

Untersuchungen über die Biosynthese einiger wasserlöslicher Vitamine der B-Gruppe, insbesondere der Pantothensäure

Autor(en): **Louis, Rolf**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **10 (1953)**

PDF erstellt am: **15.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-319459>

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.

ROLF LOUIS

Untersuchungen über die Biosynthese einiger wasserlöslicher Vitamine der B-Gruppe, insbesondere der Pantothensäure

I. Allgemeine Einleitung

Die letzten Jahrzehnte biologischer Forschung brachten uns in den verschiedenen Teilgebieten der Wirkstofflehre ganz bedeutende Fortschritte.

Zu Beginn lag das Hauptgewicht mehr auf der Konstitutionsaufklärung der neuentdeckten Substanzen, später aber versuchte man, in den Wirkungsmechanismus der Wirkstoffe näher einzudringen. Die genaue Kenntnis der Struktur gab dem Forscher die Möglichkeit in die Hand, die einzelnen Wachstumsfaktoren auf ihre Konstitutionsspezifität hin zu prüfen. Darüber hinaus erkannte man in den letzten Jahren, daß unter Umständen chemische Veränderungen am Molekül eines Wirkstoffes dessen günstigen Einfluß auf die Entwicklung von Organismen nicht nur aufheben, sondern Substanzen entstehen lassen, die geradezu das Wachstum unterbinden. Wir gelangen so von einem Wuchsstoff zu einem ausgesprochenen Hemmstoff. In der Forschung werden unter dem Begriff der *Antivamine* alle jene Substanzen zusammengefaßt, die als Antagonisten der Vitamine auftreten können.

Unter der Wirkung eines Antivitamins werden, dank dessen Eigenschaften, das normale Eingreifen des Vitamins in den Stoffwechsel zu verhindern, in der Zelle grundlegende Lebensvorgänge gestört oder blockiert und als Folge davon Entwicklung und Fortpflanzung weitgehend oder vollständig gehemmt. Es ist klar, daß aus diesen Gründen den Antivitaminen eine enorme praktische Bedeutung als bakteriostatische, baktericide und insekticide Stoffe zukommt.

Ein schönes Beispiel für solche Vitamin — Antivitamin-Verhältnisse stellen die Sulfonamide dar. Man bemerkte, daß diese Substanzen auf

Mikroorganismen entwicklungshemmend, also bakteriostatisch, wirkten, und schloß daraus, daß die Sulfonamide in irgendeiner Weise die Ernährung dieser Organismen störten. Später konnte beobachtet werden, daß die Sulfonamide ihre Wirkung *in vitro* nur dann entfalten konnten, wenn sie in kleiner Menge verabreicht wurden oder wenn das Milieu kein Pepton enthielt, und man gelangte zur Überzeugung, daß gewisse Substanzen existieren müssen, die in der Lage sind, die Wirkung der Sulfonamide auszulöschen. 1940 gelang es WOODS und FILDES (1) und WOODS (2), den gesuchten Stoff mit *p*-Aminobenzoesäure (PAB) zu identifizieren, und durch die Isolierung von PAB aus der Hefe durch KUHN und SCHWARZ (3) ließen sich die bisherigen Ergebnisse bestätigen. PAB stellt ein lebensnotwendiges Vitamin dar.

Die Ähnlichkeit in der chemischen Struktur von PAB und dem Grundkörper der Sulfonamide, der *p*-Aminobenzolsulfosäure, fand ihren Niederschlag in der Verdrängungshypothese von WOODS (4). Bald wurden auch noch andere Substanzen mit Antisulfonamidcharakter entdeckt. So erwies sich die *p*-Aminobenzoylglutaminsäure (PABG) als wirksames Antisulfonamid; daneben aber auch Stoffe ohne irgendeine chemische Verwandtschaft mit PAB, wie Purine und Nucleinsäuren. Aus verschiedenen Versuchen über die Wirkung der Purine, vor allem Adenin, als Antisulfonamide (5, 6, 7) schließt SCHOPFER, daß PAB in die Synthese der Purine eingreift; daher wird bei der Verdrängung von PAB deren Synthese gestört. SHIVE und ROBERTS (8) kommen, unabhängig von SCHOPFER, zu den gleichen Schlüssen und fanden außerdem in durch Sulfonamid gehemmten Kulturen eine Vorstufe der Purine angehäuft.

Der erste Versuch über die Sulfonamidwirkung bei höheren Pflanzen stammt von FOURNEAU und Mitarbeitern (9) und betrifft die Keimung von Kressesamen. In einer grundlegenden Arbeit zeigten MANGENOT und CARPENTIER (10), daß die Sulfonamide das Längenwachstum der Wurzel von *Pisum sativum* hemmen und starke histologische Veränderungen hervorrufen. Weitere Ergebnisse stammen von WIEDLING (11), STOLL (12), HAZARD (13), MACHT (14) und SCHOPFER (15).

Alle diese Versuche wurden mit Wurzeln unternommen, die noch mit den Kotyledonen in Verbindung standen. Erst durch die Möglichkeit, isolierte Wurzeln zu kultivieren, wird jeglicher Einfluß durch Wirkstoffe aus den oberirdischen Teilen einer Pflanze ausgeschaltet. Die Untersuchungen von BONNER (16) über die Wirkung von Sulfonamiden auf das Wachstum isolierter Tomatenwurzeln zeigten klar, daß die Wurzel ein außerordentlich günstiges Testobjekt darstellt.

Eine eingehende Arbeit über die Wirkung von Sulfonamiden und ihren Antagonisten auf das Wachstum von *Pisum* Wurzeln in steriler Organkultur wurde 1951 von ANKER (17) veröffentlicht. Er prüfte die wachstumshemmende Wirkung zahlreicher Sulfonamide, die Möglichkeit der Enthemmung durch PAB, PABG, Folsäure, Purine und Nucleinsäuren und die Histologie und Zytologie gehemmter und enthemmter Wurzeln.

Die Sulfonamide verhalten sich recht unterschiedlich: in einer Konzentration von 10^{-5} molar wirken am stärksten Irgafen, Irgamid und Albucid, während Cibazol etwas weniger wirksam ist; Elkosin und Guanicil sind etwa $1/20$ so wirksam wie das Cibazol, und Sulfanilamid und Uliron sind ganz inaktiv.

PAB allein übt in dem verwendeten Konzentrationsbereich (10^{-4} bis 10^{-7} m) keinen Einfluß auf das Längenwachstum der Wurzel aus, desgleichen PABG. Trockengewicht und Zahl der Nebenwurzeln werden nur durch die stärkste Konzentration von PAB (10^{-4} m) etwas gehemmt.

Die Hemmungswirkung des Cibazols wird durch eine Menge von PAB, die 16mal geringer ist als die des Sulfonamids, bis zum 16. Kulturtage vollständig aufgehoben; ebenso gelingt es, durch Irgafen ($6 \cdot 10^{-5}$ m) gehemmte Wurzeln durch PAB, PABG und Folsäure bestimmter Konzentration ganz zu enthemmen. Unter den von ANKER geprüften Purinen und Nucleinsäuren gaben einzig Guanin und Adenosinphosphorsäure eine sichere Enthemmung.

Die Histologie der Wurzelspitzen war nach der Behandlung mit Cibazol deutlich verändert; vor allem erscheint das Periblem deformiert und degeneriert. Die enthemmten Wurzeln weisen im Gegensatz dazu keine morphologischen Veränderungen mehr auf.

ANKER konnte die von SCHOPFER bei *Saccharomyces* beobachtete Tatsache, daß die Ribonucleinsäure der mit Sulfonamid behandelten Zellen bedeutend rascher abgebaut wird als in den Kontrollzellen, bei den isolierten Wurzelspitzen von *Pisum* bestätigen. Die durch Adenosinphosphorsäure enthemmte Wurzel ist nur histologisch und morphologisch wieder normal, während die Ribonucleinsäure sich gleich wie bei den gehemmten Wurzeln verhält. Störungen in den Mitosestadien in mit Irgafen behandelten Zellen wurden vom Autor nicht beobachtet, dagegen ist die Zahl der Mitosen deutlich verringert.

Eine Erweiterung und Ergänzung zu den oben beschriebenen Untersuchungen von ANKER stellt die Arbeit von BEIN (18) über den Einfluß verschiedener Wirkstoffe und von Bodenextrakten auf das Wachstum

der isolierten Wurzel in Organkultur dar. Die Ergebnisse der dort mitgeteilten ausführlichen Versuche geben Aufschluß über das Verhalten eines pflanzlichen Meristems gegenüber einem selektiv herbiziden Phytohormon (2,4—D), einem Insekticid (Gammexan) und gegenüber Antibiotika (Penicillin und Streptomycin). Es stellte sich heraus, daß sich die 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4—D) Wurzelkulturen gegenüber wie ein Phytohormon verhält. Wie mit Heteroauxin ergab sich auch hier ein von der Konzentration abhängiger klarer Übergang von einer fördernden zu einer hemmenden Wirkung. Deutlich kommt die selektive herbicide Wirkung von 2,4—D bei den Wurzelkulturen zum Ausdruck: die Wurzeln von Dikotylen (*Pisum sativum*) werden viel stärker in ihrem Wachstum gehemmt als Wurzeln von Monokotylen (*Zea mays*) (18).

Die Frage, ob den beiden Antibiotika Penicillin und Streptomycin neben ihrer baktericiden Wirksamkeit eine cytotoxische Aktivität gegenüber pflanzlichem Gewebe zukommt, führte zum Ergebnis, daß reines Na-Penicillin G auf Wurzeln von *Zea mays* (150 OE/cc) und von *Pisum* (160 OE/cc) keine Wirkung ausübt. Bei Verwendung der gelben Handelspenicilline der Jahre 1945 bis 1947 an Stelle des reinen konnte der Verfasser eine starke Hemmung des Längenwachstums der Wurzel von *Zea mays* in einer Konzentration von bloß 5 OE/cc feststellen. Durch chromatographische Trennung gelang es, das für die beobachtete Wachstumshemmung wirksame Prinzip von den gelben Farbstoffen des Handelspenicillins abzutrennen und colorimetrisch als Indol-3-Essigsäure zu identifizieren. Dieses Phytohormon tritt als Stoffwechselprodukt in *Penicillium notatum* auf. Streptomycin (sulfat) in einer Konzentration von 12,5 γ /cc beeinträchtigt das Längenwachstum der Pisumwurzel sehr stark, während das Trockengewicht weniger beeinflußt wird (19).

Die isomeren Hexachlorcyclohexane (HCH) üben auf die Wurzel von *Pisum* ungleiche Wirkungen aus: ist das α -HCH inaktiv oder wenig toxisch, so setzen 6 bis 10 γ /cc Gammexan (γ -HCH) Längenwachstum und Trockengewicht erheblich herab; das δ -Isomere gibt schon mit 1 γ /cc denselben Effekt wie das Gammexan. Die Pisumwurzel gehört somit zu einer Gruppe von Organismen, die gegenüber γ - und δ -HCH empfindlich sind, wobei das δ -Isomere viel aktiver ist. Die Analogie im Molekülbau der HCH und der Inosite veranlaßten SLADE (20) zur Hypothese, daß das γ -Isomere (Gammexan) und das meso-Inositol die gleiche Raumkonfiguration besitzen; man müßte also das Gammexan als ein Antivitamin des *m*-Inositols auffassen, das, analog den Verhältnissen Sulfonamid/PAB, seine Wirkung durch Verdrängen des Vitamins entfaltet. In der Folge erschie-

nen dann einige Arbeiten, die diese Annahme bestätigen (21, 22), aber auch solche, die keinen Antagonismus mit dem *m*-Inositol nachweisen konnten (23, 24, 25), was zu ernsthaften Kritiken an der Hypothese von SLADE führte. Die Versuche von BEIN (18) zur Enthemmung mit *m*-Inositol verliefen negativ: *m*-Inositol besitzt im Verhältnis 10 : 1 gegenüber γ - und δ -HCH keine antagonistische Wirksamkeit. 1948 gelang es nun außerdem, die Raumkonfiguration des γ - und δ -HCH aufzuklären. Gammexan weist nicht dieselbe Konfiguration auf wie das *m*-Inositol; vielmehr sind δ -HCH und *m*-Inositol räumlich gleich gebaut (26). Im Jahre darauf konnten BASTIANSEN, ELLEFSEN und HASSEL (27) dieses Ergebnis bestätigen. Auf Grund aller dieser Befunde muß wohl die Hypothese von SLADE, daß Gammexan durch Verdrängung von *m*-Inositol wirkt, endgültig fallengelassen werden.

Der Gehalt der Böden an Wirkstoffen (Vitamine, Hormone, Antibiotika), die das Wurzelwachstum *in vitro* beeinflussen, führte BEIN zu der Frage, welche Rolle diesen Stoffen als exogene Faktoren für die Regulierung des Wurzelwachstums im Boden zukommt und inwiefern sie indirekt durch Wirkung auf die Mikroorganismen des Bodens darauf einwirken. Versuche mit Extrakten aus Böden verschiedener Herkunft zeigten, daß bei gleicher Dosierung die Entwicklung von *Mucorineen* stark gefördert, das Wachstum der Pisumwurzel aber gehemmt wird. Dieser hemmende Einfluß nimmt mit zunehmender Bodentiefe ab; außerdem erwiesen sich Extrakte von Waldböden viel wirksamer als Garten- und Ackererden. Jahreszeitliche Veränderungen, die im Sinne einer Periodizität hätten gedeutet werden können, ergaben sich aber nicht.

Mit den Fortschritten der Forschung drängt sich mehr und mehr die Frage nach dem vitaminischen Gleichgewicht und den Vitaminkorrelationen auf. Diese beiden Begriffe sind im Zusammenhang mit der Antivitaminwirkung durch SCHOPFER (28, 34) geprägt worden. Der Stoffwechsel und die normale Biosynthese der Vitamine verlaufen scheinbar in vorgezeichneten Bahnen. Ein Gleichgewicht stellt sich ein, Produkt einer langen Anpassung, die den auf einem Milieu zum Ausdruck kommenden charakteristischen Stoffwechsel bestimmt. Die Zufuhr eines einzelnen Vitamins von außen im Überschuß oder eines Antivitamins führt zu Störungen mannigfaltiger Art, die sich oft unserer direkten Beobachtung entziehen, deren Kenntnis aber von großer Wichtigkeit ist.

Als Beispiel erinnern wir an *Rhizopus suinus*; dieser Pilz (ein Phycomycet der Gruppe der Mucorineen) wird in seiner Entwicklung durch das Aneurin gehemmt, das hier die Rolle eines Inhibitors spielt. In seiner

Gegenwart nimmt, obgleich die Bildung der lebenden Substanz deutlich vermindert ist, die Quantität des synthetisierten Biotins beträchtlich zu. Der gestörte Stoffwechsel eines Vitamins wirkt sich also auf den eines anderen aus (28). Untersuchungen, die mit dem Vitamin K₃ (2-methyl—1,4-Naphtochinon) in unserem Institut durchgeführt wurden, brachten neues Tatsachenmaterial über das vitaminische Gleichgewicht. Vitamin K₃ ist der Grundkörper des Vitamins K₁ (2-methyl—3-phytyl—1,4-Naphtochinon), das durch höhere Pflanzen gebildet wird, und des Vitamins K₂ (2-methyl—3-squalenyl—1,4-Naphtochinon), das sich in Bakterien vorfindet.

Das Vitamin K₃ wird in den Chloroplasten und den Blättern synthetisiert (29). Seine Funktionen im pflanzlichen Stoffwechsel sind noch wenig bekannt; vor allem zeigt es eine antibiotische, hemmende Wirkung, die in Zusammenhang mit seiner Chinonstruktur zu setzen ist: Hemmung der Entwicklung zahlreicher Mikroorganismen, Hemmung der Photosynthese bei *Elodea*, zerstörende Wirkung auf die Semipermeabilität (*Spirogyra*), hemmende Wirkung auf die Aktivität kristallisierter Urease (30, 31, 32, 33). Außerdem übt das Vitamin K₃ eine sehr starke antibiotische Wirkung auf das Wachstum der isolierten Pisumwurzel *in vitro* aus. 5 γ /cc setzen die Entwicklung gegenüber den Kontrollen bereits um 24 Prozent herab. Die Tätigkeit des Wurzelvegetationspunktes wird blockiert. Der bei Mikroorganismen (*Phycomyces*) beobachtete Antagonismus zwischen K₃ und Nicotinsäure ist bei der Pisumwurzel weniger deutlich und nicht einfach zu zeigen, da die zugefügte Nicotinsäure sehr rasch selbst zum Inhibitor wird; immerhin gelingt mit schwachen Dosen eine teilweise Ent-hemmung des Längenwachstums und der Nebenwurzelbildung.

Die Analyse der durch K₃ in ihrer Entwicklung blockierten Wurzeln zeigt klar, wie der gesamte Vitaminstoffwechsel gestört ist (34):

Das in der Nährlösung enthaltene Aneurin wird bedeutend rascher abgebaut als bei den Kontrollen ohne Vitamin K₃; für Lactoflavin und Adermin stellt sich eine Hypervitaminose, für Biotin und Pantothen-säure eine Hypovitaminose ein. Der Gehalt an Nicotinsäure hingegen bleibt unverändert. Ähnliche tiefgreifende Störungen des vitaminischen Gleichgewichtes konnten nach der Einwirkung eines Antivitamins des Aneurins, des Neopyrithiamins, auf die gleiche Wurzel festgestellt werden (34).

Über die für die normale Gestaltung erforderlichen quantitativen Beziehungen anderer Vitamine sind erst spärliche Kenntnisse vorhanden.

Die grüne Pflanze als Ganzes ist im allgemeinen befähigt, ihren Wirkstoffbedarf durch die eigene Synthese zu decken, und ist somit, was diese

Substanzen betrifft, von der Umwelt weitgehend unabhängig, wobei allerdings nicht zu vergessen ist, daß die im Boden vorhandenen Wirkstoffe nicht ohne jeglichen Einfluß auf die Pflanzen sein werden.

Anders verhalten sich dagegen die einzelnen Teile einer solchen Pflanze. Ihr Synthesevermögen für verschiedene Wirkstoffe ist recht unterschiedlich. Dank der Technik der isolierten Organkultur unter aseptischen Bedingungen hat man in den letzten Jahren einen Einblick in die Wirkstoffbedürfnisse einzelner Pflanzenteile gewinnen können. Ist ein solcher Teil nicht imstande, einen bestimmten Wirkstoff zu bilden, so muß ihm dieser, will man ihn mit Erfolg *in vitro* kultivieren, von außen zugefügt werden. Den Wurzeln fehlt beispielsweise ganz allgemein die Synthesefähigkeit für das Aneurin. *In vivo* wird es ihnen von den oberirdischen grünen Teilen geliefert, *in vitro* muß es dem Kulturmilieu beigelegt werden. Von den für optimales Wachstum nicht benötigten Wirkstoffen nimmt man an, daß sie durch das betreffende Organ selbst gebildet werden.

Die nachstehende Arbeit hatte zum Ziel, nicht die Bedürfnisse eines Organs an Wirkstoffen zu untersuchen, sondern vielmehr seine synthetischen Fähigkeiten für einige Glieder des großen Vitamin-B-Komplexes, und gleichzeitig zu versuchen, deren Stoffwechsel über eine gewisse Zeit hin zu verfolgen. Als Untersuchungsmaterial wählten wir Samen von *Phaseolus vulgaris* und isolierte Wurzeln von *Pisum sativum* in steriler Organkultur.

II. Organkultur und Gewebekultur

Mit zunehmender Organisation eines Organismus spezialisiert sich auch sein Gesamtstoffwechsel, und die Schwierigkeiten, ihn zu überblicken, vergrößern sich rasch. Ein Organismus pflanzlicher oder tierischer Natur ist aus Organen aufgebaut, die oft ganz verschiedene Funktionen ausüben, und aus Geweben, denen je nach Grad und Art ihrer Differenzierung verschiedene Aufgaben zukommen. Weiter ist die Tätigkeit aller dieser Teile genau aufeinander abgestimmt.

Aus diesen Gründen ist es praktisch außerordentlich umständlich, wenn nicht unmöglich, die physiologischen Vorgänge, die sich in einem Organ oder in einer bestimmten Gewebeart abspielen, zu erfassen, solange noch der in Frage kommende Teil mit dem Gesamtorganismus in Verbindung steht. Setzen wir uns beispielsweise zum Ziel, zu untersuchen, ob irgendein Vitamin in allen Organen der Pflanze synthetisiert wird oder nur in ganz bestimmten, so stoßen wir schon auf Schwierigkeiten; denn es ist

nicht möglich, die Vitaminsynthese zum Beispiel der Wurzel zu erfassen, solange sie mit den oberirdischen Teilen der Pflanze in Verbindung steht und von den Blättern Vitamine in die Wurzel geleitet werden können. Erst durch die Entwicklung der Technik der Organ- und Gewebekultur wurden manche Probleme der Wirkstoffphysiologie im Zusammenhang mit der Entwicklungsphysiologie der Lösung nähergebracht.

Die ersten Versuche, pflanzliche Gewebekulturen zu erhalten, stammen von HABERLANDT (35). Zwei Jahrzehnte später gelang es KOTTE (36) und ROBBINS (37), Gewebe- und Wurzelkulturen zu züchten, doch stellten diese nach kurzer Zeit ihr Wachstum ein und gingen zugrunde. Diese anfänglichen Mißerfolge lassen sich wohl weniger auf die Wahl ungeeigneter Versuchspflanzen zurückführen als vielmehr auf die noch unvollkommene Nährlösung. WHITE (38) erzielte das erste wichtige Ergebnis, indem es ihm gelang, Tomatenwurzeln während unbeschränkter Zeit in einem relativ einfachen Milieu zu kultivieren. Bereits anfang der zwanziger Jahre ermöglichten die Arbeiten von HARRISON und CARREL Untersuchungen an tierischen Gewebekulturen, während erst Jahre später die tierische Organkultur gelang. Demgegenüber bereitete die pflanzliche Gewebekultur mehr Schwierigkeiten als die Organkultur. Erst die Technik von GAUTHERET (39, 40) ermöglichte es, pflanzliche Gewebekulturen erfolgreich durchzuführen. Den Ausgangspunkt bilden meristematische Gewebe — wie Kambium —, die sich unbeschränkt überimpfen lassen.

