mit dem Spatel eine Wurzelspitze steril eingeführt.

Der Vorteil dieser von Geiger in die Technik eingeführten Kulturröhren besteht darin, daß die Wurzel in die Länge wächst und ihr Wachstum periodisch gemessen werden kann, ohne daß die Wurzel aus dem Milieu herausgenommen werden muß. Das Längenwachstum wurde mit Hilfe eines Busch-Citophot auf folgende Art gemessen: Wir legen die Kulturröhre auf eine Platte und beleuchten seitlich von oben die Wurzel. Das durch ein Objektiv aufgefangene Bild wird durch ein Prisma auf einen seitlich angebrachten Spiegel geworfen, der das 3.75 mal vergrößerte Bild auf einen Zeichentisch projiziert. Auf dem Zapiert wird nun die hell erscheinende Wurzel abgezeichnet, das heißt, es wird mit einem Bleistiftstrich nur die Länge festgehalten. Später messen wir mit einem Kurvenmesser (ein sogenanntes Distanzmeßgerät für geographische Karten) die Länge des Bleistiftstriches und können so leicht die wirkliche Länge der Wurzeln errechnen. So können wir die gleiche Wurzel während ihres Wachstums beliebig oft messen und erhalten dadurch Zeitwachstumskurven.

Der Nachteil der Röhren liegt in der schlechten und ungleichen Belüftung. Deshalb ist die Wachstumsgeschwindigkeit auch kleiner gegenüber derjenigen in Erlenmeyer und Petrischalen.

Für jede Konzentration eines Versuches wurden 20 Wurzeln genommen, um einen möglichst guten Durchschnittswert zu erhalten. Denn erstens weisen die Wurzeln eine ziemlich große Variationsbreite im Längenwachstum und in der Zahl der Nebenwurzeln auf, dann gibt es ja immer noch Ausfälle durch Infektion und durch Wurzeln, die überhaupt nicht oder schon nach sehr kurzer Zeit ihr Wachstum einstellen und sich braun verfärben.

Als Nährlösung verwendeten wir für *Pisum sativum* das Milieu von Bonner und Devirian mit Aneurin:

Aqua dest.	1000,0 cm <sup>3</sup>
Ca-nitrat	242 mg
Mg-sulfat	42 mg
K-nitrat	85 mg
K-chlorid	61 mg
K-monophosphat	20 mg
Ferritartrat	1,5 mg
Saccharose puriss.	40 g (4%)
Aneurin	100 $\gamma$

Für die Kultur von *Solanum lycopersicum* und *Foeniculum dulce* kam das Milieu von Robbins und Schmidt mit Aneurin und Pyridoxin zur Anwendung:

Aqua dest.	1000,0	cm <sup>3</sup>
Ca-nitrat	333	mg
Mg-sulfat	63	mg
K-nitrat	63	mg
K-chlorid	42	mg
K-monophosphat	60	mg
Ferrisulfat	2,5	mg
Kupfersulfat	150	γ
Borax	60	γ
Ammoniummolybdat	40	γ
Zinksulfat	800	γ
Mangansulfat	100	γ
Saccharose puriss.	20	g
Aneurin	200	γ
Pyridoxin	200	γ

Als Saccharose verwendeten wir Saccharose reinst von Siegfried. Schopfer untersuchte diese Saccharose 1949 und fand, daß sie keineswegs als reinst angesehen werden kann, sondern durch Vitamine verunreinigt ist. Neben anderen Vitaminen enthielt die Saccharose «Siegfried» pro Gramm Zucker 172 mγ p-Aminobenzoesäure und 8 mγ Biotin. Da in unseren Versuchen die Wurzeln mit Sulfonamiden gehemmt und mit PAB enthemmt werden sollten, ist das Vorhandensein von PAB im Zucker und folglich in der Nährlösung gar nicht erwünscht. Natürlich ist zu bedenken, daß dieser Zusatz von PAB gleichmäßig verteilt ist, das heißt Kontrolle wie die gehemmte oder enthemmte Serie enthalten dieses Vitamin. Es kann also in den Versuchsergebnissen höchstens quantitative Unterschiede ergeben.