Grundlegend für das Gelingen von Organ- und Gewebekulturen ist die richtige Zusammensetzung der Nährlösung. Der Organismus als Ganzes weist nicht denselben Stoffwechsel auf wie eine bestimmte Gewebeart oder ein isoliertes Organ. In jedem Fall muß bei der Wahl der Nährlösung den Bedürfnissen des zu kultivierenden Objekts Rechnung getragen werden. Ferner ist zu berücksichtigen, daß es für viele Untersuchungen unerlässlich ist, die genaue Zusammensetzung des verwendeten Milieus zu kennen, es also keine chemisch undefinierten Bestandteile enthalten darf. Die ersten für die Kultur der isolierten Wurzel benutzten Nährmedien waren auf der Grundlage der KNOPSchen und der PFEFFERschen Nährlösung aufgebaut. Das von WHITE verwendete Milieu für die Kultur der Tomatenwurzeln war die durch Saccharose und Hefeextrakt (Wachstumsfaktoren) verbesserte Nährlösung von USPENSKI. Der nicht unbedeutende Nachteil dieses Milieus war der, daß es sich infolge seines Gehaltes an Hefeextrakt nicht vollständig aus chemisch genau definierten Bestandteilen herstellen ließ. Daher bemühte sich die Forschung intensiv, herauszufinden, was für eine Substanz das wirksame Prinzip des

Hefeextraktes darstellt. 1934 ersetzte SCHOPFER (41) mit Erfolg den Hefeextrakt bei *Phycomyces* durch kristallisiertes Aneurin. Kurz darauf fanden zur gleichen Zeit ROBBINS und BARTLEY (42), BONNER (43) und WHITE (44), daß auch für Wurzelkulturen das Aneurin wirksam ist und den Hefeextrakt zu ersetzen vermag. Weitere Untersuchungen führten dann zur Erkenntnis, daß der Ertrag durch Zusatz von Spurenelementen (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B, J) verbessert werden kann (WHITE, ROBBINS und SCHMIDT).

Im Gegensatz dazu verzichteten BONNER und DEVIRIAN auf eine komplizierte Spurenelementmischung und setzen Ferritartrat und Aneurin zu (Milieu I), während Milieu II zusätzlich noch Nikotinsäure enthält. Neben Ferritartrat und Aneurin ist im Milieu III außerdem Pyridoxin vorhanden.

In diesen von den verschiedenen Forschern vorgeschlagenen Grundmilieus sind folgende Mineralsalze in wechselnden Mengenverhältnissen vorhanden: Ca-nitrat, K-nitrat, Mg-sulfat, K-chlorid und K-monophosphat.

Die Wahl eines der erwähnten Milieus richtet sich nach der für die Wurzelkultur vorgesehenen Pflanzenart. Die Wurzeln vieler Dikotyledonen lassen sich in einer oder mehreren der angeführten Nährlösungen unbegrenzt überimpfen, dagegen ist es bei Wurzelkulturen von Monokotyledonen bis jetzt nicht gelungen, Passagen über längere Zeit zu erhalten. Erst kürzlich erschien eine Arbeit von MOREL und WETMORE (45), in welcher über Gewebekulturen von Monokotyledonen berichtet wird. Den Verfassern gelang es, Gewebe zweier tropischer *Araceen* während unbeschränkter Zeit *in vitro* zu kultivieren. Ihre Untersuchungen scheinen zu zeigen, daß diese Gewebe gewisse bis jetzt noch unbekannte Wachstumsfaktoren verlangen, die in der Milch unreifer Kokosnüsse vorhanden sind.

Die meisten Wurzeln sind nicht in der Lage, die Synthese des Aneurins zu bewerkstelligen. Alle vollsynthetischen Nährlösungen enthalten deshalb dieses Vitamin, um ein optimales Wachstum der isolierten Wurzel zu gewährleisten. Daneben gibt es viele Wurzeln, die außer dem Aneurin noch andere Wachstumsfaktoren (zum Beispiel Adermin, Nikotinsäure) für ihr Wachstum benötigen (BONNER [46], BONNER und DEVIRIAN [47], ROBBINS und SCHMIDT [48], WHITE [49]). Prinzipiell fand man in bezug auf den Vitaminstoffwechsel gleiche Verhältnisse bei der Wurzel wie bei den Mikroorganismen. Ein Vitamin kann als Hauptfaktor benötigt werden, wenn die Wurzel dessen Synthese nicht durchzuführen imstande ist,

oder aber es wirkt bloß zusätzlich (Zusatzfaktor). Was die Wirkungsspezifität der Vitamine betrifft, so bewegt sie sich im Rahmen der für Tiere und Mikroorganismen beobachteten Verhältnisse (BONNER [50, 51]). Die Auxoheterotrophie einer Wurzel bezieht sich auf ein bis mehrere Vitamine. Diese werden ihr einerseits aus den oberirdischen Pflanzenteilen zugeführt, möglicherweise werden sie außerdem auch zum Teil aus dem Boden aufgenommen, wo sie in nachweisbaren Mengen vorhanden sind (ROULET [52]).

III. Technik und Testmethoden

Für die Untersuchungen an *Phaseolus vulgaris* verwendeten wir die Handelssorte «Rapid». Die Bohnen wurden, nach dem Auslesen der beschädigten Samen, in einer 3,5prozentigen Chlorkalklösung während einer Stunde sterilisiert und anschließend in einem vorher mit einer gleich konzentrierten Chlorkalklösung behandelten Keimkasten auf Filtrierpapier und in Berührung mit destilliertem Wasser bzw. KNOPScher Nährlösung bei Zimmertemperatur zur Keimung gebracht. Die in bestimmten Zeitabständen geernteten Pflänzchen untersuchten wir, getrennt nach Kotyledonen und Keimling, auf ihren Gehalt an Aneurin und Biotin.

Alle übrigen Versuche wurden mit *Pisum sativum* («Maikönigin») ausgeführt. Das Samenmaterial wurde, nach gründlicher Auslese, vor der Keimung in einer frischbereiteten 3,5prozentigen Chlorkalklösung sterilisiert. Die Einwirkungsdauer betrug 1 bis 1 $\frac{1}{4}$ Stunden. Darauf wurden die Samen mittels einer abgeflamten Drahtgabel in vorbereitete sterile Petrischalen verbracht, deren Boden mit gut durchnäßter Watte und Filtrierpapier ausgekleidet ist. Jede der Schalen enthielt 10 bis 15 Samen und wurde für 4 bis 5 Tage in einem Raum von 23 ° C im Dunkeln belassen. Um eventuelle Infektionen zu erkennen, wird jede Schale mit einer Lupe genau besehen, und die infizierten werden sofort ausgeschaltet. (Ein während der Kulturdauer immer wieder auftretender kleiner Prozentsatz von Infektionen läßt sich in den wenigsten Fällen auf einen Manipulationsfehler zurückführen, sondern hat seinen Grund wohl in der mangelhaften Sterilisation einzelner Samen.) Darauf werden Wurzeln ausgewählt, die in ihrer Länge möglichst übereinstimmen, um die ohnehin große Variationsbreite im Längenwachstum etwas zu vermindern. Mit Hilfe eines sterilen Skalpells werden etwa 10 mm lange Wurzelspitzen abgeschnitten und mit einem Spatel steril in die Kulturgefäße gebracht. Die

Arbeitsweise folgt den Richtlinien, wie sie GAUTHERET (53) für die Wurzelkultur vorgeschlagen hat.

Die so isolierten Wurzelspitzen von *Pisum* werden im Milieu von BONNER und DEVIRIAN mit Aneurin (Milieu I) kultiviert:

Aqua dest.	1000,0 cc
Ca-nitrat	242,0 mg
Mg-sulfat	42,0 mg
K-nitrat	85,0 mg
K-chlorid	61,0 mg
K-monophosphat	20,0 mg
Ferritartrat	1,5 mg
Saccharose puriss.	40,0 g
Aneurin	0,1 mg

In einer Versuchsserie gelangte außerdem das Milieu II von BONNER und DEVIRIAN zur Anwendung, das neben den Bestandteilen des Milieus I noch 0,5 mg Nicotinsäure pro Liter Nährlösung enthält.

Als Kulturgefäße dienten 150 cc Erlenmeyerkolben aus Jenaerglas, in die je 20 cc Nährlösung abgefüllt wurden. Die Sterilisation der Kolben erfolgte im Autoklaven bei 115 ° C während 15 Minuten.

Alle 15 Tage nahmen wir eine Überimpfung vor, indem die Wurzelspitze etwa 10 mm lang abgeschnitten und in ein frisches Milieu übertragen wurde. Nach jeder solchen Überimpfung ermittelten wir folgende Daten: Länge der Wurzel, Zahl der sichtbaren Nebenwurzeln und das Trockengewicht sowie den Gehalt an Vitaminen. Auf Grund der beiden letzten Angaben ließ sich für jede Passage die pro Milligramm Trockensubstanz synthetisierte Menge eines bestimmten Vitamins errechnen.

Die in dieser Arbeit benutzten mikrobiologischen Bestimmungsmethoden sind allgemein eingeführt und oft angewendet, so daß wir es nicht als nötig erachten, in Einzelheiten darauf einzugehen. Nachstehend eine kurze Übersicht über die angewendeten Testmethoden.

Aneurin — Zur Bestimmung dieses Vitamins benutzten wir den *Phycomyces*-Test von SCHOPFER und JUNG (54, 55). Als Testorganismus findet der Pilz *Phycomyces Blakesleeanus* Verwendung. Außer dem freien Vitamin wird auch das gebundene erfaßt.

Lactoflavin — *Lactobacillus casei* ϵ ist der Testorganismus in der von SNELL und STRONG (56) eingeführten Methode zur Bestimmung des Lactoflavins. Dieser mikrobiologische Test bestimmt nicht nur das in

freier Form vorliegende Lactoflavin, sondern auch seine gebundenen Formen (SNELL und STRONG [57]).

A d e r m i n — Der für die mikrobiologische Bestimmung dieses Vitamins verwendete Organismus ist der X-Strahlen-Mutant des Pilzes *Neurospora sitophila* (Mutant 299). Die Methode wurde eingehend beschrieben bei STOKES und Mitarbeitern (58).

N i c o t i n s ä u r e — Die Nicotinsäure wurde nach der von SNELL und WRIGHT (59) beschriebenen Methode bestimmt, in welcher als Testorganismus *Lactobacillus arabinosus* verwendet wird.

B i o t i n — *Saccharomyces cerevisiae* dient als Testorganismus in der von WILLIAMS und Mitarbeitern (60) stammenden Methode für die Biotinbestimmung.

P a n t o t h e n s ä u r e — SKEGGS und WRIGHT (61) arbeiteten die *Lactobacillus arabinosus* benützende Methode zur Bestimmung der Pantothen-säure aus.

Zur Herstellung der Vitaminstandardlösungen benutzten wir in allen Fällen reine kristallisierte Produkte der Firma Hoffmann-La Roche in Basel.

Bei der Bestimmung des Aneurins und des Adermins bildeten die Myceltrockengewichte die Grundlage zur Berechnung des Vitamingehaltes, während bei den anderen Vitaminen die durch das verschieden starke Wachstum des Organismus hervorgerufene Trübung der Nährlösung im Hilger-Turbidimeter gemessen wurde.

Die Bereitung der zu prüfenden Extrakte geschah wie folgt:

Das bei 105 ° C im Trockenschrank entwässerte Material wird im Porzellanmörser fein zerrieben und davon eine genau abgewogene Menge mit destilliertem Wasser 15 Minuten lang bei 115 ° C extrahiert. Darauf wird vom Rückstand abfiltriert und noch so viel Wasser zugegeben, daß die Konzentration des zu analysierenden Extraktes 0,5 Prozent beträgt.

Die Benutzung von Milieux der Difco Laboratories Inc., Detroit (Michigan), für die Bestimmung von Lactoflavin, Nicotinsäure und Pantothen-säure wurde ermöglicht durch die Fritz-Hoffmann-La-Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz. Eine Zuwendung aus dem Ed.-Fischer-Fonds erlaubte die Anschaffung gewisser Chemikalien. Den beiden Institutionen möchten wir an dieser Stelle unseren herzlichsten Dank für ihre Unterstützung aussprechen.

IV. Experimenteller Teil

A. Untersuchungen an *Phaseolus*-Pflanzen und -keimlingen

1. Einleitung

Das Aneurin ist das erste Vitamin, das chemisch rein isoliert wurde, und sein Auffinden stellt den Beginn der modernen Vitaminlehre dar. Im Pflanzenreich ist es weit verbreitet und findet sich in fast allen Pflanzengruppen. Viele Bakterien, Hefen und andere Pilze sind autotroph für dieses Vitamin. Daneben gibt es aber auch Mikroorganismen, die auf das ganze Vitaminmolekül oder auf einen Teil desselben (Pyrimidin oder Thiazol) angewiesen sind, also vollständig oder teilweise heterotroph sind in bezug auf das Aneurin (vgl. SCHOPFER [62]). Bei Chlorophyceen, Fucaceen, Rhodophyceen, Bryophyten und Pteridophyten ist das Aneurin gleichfalls vorhanden. In der höheren Pflanze kommt es in allen Organen vor, besonders reichlich in jungen Blättern, Früchten und Samen (BONNER [63], CRAVIOTO [64], Mc VEIGH [65], HINTON [66, 67]); desgleichen in den verschiedenen Teilen der Blüten (SCHOPFER) und in Pollenkörnern (SCHOPFER [68]). Das Aneurin bildet einen wesentlichen Teil der Cocarboxylase und nimmt an der Decarboxylierung der Brenztraubensäure teil, es scheint aber offenbar auch als Bestandteil anderer Enzyme zu fungieren (LIPMANN [69], WILLIAMS und SPIES [70]. RYTZ, jun. (71), untersuchte den Aneuringehalt von *Pisum* während der ganzen Entwicklung und fand, daß bei der Keimung der Keimling reicher, die Kotyledonen ärmer an Aneurin werden. Die Aneurinproduktion des Keimlings erreicht nach 8 bis 10 Tagen ein Maximum, worauf ein Rückgang bis zu einem für die weitere Entwicklung ziemlich konstant bleibenden Gehalt nachzuweisen ist.

In seiner Arbeit über den Aneuringehalt von *Melandrium album* beobachtete HURNI (72) folgendes: bei der Keimung sinkt der Aneuringehalt zunächst während der Quellung ab. Licht beschleunigt die Abnahme. Sobald Wachstum ersichtlich ist, steigt der Aneuringehalt wieder an und bleibt dann mehr oder weniger konstant. Die größte Menge an nachweisbarem Aneurin findet sich im Vegetationspunkt.

2. Der Aneuringehalt im Verlaufe der Keimung

a) Keimung in destilliertem Wasser am Licht:

Die Zimmertemperatur schwankte im Laufe des Versuches zwischen 19 und 21 ° C. Tabelle I veranschaulicht die prozentuale Zunahme des An-

teils des Keimlings am Gesamtfrisch- und Trockengewicht (Durchschnitt von je 25 Samen).

Beträgt der Anteil am 4. Tage schon 10 %, so steigt er in den folgenden Tagen rasch an und macht am 13. Tage rund 75 % des totalen Frischgewichtes aus. Demgegenüber nimmt der Anteil am Trockengewicht begreiflicherweise langsamer zu, hat aber am 13. Tage 50 % schon überschritten.

Der Aneuringehalt der Kotyledonen bleibt während der ganzen Zeit ziemlich konstant, und nur gegen das Ende des Versuches ist ein leichtes Absinken festzustellen. Bei den Keimlingen tritt nach einem ersten Anstieg (24 h) nach 48 h ein Mindestwert auf. Anschließend steigt der Aneuringehalt wieder und erfährt weiter keine großen Änderungen mehr (Tabelle II).

TABELLE I

Prozentualer Anteil der Keimlinge am Frisch- und Trockengewicht

Zeit	Frishgewicht	Trockengewicht
0 h	1,36	1,38
24 h	1,72	1,46
48 h	2,00	1,63
72 h	4,98	1,77
96 h	10,23	3,36
144 h	18,06	5,79
168 h	26,28	8,94
192 h	34,94	13,13
240 h	53,66	26,04
312 h	74,88	52,98

TABELLE II

Aneuringehalt in γ /g Trockengewicht

Zeit	Kotyledonen	Keimlinge
0 h	10,5	25,8
24 h	10,6	29,75
48 h	9,7	22,7
96 h	11,1	27,0
144 h	11,4	32,2
192 h	9,2	30,8
240 h	8,9	26,4
312 h	8,3	26,2

b) Keimung in Knopscher Nährlösung am Licht:

Die Raumtemperatur betrug konstant 23 ° C. Tabelle III zeigt uns wieder den prozentualen Anteil der Keimlinge am Frisch- und Trockengewicht. Unter dem Einfluß der Mineralsalze nehmen sowohl Frisch- als auch Trockengewicht bedeutend rascher zu als im vorigen Versuch.

TABELLE III

Prozentualer Anteil der Keimlinge an Frisch- und Trockengewicht

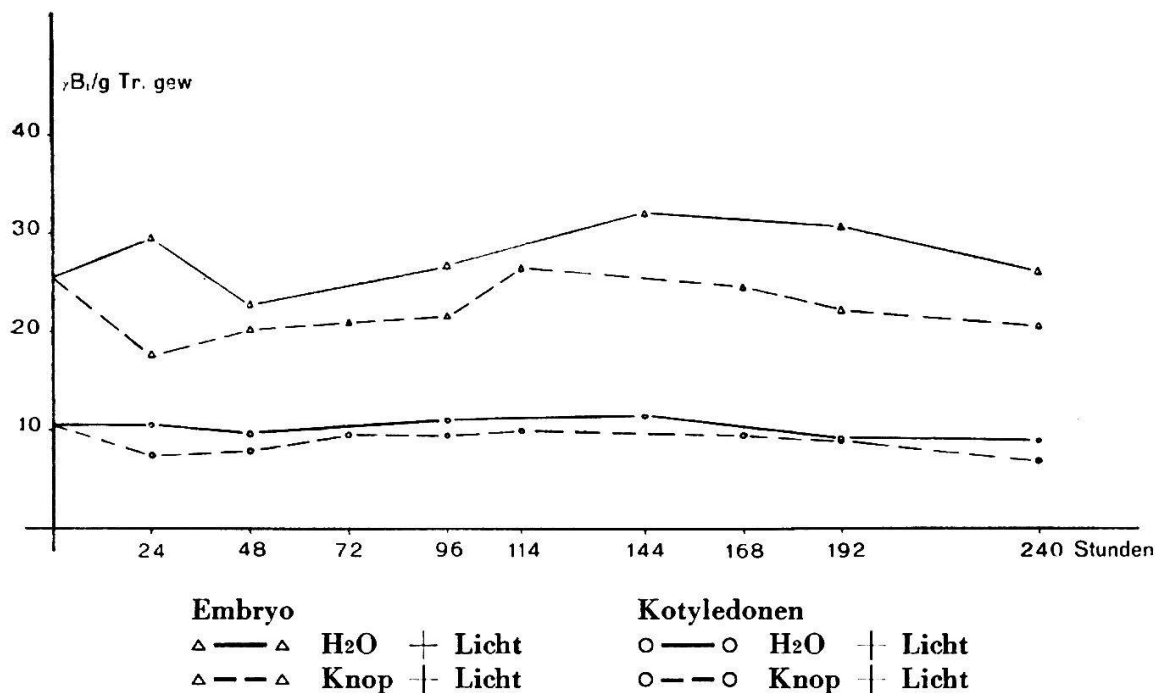
Zeit	Frischgewicht	Trockengewicht
0 h	1,26	1,38
24 h	1,60	1,38
48 h	3,16	1,51
72 h	9,84	3,11
96 h	18,66	5,79
114 h	26,00	8,45
168 h	42,37	17,04
192 h	55,24	25,80
240 h	84,02	61,31

Was den Gehalt der Kotyledonen an Aneurin betrifft, so ergibt sich das gleiche Bild wie oben: die Menge des nachgewiesenen Aneurins ist ziemlich konstant, gegen Ende des Versuches tritt ein leichtes Absinken auf. In den Keimlingen hingegen erscheint der Mindestwert bereits nach 24 h. Darauf steigt der Aneurin Gehalt wieder an, um in der restlichen Zeit mehr oder weniger auf der gleichen Höhe zu bleiben (Tabelle IV).

TABELLE IV

Aneurin Gehalt in γ /g Trockengewicht

Zeit	Kotyledonen	Keimlinge
0 h	10,2	25,8
24 h	7,5	17,8
48 h	7,9	20,5
72 h	9,5	21,1
96 h	9,3	21,6
114 h	9,8	26,6
168 h	9,5	24,6
196 h	9,0	22,4
240 h	6,8	20,6

Aneuringehalt von Phaseolussamen während der Keimung

Figur 1

3. Der Biotingehalt während der Keimung

a) *Keimung in destilliertem Wasser am Licht:*

Das auf seinen Biotingehalt untersuchte Pflanzenmaterial ist dasselbe wie das für die entsprechende Aneurinbestimmung verwendete.

In Tabelle V sind die für Kotyledonen und Keimlinge ermittelten Werte zusammengestellt. Nach dem 2. Tage steigt der Biotingehalt der Keim-

TABELLE V

Biotingehalt in mγ/g Trockengewicht

Zeit	Kotyledonen	Keimlinge
0 h	10,2	26,6
24 h	9,4	63,4
48 h	13,2	128,0
72 h	60,8	998,0
96 h	82,0	664,0
144 h	81,8	640,0
168 h	83,6	738,0
192 h	109,0	564,0
240 h	78,0	519,0
312 h	109,6	601,0

linge sehr stark an, um anschließend etwas zu sinken und dann mehr oder weniger konstant zu bleiben. Zu bemerken ist, daß dieser Anstieg mit dem Durchstoßen der Keimwurzel durch die Samenschale zusammenfällt. Auch in den Kotyledonen nimmt der Biotingehalt vom 2. Tage an zu und erreicht nach kurzer Zeit einen ziemlich gleich bleibenden Wert.

b) Keimung in Knopscher Nährlösung am Licht:

Hier handelt es sich ebenfalls um dasselbe Material, das für die entsprechende Aneurinanalyse Verwendung fand.

Im Gegensatz zum vorigen Versuch setzt der Anstieg bereits nach dem 1. Tage ein. Der erreichte Maximalwert liegt aber ziemlich tiefer; eine deutliche Verminderung des Biotingehaltes tritt dagegen erst nach 8 bis 10 Tagen in Erscheinung. Das Durchstoßen der Keimwurzeln durch die Samenschale trifft auch da mit dem starken Anstieg des Biotingehaltes der Keimlinge zusammen. In den Kotyledonen ist das Biotin in zunehmender Menge während der ganzen Versuchsdauer nachzuweisen (Tabelle VI).

TABELLE VI
Biotingehalt in mγ/g Trockengewicht

Zeit	Kotyledonen	Keimlinge
0 h	10,2	26,6
24 h	9,5	39,8
48 h	26,4	675,0
72 h	58,1	605,0
96 h	68,9	664,0
114 h	71,9	650,0
168 h	69,6	593,0
192 h	85,2	511,0
240 h	92,7	475,0

c) Keimung in Knopscher Nährlösung im Dunkel:

Die Raumtemperatur schwankte in der Zeit des Versuches zwischen 21 ° und 22 ° C. Der prozentuale Anteil der Keimlinge am Frisch- und Trockengewicht ist in Tabelle VII zusammengestellt. Es läßt sich eine ziemlich gute Übereinstimmung mit den am Licht bei gleicher Versuchsanordnung gefundenen Werten feststellen. Mit dem Durchbrechen der Keimwurzeln durch die Samenschale setzt einmal mehr ein Anstieg des Biotingehaltes ein, der aber erst am 4. Tage sein Maximum erreicht. Der

Höchstwert liegt noch tiefer als beim gleichen Versuche am Licht. Anschließend nimmt der Biotingehalt bis zur letzten Analyse am 10. Tage nur leicht ab.

In den Kotyledonen läßt sich bis zum Schlusse der Untersuchung eine leicht steigende Biotinmenge nachweisen (Tabelle VIII).

TABELLE VII

Prozentualer Anteil der Keimlinge an Frisch- und Trockengewicht

Zeit	Frischgewicht	Trockengewicht
0 h	1,36	1,38
24 h	1,65	1,26
48 h	3,07	1,36
72 h	6,89	2,39
96 h	16,48	4,31
144 h	39,43	13,57
168 h	45,50	17,80
192 h	59,52	25,92
240 h	81,91	55,00

TABELLE VIII

Biotingehalt in m γ /g Trockengewicht

Zeit	Kotyledonen	Keimlinge
0 h	10,2	26,6
24 h	18,1	29,7
48 h	11,8	283,5
72 h	28,2	344,5
96 h	42,8	442,5
144 h	46,9	397,5
163 h	68,7	386,0
192 h	54,5	376,5
240 h	56,0	345,5

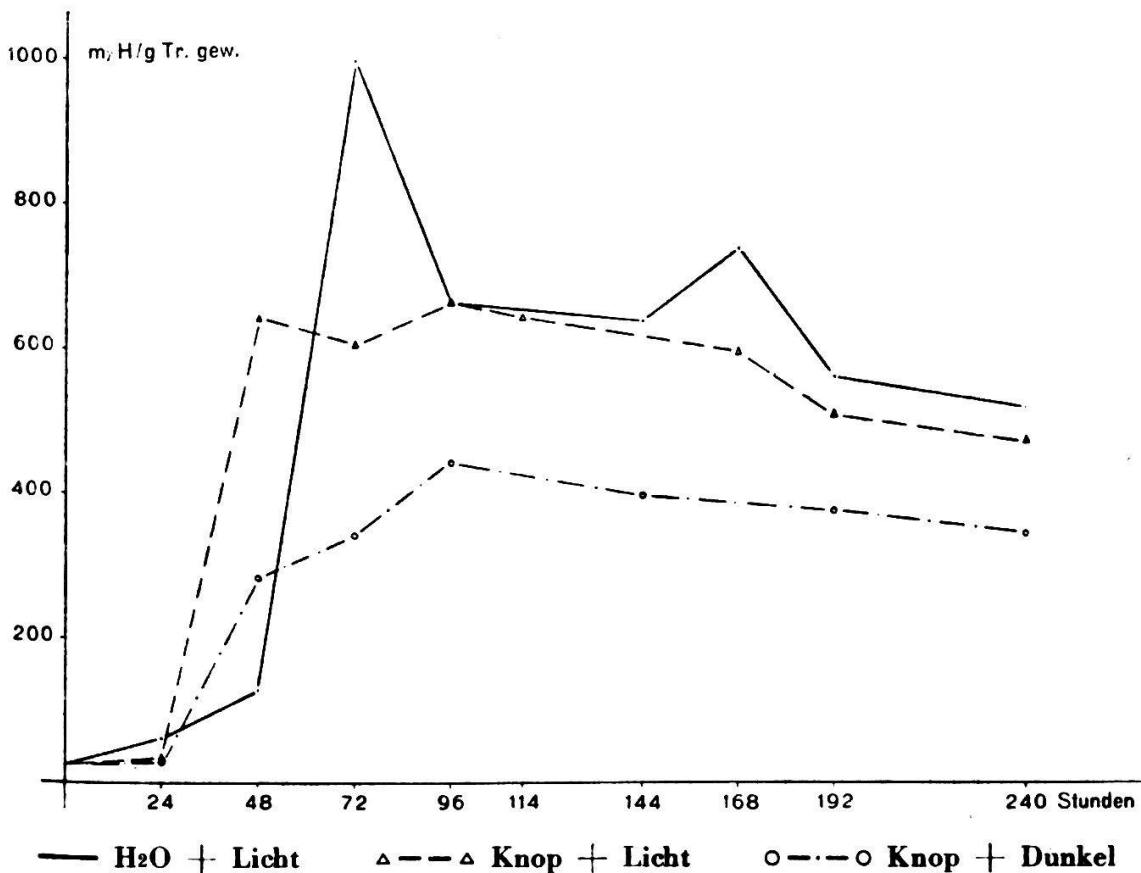
4. Besprechung der Ergebnisse

Unter dem Einfluß der mineralischen Substanzen in der Knopschen Nährlösung nimmt der prozentuale Anteil des Keimlings am gesamten Frisch- und Trockengewicht bedeutend rascher zu als in destilliertem Wasser allein, was eigentlich nicht überraschend ist. Im Lichte gekeimte

Bohnsamen zeigen in Wasser und in Knopscher Nährlösung keine wesentlichen Unterschiede in ihrem Aneurin Gehalt. Dieser ist im ganzen genommen während der untersuchten Zeitspanne weder in den Kotyledonen noch in den Keimlingen großen Schwankungen unterworfen: nur für die Keimlinge ist in den ersten Stunden ein leichter Abfall im Aneurin Gehalt feststellbar, auf den ein Anstieg folgt, der zu einem im großen und ganzen konstanten Aneurinwert führt. Wie BONNER und GREENE (73) an kotyledonenlosen Erbsenembryonen zeigen konnten, ist die Aneurinsynthese vom Lichte abhängig. In der Dunkelheit findet keine nennenswerte Bildung statt.

KOEGL und HAAGEN SMIT (74) beobachteten, daß Embryonen von *Pisum* nach 48 h in der Plumula und besonders in der Radikula mehr Biotin enthalten als nach 6 h. In unseren Versuchen mit *Phaseolus* konnten wir dieses Ergebnis bestätigen: im Licht in Wasser bzw. Knopscher Nährlösung ist nach dem 2. bzw. 1. Tag ein sehr starker Anstieg im Biotingehalt des Keimlings festzustellen, der mit dem Austreiben der Wurzel zusammenfällt. Diese Tatsache macht es wahrscheinlich, daß die Wurzel

Biotingehalt von Phaseoluskeimlingen während der Keimung



Figur 2

Biotin in beträchtlicher Menge zu bilden vermag und daß, wie aus einem Vergleich der Werte in den Tabellen zu schließen ist, diese Synthese im Lichte rascher und intensiver vor sich geht als im Dunkel.

Die Möglichkeit einer Freisetzung von gebundenem Biotin während der Keimung veranlaßte uns, Hydrolyseversuche mit HCl durchzuführen. Doch konnten weder in den Kotyledonen noch in den Embryonen der ungekeimten Samen nach erfolgter Hydrolyse höhere Biotinwerte gefunden werden. Dieser Befund scheint ebenfalls für eine Bildung des Biotins durch die Wurzel selbst zu sprechen, was die Wurzelkulturen bestätigen werden.

*B. Untersuchungen an *Pisum sativum**

(Wurzelkulturen, ganze Pflanze)

1. Einleitung

Die Technik der Kultur isolierter Wurzeln ermöglicht es, unter Ausschaltung des Einflusses des Sproßteils, die mannigfaltigen Probleme des Stoffwechsels in diesem Organ genauer zu verfolgen. Wie der Großteil der bisher untersuchten Wurzeln ist auch die Pisumwurzel für ihr Wachstum auf die exogene Zufuhr von Aneurin angewiesen. Je nach Art sind außerdem noch verschiedene andere Wachstumsfaktoren notwendig (ADDICOTT und DEVIRIAN [75]), BONNER und DEVIRIAN [47], BONNER [46], WHITE [49]). Es schien uns daher wichtig, die isolierte Wurzel von *Pisum* auf die von ihr benötigten Wachstumsfaktoren und vor allem auf ihre Synthesefähigkeiten im Verlauf einiger Passagen zu untersuchen. Wir richteten unsere Aufmerksamkeit besonders auf einige Vitamine der umfangreichen B-Gruppe.

2. Der Aneurinstoffwechsel

Wie bereits erwähnt, ist die Pisumwurzel heterotroph in bezug auf das Aneurin. In der Natur wird ihr Bedarf durch Zufuhr aus oberirdischen Organen gedeckt. Kultiviert man isolierte Pisumwurzeln *in vitro*, ohne Aneurin der Kulturlösung beizufügen, so stellen diese nach einiger Zeit, d. h. nachdem der in der Spitze enthaltene Vorrat an Aneurin aufgebraucht ist, ihr Wachstum ein und gehen zugrunde.

In unserem Versuch führten wir im ganzen sieben Überimpfungen aus und bestimmten jedesmal die Länge und das Trockengewicht der Wurzeln sowie das in der Wurzel und im Milieu enthaltene Aneurin. Während der ersten 15 Tage wuchsen die Wurzeln ohne jegliche Aneurinzugabe.

TABELLE IX

Aneurinstoffwechsel isolierter Pisumwurzeln

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Tage	Trockengewicht (mg)	Wurzellänge (mm)	γB_1 pro Wurzel	γB_1 pro Milieu	γB_1 total	Analysierter Gehalt auf 1 mg Wurzel bezogen	Theoretischer Wert pro 1 mg Wurzel, wenn kein Aneurinverbrauch	Differenz in %
Wurzelspitzen	0	0,7	1,0	0,0036	—	0,0036	0,005	—	—
1. Überimpfung	15	7,1	120,7	0,027	0,000	0,027	0,004	—	—
2. „	29	6,7	134,5	0,496	1,404	1,900	0,283	0,300	5,7
3. „	46	6,9	155,1	0,413	1,086	1,499	0,217	0,290	25
4. „	60	4,4	80,6	0,315	1,116	1,431	0,325	0,454	28
5. „	75	4,4	94,1	0,193	1,005	1,198	0,272	0,454	40
6. „	90	3,6	74,2	0,293	1,271	1,564	0,434	0,555	22
7. „	105	3,5	73,6	0,180	1,278	1,458	0,417	0,571	27

Legende: 4: Analysiert mit Phycomyces
5: Analysiert mit Phycomyces
6: Total (4 + 5)
7: 6 bezogen auf 1 mg Trockengewicht
8: Theoretischer Wert = zugesetzte Vitaminmenge auf 1 mg Wurzeltrockengewicht bezogen
9: Differenz zwischen den Werten der Kolonnen 8 und 7, in Prozenten ausgedrückt

Nach der ersten Überimpfung fügten wir jeder Kultur 2 γ Aneurin zu, entsprechend der von WHITE angegebenen Menge. Für alle weiteren Überimpfungen wurde gleich verfahren. Tabelle IX gibt uns eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse. Kolonne 7 dieser Tabelle enthält die Werte für den auf 1 mg Wurzeltrockengewicht bezogenen Gesamtgehalt (Wurzel + Milieu) an Aneurin. Die vorletzte Kolonne veranschaulicht uns die pro 1 mg Wurzel theoretisch zu fordernden Werte, für den Fall, daß kein Verbrauch des zugesetzten Aneurins stattfindet. Die Differenz zwischen den theoretischen und den gefundenen Werten, in Prozent ausgedrückt, ist in der letzten Kolonne dargestellt. Die schon lange bekannte Tatsache, daß das Aneurin für Pisumwurzeln essentieller Wachstumsfaktor ist, kommt erneut zum Ausdruck. ADDICOTT (76) untersuchte ausführlich die Wirkungsweise des Aneurins in bezug auf seinen Einfluß auf die Zytologie der Wurzel (*Pisum*). Aneurin stimuliert die meristematische Tätigkeit der Wurzel, wirkt dagegen nicht auf die Zellstreckung.

BONNER und ADDICOTT (77) wiesen darauf hin, daß im Falle der Pisumwurzel die beiden Komponenten des Aneurins, Pyrimidin und Thiazol, ersteres ersetzen können. Das Wachstum der Wurzel ist genau so gut, wie wenn Aneurin als Ganzes vorhanden wäre. Die Pisumwurzel hat die Fähigkeit, Pyrimidin und Thiazol zu bilden, verloren, ist aber noch imstande, aus den beiden Komponenten des Aneurins das ganze Molekül zu synthetisieren. Diese Verhältnisse lassen sich gut mit den bei vielen Mikroorganismen beobachteten vergleichen, wo partielle Syntheseverluste für lebenswichtige Substanzen häufig auftreten.

In einer 1938 erschienenen Arbeit weisen BONNER und BUCHMANN (78) darauf hin, daß die Pisumwurzel in steriler Organkultur in der Lage ist, die beiden Thiazolvorstufen Thioformamid und Chloracetopropanol zum vollständigen Thiazolmolekül zu vereinigen. Das Wachstum der Wurzel mit den beiden Vorstufen des Thiazols plus Pyrimidin ist ebenso gut wie in Gegenwart von Aneurin. Die Biosynthese beschreitet hier offenbar den gleichen Weg wie die Chemosynthese. Nachstehend seien die Formeln der beiden Vorstufen wiedergegeben:

Thioformamid



Chloracetopropanol



Das allgemeine Schema für die Bildung des Aneurins hat demnach folgendes Aussehen:



Im Zusammenhang mit diesen Befunden interessierte uns die Frage, ob die von uns gebrauchte Sorte von *Pisum* («Maikönigin») zu den selben Leistungen fähig sei. Wir wählten nachstehende Versuchsanordnung:

Als Grundmilieu für alle Serien das Milieu I von BONNER, aber ohne Aneurinzusatz.

1. Serie Kontrollen ohne Aneurin
2. Serie Kontrollen mit Aneurin
3. Serie Milieu I + Pyrimidin
4. Serie Milieu I + Thiazol
5. Serie Milieu I + Pyrimidin + Thiazol
6. Serie Milieu I + beide Thiazolvorstufen + Pyrimidin
7. Serie Milieu I + beide Thiazolvorstufen + Pyrimidin
(in 10facher Konzentration)

Pyrimidin, Thiazol und die Thiazolvorstufen wurden in äquivalenten Mengen zugesetzt. Es entsprechen:

$$\begin{aligned}
 1 \gamma \text{ Aneurin (MG 337)} &= 0,41 \gamma \text{ Pyrimidin (138)} + \\
 &\quad 0,42 \gamma \text{ Thiazol (143)} \\
 1 \gamma \text{ Thiazol} &= 0,43 \gamma \text{ Thioformamid (61)} + \\
 &\quad 0,955 \gamma \text{ Chloracetopropanol (136,5)}
 \end{aligned}$$

Chloracetopropanol lag als Fertigpräparat vor. Das Thioformamid wurde von uns selbst hergestellt nach folgender Umsetzungsgleichung:



Diese Reaktion geht bei Zimmertemperatur vor sich. Außerdem stand uns ein Präparat der Firma Hoffmann-La Roche zur Verfügung.*

Aneurin, Pyrimidin und Thiazol wurden zusammen mit der Nährlösung sterilisiert, während Thioformamid und Chloracetopropanol kalt sterilisiert und mit steriler Pipette jeder Kultur zugefügt wurden.

Vor der nach 20 Tagen erfolgten ersten Überimpfung schieden wir alle schlecht oder nicht gewachsenen Wurzeln aus und überimpften nur die einwandfrei gewachsenen. Nach jeder Überimpfung ermittelten wir das Längenwachstum der Wurzeln (Figur 3) und das Trockengewicht (Tabelle X).

Wird der isoliert wachsenden Wurzel von *Pisum* nur Pyrimidin oder nur Thiazol geboten, so stellt sie nach kurzer Zeit ihr Wachstum ein und geht zugrunde, verhält sich also genau wie die Wurzeln der Kontrollen ohne Aneurin. Enthält das Kulturmilieu Aneurin oder dessen Kompo-

* Der Verfasser möchte an dieser Stelle der Firma Hoffmann-La Roche in Basel für die freundliche Überlassung dieses Präparates seinen besten Dank aussprechen.

TABELLE X

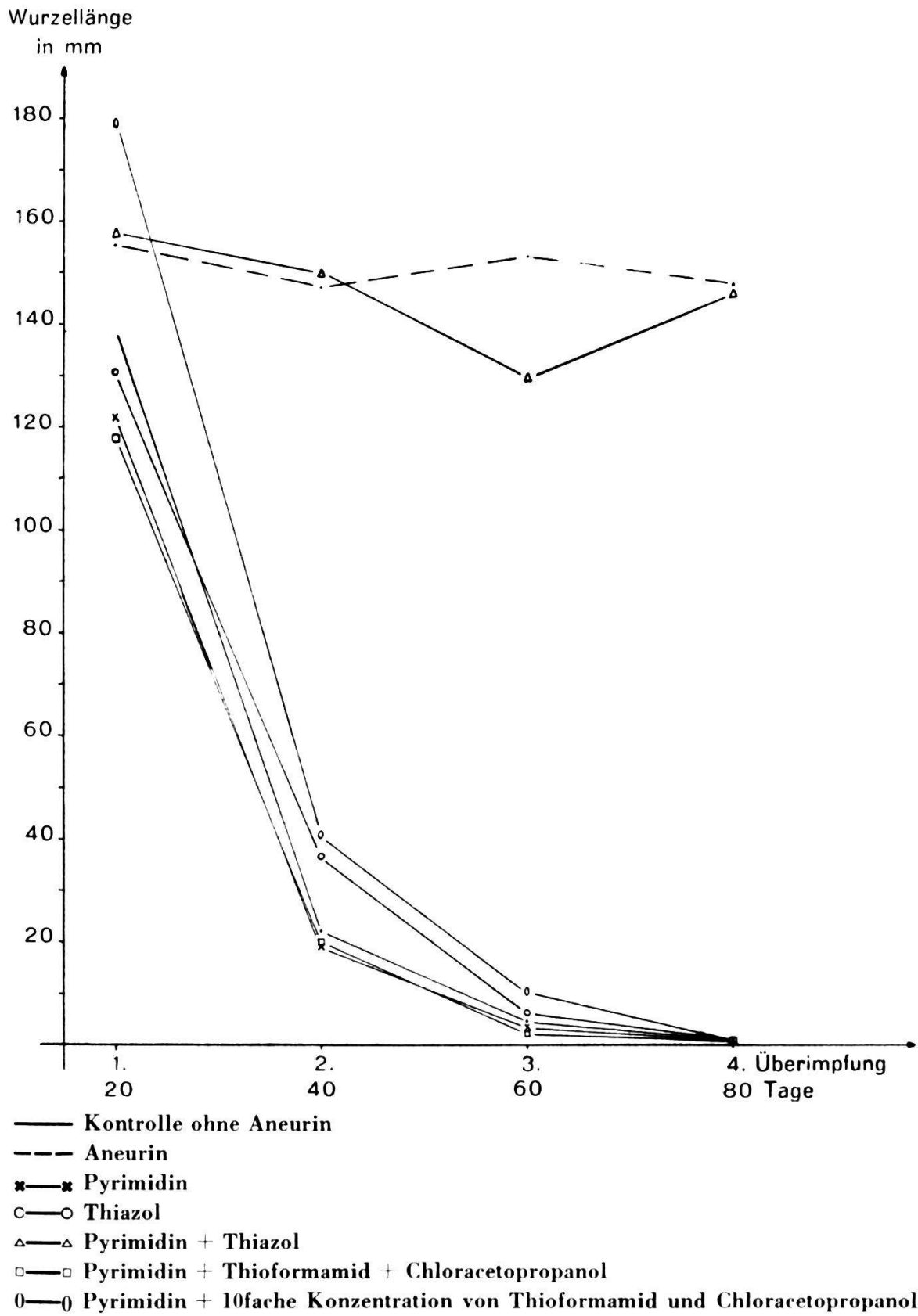
Wurzelrockengewichte in mg

Überimpfung	1	2	3	4
Tage	20	40	60	80
Ohne Aneurin	11,4	2,2	1,13	0,86
Aneurin	11,9	9,8	8,7	8,25
Pyrimidin (P)	9,9	2,4	1,03	0,85
Thiazol (T)	9,8	2,7	1,0	0,8
P + T	12,4	9,8	7,9	8,9
P + CP + TA (Roche)	8,4	2,2	0,87	0,8
P + CP + TA (Eigenfabrikat)	9,5	2,5	0,92	0,8
P + CP + TA	10,6	2,5	1,17	0,8

Vorstufen des Thiazols: Chloracetopropanol (CP)
Thioformamid (TA)

nenten Pyrimidin und Thiazol, so erfolgt das Wachstum normal. Soweit stimmen unsere Ergebnisse mit den bisher bekannt gewordenen überein. Dagegen bleiben die Wurzeln in einem Milieu mit Pyrimidin + Thiazolvorstufen (Thioformamid und Chloracetopropanol) schon nach der zweiten Überimpfung im Längenwachstum stark zurück, und nach 80 Tagen (vierte Überimpfung) waren sämtliche Wurzeln abgestorben. Die Verwendung der zehnfachen Konzentration der Thiazolvorstufen führte zum gleichen negativen Ergebnis. Dieser Befund widerspricht den Angaben von BONNER und BUCHMANN vollständig. Die beiden Autoren stellten ja fest, daß die Pisumwurzel in der Lage ist, in Gegenwart von Pyrimidin + Thiazolvorstufen genau so gut zu wachsen wie mit Aneurin. Ihre Arbeit enthält allerdings keine Angaben über Längenwachstum und Trockengewicht der Wurzel oder, ob Überimpfungen vorgenommen worden sind. Mit Hilfe des *Phycomyces*-Testes wiesen sie nach einer gewissen Kulturdauer bei den in Gegenwart von Pyrimidin + Thiazolvorstufen gewachsenen Wurzeln denselben Gehalt an Aneurin nach wie bei solchen, die in einem Milieu mit Pyrimidin + Thiazol wuchsen. Möglicherweise beruhen diese gegensätzlichen Ergebnisse auf Verschiedenheiten im unter-

Wachstum der isolierten Wurzel von Pisum



Figur 3

suchten Material (Unterschiede im Synthesevermögen). Ein ähnlicher Fall ist für Tomatenwurzeln bekannt, wo je nach der Sorte ein verschiedenartiges Bedürfnis für Wachstumsfaktoren auftritt (BONNER und DEVIRIAN [47], ROBBINS und BARTLEY-SCHMIDT [79, 48], WHITE (49)).