Trotzdem wurde versucht, ob eine Saccharose mit wenig oder keiner Vitaminverunreinigung die Saccharose «Siegfried» ersetzen könne. Geprüft wurde eine Saccharose, die 6mal umkristallisiert war (Hoffmann-La Roche) und die pro Gramm Zucker noch 16,6 mγ PAB enthält und gar kein Biotin mehr. Im weiteren wurde Glucose (reinst) geprüft, die pro Gramm Zucker 14,6 mγ PAB und kein Biotin enthält. Dann wurde auch eine d-Fructose (Hoffmann-La Roche) als Zuckerquelle versucht, über deren Vitamingehalt nichts bekannt war, die aber sicher noch Spuren von Wirkstoffen enthält. Die Glucose wie die Fructose sind Monosaccharide, deshalb wurde von ihnen nur die Hälfte genommen, also nur 2 % statt 4 %, damit die molare Konzentration gleichbleibt. Die Versuche wurden mit *Pisum sativum* in Kulturröhren mit 10 cm<sup>3</sup> Nährlösung durchgeführt, und zwar dauerte die Kultur der Wurzeln 26 Tage bei 23 ° in völliger Dunkelheit.

Die folgende Tabelle zeigt die zusammengestellten Ergebnisse:

Zucker	% Zucker in Nährl.	Gehalt an PAB/g Zucker	Gehalt an Biotin	Längenwachstum am 26. Tag in %	Zahl der Kulturen
Saccharose „Siegfried“ ....	4	172 m $\gamma$	8 m $\gamma$	100	84
Saccharose umkristallisiert	4	16,1 m $\gamma$	—	23	51
Glucose .....	2	14,16 m $\gamma$	—	59	19
d-Fructose .....	2	unbek.	unbek.	102	11

Auffallend an diesen Ergebnissen ist der Stillstand des Wachstums bei der 6mal umkristallisierten Saccharose. Die Wurzeln sind verkümmert und bräunlich verfärbt. Mit Glucose wachsen die Wurzeln besser, erreichen aber bei weitem nicht die Länge der in Saccharose «Siegfried» gewachsenen und sind auch morphologisch anders geartet (sehr dünne und schwache Wurzeln). Die d-Fructose hingegen ermöglichte ein ganz normales Wachstum der Wurzeln, so daß man berechtigt ist, eine der Saccharose «Siegfried» ähnliche Vitaminverunreinigung anzunehmen.

Es stellte sich nun die Frage, ob der Unterschied im Wachstum zwischen der Saccharose «Siegfried» und der gereinigten Saccharose auf den Unterschied im Gehalt an PAB und Biotin zurückzuführen sei. Deshalb wurde zu der umkristallisierten Saccharose, wie auch zur Glucose eine entsprechende Menge PAB oder Biotin, oder beides zusammen hinzugefügt. Zu der Saccharose wurde pro Gramm Zucker 200 m $\gamma$  PAB und 10 m $\gamma$  Biotin hinzugegeben. Um bei der Glucose, die ja nur

Zucker	Zugesetzte Menge PAB/g Zucker	Zugesetzte Menge Biotin/g Zucker	Längenwachstum am 26. Tag in %
Saccharose umkristallisiert	—	—	23
Saccharose umkristallisiert	200 m $\gamma$	—	17
Saccharose umkristallisiert	—	10 m $\gamma$	29
Saccharose umkristallisiert	200 m $\gamma$	10 m $\gamma$	28
Glucose (reinst) .....	—	—	59
Glucose .....	400 m $\gamma$	20 m $\gamma$	71

2 %ig vorlag, pro Kulturröhre die gleiche Menge Vitamin zu haben, wurde die doppelte Menge genommen, nämlich 400 m $\gamma$  PAB und 20 m $\gamma$  Biotin pro Gramm Zucker.

Bei der umkristallisierten Saccharose bleibt trotz der Zugabe von p-Aminobenzoesäure der Wachstumsstillstand bestehen. Durch die Zugabe von Biotin wird das Wachstum nicht gefördert, und auch durch das Zusammenwirken beider Vitamine bleiben die Wurzeln im Wachstum stark zurück. Aehnlich ist das Ergebnis bei der Glucose. Hier wird durch die Zugabe von PAB und Biotin das Wachstum leicht gefördert, aber die Wurzeln bleiben doch noch gehemmt.

Damit zeigt sich, daß in der Saccharose «Siegfried» neben der p-Aminobenzoesäure und Biotin noch andere Faktoren, Wuchsstoffe wahrscheinlich hormonaler Natur vorhanden sind, die ein optimales Wachstum der Wurzeln ermöglichen. Deshalb wurde für alle Versuche die Saccharose «Siegfried» verwendet, auch wenn sie nicht als reinst anzusehen ist.