3. Der Biotinstoffwechsel

Das Biotin wird sowohl von zahlreichen Mikroorganismen reichlich synthetisiert (*Phycomyces*) (SCHOPFER [80]), als auch durch die höhere Pflanze. Die verschiedenen Teile der letzteren enthalten nachweisbare Mengen dieses Vitamins, was uns aber über den Ort besonders intensiver Synthese keinen näheren Aufschluß gibt. BONNER (46) untersuchte das Verhalten der Wurzel von Lein, Klee, Luzerne und Tomate und fand, daß alle diese Wurzeln die Fähigkeit besitzen, Biotin zu synthetisieren. Er gibt indessen nur den Endgehalt an Biotin nach langer Kulturdauer und mehreren Überimpfungen an.

Für unsere Untersuchungen teilten wir die Wurzeln in zwei verschiedene Gruppen ein: die erste wuchs im Milieu I von BONNER mit Aneurin, die zweite im genau gleichen Milieu, dem aber noch Nicotinsäureamid (500 γ /l) zugesetzt wurde (Milieu II). Nach jeder Passage ermittelten

TABELLE XI

Biotinsynthese der Wurzel von Pisum

Passage	Tage	my Biotin					
		Wurzel		Milieu		Total	
		I	II	I	II	I	II
1	29	1,316	1,482	2,450	2,290	3,766	3,772
2	45	1,550	1,353	2,888	3,261	4,438	4,614
3	60	0,506	1,170	1,059	3,403	1,565	4,573
4	75	0,785	1,632	1,242	2,898	2,027	4,530
5	90	0,508	0,926	0,992	2,281	1,500	3,207
6	104	0,358	0,747	0,846	2,092	1,204	2,893
7	120	0,460	0,843	1,372	2,530	1,832	3,373
8	135	0,318	0,610	1,748	2,444	2,066	3,054
9	150	0,780	1,333	2,644	3,497	3,424	4,830

I: Milieu I mit Aneurin

II: Milieu II mit Aneurin und Nicotinsäureamid

TABELLE XII

Biosynthese des Biotins durch die isolierte Wurzel von Pisum

	1 Tage	2 Trockengewicht (mg)		3 Wurzellänge (mm)		4 Zahl der Nebenwurzeln		5 mγ Biotin pro mg Wurzel	
		I	II	I	II	I	II	I	II
1. Passage	29	8,0	7,8	148,0	153,0	6,4	9,0	0,446	0,458
2. „	45	10,6	10,4	177,7	178,1	9,3	4,1	0,400	0,425
3. „	60	5,4	9,0	117,5	169,3	0,0	9,0	0,253	0,486
4. „	75	6,0	10,5	140,8	182,7	1,6	6,7	0,305	0,413
5. „	90	5,1	7,5	100,0	138,0	0,0	5,0	0,275	0,401
6. „	104	3,8	5,8	78,6	120,4	0,0	7,1	0,265	0,456
7. „	120	5,0	7,5	109,6	156,8	1,0	8,0	0,327	0,424
8. „	135	2,7	5,0	63,0	108,0	0,7	1,4	0,693	0,572
9. „	150	5,0	6,7	113,0	125,0	2,0	6,3	0,646	0,691

Legende: I: Milieu I mit Aneurin
 II: Milieu II mit Aneurin und Nicotinsäureamid
 5: Biotingehalt von Milieu + Wurzel zusammen, bezogen auf
 1 mg Wurzeltrockengewicht (vgl. dazu Tabelle XI)

wir folgende Daten: Länge der Wurzel, Zahl der sichtbaren Nebenwurzeln, Trockengewicht der Wurzel und die Quantität des synthetisierten Biotins. Wir bestimmten quantitativ das in der Wurzel vorhandene wie auch das ins Milieu diffundierte Biotin (Tabelle XI).

Nachdem wir so das gesamte synthetisierte Biotin ermittelt hatten, errechneten wir, nach Abzug der in den zur Beimpfung der Kulturgefäße verwendeten Wurzelspitzen vorhandenen Biotinmenge (0,195 m γ), die pro 1 mg Wurzeltrockengewicht produzierte Vitaminquantität (Tabelle XII).

In den Kulturen der beiden Gruppen machen sich einige Unterschiede bemerkbar. Nach der 3. Passage sinkt in den Milieux ohne Nicotinsäureamid der Biotingehalt um $\frac{1}{3}$ seines Anfangswertes. In Gegenwart von Nicotinsäureamid bleibt er dagegen ziemlich konstant. Dieselben Beobachtungen gelten für das Trockengewicht der Wurzel, das Längenwachstum und für die Anzahl der sichtbaren Nebenwurzeln. Nach 150 Tagen gleichen sich diese Unterschiede mehrheitlich aus.

Die isoliert wachsende Wurzel von *Pisum* ist also Sitz einer gleichmäßigen Synthese von Biotin, die nach 150 Tagen Kulturdauer unverändert anhält (LOUIS [81]). Man darf daher annehmen, daß in bezug auf den Biotinstoffwechsel die Wurzel in weitem Maße unabhängig ist. Es ist allerdings nicht möglich, die Frage zu beantworten, ob in der intakten Pflanze das Blatt nicht doch auf den Biotinhaushalt der Wurzel wirkt.

Das Nicotinsäureamid, obschon es nicht unbedingt von der Wurzel verlangt wird, wirkt günstig auf die ganze Entwicklung und die Biosynthese des Biotins. Es kann somit als Zusatzfaktor betrachtet werden, wenigstens für die von uns untersuchte Sorte von *Pisum*.

4. Der Einfluß von Pisumblattextrakten auf die Biosynthese des Biotins in der isoliert wachsenden Wurzel von Pisum

Wir haben bereits darauf hingewiesen, daß es nicht ausgeschlossen ist, ja sogar wahrscheinlich, daß an der intakten Pflanze das Blatt neben seiner Aufgabe, Vitamin zu liefern, den Vitaminhaushalt der Wurzel in irgendeiner Weise beeinflußt. Die nachstehenden Untersuchungen sollten uns einigen Aufschluß über diese Frage geben.

Das Vorgehen war folgendes: Wir bereiteten uns kalte, wässrige Extrakte von Pisumblättchen in ganz bestimmter Konzentration; nach dem Abfiltrieren des Rückstandes (Zellwände, Leitgewebe) versuchten wir, das grüne kolloidale Filtrat auf verschiedene Arten zu sterilisieren. Die

größte Wirksamkeit durfte von solchen Extrakten erwartet werden, die den Inhalt der Zellen in möglichst unveränderter Form enthielten. Von den einzelnen Extrakten setzten wir zu jeder Wurzelkultur je 0,5 cc zu. Eine Serie, die Kontrollen, blieb ohne jeglichen Zusatz. Nach 15 Tagen Kulturdauer ermittelten wir Längenwachstum und Trockengewicht der Wurzeln, die Zahl der sichtbaren Nebenwurzeln und den Biotingehalt in Wurzel und Milieu. Mit Hilfe dieser Angaben und unter Berücksichtigung der von den Kontrollserien gebildeten Biotinmenge und des mit dem betreffenden Extrakt zugefügten Biotins ließ sich eine genaue Bilanz erstellen, die uns zeigte, in welchem Grade und ob überhaupt der geprüfte Blattextrakt auf die Biosynthese des Biotins durch die Wurzel einwirkt.

Ein erster Versuch umfaßte folgende Serien:

1. Serie Kontrollen ohne Blattextrakt
2. Serie a) 10 % wässriger Blattextrakt
b) 1 % wässriger Blattextrakt
Beide Extrakte wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen im Wasserbad während einer Stunde erwärmt (Temperatur 45 ° C).
3. Serie a) 10 % wässriger Extrakt; bei 115 ° C sterilisiert und anschließend filtriert, ergibt ein braunes, klares Filtrat.
b) 1 % wässriger Extrakt; bei 115 ° C sterilisiert und anschließend filtriert, ergibt ein gelbliches, klares Filtrat.
4. Serie 1 % wässriger Blattextrakt; dieser Extrakt wurde mit Äther behandelt, unter dessen Einwirkung er sterilisiert wurde. Dabei fielen allerdings die Eiweißsubstanzen aus, und es resultierte ein klares, gelbliches Filtrat, ähnlich 3 b.

Vorgängig der Ermittlung des Biotingehaltes in Wurzeln und Milieu bestimmten wir mit Hilfe des *Saccharomyces*-Testes (WILLIAMS und Mitarbeiter) die in den verschiedenen Extrakten enthaltene Biotinmenge. Die Ergebnisse sind die folgenden:

TABELLE XIII
Biotingehalt der verschiedenen Extrakte

Extrakt	Behandlung	Biotingehalt
10 %	45 ° C	6,85 mγ / cc
1 %	45 ° C	0,48 „
10 %	115 ° C	9,07 „
1 %	115 ° C	0,91 „
1 %	Aether	0,50 „

In Tabelle XIV sind die durchschnittlichen Werte für Längenwachstum, Trockengewicht und Anzahl der sichtbaren Nebenwurzeln zusammengestellt. Der 1 % bei 115 ° C sterilisierte und der mit Äther behandelte Blattextrakt haben auf das Längenwachstum der Wurzel und auf die Bildung von Trockensubstanz einen günstigen Einfluß, während die beiden bei 45 ° C pasteurisierten sich auf die gleichen Kriterien eher leicht negativ auswirken.

TABELLE XIV

Wirkung von Pisumblattextrakten auf Längenwachstum, Trockengewicht und Nebenwurzelzahl isolierter Pisumwurzeln

Extrakt, Behandlung	Längenwachstum (mm)	Trockengewicht (mg)	Zahl der Nebenwurzeln
Kontrollen	123,7	6,7	1,2
10 % 45 ° C	104,4	5,5	2,1
1 % 45 ° C	109,3	5,6	2,0
10 % 115 ° C	134,5	6,8	3,3
1 % 115 ° C	153,5	8,15	3,0
1 % Aether	152,1	8,6	2,3

Im Anschluß daran bestimmten wir quantitativ das in Wurzeln und Milieus vorhandene Biotin und erstellten an Hand der benötigten Daten eine genaue Bilanz. Die Resultate sind in Tabelle XV vereinigt. Für die Ausrechnung ist zu beachten: das Total in Kolonne 3 setzt sich zusammen aus dem für Wurzel und Milieu ermittelten Gehalt. Von diesem Wert sind abzuziehen:

- a) die von den Kontrollkulturen gebildete Biotinmenge (6,899 m γ) und
- b) das mit dem Extrakt zugefügte Biotin (Kolonne 4).

Die so erhaltenen Zahlen sind in der Kolonne 5 verzeichnet. Die in der letzten Spalte der Tabelle stehenden Zahlen veranschaulichen die auf 1 mg Wurzeltrockengewicht bezogene Biotinsynthese.

Es läßt sich feststellen, daß der mit Äther behandelte Extrakt sowie die beiden bei 115 ° C sterilisierten Extrakte eine nur geringe fördernde Wirkung auf die Biosynthese der isoliert wachsenden Pisumwurzel ausüben. Demgegenüber ergibt sich für die bei 45 ° C pasteurisierten Extrakte eine ansehnliche Steigerung der pro 1 mg Trockensubstanz produzierten

TABELLE XV

Einfluß von Blattextrakten auf die Biotinsynthese isolierter Pisumwurzeln

Extrakt, Art der Behandlung	Biotin in m γ					
	1	2	3	4	5	6
	pro Wurzel	pro Milieu	Total	mit dem Extrakt zugefügt	total nach Abzug von **)	synthetisiert pro mg Wurzel
10 % 45 ° C	1,370	13,063	14,433	3,425	4,109	0,747
1 % 45 ° C	1,187	8,037	9,224	0,240	2,301	0,411
10 % 115 ° C	1,526	10,630	12,156	4,535	0,722	0,106
1 % 115 ° C	1,654	6,880	8,534	0,455	1,180	0,145
1 % Aether	1,939	5,986	7,925	0,250	0,776	0,090

** Abgezogen werden:

1. Die Kontrollen = Kulturen ohne zugefügten Extrakt
Wert (Wurzel + Milieu): 6,899 m γ
2. Das mit dem Blattextrakt zugesetzte Biotin (Kolonne 4 der Tabelle)

Menge an Biotin, und zwar nimmt die Quantität mit der Konzentration des Blattextraktes zu.

Ein weiterer Versuch mit Blattextrakten umfaßte die folgenden Serien:

1. Serie Kontrollen ohne Extrakt
2. Serie 1 % wässriger Blattextrakt, der an vier aufeinanderfolgenden Tagen je eine Stunde lang auf 60 ° C erwärmt wurde.
3. Serie 1 % wässriger Extrakt, bei 115 ° C sterilisiert und anschließend filtriert.
4. Serie 1 % wässriger Extrakt, bei Zimmertemperatur mit Hilfe eines Spezialfilters von SCHOTT (Jena) kalt sterilisiert. Es resultierte ein kleines, leicht gelbliches Filtrat.

Von diesen Extrakten wurden je 1,0 cc einer Wurzelkultur zugesetzt. Die nachstehende kleine Tabelle gibt die Werte für den Biotingehalt der drei verschieden behandelten Blattextrakte wieder:

TABELLE XVI
Biotingehalt der geprüften Extrakte

Extrakt	Behandlung	Biotingehalt
1 ‰	60 ° C	0,54 m ^g /cc
1 ‰	115 ° C	0,73 „
1 ‰	Kalt sterilisiert	0,54 „

Nach 15 Tagen Kulturdauer ernteten wir die Wurzeln und bestimmten wie im vorigen Versuch Längenwachstum, Trockengewicht und Anzahl der sichtbaren Nebenwurzeln. Die Resultate sind in Tabelle XVII zusammengestellt.

TABELLE XVII
Wirkung von Pisumblattextrakten auf Längenwachstum, Trockengewicht und Nebenwurzelzahl isolierter Pisumwurzeln

Extrakt, Behandlung	Längenwachstum (mm)	Trockengewicht (mg)	Zahl der Nebenwurzeln
Kontrollen	114,8	6,1	2,5
1 ‰ 60 ° C	133,7	7,1	5,5
1 ‰ 115 ° C	118,4	6,3	3,8
1 ‰ kalt sterilisiert	117,0	6,0	2,5

Die nach der Ermittlung des Biotingehaltes in den Wurzeln und Milieus aufgestellte Bilanz des Biotinstoffwechsels ergab, daß keiner der drei unterschiedlich behandelten Blattextrakte die Biosynthese des Biotins in der isoliert wachsenden Wurzel von *Pisum* entscheidend beeinflusst (vgl. dazu die Tabelle XVIII).

Zusammenfassend läßt sich feststellen:

1. Die in der Hitze bei 115 ° C sterilisierten Extrakte sind nur wenig wirksam. Dasselbe gilt für einen mit Äther behandelten Blattextrakt. Allen fehlen die proteischen Substanzen, die entweder durch Hitze oder durch chemische Agentien zerstört worden sind.
2. Ein mit einer Temperatur von 60 ° C behandelter Extrakt ist ebenfalls nur schwach wirksam, da bei diesem Wärmegrad die Proteine offenbar schon in Mitleidenschaft gezogen worden sind.

TABELLE XVIII

Einfluß von Blattextrakten auf die Biotinsynthese isolierter Pisumwurzeln

Extrakt, Art der Behandlung	Biotin in m γ					
	1	2	3	4	5	6
	pro Wurzel	pro Milieu	Total	mit dem Extrakt zugefügt	total nach Abzug von ***)	synthetisiert pro mg Wurzel
1 % 60 ° C	0,951	4,540	5,491	0,540	0,694	0,097
1 % 115 ° C	0,838	4,995	5,833	0,730	0,846	0,134
1 % kalt sterilisiert	0,864	4,142	5,006	0,540	0,209	0,033

*** Abgezogen werden:

1. Die Kontrollen = Kulturen ohne zugefügten Extrakt

Wert (Wurzel + Milieu): 4,257 m γ

2. Das mit dem Blattextrakt zugesetzte Biotin (Kolonne 4)

3. Der mittelst Spezialfilter kalt sterilisierte Extrakt führte zu keiner Förderung der Biotinbildung.

4. Die beiden mit einer Temperatur von 45 ° C behandelten Blattextrakte wirkten sich dagegen günstig aus und übten eine nicht unwesentliche Förderung auf die Biosynthese des Biotins in der isolierten Pisumwurzel aus, und zwar erwies sich der zehnprozentige Extrakt wirksamer als der einprozentige.

Die Vermutung liegt nahe, daß ein solcher Extrakt nicht nur gerade auf die Biotinsynthese sich positiv auswirkt, sondern auch auf die Bildung anderer Wirkstoffe.

Im Laufe dieser Untersuchungen konnte die interessante Beobachtung gemacht werden, daß die im Wasserbad bei 45 ° C bzw. 60 ° C pasteurisierten Extrakte, die also noch die in den Zellen enthaltenen Proteine besaßen, bei der Bestimmung ihres Biotingehaltes auf den Testorganismus *Saccharomyces cerevisiae* in Mengen von 1,0 cc und mehr die Entwicklung dieser Hefe stark hemmten; diese Wirkung fehlt den heiß sterilisierten Extrakten. Ein kalt sterilisierter Blattextrakt wirkt dagegen auch

wachstumshemmend. Hier wird aber bei der Filtration der größte Teil der Proteine zurückgehalten, so daß im Filtrat keine sehr großen Molekeln mehr vorhanden sein werden. Erhitzen wir dieses Filtrat auf 115 ° C, so bildet sich ein geringer Niederschlag, und die überstehende klare Lösung hemmt das Wachstum der Hefe nicht. Der oder die eine Hemmung ausübenden Stoffe dürften daher in dem durch nachträgliche Hitzebehandlung entstandenen Niederschlag zu suchen sein. Über die Natur dieser Substanzen ist uns aber nichts Näheres bekannt. Die Bestimmungen mit dem *Saccharomyces*-Test werden indessen durch die beobachtete Hemmung nicht gestört, da der Biotingehalt auch in Mengen von 0,05 bis 0,5 cc genau ermittelt werden kann.

5. Der Nicotinsäurestoffwechsel

Bei *Phycomyces blakesleeanus*, auf synthetischem Milieu mit Aneurin kultiviert, bewirkt das Vitamin K₃ eine Hypovitaminose in bezug auf die Nicotinsäure (Hemmung der Biosynthese der Nicotinsäure), und zwar ist ihre Intensität proportional der Menge des Inhibitors (SCHOPFER und BOSS [82, 83]). Die Wirkung des Vitamins K₃ beschränkt sich übrigens nicht nur auf eine Störung des Nicotinsäurestoffwechsels: als Folge davon wird das Gleichgewicht anderer Vitamine stark in Mitleidenschaft gezogen (34). Die Hemmung der Nicotinsäurebildung läßt sich durch Zusatz von Nicotinsäure oder ihrer Vorstufen wieder rückgängig machen; die normale Bilanz im Nicotinsäurestoffwechsel wird auf diese Weise wieder hergestellt. Ein Studium dieses Antagonismus wurde ebenfalls an Wurzeln in isolierter Organkultur durchgeführt. Die ersten Ergebnisse sind anlässlich des Colloque international de Morphogenèse, Straßburg, Juli 1949, mitgeteilt worden (34). Die nachfolgenden Untersuchungen ergänzen in der Weise, daß sie uns Aufschluß geben über die Art, wie sich der Stoffwechsel der Nicotinsäure im Verlauf der Entwicklung der isolierten Wurzel abspielt. Im besonderen kann man sich fragen, ob die Wurzel dieses Vitamin in genügender Menge zu bilden imstande ist oder ob es als exogener Wachstumsfaktor dem Milieu zugefügt werden muß.