#### *Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration*

Zu den das Wachstum limitierenden Faktoren gehört nicht zuletzt auch die Wasserstoffionenkonzentration. Dies bewiesen eindeutig die Versuche von White [64] und Gautheret [65]. Da in unseren Versuchen zu der Nährlösung Substanzen zugefügt werden sollten, wie p-Aminobenzoesäure oder Purine, die also sauer oder alkalisch sind, so mußte geprüft werden, wie groß der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Wurzelkultur von *Pisum sativum* bei unseren Kulturbedingungen ist. Im weiteren war festzustellen, wie weit das pH der Nährlösung durch das Zusetzen der zu prüfenden Substanzen verändert wird.

Die Messung des pH erfolgte elektrometrisch, und zwar mit einem pH-Meßgerät «Tena» mit Chinhydrion-Calomel-Elektrode. Zum Eichen des Gerätes und als Standardlösung wurden Puffergemische nach Sorensen benutzt. Die Nährlösung nach Bonner, die selbst ein pH um 5 besitzt, wurde nun durch Zusatz von Salzsäure oder Natronlauge saurer oder alkalischer gemacht.

10 cm <sup>3</sup> Nährlösung + 1 cm <sup>3</sup> n/10 HCl	= pH 2,06
10 cm <sup>3</sup> Nährlösung + 1 cm <sup>3</sup> n/100 HCl	= pH 2,87
Nährlösung nach Bonner	= pH 5,03
10 cm <sup>3</sup> Nährlösung + 1 cm <sup>3</sup> n/100 NaOH	= pH 6,33
10 cm <sup>3</sup> Nährlösung + 1 cm <sup>3</sup> n/10 NaOH	= pH 8

Die Nährlösungen mit dem pH 2,06, 2,87, 3,75, 5,03, 6,33, 8 wurden in die Röhren abgefüllt und während 15 Minuten bei 115 ° im Autoklav sterilisiert und dann das pH erneut bestimmt.

pH vor dem Sterilisieren	2,06	pH der sterilen Lösung =	2,06
» » » »	2,87	» » » »	= 2,85
» » » »	3,75	» » » »	= 3,78
» » » »	5,03	» » » »	= 5,02
» » » »	6,35	» » » »	= 6,30
» » » »	8	» » » »	= 8

Das pH der Nährlösungen wird also durch das Sterilisieren nicht verändert.

Die folgende erste graphische Darstellung (Fig. 1) zeigt das Längenwachstum der Wurzeln in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration und der Zeit, während die zweite Darstellung (Fig. 2) den Einfluß des pH auf das Längenwachstum und Trockengewicht der Wurzeln am 26. Tag zeigt.