Nach Ergebnissen von ADDICOTT und BONNER (84) und ADDICOTT und DEVIRIAN (75) wird das Wachstum der isolierten Pisumwurzel gefördert, wenn dem Milieu mit Aneurin noch Nicotinsäure beigefügt wird. BONNER (51) widmete der Wirkungsspezifität der Nicotinsäure eine eingehende Arbeit, der zu entnehmen ist, daß von 23 der Nicotinsäure mehr oder

weniger verwandten Substanzen einzig solche auf Pisumwurzeln aktiv waren, die nach einfacher Hydrolyse Nicotinsäure liefern.

In unseren Versuchen führten wir innerhalb 105 Tagen sieben Überimpfungen aus (85). Nach jeder Überimpfung wurden Kulturmilieu und Wurzeln einer Nicotinsäureanalyse unterworfen und außerdem die Länge der Wurzel und das Gewicht der gebildeten Trockensubstanz ermittelt. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle XIX zusammengestellt. Die zur Beimpfung der Kulturgefäße verwendeten 10 mm langen Wurzelspitzen enthielten 138 μg Nicotinsäure. Die Zahlen in der Tabelle stellen die korrigierten Werte nach Abzug dieses Anfangsgehaltes dar.

Im Kulturmilieu ist eine ziemliche Menge Nicotinsäure nachzuweisen, die entweder von einer Diffusion dieses Vitamins aus den lebenden Zellen oder aber aus zerfallenden toten Zellen herrührt (Tabelle XX). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Wurzel der von uns untersuchten Sorte von *Pisum sativum* für die Nicotinsäure weitgehend autotroph ist. Ein in der zweiten und fünften Überimpfung auftretendes Absinken der gebildeten Nicotinsäuremenge wird in der folgenden Passage wieder kompensiert (vgl. Figur 4).

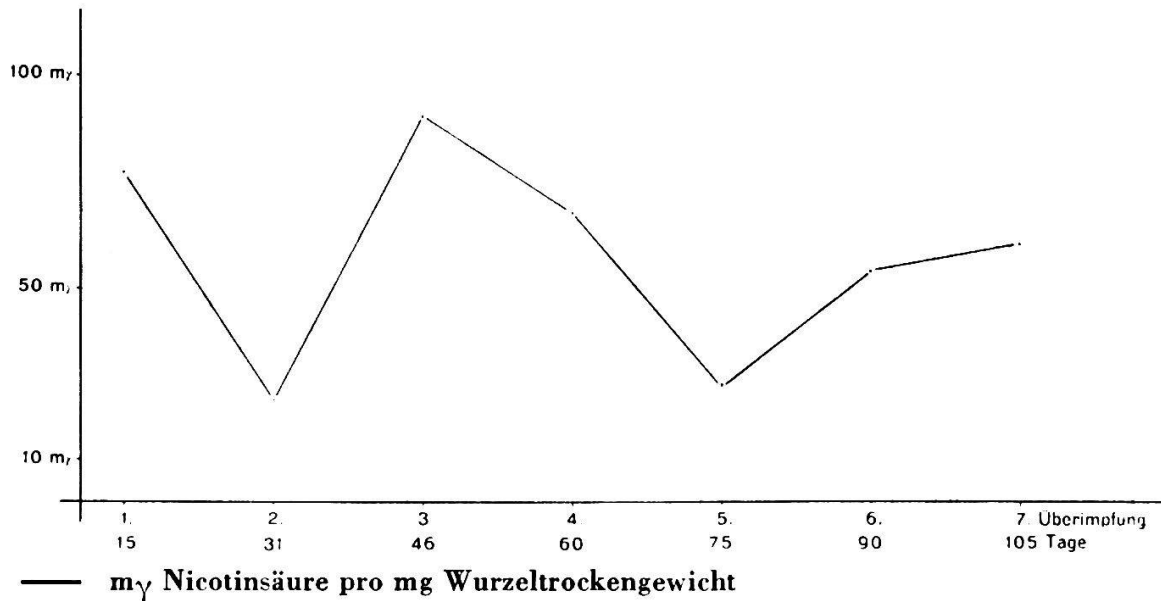
Nach 7 Überimpfungen in 105 Tagen hält sich die Biosynthese der Nicotinsäure ungefähr auf der gleichen Höhe wie zu Beginn des Versuches. Wie beim Biotinstoffwechsel, so stellt sich auch hier die Frage, ob bei der intakten Pflanze die Biosynthese der Nicotinsäure in der

TABELLE XIX

Biosynthese der Nicotinsäure durch die isolierte Wurzel von Pisum

Überimpfung	Tage	Wurzellänge (mm)	Trockengewicht (mg)	Nicotinsäure total (μg) *	Nicotinsäure pro mg Wurzel (μg)
1	15	92,4	7,8	604,3	77,5
2	31	102,2	5,7	138,2	24,2
3	46	93,2	4,6	417,0	90,6
4	60	94,2	3,85	261,4	67,9
5	75	103,2	3,1	83,6	27,0
6	90	108,7	4,9	266,7	54,4
7	105	111,4	5,6	339,9	60,7

* Nicotinsäure der Wurzel und des Milieus

Nikotinsäurebilanz

Figur 4

Wurzel wirklich ganz unabhängig vom Stoffwechsel des Blattes ist. Fest steht nur, daß die isolierte Pisumwurzel mit der von ihr produzierten Nicotinsäuremenge auskommt.

Diese Befunde vervollständigen, was wir schon anlässlich der Untersuchung des Biotinstoffwechsel fanden: trotzdem die Nicotinsäure durch die Pisumwurzel gebildet wird, ist sie als exogener Wachstumsfaktor doch nicht ganz unwirksam; sie wirkt fördernd auf die gesamte Entwicklung, ist aber nur Zusatzfaktor.

TABELLE XX

Verteilung der gebildeten Nicotinsäure auf Wurzel und Milieu

Überimpfung	Tage	Nicotinsäure in mγ		
		Wurzel	Milieu	Total
1	15	592,0	149,5	742,3
2	31	225,0	151,2	376,2
3	46	401,0	154,0	555,0
4	60	246,4	153,0	399,4
5	75	71,2	150,4	221,6
6	90	256,0	148,7	404,7
7	105	275,5	202,4	477,9

6. Lactoflavinstoffwechsel

Die höheren Pflanzen sind reich an Flavinen; Erbsen enthalten beispielsweise 0,5 bis 1,5 mg pro kg Frischgewicht. Die Anwesenheit von Flavinen in Bakterien beweist, daß die Biosynthese dieser Pigmente nicht direkt an die Anwesenheit von Chlorophyll gebunden ist. Buttersäure- und Milchsäurebakterien sowie Hefen sind Träger von Flavinen. *Eremothecium Ashbyii* synthetisiert große Mengen von Lactoflavin, das in der Vakuole als Kristalle ausgeschieden wird (GUILLIERMOND [86]). SCHOPFER (87) zeigte, daß das Lactoflavin wie auch Lumiflavin und Lumichrom in der Vakuole verschiedener Pflanzenzellen angehäuften werden kann, besonders in den Zellen der oberen Epidermis von *Allium*-Zwiebelschuppen.

Sehr wenig ist über den Lactoflavingehalt der höheren Pilze, der Algen und der höheren Kryptogamen bekannt, obgleich diese Organismen zweifellos dieses Vitamin enthalten.

BONNER (88) prüfte die isoliert wachsenden Wurzeln von Tomate, Luzerne, Klee, Datura und Sonnenblume auf ihre Fähigkeit, Lactoflavin zu bilden. Alle diese Wurzeln enthalten auch nach 60 bis 70 wöchentlichen Passagen bedeutend mehr Lactoflavin als die anfänglich in Kultur gesetzten Wurzelspitzen. Dies läßt vermuten, daß während der Kultur eine Synthese von Lactoflavin stattfindet.

TABELLE XXI

Biosynthese des Lactoflavins durch die isolierte Wurzel von Pisum

Überimpfung	Tage	Wurzellänge (mm)	Trockengewicht (mg)	Lactoflavin	
				mγ total **)	mγ pro mg Wurzel
1	15	92,4	7,8	174,5	22,4
2	31	102,2	5,7	99,7	17,5
3	46	93,2	4,6	56,3	12,2
4	60	94,2	3,85	65,7	17,0
5	75	103,2	3,1	58,9	19,0
6	90	108,7	4,9	94,5	19,3
7	105	111,4	5,6	103,7	18,5

** Lactoflavin der Wurzel und des Milieus

Wir untersuchten die solierte Wurzel von *Pisum* auf ihren Gehalt an Lactoflavin und führten im Laufe von 105 Tagen 7 Überimpfungen durch. Nach jeder Überimpfung wurden ermittelt: Länge und Trockengewicht der Wurzel, Lactoflavin der Wurzel und des Milieus. Mit Hilfe dieser Angaben ließ sich eine genaue Bilanz des Lactoflavinstoffwechsels aufstellen, deren Ergebnisse in Tabelle XXI verzeichnet sind.

Die ursprünglich in Kultur gesetzten Wurzelspitzen enthielten 13,6 m γ Lactoflavin. Die Zahlen der Tabelle XXI stellen die berichtigten Werte nach Abzug des Anfangsgehaltes dar.

Im Gegensatz zu Biotin und Nicotinsäure läßt sich in keiner der 7 Überimpfungen in den Kulturmilieus Lactoflavin nachweisen (Tabelle XXII).

Wir kommen zum Schlusse, daß die Wurzel der von uns geprüften Sorte von *Pisum sativum* für ihren eigenen Bedarf genügend Lactoflavin zu bilden vermag. Der Vitamingehalt bleibt während der ganzen Dauer des Versuches ziemlich konstant und hält sich bei Versuchsende ungefähr auf der gleichen Höhe wie zu Anfang (Figur 5).

Die Tatsache, daß die isolierte Pisumwurzel *in vitro* mit dem von ihr produzierten Lactoflavin auskommt, besagt aber noch nicht, daß an der intakten Pflanze das Blatt ohne jeglichen Einfluß auf die Biosynthese des Lactoflavins in der Wurzel ist.

TABELLE XXII

Verteilung des gebildeten Lactoflavins auf Wurzel und Milieu

Überimpfung	Tage	Lactoflavin in m γ		
		Wurzel	Milieu	Total
1	15	188,1	0	188,1
2	31	113,3	0	113,3
3	46	69,9	0	69,9
4	60	79,3	0	79,3
5	75	72,5	0	72,5
6	90	108,1	0	108,1
7	105	117,3	0	117,3

7. Der Aderminstoffwechsel

Wie MOELLER (89) zeigte, wird das Adermin von Milchsäurebakterien als Wachstumsfaktor benötigt. Für Hefen ist das Adermin ebenfalls unentbehrlich (EAKIN und WILLIAMS [90]). Über die Biosynthese dieses Vitamins ist bis heute recht wenig bekannt. Auch seine Wirkung auf die Keimung von Samen oder auf die Entwicklung der ganzen Pflanze in Sandkultur ist bisher nicht genauer untersucht worden. MINNUM (91) prüfte den Einfluß des Adermins auf das Wachstum verschiedener Pflanzen, fand es aber ohne jegliche Wirkung. ROBBINS und BARTLEY-SCHMIDT (48) entdeckten im Jahre 1938 die stark wachstumsfördernde Wirkung des Adermins auf die isolierte Tomatenwurzel, wenn es zusammen mit Aneurin oder Thiazol dem Kulturmilieu zugesetzt wurde:

	dry weight of crop in mg
Control	0,4
5 γ thiamin	3,4
5 γ thiamin + 1 γ pyridoxine	16,1
1 γ pyridoxine	1,8

(nach ROBBINS und BARTLEY-SCHMIDT (1938))

Aus dieser kleinen Aufstellung ist zu ersehen, daß das Adermin allein unwirksam ist; erst in Gemeinschaft mit Aneurin oder Thiazol kommt ausgeprägte Wachstumsförderung zustande.

TABELLE XXIII

Biosynthese des Adermins durch die isolierte Wurzel von Pisum

Überimpfung	Tage	Wurzellänge (mm)	Trockengewicht (mm)	Adermin	
				m γ total ***)	m γ pro mg Wurzel
1	15	133,3	9,1	15,45	1,70
2	31	144,2	8,1	55,58	6,86
3	46	106,7	5,9	61,36	10,40
4	60	84,4	4,6	35,97	7,82
5	75	92,4	4,9	53,43	10,90
6	90	69,6	3,8	36,52	9,61
7	105	70,2	4,5	40,23	8,94

*** Adermin der Wurzel und des Milieus

Wir stellten uns die Frage, ob die isoliert wachsende Wurzel von *Pisum* in der Lage sei, das Adermin selbst zu produzieren. Nach den Untersuchungen von BONNER (46) über das Vitaminbedürfnis isolierter Wurzeln durfte man annehmen, daß dies der Fall sei.

Innerhalb 105 Tagen führten wir 7 Überimpfungen aus. Nach jeder ermittelten wir wie üblich Länge und Trockengewicht der Wurzeln und den Gehalt an Adermin in Wurzel und Milieu. Aus diesen Angaben erstellten wir eine exakte Bilanz des Aderminhaushaltes. Die Ergebnisse sind in Tabelle XXIII veranschaulicht (siehe auch Figur 5).

Zu Beginn der Kulturen enthielten die Wurzelspitzen 10,03 $\mu\gamma$ Adermin. Die in Tabelle XXIII wiedergegebenen Zahlen für den Adermingehalt stellen die bereinigten Werte nach Abzug dieses Anfangsgehaltes dar.

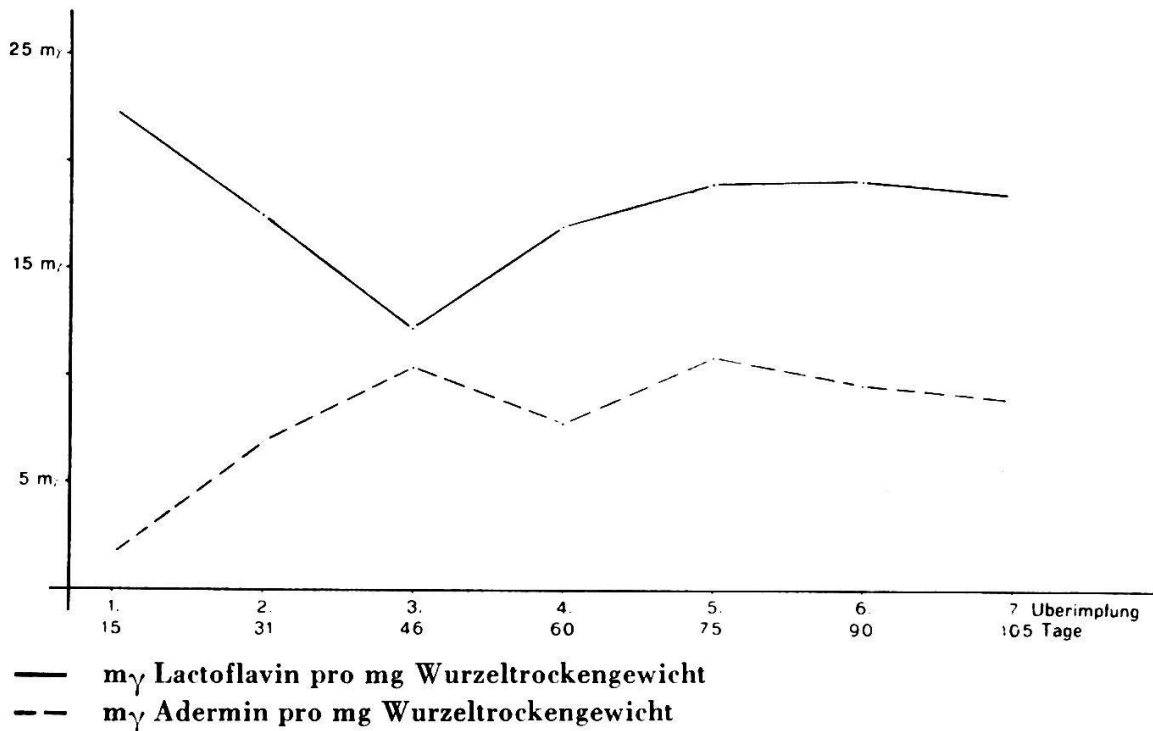
Wieder im Gegensatz zu Biotin und Nicotinsäure, aber in Übereinstimmung zum Lactoflavin, ist in keiner der 7 Überimpfungen in den Kulturlösungen Adermin vorhanden (Tabelle XXIV). Es gibt also keine Ausscheidungen von nachweisbarem Adermin.

TABELLE XXIV

Verteilung des gebildeten Adermins auf Wurzel und Milieu

Überimpfung	Tage	Adermin in $\mu\gamma$		
		Total	Wurzel	Milieu
1	15	25,48	0	25,48
2	31	65,61	0	65,61
3	46	71,39	0	71,39
4	60	46,00	0	46,00
5	75	63,46	0	63,46
6	90	46,55	0	46,55
7	105	53,26	0	53,26

Der geringe Adermingehalt nach der ersten Überimpfung wird in der folgenden kompensiert. Die Wurzel benötigt offenbar einige Zeit, um unter den veränderten Lebensbedingungen die Bildung des Adermins in Gang zu setzen. Bis Versuchsende bleibt die Produktion dann ziemlich regelmäßig. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß für die isoliert wach-

Lactoflavin- und Aderminbilanz

Figur 5

sende Wurzel von *Pisum* (Sorte «Maikönigin») in vitro die von ihr synthetisierte Quantität Adermin zum Wachstum ausreicht. Die Möglichkeit einer Beeinflussung des Aderminhaushaltes der Wurzel an der intakten Pflanze durch das Blatt ist dadurch aber nicht von vornherein auszuschließen.

8. Der Pantothen säurestoffwechsel

a) Einleitung

Die Synthese der Pantothen säure und die Ermittlung ihrer Strukturformel durch WILLIAMS und Mitarbeiter (92, 93) führten zur Erkenntnis, daß sie aus β -Alanin und Butyrolakton besteht. Das Synthesevermögen der verschiedenen Organismen für die Pantothen säure kann sich auf die eine Komponente beschränken. So gibt es beispielsweise solche, die in der Lage sind, das Lakton zu produzieren, dagegen nicht das β -Alanin. Wird dem Organismus das letztere zur Verfügung gestellt, so ist er in der Lage, aus den beiden Teilen das gesamte Molekül aufzubauen.

Nach BONNER und AXTMANN (1937) wirkt die Pantothen säure günstig auf *Pisum*embryonen. In jüngster Zeit erschien eine ganze Reihe von

Arbeiten über gebundene Formen der Pantothersäure. Wir werden an gegebener Stelle darauf zurückkommen.

b) Der Pantothersäurestoffwechsel im Laufe einiger Überimpfungen

Unsere Untersuchungen über den Stoffwechsel dieses Vitamins hatten wiederum zum Ziele, das Synthesevermögen der isolierten Wurzel von *Pisum* innerhalb verschiedener Passagen zu prüfen. Im Laufe von 105 Tagen wurden die Wurzeln siebenmal überimpft. Nach jeder Überimpfung ermittelten wir wie bisher Längenwachstum und Trockengewicht der Wurzeln und bestimmten anschließend mit Hilfe des *Lactobacillus-arabinosus*-Testes den Gehalt an Pantothersäure in den Kulturlösungen und den Wurzeln. Die nachstehende Tabelle gibt die Zusammenstellung der Werte für Längenwachstum und Trockengewicht.

TABELLE XXV

Längenwachstum und Trockengewicht isoliert wachsender Pisumwurzeln

Überimpfung	Tage	Längenwachstum (mm)	Trockengewicht (mg)
1	15	60,1	5,5
2	30	75,2	3,8
3	44	87,6	4,5
4	60	126,8	6,7
5	75	98,8	4,8
6	90	114,1	5,9
7	105	136,8	8,6

Die an Hand der vorstehenden Daten aufgestellte Bilanz des Pantothersäurestoffwechsels führte zu folgenden Ergebnissen:

In den Nährlösungen läßt sich mit Hilfe des mikrobiologischen Testes in keiner der sieben Überimpfungen Pantothersäure nachweisen. Die Wurzeln enthalten nach 15 Tagen noch 2,6 m γ pro mg Trockengewicht, doch sinkt der Gehalt weiter ab, und nach der vierten Überimpfung ist im Wurzelmaterial überhaupt keine Pantothersäure mehr feststellbar. Dieses Ergebnis ist um so überraschender, als nämlich die anfangs in Kultur gesetzten Wurzelspitzen eine recht beträchtliche Menge Pantothersäure enthielten; in diesem bestimmten Versuch waren es 43,9 m γ /mg Trockengewicht (vgl. Tabelle XXVI).

TABELLE XXVI
Pantothensäure-Bilanz

	Tage	mγ Pantothensäure			
		Wurzel	Milieu	total)	pro mg Wurzel
Wurzelspitzen		39,7	—	39,7	43,9
1. Überimpfung	15	14,3	0	14,3	2,6
2. „	30	5,7	0	5,7	1,5
3. „	44	2,7	0	2,7	0,6
4. „	60	0	0	0	0
5. „	75	0	0	0	0
6. „	90	0	0	0	0
7. „	105	0	0	0	0

* Pantothensäure der Wurzel und des Milieus

Es findet offenbar keine Bildung von nachweisbarer Pantothensäure durch die Wurzel statt, und der in der Spitze ursprünglich vorhandene Vorrat verschwindet im Laufe der Zeit.