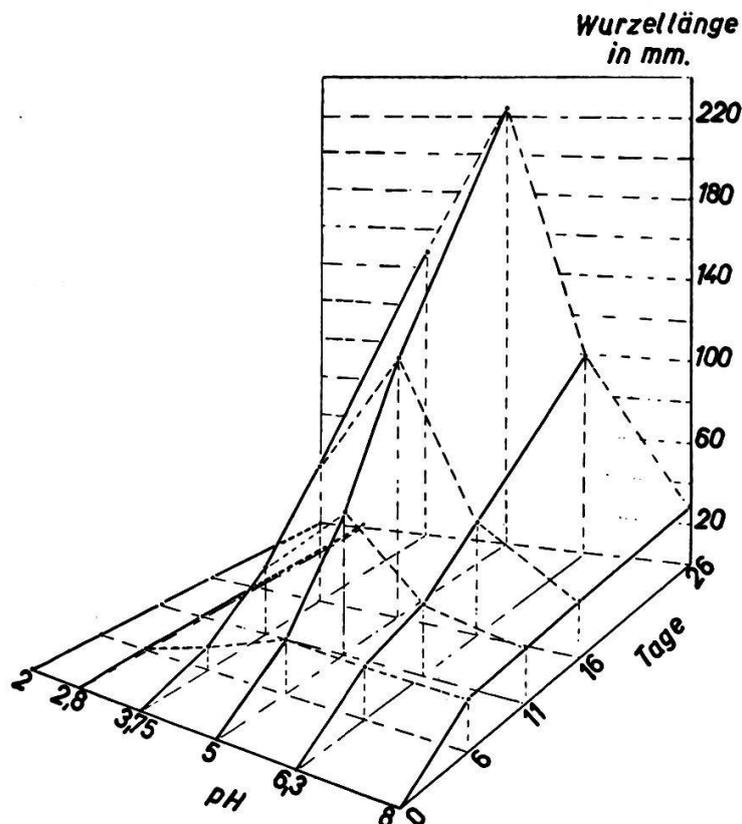


Fig. 1

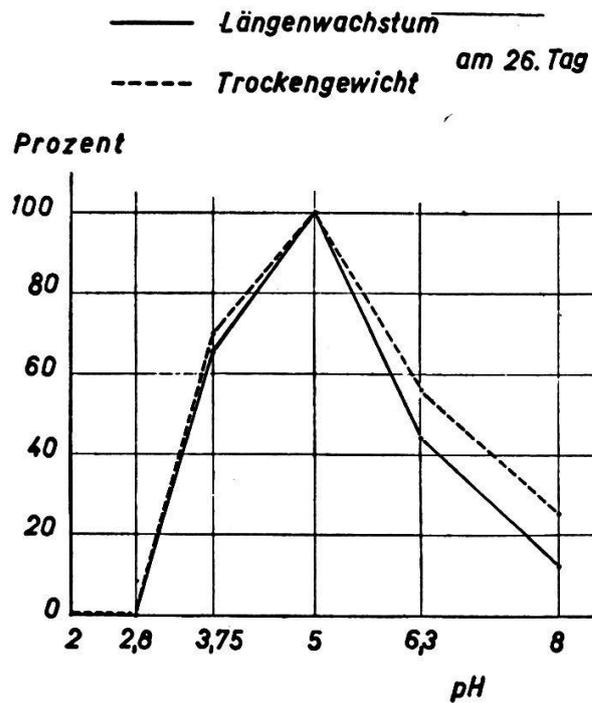


Fig. 2

Die Zusammenstellung der Versuchsergebnisse findet sich in der folgenden Tabelle:

pH	Zahl der Kulturen	Längenwachstum am 26. Tag in mm	Prozent	Trockengewicht in mg	Prozent
2,0	23	0	0	0	0
2,8	23	2	0	0	0
3,75	21	147,8	65,8	9,66	70
5,0	19	224,6	100	13,8	100
6,3	17	99,3	44,2	7,76	56,2
8	18	28,8	12,8	3,55	25,7

Das Wachstum der Pisumwurzeln in steriler Organkultur ist somit stark von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Das Optimum liegt bei pH 5 (Grundmilieu von B o n n e r) und das Verschieben um 1 pH nach dem sauren oder alkalischen Gebiet vermindert das optimale Wachstum um 30—40 %. Bei pH 2 und 2,8 wachsen die Wurzeln überhaupt nicht mehr und werden sofort bräunlich verfärbt.

Die Nährlösungen wurden nach 26tägiger Kulturdauer noch einmal auf ihr pH geprüft.

pH der Nährlösung am 1. Kulturtag	am 26. Tag	Differenz
2,0	2,23	+ 0,23
2,8	3,0	+ 0,20
3,75	5,05	+ 1,30
5,02	5,07	+ 0,07
6,3	4,7	— 1,60
8	7,4	— 0,60

Es zeigt sich, daß die Wurzeln die Tendenz haben, das pH ihres Milieus näher an das pH des Optimalmilieus zu bringen. Liegt das pH der Nährlösung in saurem Bereich, so reagiert die Wurzel mit der Abgabe von Alkali um die Wasserstoffionenkonzentration herabzusetzen, auf der andern Seite wird im neutralen bis schwach alkalischen Milieu von der Wurzel Säure freigesetzt.

Um festzustellen wie weit nun das pH der Nährlösung durch den Zusatz von Sulfonamiden und anderen Substanzen beeinflußt wird, wurde das pH der verschiedenen Nährlösungen nach dem Sterilisieren gemessen. Es ergab sich, daß durch die Zugabe der sehr geringen Substanzmengen zu der Nährlösung das pH der letzteren nicht wesentlich verändert wird. So wurde zum Beispiel das pH der Nährlösung nach **B o n n e r** durch Zugabe von Sulfanilamidothiazol in einer Konzentration von  $10^{-5}$  molar von 5,02 auf ein pH von 5,17 verschoben.

Somit hat also in unseren Versuchen die Wasserstoffionenkonzentration keinen Einfluß auf die Versuchsergebnisse.

### VORVERSUCHE ÜBER DIE WIRKUNG EINES SULFONAMIDS AUF DIE STERILE WURZELKULTUR DREIER DIKOTYLEDONEN

#### *Solanum Lycopersicum*

Nach 6 Tagen wurden die bei 23 ° im Dunkeln gekeimten Wurzelspitzen von *Solanum lycopersicum* geschnitten. Je eine Wurzelspitze wurde in einer flachen Roux-Schale in 35 cm<sup>3</sup> Nährlösung nach **R o b b i n s** mit Aneurin und Pyridoxin bei 23 ° im Dunkeln gezüchtet.