TABELLE XXVII
Pantothensäure-Bilanz

	Tage	mγ Pantothensäure			
		Wurzel	Milieu	total)	pro mg Wurzel
Wurzelspitzen		36,1	—	36,1	42,5
1. Überimpfung	16	0	0	0	0
2. „	32	0	0	0	0
3. „	46	0	0	0	0
4. „	60	0	0	0	0
5. „	75	0	0	0	0
6. „	90	0	0	0	0
7. „	107	0	0	0	0

* Pantothensäure der Wurzel und des Milieus

Eine erste Nachprüfung dieses ungewöhnlichen Befundes fiel noch eindrücklicher aus: in den Milieux war wie vorher in keiner der Überimpfungen Pantothen Säure nachzuweisen, und die Wurzeln enthielten bereits nach 15 Tagen keine durch den Test erfaßbare Pantothen Säure mehr, obschon die Wurzelspitzen bei Versuchsbeginn einen Gehalt von 42,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Trockengewicht aufwiesen (Tabelle XXVII).

Eine nochmalige Wiederholung führte wieder zum gleichen Resultat; in den Kulturlösungen ist in keinem Zeitpunkt Pantothen Säure erfaßbar, und die in den Wurzelspitzen vorhandene verschwindet mehr oder weniger rasch. Tabelle XXVIII gibt das Ergebnis der zweiten Nachprüfung wieder.

TABELLE XXVIII

Pantothen Säure-Bilanz

	Tage	μg Pantothen Säure			
		Wurzel	Milieu	total (*)	pro mg Wurzel
Wurzelspitzen		32,95	—	32,95	39,2
1. Überimpfung	15	6,6	0	6,6	0,77
2. „	30	0	0	0	0
3. „	45	0	0	0	0
4. „	60	0	0	0	0
5. „	75	0	0	0	0

* Pantothen Säure der Wurzel und des Milieus

Im Anschluß an diese Feststellungen ausgeführte weitere Untersuchungen zeigten deutlich, daß der Pantothen Säuregehalt der isoliert wachsenden Pisumwurzeln bereits am dritten Tage nach dem Einbringen der Wurzelspitzen in die Nährlösung erheblich kleiner ist als derjenige der frisch isolierten Wurzelspitzen und daß diese Abnahme während der folgenden Tage anhält. Tabelle XXIX veranschaulicht das Ergebnis dieser Versuche: in der ersten Kolonne findet sich die Zunahme der Wurzellänge, in der zweiten das Trockengewicht, während die letzte die pro 1 mg Wurzeltrockengewicht gefundene Menge Pantothen Säure in μg wiedergibt.

TABELLE XXIX

*Längenwachstum, Trockengewicht und Pantothersäuregehalt
von Wurzelkulturen verschiedenen Alters*

Tage	Längenwachstum (mm)	Trockengewicht (mg)	mγ Pantothersäure pro mg Wurzeltrockengewicht
3	25,8	1,9	12,7
6	45,6	3,0	6,25
10	72,7	4,8	4,3
13	106,3	6,7	3,6

Die Bestimmung der Pantothersäure in den verschiedenen Teilen einer Wurzel (Spitze, Mittelstück, Wurzelende) ließen einen ungleich großen Gehalt an diesem Vitamin erkennen; so enthält die Wurzelspitze am meisten, während gegen die Wurzelbasis hin die Quantität abnimmt. Es besteht in der isoliert wachsenden Wurzel von *Pisum* ein deutlicher Gradient von der Spitze zur Basis. Ferner sinkt im Laufe der Kultur die in den einzelnen Teilen feststellbare Vitaminmenge mehr oder weniger regelmäßig ab. Die genauen Werte sind für die drei untersuchten Zeitpunkte (3, 6 und 15 Tage) in der nachstehenden Tabelle XXX zusammengestellt.

TABELLE XXX

Verteilung der Pantothersäure in der isolierten Wurzel von Pisum

Alter in Tagen	mγ Pantothersäure pro mg Wurzeltrockengewicht		
	Spitze	Mittelstück	Wurzelende
3	6,8	—	5,6
6	5,4	—	4,0
15	2,5	1,1	0,0

Wir dehnten unsere Untersuchungen noch weiter aus und prüften ungekeimte Samen auf ihren Gehalt an Pantothersäure. Bei den Embryonen stellten wir das eine Mal eine Menge von 28,9 mγ/mg Trockensubstanz fest, während in einer anderen Bestimmung 19,3 mγ/mg Trockensubstanz gefunden wurden. Im Gegensatz dazu wiesen die Kotyledonen einen konstanteren Gehalt auf, nämlich 12,8 mγ/mg im ersten Fall und 12,5 mγ/mg

im zweiten. Erfolgt die Bestimmung der Pantothersäure in den Kotyledonen nach viertägiger Keimung der Samen, also in dem Zeitpunkt, wo die für die Versuche verwendeten Wurzelspitzen normalerweise abgeschnitten werden, so beträgt die durchschnittlich gefundene Menge noch 7,1 mγ/mg Trockensubstanz. Embryonen gleichen Alters enthalten 30,0 mγ/mg (Tabelle XXXI). Im Gegensatz zu den Kotyledonen, bei denen eine Abnahme des Pantothersäuregehaltes feststellbar ist, steigt die nach viertägiger Keimung in den Embryonen vorhandene Vitaminmenge an. Diese Zunahme ist wohl auf einen Transport eines Teils der in den Kotyledonen sich befindenden Pantothersäure zurückzuführen. Betrachten wir den ganzen Samen, so ergibt sich im ungekeimten Zustande ein Gesamtgehalt von 1633,8 mγ Pantothersäure, nach viertägiger Keimung aber nur noch 1054,7 mγ, was einer Verminderung um 589,1 mγ entspricht. In der gleichen Zeit sinkt die auf 1 mg Trockensubstanz bezogene Pantothersäuremenge von 41,7 mγ im ungekeimten Zustande auf 37,1 mγ. Es findet also schon in den allerersten Stadien des Wachstums eine ziemliche Abnahme der im trockenen Samen ursprünglich nachweisbaren Vitaminmenge statt.

TABELLE XXXI

Verteilung der Pantothersäure in ungekeimten und gekeimten Erbsen

	mγ Pantothersäure	
	pro Kotyledonenpaar bzw. pro Embryo	pro mg Trockensubstanz
Kotyledonen ungekeimt	1548,4	12,8
Kotyledonen nach viertägiger Keimung ..	688,7	7,1
Embryonen ungekeimt	85,0	28,9
Embryonen nach viertägiger Keimung ..	366,0	30,0

c) Die Wirkung von Pantothersäurezugaben

Die Resultate der vorstehenden Untersuchungen ließen die Frage auftauchen, wie sich wohl die isoliert wachsende Wurzel von *Pisum* Zusätzen von reiner, synthetischer Pantothersäure gegenüber verhalten werde. Kommen dadurch irgendwelche erfaßbaren Änderungen im Stoffwechsel dieses Vitamins zustande, oder erscheinen, besonders bei höheren

Dosen, Hemmungen in der Entwicklung, die Längenwachstum und Trockengewicht beeinflussen?

Einer ersten Versuchsreihe setzten wir folgende Mengen zu: 50, 200 und 500 m γ pro Kultur. Eine Anzahl Kulturen blieb ohne Zusatz und diente als Kontrollen. Nach 15 Tagen unterbrachen wir den Versuch und nahmen eine Bestimmung des in Wurzeln und Milieus noch vorhandenen Vitamins vor. Die Auswertung der Vitaminbestimmung ergab, daß in den Kontrollkulturen weder in der Nährlösung noch in den Wurzeln mit dem mikrobiologischen Test Pantothersäure erfaßbar war. Dasselbe gilt für die Kulturen, denen 50 m γ Pantothersäure zugefügt wurden: auch hier läßt sich nach 15 Tagen keine Pantothersäure mehr nachweisen. Demgegenüber war bei den in Gegenwart von 200 m γ bzw. 500 m γ Pantothersäure gewachsenen Wurzeln sowohl im Milieu als auch in der Wurzel selbst dieses Vitamin noch feststellbar. Tabelle XXXII gibt die erhaltenen Resultate wieder.

TABELLE XXXII

Bilanz der zugesetzten Pantothersäure

	Kontrollen	1. Serie	2. Serie	3. Serie
Zugefügt	0,0 m γ	50,0 m γ	200,0 m γ	500,0 m γ
Gehalt der Wurzelspitzen	41,9 m γ	41,9 m γ	41,9 m γ	41,9 m γ
Total zugefügt	41,9 m γ	91,9 m γ	241,9 m γ	541,9 m γ
Nach 15 Tagen gefunden:				
Wurzel	0,0 m γ	0,0 m γ	17,7 m γ	32,4 m γ
Milieu	0,0 m γ	0,0 m γ	199,1 m γ	452,9 m γ
Total	0,0 m γ	0,0 m γ	216,8 m γ	485,3 m γ
Abnahme	41,9 m γ	91,9 m γ	25,1 m γ	56,6 m γ
In % ausgedrückt	100,0 %	100,0 %	10,38 %	10,44 %

In einer zweiten Versuchsreihe erhöhten wir die zugesetzte Quantität an synthetischem Vitamin auf 1000 m γ bzw. 10 000 m γ pro Kultur. Nach

25 Tagen erfolgte die Bestimmung der Pantothensäure in den Wurzeln und im Milieu. In den Kontrollkulturen konnte nach dieser Zeit wiederum weder in den Wurzeln noch in der Nährlösung Pantothensäure nachgewiesen werden, während erwartungsgemäß in den beiden Serien mit 1000 m γ bzw. 10 000 m γ Pantothensäure diese in den Wurzeln und in der Kulturlösung noch vorhanden war. Die genauen Werte sind in Tabelle XXXIII zusammengestellt.

TABELLE XXXIII
Bilanz der zugesetzten Pantothensäure

	Kontrollen	4. Serie	5. Serie
Zugefügt	0,0 m γ	1000,0 m γ	10 000,0 m γ
Gehalt der Wurzelspitzen	38,9 m γ	38,9 m γ	38,9 m γ
Total	38,9 m γ	1038,9 m γ	10 038,9 m γ
Nach 25 Tagen gefunden:			
Wurzel	0,0 m γ	22,5 m γ	249,9 m γ
Milieu	0,0 m γ	880,8 m γ	8 494,0 m γ
Total	0,0 m γ	903,3 m γ	8 743,9 m γ
Abnahme	38,9 m γ	135,6 m γ	1 295,0 m γ
In % ausgedrückt	100,0 %	13,05 %	12,90 %

Es ergibt sich, daß in den Kontrollen und bei der geringsten zugesetzten Pantothensäuremenge (50 m γ) alles Vitamin verschwunden ist. Von größeren zugefügten Mengen bleibt ein beträchtlicher Teil übrig. Die Wurzel enthält bedeutend weniger als die Kulturlösung, ist aber nicht frei von nachweisbarer Pantothensäure geworden. Beim Vergleich der Prozentzahlen für die Abnahme der Pantothensäure fällt auf, daß sie sich das eine Mal um 10 %, das andere um 13 % herum bewegen, so daß es den Anschein hat, als ob von größeren Mengen Pantothensäure in der gleichen Zeit mehr verschwinden würde. Berücksichtigen wir die Fehlergrenze der Bestimmungsmethode, so glauben wir annehmen zu

dürfen, daß die isoliert wachsende Wurzel der von uns untersuchten Pisumsorte «Maikönigin» gar nicht auf die Pantothersäure angewiesen ist und vermutlich geringe Mengen davon abzubauen vermag, wobei allerdings noch offensteht, ob dieser Teil nicht in irgendeine gebundene Form übergeführt wird und so im mikrobiologischen Test nicht mehr erfaßbar ist.

Entwicklungshemmungen, verursacht durch die hohen Konzentrationen der Pantothersäure im Milieu, wurden nicht beobachtet. In den ausgeführten Versuchen blieben Längenwachstum und Trockengewicht im Rahmen des Normalen. Die exogen zugeführte Pantothersäure übt im geprüften Bereich (50 bis 10 000 $\mu\gamma$) keine Wirkung auf das Wachstum der isolierten Wurzel von *Pisum* aus.

d) Fermentative Abbauversuche

Im Jahre 1945 beobachteten LIPMANN und Mitarbeiter (94, 95) bei der Acetylierung von aromatischen Aminen in Leberpräparaten die Wirkung eines neuen, allgemein verbreiteten Co-enzym. Die gleichen Autoren fanden bald darauf, daß das analoge Acetylierungssystem für Choline im Hirn dasselbe Co-enzym benötigt (97).

Die Versuche, dieses neue Co-enzym (Co-enzym A genannt) zu identifizieren, führten wenig später zum Erfolg (96): es stellte sich heraus, daß neben anderen Substanzen die Pantothersäure einen wichtigen Bestandteil dieses Co-enzym darstellt. Ihr Anteil beträgt ungefähr 10%. Die im aktiven Co-enzym A vorkommende gebundene Pantothersäure ist wohl im Kückentest erfaßbar, dagegen nicht im mikrobiologischen Test. Für diesen muß sie aus dem Co-enzym A durch Abbau in Freiheit gesetzt werden.

Weitere Untersuchungen mit dem Co-enzym A ließen erkennen, daß es noch bei anderen Reaktionen eine wichtige Rolle spielt (98, 99).

LIPMANN und Mitarbeiter (100) veröffentlichten 1950 eine wichtige Arbeit über Isolierung und Zusammensetzung des Co-enzym A. Der Gehalt des untersuchten Präparates an Vitaminen war sehr gering, zum Teil konnten sie überhaupt nicht erfaßt werden (Biotin und Aneurin). Eine direkte Bestimmung der Pantothersäure ergab einen Gehalt von 0,083%; nach einwöchiger Verdauung mit Clarase-Papain stieg die im Test ermittelte Pantothersäuremenge auf 0,16% (diese Beobachtung läßt vermuten, daß die enzymatische Behandlung, die in der routinemäßigen Bestimmung der Pantothersäure gebraucht wird [101], bloß ganz kleine Mengen Pantothersäure aus dem Co-enzym A freisetzen kann); aus β -Alanin nach saurer Hydrolyse errechneten die Autoren dagegen einen Gehalt an Pantothersäure von 11%.

Nach den Auffassungen der Verfasser setzt sich das Co-enzym A aus drei hauptsächlichen Komponenten zusammen:

Pantothersäure (Komp. 1), verbunden *a*) mit Komponente 2, vermutlich Adenylsäure (durch Phosphorbrücke), *b*) mit Komponente 3, möglicherweise eine Aminosäure, durch eine bis jetzt nicht näher bekannte Bindung.

Bereits vor der Entdeckung des Co-enzym A wurden Konjugate der Pantothersäure beschrieben (102, 103). Im Jahre 1948 berichten KING, LOCHER und CHELDELIN (104)

über eine neue, im Herzmuskelkonzentrat entdeckte gebundene Form der Pantothen-säure. Die beiden oben erwähnten Konjugate sind wahrscheinlich von diesem als PAC (pantothenic acid conjugate) bezeichneten Konjugat verschieden, während das von LIPMANN et al. beschriebene Co-enzym A ähnliche Eigenschaften aufweist.

Über das Vorhandensein eines nicht identifizierten Wachstumsfaktors für *Lactobacillus bulgaricus* und andere Milchsäurebakterien erschien 1949 eine erste Arbeit (105). Spätere Untersuchungen brachten auch diesen *Lactobacillus-bulgaricus*-Faktor (LBF) mit der Pantothen-säure und dem Co-enzym A in nähere Beziehung (106, 107).

Alle erwähnten gebundenen Formen der Pantothen-säure unterscheiden sich voneinander durch ihre Stabilität gegen Säuren, Alkalien, Fermente und Fällungsmittel. Die Möglichkeit, daß es sich bei den verschiedenen Konjugaten um Abbauprodukte des Co-enzym A handeln könnte, ist naheliegend, und es ist in der Tat KING und STRONG (108) gelungen, interessante vermutliche Zusammenhänge zwischen Co-enzym A, LBF und dem NEAL-und-STRONG-Faktor aufzudecken.

Für die Durchführung unserer Abbauersuche hielten wir uns an das von BARTON-WRIGHT (109) angegebene Verfahren:

1 g der fein pulverisierten Substanz wird mit je 20 mg Papain und Takadiastase und 40 cc eines 0.5prozentigen Acetatpuffers (pH 4,5) versetzt. Dieses Gemisch läßt man unter Toluol während 24 h bei 37 ° C. Nach der Verdauung trennt man im Scheidetrichter vom Toluol ab und kocht die Mischung 1/2 h, um die Enzyme zu zerstören. Nach dem Abkühlen wird vom Rückstand abfiltriert und mit destilliertem Wasser auf 50 cc aufgefüllt, sowie das pH des Filtrates auf 6,8 gebracht. Bei Material mit hohem Fettgehalt empfiehlt es sich, nach der Filtration und bevor man das pH auf 6,8 bringt, den Extrakt mit Aethyläther auszuschütteln.

Außer Material von Wurzelkulturen verschiedenen Alters bezogen wir auch Sproß-teile und Wurzeln *in vivo* gewachsener Pisumpflanzen in die Untersuchungen ein. Ein zuerst durchgeführter Kontrollversuch mit den beiden zur Verdauung verwendeten Fermenten und der Pufferlösung allein ergab, daß sie keine auf den Testorganismus *Lactobacillus arabinosus* wirksamen Substanzen enthielten und auch sein Wachstum nicht beeinträchtigten. Ein Vergleich der Zahlen für die vorhandene Pantothen-säure-menge in den verschiedenen Proben vor und nach der Verdauung (Tabelle XXXIV) zeigt, daß nach der Fermentbehandlung die nachweisbare Vitaminmenge nicht größer geworden ist. Eine zeitliche Ausdehnung der Verdauung auf das Doppelte lieferte keine besseren Ergebnisse.

Ein Ersatz der beiden Fermente durch einen Kotyledonenextrakt zeigte keine neuen Gesichtspunkte: nach der Verdauung ist der Gehalt der geprüften Wurzelextrakte unter Berücksichtigung der in den Extrakten aus den Kotyledonen bereits vorhandenen Pantothen-säure nicht größer geworden. Verwendet wurden zehnpromtente wässrige Extrakte, zum Teil bei Zimmertemperatur, zum Teil bei 115 ° C hergestellt.

Durch die negativen Ergebnisse der fermentativen Abbauersuche veranlaßt, legten wir uns die Frage vor, ob vielleicht eine Hydrolyse mit Salzsäure den β -Alaningehalt ansteigen ließe. LIPMANN und Mitarbeiter (100) vermuten auf Grund eigener Erfahrungen, daß die übliche enzymatische Behandlung bloß ganz kleine Mengen Pantothen-säure freisetzen kann.

TABELLE XXXIV

Ergebnisse der Abbauversuche mit Papain und Takadiastase

	m ^g Pantothensäure	
	im unbehandelten Material	nach der Fermentbehandlung
Kotyledonen ungekeimt	12,5	11,9
Wurzelkulturen 15 Tage alt	0	0
Wurzeln 2. Überimpfung	0	0
Wurzeln 4. Überimpfung	0	0
Blätter 14 Tage alt	10,1	10,8
Stengel 14 Tage alt	8,7	8,8
Wurzel 29 Tage alt	13,4	12,8
Sproß 39 Tage alt	6,9	6,9
Wurzel 39 Tage alt	13,3	13,3
Sproß 65 Tage alt	6,1	4,5
Wurzel 65 Tage alt	10,5	9,3

Bei der Ausführung von β -Alaninbestimmungen (SCHENK und DU VIGNEAUD (110)) stellte es sich heraus, daß der Testorganismus *Saccharomyces cerevisiae* Hansen-St. Fleischmann in Gegenwart von Pantothensäure sich genau so gut entwickelt wie mit β -Alanin. Der Buttersäureanteil des Pantothensäuremoleküls ist dagegen unwirksam. In pantothensäurefreiem Material läßt sich β -Alanin mit dieser Methode wohl bestimmen. Im anderen Falle ist es unerlässlich, zuerst die freie Pantothensäure zu bestimmen und anschließend nach saurer Hydrolyse das β -Alanin. Dieses kann ursprünglich frei vorhanden gewesen oder aber durch die Hydrolyse aus der Pantothensäure oder sogar aus gebundenen Formen dieses Vitamins befreit worden sein. Bei der Auswertung treten dadurch natürlich einige Komplikationen auf. Als weitere ungünstige Tatsache kommt hinzu, daß die Empfindlichkeit des Testorganismus gegenüber β -Alanin mit zunehmendem Gehalt an Protein und dessen Abbauprodukten in den Extrakten abnimmt und die Ergebnisse rasch fehlerhaft werden. SARETT und CHELDELIN (111) versuchten eine brauchbare Methode zur Bestimmung des β -Alanins zu entwickeln. Die Ergebnisse ihrer Arbeit zeigten aber, daß die zahlreichen geprüften Hefen unter den beschriebenen Bedingungen nicht zur Bestimmung des β -Alanins verwendet werden können, wegen der hemmenden Wirkung, die durch Aminosäuren und natürliche Extrakte ausgeübt wird.

Trotz den ungünstigen Voraussetzungen führten wir Bestimmungen durch, und zwar in Wurzelmaterial, von welchem bekannt war, daß es keine Pantothensäure enthielt. In den mit 1nHCl eine Stunde lang bei 115 ° C hydrolysierten Proben ließ sich nach dem Neutralisieren mit NaOH kein β -Alanin nachweisen; eine Hemmung des Test-

organismus durch die Extrakte konnte nicht beobachtet werden. Wird aber mit 20prozentiger HCl unter den gleichen Bedingungen hydrolysiert, so wird das Wachstum des Testorganismus in den Hemmungskontrollen fast vollständig unterdrückt, was eine Auswertung unmöglich macht. Die Prüfung einer reinen β -Alaninlösung auf ihre Beständigkeit gegen eine 1 n HCl-Lösung (Einwirkungsdauer 1 Stunde bei 115 °C) ergab keine Aktivitätsverminderung unter dem Einfluß der Säure.

Abschließend kommen wir zum Resultat, daß, wenn überhaupt Pantothenensäure im untersuchten Pflanzenmaterial in gebundener Form vorliegt, sie mit der üblichen fermentativen Abbaumethode nicht freigesetzt werden kann. Ebensowenig führten Bestimmungen des β -Alaningehaltes nach saurer Hydrolyse zum Erfolg, so daß wir unter gewissen Vorbehalten (mangelnde Zuverlässigkeit des Hefetestes) auf ein Fehlen von Konjugaten der Pantothenensäure schließen dürfen und somit das Verschwinden der Pantothenensäure andere Ursachen haben muß als einen Einbau in einen Komplex.

e) Der Pantothensäurestoffwechsel der Wurzel *in vivo*

Die vorstehenden Untersuchungen ergaben, daß in der Wurzel *in vitro* nach kurzer Zeit keine Pantothenensäure mehr vorhanden war. Offensichtlich hat die Wurzel die Fähigkeit, Pantothenensäure zu bilden, verloren. Da andererseits die Pantothenensäure, wie schon ihr Name besagt, überall verbreitet ist, wird sie vermutlich durch das Blatt gebildet und dann der Wurzel zugeführt. Wenn diese Ansicht richtig ist, so müssen wir *in vivo* Pantothenensäure sowohl in den Blättern als auch in der Wurzel finden, und der Pantothenensäuregehalt der Wurzel wird wahrscheinlich ziemlich konstant bleiben.

Wir kultivierten eine entsprechend große Anzahl *Pisum*-Pflanzen in Töpfen im Freien. Die Töpfe wurden mit einer lockeren Mischung von Sand und Gartenerde gefüllt und in jeden ungefähr 20 Samen ausgelegt. Die Mischung Sand + Gartenerde wählten wir aus zwei Gründen: erstens findet die Pflanze mehr Nährstoffe in ihrem Substrat als zum Beispiel in Sand allein oder in Sand + Torfmull, und zweitens lassen sich die zu analysierenden Wurzeln leicht von den anhaftenden Teilchen durch Waschen befreien, was besonders bei älteren und reich verzweigten von Vorteil ist.

In bestimmten Zeitabständen entnahmen wir unseren Kulturen 2 bis 3 Töpfe und analysierten die gewaschenen und getrockneten Wurzeln. Nach sechs Wochen standen die meisten Pflanzen in Blüte und trugen ungefähr zwei Wochen später Früchte. Die Resultate der einzelnen Bestimmungen sind in Tabelle XXXV zusammengestellt. 32 Tage nach Versuchsbeginn ist die ermittelte Menge an Pantothenensäure noch annähernd so groß wie nach 6 Tagen. Später sinkt der Gehalt an Pantothenensäure ab. Bei 67 Tage alten Pflanzen mit Früchten, zu einem Zeitpunkt also, wo in Wurzelkulturen längst keine Pantothenensäure mehr festzustellen ist, ent-

halten die Wurzeln immer noch eine gewisse Menge davon, allerdings auch nur mehr den dritten Teil des nach 6 Tagen ermittelten Wertes. Wir dürfen deshalb annehmen, daß die Wurzel durch den Sproßteil mit Pantothenensäure versorgt wird.

TABELLE XXXV

Pantothenensäuregehalt von Pisumwurzeln in vivo

Alter der Pflanzen	m% Pantothenensäure pro mg Wurzel
6 Tage	31,7
12 „	34,1
22 „	23,3
32 „	29,6
44 „	10,2
55 „	17,6
67 „	10,1

Es gelang uns, diese Abhängigkeit der Wurzel von den oberirdischen grünen Teilen der Pflanze besonders eindrücklich durch folgende Versuchsanordnung zu belegen:

Ausgangsmaterial bildeten zwei Wochen alte Erbsenpflänzchen in Töpfen. Wir teilten die Pflanzen in zwei verschiedene Serien ein; diejenigen der ersten wurden vollständig entblättert und entknospt, nur der grüne Stengel blieb stehen. Im Laufe des Versuches sich neu entwickelnde Knospen entfernten wir fortlaufend. Die der zweiten Serie dagegen wurden ungefähr 1 cm über dem Erdboden abgeschnitten, so daß die Wurzel nur noch mit diesem kleinen grünen Stumpf in Verbindung war. Gleich zu Beginn ermittelten wir den Gehalt an Pantothenensäure in den Wurzeln und darauf im Abstände von je einer Woche wieder. Für die genauen Werte verweisen wir auf Tabelle XXXVI. In Figur 6 ist das Verhalten der Wurzeln der beiden Versuchsreihen graphisch aufgetragen.

In den Wurzeln der Pflanzen ohne Knospen und Blätter ist zunächst eine ziemliche Erhöhung des Gehaltes an Pantothenensäure festzustellen, worauf die nachweisbare Vitaminmenge wieder auf ihren ursprünglichen Wert zurückgeht. Eine Abnahme tritt erst bei sieben Wochen alten Pflanzen ein. Dieses Verhalten entspricht also dem *in vivo* gewachsener, intakter Pflanzen.

TABELLE XXXVI

Pantothensäuregehalt der Pisumwurzel in vivo

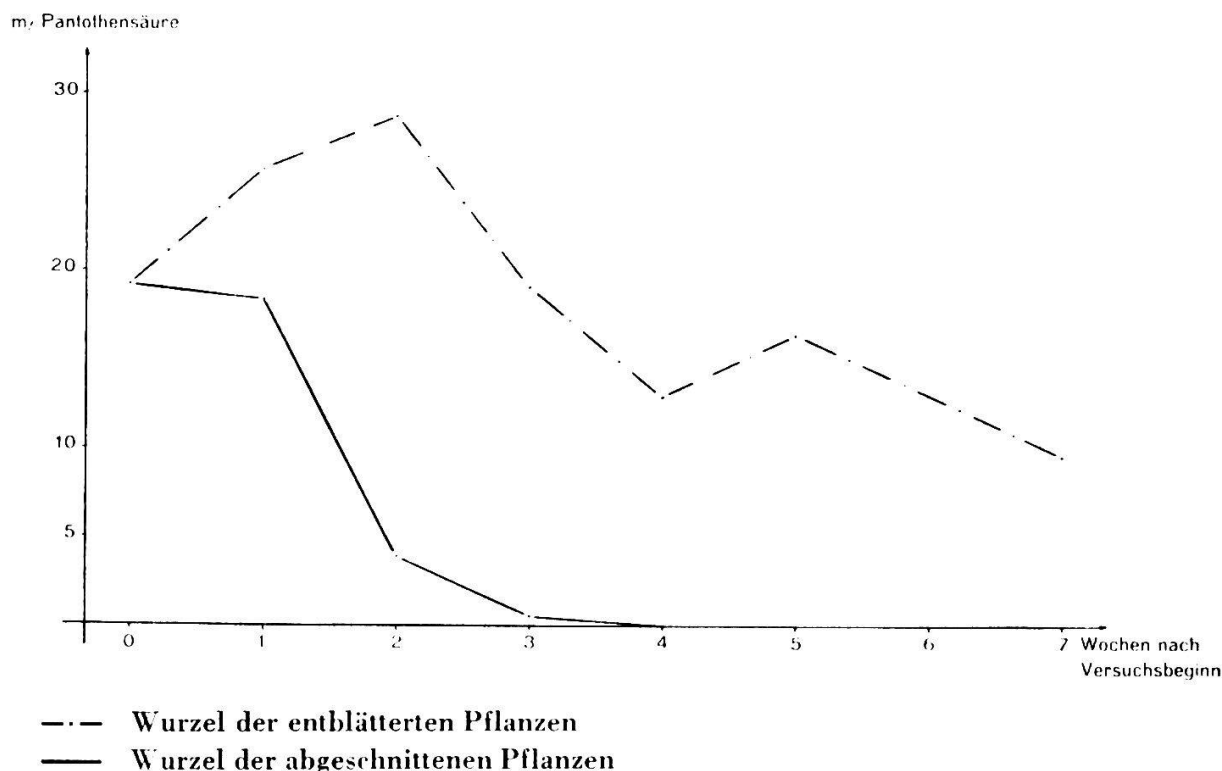
Alter der Pflanzen	Stengel der entblätterten Pflanzen	Wurzel der entblätterten Pflanzen	Wurzel der abgeschnittenen Pflanzen
13 Tage	Pflanzen entblättert und entknospt bzw. 1 cm über der Erde abgeschn.		
14 ..	—	19,3 *	19,3 *
21 ..	13,0 *	25,8	18,4
28 ..	12,1	28,8	3,9
35 ..	10,8	19,1	0,6
42 ..	5,2	12,9	0,0
49 ..	7,1	16,4	—
65 ..	8,7	9,6	—

* mγ/mg Trockengewicht

Interessant ist dagegen das Ergebnis mit den Wurzeln der abgeschnittenen Pflanzen. Hier tritt keine Erhöhung des Vitamingehaltes ein, vielmehr erfolgt ein rasches Absinken des Pantothensäuregehaltes. Zwei Wochen nach Versuchsbeginn findet man nur noch rund einen Fünftel des Anfangsgehaltes. In einem solchen Experiment ist es natürlich unerläßlich, nur Wurzeln zu verwenden, die noch leben und deren kleiner oberirdischer Teil noch grün ist. Das setzt der zeitlichen Dauer der Untersuchung aber eine Grenze. Da jedoch die Abnahme rasch einsetzt, läßt sich der Versuch vor dem auf Mangel an Versorgung mit Assimilaten beruhenden Absterben der Wurzel abschließen. Die von ihren oberirdischen, grünen Teilen getrennte Wurzel der untersuchten Erbsensorte verhält sich *in vivo* gleich wie in isolierter Organkultur: sie ist nicht in der Lage, Pantothensäure zu bilden.

f) Verteilung der Pantothensäure in den einzelnen Teilen der Erbsenpflanze während deren Entwicklung

Zum Abschluß der Untersuchungen über die Pantothensäure verfolgten wir den Stoffwechsel dieses Vitamins in der ganzen Pflanze *in vivo* während einer vollständigen Vegetationsperiode. Wie es bereits HURNI

Pantothensäuregehalt der Pisumwurzel in vivo

Figur 6

(72) getan, so beschränkten wir uns nicht nur darauf, den Pantothensäuregehalt der ganzen Pflanze zu ermitteln, sondern trachteten danach, den Stoffwechsel der Pantothensäure in den einzelnen Teilen des Organismus zu erfassen; daher führten wir zahlreiche Bestimmungen in Wurzeln, Kotyledonen, Stengel, Blättern verschiedenen Alters, Blüten und Samen durch. Die Erbsen wuchsen wir im vorigen Experiment in Töpfen im Freien in einer Mischung aus Sand und Gartenerde. Zu Beginn des Versuches erfolgten die Analysen alle Wochen, später in größer werdenden Zeitabständen. Ungefähr 50 Tage nach der Aussaat standen die Pflanzen in Blüte, und nach 100 Tagen konnten wir reife Samen ernten.

Überblicken wir die Ergebnisse der einzelnen Analysen, so lassen sich folgende Feststellungen machen (für die genauen Werte verweisen wir auf die ausführliche Tabelle XXXVII):

In den Kotyledonen ungekeimter Samen stellten wir 12,5 mγ Pantothensäure pro mg Trockengewicht fest. Nach einer Woche ist der Gehalt auf weniger als einen Drittel dieses Wertes gesunken. Ein Vergleich der aus diesen Werten errechneten Mengen, die auf ein Kotyledonenpaar entfallen, zeigt, daß ein beträchtlicher Teil der Pantothensäure aus den

TABELLE XXXVII

Verteilung der Pantothensäure in der Pisumpflanze im Laufe ihrer Entwicklung

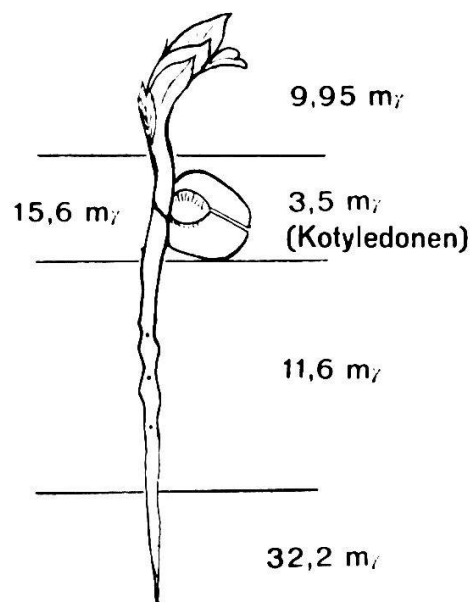
Alter	m γ Pantothensäure pro mg Trockengewicht									
	Embryo	Wurzel Spitze	Wurzel Rest	Kotyledonen *)	Untersster Teil des Stengels	Blätter + Stengelteile jüngste ——— älteste		An der Pflanze vergilbte Blätter	Blüten	Samen (ganz)
Ungekeimt	19,3			12,5						17,5
7 Tage		32,2	11,6	3,5	15,5	9,95				
14 "		29,3	13,4	29,6	8,7	10,1	15,3			
21 "		16,7	12,9	52,2	6,7	11,2	11,8 11,3 11,2			
29 "		13,6	13,3	8,0	5,0	5,6				
39 "		12,5	14,0	0,0	4,5	4,3	10,7 5,6	10,5		
50 "			12,2		5,6	6,7	5,2 7,3	6,4	6,2	
65 "			10,5			6,6	5,6		8,9	9,9
80 "			2,8			2,4				9,4
100 "			0,0			0,0				9,0

* K o t y l e d o n e n :

Ungekeimt	1512,5 m γ Pantothensäure/Kotyledonenpaar
7 Tage	302,9 m γ Pantothensäure/Kotyledonenpaar
14 Tage	307,8 m γ Pantothensäure/Kotyledonenpaar
21 Tage	417,6 m γ Pantothensäure/Kotyledonenpaar
29 Tage	15,2 m γ Pantothensäure/Kotyledonenpaar
39 Tage	0,0 m γ Pantothensäure/Kotyledonenpaar

Kotyledonen verschwunden ist (siehe Tabelle XXXVII unten). Im weiteren Verlaufe der Entwicklung steigt die pro mg Trockengewicht ermittelte Vitaminmenge ziemlich an, um mit zunehmender Entleerung der Keimblätter wieder abzufallen. Nach ungefähr 40 Tagen ist keine Pantothenensäure mehr nachzuweisen. Der vorübergehende Anstieg findet seine Erklärung wohl darin, daß andere Substanzen, die in den Keimblättern enthalten sind, rascher daraus fortgeschafft werden, die Trockensubstanz nimmt ab bei ziemlich gleichbleibendem Pantothenensäuregehalt; folglich entfallen auf 1 mg Trockengewicht mehr $m\gamma$ Pantothenensäure als vorher.

Bei den Wurzeln ermittelten wir in den fünf ersten Analysen die Pantothenensäure getrennt nach Wurzelspitze und restlichem Teil, später nurmehr für die ganze Wurzel. Es ergab sich nämlich, daß in den ersten Wochen die Spitze eine bedeutend höhere Pantothenensäuremenge aufwies als der übrige Teil, eine Tatsache, die wir schon an isoliert wachsenden Wurzeln feststellen konnten. Nach ungefähr vier Wochen glich sich dieser Unterschied aber vollständig aus, so daß sich eine getrennte Bestimmung erübrigte. Der für die Wurzel ermittelte durchschnittliche Gehalt an Pantothenensäure sinkt im Laufe der Entwicklung ab; er macht zur Zeit der Blüte noch etwa die Hälfte des Anfangswertes aus. Sobald die Pflanze Früchte gebildet hat und langsam vergilbt, schwindet die nachweisbare Quantität an Pantothenensäure rasch, und wenn die Samen reif sind, werden die Wurzeln pantothenensäurefrei.



Figur 7

Verteilung der Pantothenensäure in der 7 Tage alten Pflanze

Die Verteilung der Pantothensäure in den Blättern und im Stengel ließ folgende Besonderheit erkennen: im Gegensatz zu der von HURNI (72) gemachten Beobachtung, daß bei *Melandrium album* der Gehalt an Aneurin von den jüngsten zu den ältesten Blättern mehr oder weniger regelmäßig abnimmt, stellten wir bei unseren Versuchspflanzen für die Pantothensäure fest, daß eine derartige Regelmäßigkeit vollkommen fehlt. Der größte Gehalt tritt in den einzelnen Analysen ganz unregelmäßig an verschiedenen Stellen auf. Vergilbte Blätter, die noch an der Pflanze sich befinden, enthalten ebensoviel Pantothensäure wie die grünen.

TABELLE XXXVIII

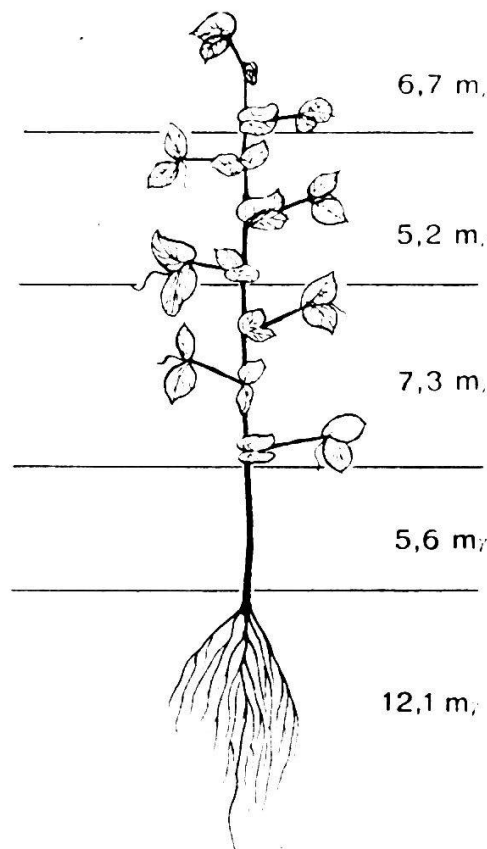
Verteilung der Pantothensäure in Wurzel und Sproß in vivo

Alter der Pflanzen	Mittlerer Pantothensäuregehalt in $\mu\gamma$ pro mg Trockengewicht	
	Wurzel	Sproß
7 Tage	21,9	12,7
14 „	21,4	11,3
21 „	14,8	10,4
29 „	13,5	5,3
39 „	13,3	7,1
50 „	12,1	6,2
65 „	10,5	7,2
80 „	2,8	2,4
100 „	0,0	0,0

Ermitteln wir für jede Bestimmung den durchschnittlichen Pantothensäuregehalt in den Blättern und im Stengel, so kann man mit fortschreitender Entwicklung ein langsames Absinken beobachten. Mit dem Absterben der Pflanzen am Ende der Vegetationsperiode schwindet die Pantothensäure vollständig aus dem Sproßteil (vgl. Tabelle XXXVIII).

In den Blüten finden wir ähnliche Mengen Pantothensäure wie in den Blättern; junge, noch grüne Samen enthalten etwas mehr Pantothensäure als ältere, die schon gelb geworden sind. Die zur Aussaat verwendeten Samen besitzen pro mg Trockengewicht etwa das Doppelte an Pantothensäure wie die von uns geernteten. Möglicherweise beruht dieser Unterschied auf gewissen Stoffwechselfvorgängen, die sich während der Lagerung abspielen.

Ganz allgemein zeigten die Untersuchungen, daß die Wurzel und in den ersten Wochen des Wachstums vor allem die Wurzelspitze reicher ist an Pantothenensäure als der oberirdische, grüne Teil der Pflanze. In diesem ist die Verteilung mehr oder weniger gleichmäßig: der Vegetationspunkt und die jüngsten Blätter enthalten nicht mehr Pantothenensäure als die ältesten, bereits vergilbenden Blätter. Mit zunehmendem Alter der Pflanzen sinkt der Pantothenensäuregehalt langsam ab, und sobald die Entwicklung ihrem Ende entgegengeht, die Samen am Ausreifen sind, schwindet sie aus Wurzel und Sproßteil (mit Ausnahme der Samen) vollständig.



Figur 8

Verteilung der Pantothenensäure in 50 Tage alten Pflanzen

V. Diskussion und Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit versuchten wir, den Stoffwechsel einiger Vitamine der B-Gruppe während der Keimung (*Phaseolus*) und vor allem bei isolierten Wurzeln (*Pisum*) in steriler Organkultur zu verfolgen.

Keimende Samen von *Phaseolus* (Sorte «Rapid») verhalten sich in bezug auf den Stoffwechsel des Aneurins und des Biotins ganz unterschiedlich. Während der Aneurin Gehalt am Licht in Wasser oder in Knopscher Nährlösung in den Keimlingen zuerst einen leichten Abfall aufweist, der später wieder ausgeglichen wird, nimmt parallel dazu der Gehalt an Biotin sprunghaft enorm zu und vermindert sich dann mit fortschreitender Entwicklung etwas. Wenn wir berücksichtigen, daß der starke Anstieg mit dem Durchstoßen der Keimwurzeln durch die Samenschale zusammenfällt, so erscheint die Vermutung, daß diese Zunahme auf eine Biotinbildung durch die Wurzel zurückzuführen ist, nicht unwahrscheinlich, zumal da nach Hydrolyse ungekeimte Samen keinen höheren Biotinwert geben. Diese Annahme fand in der Folge eine Bestätigung bei isolierten Wurzeln in Organkultur. In den Kotyledonen bleibt die nachweisbare Aneurinmenge ziemlich konstant, der Biotin Gehalt erhöht sich dagegen mit zunehmender Entwicklung deutlich.

Über den Bedarf an Wirkstoffen von isoliert wachsenden Wurzeln in Organkultur haben uns zahlreiche Arbeiten vieler Forscher Einblick gegeben. Unseres Erachtens kommt aber den Kenntnissen über das Synthesevermögen für Wirkstoffe durch die Wurzel, sein Vorhandensein oder Fehlen, seine Intensität, eine ebenso große Bedeutung zu, geben sie uns doch wertvolle Hinweise auf die Beziehungen zwischen Sproß und Wurzel an der intakten Pflanze. So versuchten wir, an bereits Vorhandenes anknüpfend, einige neue Gesichtspunkte aufzudecken.

Es ist bekannt, daß die Wurzel von *Pisum* die Fähigkeit, das Aneurin zu bilden, nicht besitzt. Ohne diesen Wirkstoff im Kulturmilieu geht sie nach einiger Zeit zugrunde, sobald das in der Wurzel selbst vorhandene Aneurin verbraucht worden ist. Aneurin ist also essentieller Wachstumsfaktor, kann aber durch eine Mischung von Pyrimidin + Thiazol vollständig ersetzt werden. Die Wurzel ist noch in der Lage, Pyrimidin und Thiazol zum Aneurinmolekül zusammenzubauen. Pyrimidin oder Thiazol allein sind nicht

imstande, das Wachstum aufrechtzuerhalten. BONNER und BUCHMANN (78) stellten fest, daß isolierte *Pisum*wurzeln in Gegenwart von Pyrimidin + Vorstufen des Thiazols genau so gut sich entwickeln wie mit Aneurin. Diesen Befund konnten wir nicht bestätigen: Zusatz der Vorstufen des Thiazols (Thioformamid und Chloracetopropanol) in normaler und zehnfacher Konzentration zum Pyrimidin bewirkt kein dauerndes Wachstum der Wurzeln; nach einiger Zeit starben sie ab, gleich wie die ohne Aneurin. Dieses gegensätzliche Ergebnis soll aber die Beobachtungen von BONNER und BUCHMANN nicht unbedingt als unrichtig hinstellen, denn möglicherweise kann dieser Unterschied auf verschiedener Synthesefähigkeit des Versuchsmaterials beruhen, weil gerade in letzter Zeit Fälle bekannt geworden sind, wo sich verschiedene Sorten einer Art in ihrem Synthesevermögen nicht unwesentlich unterscheiden.

Die Synthese des Biotins durch die Wurzel hält auch nach 150 Tagen unvermindert an; ein beträchtlicher Teil des produzierten Biotins wird ins Milieu ausgeschieden. Enthält die Kulturlösung zusätzlich noch Nicotinsäureamid, so kann man, obschon dieses Vitamin von der Wurzel nicht unbedingt verlangt wird, eine günstige Wirkung auf die ganze Entwicklung und auf die Biosynthese des Biotins beobachten. Das Nicotinsäureamid darf somit, wenigstens für die untersuchte Sorte von *Pisum*, als Zusatzfaktor betrachtet werden. Was die Biotinsynthese selbst betrifft, so scheint die *Pisum*wurzel, nach den Ergebnissen zu schließen, weitgehend autonom zu sein. Immerhin ist es nicht ausgeschlossen, daß an der intakten Pflanze durch das Blatt der Vitaminhaushalt der Wurzel doch beeinflußt wird. Versuche in dieser Richtung führten zum Resultat, daß Blattextrakte, denen die hochmolekularen, kolloidaldispersen, proteischen Substanzen durch bestimmte Operationen (Hitze, Chemikalien, Filtration) entzogen wurden, keine oder nur eine geringe Wirkung auf die Biotinbildung durch die Wurzel ausübten. Dagegen wirkten solche Extrakte, die den Zellinhalt vollständig und in noch möglichst unveränderter Form enthielten, deutlich fördernd. Wir glauben annehmen zu dürfen, daß eine derartige Beeinflussung der Synthese eines Vitamins durch Substanzen des Blattes, sei es nun im fördernden oder unter Umständen im hemmenden Sinne, auch für andere Wirkstoffe wahrscheinlich ist.

In diesem Zusammenhang sei auf die Beobachtung aufmerksam gemacht, daß ein mittels eines bakteriologischen Filters sterilisierter Blattextrakt in größeren Quantitäten stark wachstumshemmend auf *Saccharomyces cerevisiae* wirkt. Beim Erhitzen dieses Filtrates entsteht ein geringer Niederschlag; die überstehende Lösung zeigt jetzt keine wachstumshemmende Wirkung mehr. Der oder die hemmenden Stoffe dürften daher in dem durch die nachträgliche Hitzebehandlung entstandenen Niederschlag zu finden sein. Über die Natur dieser fraglichen Substanzen ist uns aber nichts Näheres bekannt. Ob die Extrakte im Turmix oder in einer Kugelmühle aus Porzellan bereitet werden, hat keinen Einfluß auf die Intensität der Hemmung, so daß eine Wirkung von metallischen Verunreinigungen wahrscheinlich nicht in Frage kommt.

Die Nicotinsäure nimmt eine Doppelstellung ein; sie wird von der Wurzel in nachweisbarer Menge gebildet und zum Teil ins Kulturmilieu abgegeben, vielleicht durch absterbende Zellen, wirkt aber auch auf die untersuchte *Pisum* wurzel als Zusatzfaktor. Offenbar reicht die durch die Wurzel produzierte Quantität an Nicotinsäure aus, um ihren Eigenbedarf zu decken, doch bewirkt ein Zusatz dieses Vitamins eine Förderung der gesamten Entwicklung sowie der Biosynthese des Biotins (vgl. oben).

Lactoflavin und Adermin werden ebenfalls durch die Wurzel gebildet. Zum Unterschied von Nicotinsäure und Biotin findet aber keine Ausscheidung ins Kulturmilieu statt. Beide Wirkstoffe werden nicht als exogene Wachstumsfaktoren verlangt. Die durch die Wurzel synthetisierte Menge reicht zu normaler Entwicklung aus.

Etwas verschieden sind hingegen die Verhältnisse bei der Pantothenensäure: die zur Kultur verwendeten Wurzelspitzen sind reich an diesem Wirkstoff, doch schon nach ein paar Tagen Wachstum sinkt die vorhandene Vitaminmenge, und nach 1—2 Passagen läßt sich im mikrobiologischen Test überhaupt keine Pantothenensäure mehr feststellen. Ferner zeigt eine Analyse der einzelnen Teile der Wurzel, daß die Spitze am meisten Pantothenensäure enthält und der Gehalt nach hinten zu abnimmt. Die Versuche, das Verschwinden der Pantothenensäure mit ihrem Einbau in ein Konjugat oder mit einem Abbau in ihre beiden Komponenten in Ein-

klang zu bringen, blieben erfolglos. Nach fermentativem Abbau ist die nachweisbare Quantität an Pantothersäure nicht größer geworden; dabei prüften wir nicht nur Material von Wurzelkulturen, sondern auch Teile *in vivo* gewachsener Pflanzen verschiedenen Alters. In pantothersäurefrei gewordenen Wurzelkulturen ist kein β -Alanin zu finden und saure Hydrolyse läßt den β -Alaningehalt nicht ansteigen. Eine Ausscheidung von nachweisbarer Pantothersäure in die Kulturlösung wurde nie beobachtet.

Die Verteilung der Pantothersäure in der ganzen Pflanze *in vivo* ist mehr oder weniger regelmäßig; die jüngsten Teile des Sprosses sind nicht, wie es beispielsweise für das Aneurin der Fall ist (HURNI), am reichsten. Die ältesten Blätter können ebensoviel enthalten wie der Vegetationspunkt. Eine Ausnahme macht, wenigstens in den ersten paar Wochen der Entwicklung, die Wurzelspitze: sie ist das Organ mit dem höchsten Pantothersäuregehalt; später aber gleicht sich dieser Unterschied völlig aus. Während dieser ersten Zeit ist in der Wurzel, genau wie bei den *in vitro*-Versuchen, ein deutlicher Gradient von der Spitze zur Basis erkennbar. Mit zunehmender Entwicklung nimmt der Pantothersäuregehalt allgemein ab und im Augenblick der Samenreife sind Wurzel und Sproß pantothersäurefrei. Nur in den Samen finden wir in diesem Zeitpunkt noch eine gewisse Menge davon. HUNT, RODRIGUEZ und BETHKE (112) untersuchten den Einfluß der Reife auf den Pantothersäuregehalt verschiedener Maisvarietäten und stellten fest, daß er in den Blättern in den einzelnen Analysen unregelmäßig variierte, was mit unseren Befunden an *Pisum* gut in Einklang steht.

Wir kommen zum Schluß, daß die isolierte Wurzel von *Pisum* (Maikönigin) die Fähigkeit, Pantothersäure zu bilden, nicht besitzt, dieses Vitamin aber, wie Versuche mit Zusätzen von Pantothersäure zeigten, auch nicht als exogenen Wachstumsfaktor verlangt. *In vivo* wird ihr dieser Wirkstoff vom Sproßteil zugeführt: schneidet man den Sproß bei *Pisum*-pflanzen wenig über dem Boden ab, so tritt innerhalb kurzer Zeit eine starke Verminderung des Pantothersäuregehaltes der Wurzel ein; sie wird bald pantothersäurefrei.

Die vorübergehende Anhäufung der Pantothensäure in der Wurzelspitze beruht wohl auf einfachem Transport dieses Wirkstoffes dorthin beim Keimen des Samens. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Anwesenheit einer größeren Menge Pantothensäure und der meristematischen Tätigkeit besteht vermutlich nicht, da diese auch noch anhält, wenn der Gehalt an Pantothensäure längst zurückgegangen ist; ferner ist im Sproßvegetationspunkt nie eine Anhäufung von Pantothensäure festgestellt worden, auch bei ganz jungen Pflanzen nicht.

Die Frage, ob das Verschwinden der Pantothensäure im Laufe der Kultur mit der Bildung von Konjugaten oder mit ihrem Abbau in Zusammenhang steht, läßt sich nicht sicher beantworten, da sich die Bestimmungsmethode für das β -Alanin als nicht einwandfrei erwiesen hat. Immerhin scheinen die erhaltenen Resultate für einen weitgehenden Abbau zu sprechen.

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1948 bis 1951 im Botanischen Institut Bern auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. H. Schopfer ausgeführt. Meinem verehrten Lehrer möchte ich an dieser Stelle den verbindlichsten Dank aussprechen für alle Hilfe und das ständige Interesse, das er meinen Arbeiten entgegenbrachte.

Herrn Nyffeler, Gärtner im Botanischen Institut, danke ich für die sorgfältige Betreuung meiner Topfkulturen.

VI. Literaturverzeichnis

1. D. D. Woods und P. Fildes: *Chem. and Ind.* 59, 133, 1940
2. D. D. Woods: *Brit. J. Exp. Path.* 21, 38, 1940
3. Kuhn und Schwarz: *Ber. D. chem. Ges.* 74, 1617, 1941
4. D. D. Woods: *Brit. J. Exp. Path.* 21, 74, 1940
5. W. H. Schopfer und M. Guilloud: *Helv. Physiol. Acta* 4, C 24, 1946
6. W. H. Schopfer: *Experientia* 2, 188, 1946
7. W. H. Schopfer: *Bull. Soc. Chim. Biol.* 30, 748, 1948
8. W. Shive und E. C. Roberts: *J. Biol. Chem.* 162, 463, 1946
9. J. Fourneau et al.: *C. r. Soc. Biol.* 122, 652, 1936
10. G. Mangelot und S. Carpentier: *C. r. Soc. Biol.* 135, 1053, 1057, 1152, 1941
11. S. Wiedling: *Naturwiss.* 31, 114, 1943
12. Stoll: *C. r. Soc. Biol.* 137, 170, 1943
13. Hazard: *C. r. Soc. Biol.* 138, 972, 1944
14. D. Macht: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 60, 217, 1945
15. W. H. Schopfer und M. Guilloud: *Verh. Schweiz. Nat. Ges.* 143, 1946
16. J. Bonner: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 28, 321, 1942
17. W. Anker: *Diss. Bern, Mitt. Nat. Ges.* 8, 55, 1951
18. M. L. Bein: *Diss. Bern, Arnaud - Druck Bern* 1951
19. M. Bein, R. Signer und W. H. Schopfer: *Experientia* 3, 291, 1947
20. R. E. Slade: *Chem. and Ind.* 64, 314, 1945
21. S. Kirkwood und P. H. Phillips: *J. Biol. Chem.* 163, 251, 1946
22. H. W. Buston, S. E. Jacobs und A. Goldstein: *Nature* 158, 22, 1946
23. W. H. Schopfer, Th. Posternak und Mlle Boss: *Schweiz. Z. Path. Bakt.* 10, 443, 1947
24. Mme P. Chaix, Mlle L. Lacroix und P. Fromageot: *Biochim. et Biophys. Acta* 2, 37, 1948
25. Mme P. Chaix und Mlle L. Lacroix: *Biochim. et Biophys. Acta* 2, 86, 1948
26. G. W. van Vloten, Ch. A. Kruissnik, B. Strijk und J. M. Bijvoet: *Nature* 162, 771, 1948
27. O. Bastiansen, O. Ellefsen und O. Hassel: *Acta Chim. Scand.* 3, 918, 1949
28. W. H. Schopfer und M. Guilloud: *Z. Vitaminf.* 16, 181, 1945
29. H. Dam, J. Glavind und E. K. Gabrielsen: *Acta Physiol. Scand.* 13, 9, 1947
30. W. H. Schopfer und M. L. Boss: *Arch. Sciences, Genève* 1, 521, 1948
31. H. Gaffron: *J. Gen. Physiol.* 28, 259, 1945
32. W. H. Schopfer und E. C. Grob: *Arch. Sciences, Genève* 2, 577, 1949
33. W. H. Schopfer und E. C. Grob: *Arch. Sciences, Genève* 2, 575, 1949
34. W. H. Schopfer: *Colloque intern. sur la morphogenèse, Strasbourg 1949; Proc. Intern. Congr. Crop Protection, London 1949; Riforma medica* No. 16—17, 1951
35. G. Haberlandt: *Sitz. Ber. Akad. Wiss., Wien* 111, 96, 1902
36. W. Kotte: *Ber. Dtsche. Bot. Ges.* 40, 269, 1922

37. W. J. Robbins: *Bot. Gaz.* 73, 376, 1922
38. P. R. White: *Plant Physiol.* 9, 585, 1934
39. R. J. Gautheret: *C. r. Acad. Sci.* 198, 2195, 1934
40. R. J. Gautheret: *C. r. Acad. Sci.* 208, 118, 1939
41. W. H. Schopfer: *Arch. Mikrobiol.* 5, 513, 1934
42. W. J. Robbins und M. A. Bartley: *Science* 85, 246, 1937
43. J. Bonner: *Science* 85, 183, 1937
44. P. R. White: *Plant Physiol.* 12, 803, 1937
45. G. Morel und R. H. Wetmore: *Amer. J. Bot.* 38, 138, 1951
46. J. Bonner: *Amer. J. Bot.* 27, 692, 1940
47. J. Bonner und P. S. Devirian: *Amer. J. Bot.* 26, 661, 1939
48. W. J. Robbins und M. B. Schmidt: *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* 25, 1, 1938
49. P. R. White: *Amer. J. Bot.* 27, 811, 1940
50. J. Bonner: *Amer. J. Bot.* 25, 543, 1938
51. J. Bonner: *Plant Physiol.* 15, 553, 1940
52. M. A. Roulet: *Diss. Bern, Imprimerie des Remparts, Yverdon* 1950
53. R. J. Gautheret: *Manuel technique de la culture des tissus végétaux - Masson, Paris* 1942
54. W. H. Schopfer: *Bull. Soc. Chim. Biol.* 17, 1097, 1935
55. W. H. Schopfer und A. Jung: *C. r. 5ème Congr. intern. technique et chimique des industr. agric., p. 22.* 1936
56. E. E. Snell und F. M. Strong: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 11, 346, 1939
57. E. E. Snell und F. M. Strong: *Univ. Texas Publication, Nr. 4137, 11—13,* 1941
58. J. L. Stokes, A. Larsen, C. R. Woodward und J. W. Forster: *J. Biol. Chem.* 150, 17, 1943
59. E. E. Snell und L. D. Wright: *J. Biol. Chem.* 139, 675, 1941
60. E. E. Snell, R. E. Eakin und R. J. Williams: *J. Amer. Chem. Soc.* 62, 175, 1940
61. H. R. Skeggs und L. D. Wright: *J. Biol. Chem.* 156, 21, 1944
62. W. H. Schopfer: *Erg. Biol.* 16, 1, 1939
63. J. Bonner: *Amer. J. Bot.* 29, 136, 1942
64. B. R. Cravioto et al.: *J. Nutrition* 29, 317, 1945
65. J. McVeigh: *Bull. Torrey Bot. Club* 71, 438, 1944
66. J. J. C. Hinton: *J. Soc. Chem. Ind.* 61, 143, 1942
67. J. J. C. Hinton: *Biochem. J.* 38, 214, 1944
68. W. H. Schopfer: *C. r. Soc. phys. hist. nat. Genève* 51, 29, 1934
69. F. Lipmann: *Enzymologia* 4, 65, 1937
70. R. R. Williams und T. D. Spies: *The MacMillan Company, New York,* 331, 1939
71. W. Rytz: *Ber. Schw. Bot. Ges.* 49, 339, 1939
72. H. Hurni: *Z. Vitaminf.* 15, 198, 1944
73. J. Bonner und J. Greene: *Bot. Gaz.* 100, 226, 1938
74. F. Kögl und A. J. Haagen Smit: *Z. physiol. Chem.* 243, 209, 1935
75. F. T. Addicott und P. S. Devirian: *Amer. J. Bot.* 26, 667, 1939
76. F. T. Addicott: *Bot. Gaz.* 100, 836, 1939
77. J. Bonner und F. T. Addicott: *Bot. Gaz.* 99, 144, 1938
78. J. Bonner und E. R. Buchmann: *Proc. Nat. Acad. Sc. Washington* 24, 431, 1938
79. W. J. Robbins und M. A. Bartley-Schmidt: *Bot. Gaz.* 99, 671, 1938

80. W. H. Schopfer: *Z. Vitaminf.* 14, 42, 1943
81. R. Louis: *Experientia* 6, 145, 1950
82. W. H. Schopfer und M. L. Boss: *Helv. Physiol. Acta* 7, C 22, 1949
83. W. H. Schopfer und M. L. Boss: *Arch. Sciences, Genève* 2, 571, 1949
84. F. T. Addicott und J. Bonner: *Science* 88, 577, 1938
85. W. H. Schopfer und R. Louis: *Arch. Sciences, Genève* 3, 446, 1950
86. A. Guilliermond: *Rev. de Mycol.* 1, 115, 1936
87. W. H. Schopfer: *C. r. Soc. phys. hist. nat. Genève, T.* 58, 1941
88. J. Bonner: *Bot. Gaz.* 103, 581, 1942
89. E. F. Möller: *Z. physiol. Chem.* 254, 285, 1938
90. R. E. Eakin und R. J. Williams: *J. Amer. chem. Soc.* 61, 1932, 1939
91. E. C. Minnum: *Bot. Gaz.* 103, 397, 1942
92. R. J. Williams: *J. Amer. chem. Soc.* 61, 454, 1939
93. R. J. Williams: *J. Amer. chem. Soc.* 62, 1784, 1940
94. F. Lipmann et al.: *J. Biol. Chem.* 160, 173, 1945
95. F. Lipmann et al.: *Feder. Proc.* 4, 97, 1945
96. F. Lipmann et al.: *J. Biol. Chem.* 167, 869, 1947
97. F. Lipmann und N. O. Kaplan: *J. Biol. Chem.* 162, 743, 1946
98. F. Lipmann und N. O. Kaplan: *Feder. Proc.* 6, 266, 1947
99. M. Soodak und F. Lipmann: *J. Biol. Chem.* 175, 999, 1948
100. F. Lipmann et al.: *J. Biol. Chem.* 186, 235, 1950
101. V. H. Cheldelin et al.: *Univ. Texas Publ.* 4237, 15, 1942
102. A. L. Neal und F. M. Strong: *J. Amer. Chem. Soc.* 65, 1659, 1943
103. L. D. Wright: *J. Biol. Chem.* 147, 261, 1943
104. T. E. King, L. M. Locher und V. H. Cheldelin: *Arch. Biochem.* 17, 483, 1948
105. W. L. Williams, E. Hoff-Jørgensen und E. E. Snell: *J. Biol. Chem.* 177, 933, 1949
106. R. A. McRorie, P. M. Mosley und W. L. Williams: *Arch. Biochem.* 27, 471, 1950
107. G. M. Brown, J. A. Craig und E. E. Snell: *Arch. Biochem.* 27, 473, 1950
108. T. E. King und F. M. Strong: *J. Biol. Chem.* 189, 325, 1951
109. E. C. Barton-Wright: *Practical Methods . . .*, Ashe Laboratories Ltd., London
110. Schenk und du Vigneaud: *J. Biol. Chem.* 153, 504, 1944
111. H. P. Sarett und V. H. Cheldelin: *J. Bact.* 49, 31, 1945
112. Ch. H. Hunt, L. D. Rodriguez und R. M. Bethke: *Cereal Chem.* 27, 157, 1950

Inhaltsverzeichnis

I. Allgemeine Einleitung	1
II. Organkultur und Gewebekultur	7
III. Technik, Testmethoden	10
IV. Experimenteller Teil	13
A. Untersuchungen an Phaseoluspflanzen und -keimlingen	13
1. Einleitung	13
2. Der Aneurin Gehalt im Verlaufe der Keimung	13
3. Der Biotin Gehalt während der Keimung	16
B. Untersuchungen an <i>Pisum sativum</i> (Wurzelkulturen, ganze Pflanze)	20
1. Einleitung	20
2. Der Aneurinstoffwechsel	20
3. Der Biotinstoffwechsel	26
4. Der Einfluß von Pisumblattextrakten auf die Biosynthese des Biotins in der isoliert wachsenden Wurzel von <i>Pisum</i>	28
5. Der Nicotinsäurestoffwechsel	34
6. Der Lactoflavinstoffwechsel	37
7. Der Aderminstoffwechsel	39
8. Der Pantothersäurestoffwechsel	41
a) Einleitung	41
b) Pantothersäurestoffwechsel im Laufe einiger Überimpfungen	42
c) Wirkung von Pantothersäurezugaben	46
d) Fermentative Abbauprobungen	49
e) Pantothersäurestoffwechsel der Wurzel <i>in vivo</i>	52
f) Verteilung der Pantothersäure in den einzelnen Teilen der Erbsen- pflanze während deren Entwicklung	54
V. Diskussion und Zusammenfassung	60
VI. Literaturverzeichnis	65