von Hultin⁶² sprechen für die Bedeutung des Calciums als Aktivator enzymatischer Prozesse, die (allerdings im Seeigelei) mit der Atmung und der anaeroben Säurebildung zu tun haben. Connors und Scheer⁶³ fanden, daß Calciumionen die Adenosintriphosphatase aktivieren, deren Substrat nach Wicklund⁵⁴ auf Seeigelspermien aktivierend wirkt.

⁶² T. Hultin, Ark. Kemi Mineral. Geol. 26 A, Nr. 27 [1949].

⁶³ W. M. Connors u. B. T. Scheer, J. cellular comparat. Physiol. 30, 271 [1947].

Die vorliegende Arbeit wurde durch die großzügige Unterstützung der Rockefeller Foundation und die umfassenden Arbeitsmöglichkeiten der Stazione zoologica in Neapel ermöglicht.

Frl. M. Dohrn, Frau G. Dohrn und Frau R. Mislin danken wir für ihre Mithilfe bei der Ausführung der Tests; Hrn. Prof. L. Califano, Hrn. Dr. A. Monroy und Hrn. Dr. F. Ghiretti für zahlreiche Ratschläge; Frau Dr. I. Hausser sei für die Aufnahme von Absorptionsspektren gedankt, Hrn. Angelo Sessa für die Anfertigung der Mikrophotographien.

Über den Einfluß von 2.4-Dinitrophenol auf Atmung und Wachstum in vitro kultivierter Maiswurzeln

VON OTTO KANDLER

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

(Z. Naturforsch. 5b, 338—344 [1950]; eingegangen am 1. August 1950)

1. 2.4-Dinitrophenol bewirkt bei Karottengewebe eine Atmungssteigerung bis zu 120%. Als wirksam erweist sich nur die undissoziierte Molekel. Eine p_H -unabhängige Kurve für die Wirkung des 2.4-Dinitrophenol wird berechnet.

2. Von den 3 Mononitrophenolen ruft *p*-Nitrophenol starke Atmungssteigerung hervor, während die beiden anderen nur wenig wirksam sind. Ebenso erweisen sich 2.5- und 2.6-Dinitrophenol als unwirksam.

3. Bei Zusatz von 2.4-Dinitrophenol zum Nährboden in vitro kultivierter Maiswurzeln rufen schwache Konzentrationen neben der Atmungssteigerung auch eine Förderung des Längenwachstums hervor, die in den ersten Tagen der Kultur auch von vermehrter Substanzeinlagerung begleitet ist. Im Laufe der Kultur schlägt diese Förderung in eine Hemmung um, wobei diese nacheinander Stickstoffeinbau, Längenwachstum, Trockengewicht und schließlich auch Atmungsintensität erfaßt.

4. Die Differenzierungsbeschleunigung durch schwache Konzentrationen von Dinitrophenol, als deren Ausdruck das gesteigerte Längenwachstum und die vermehrte Nebenwurzelbildung gedeutet werden, kann durch die Annahme einer Entkoppelung von Dehydrierung und Phosphorylierung als alleinigen Wirkungsmechanismus des Dinitrophenol nicht erklärt werden.

Die Wirkung mehrerer Nitrophenole auf die Atmung verschiedenster Organismen war in den letzten 20 Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Ausgehend von Befunden Heymans stellten Cutting und Tainter¹ fest, daß verschiedene Nitrophenole bei Ratten, Mäusen und Schweinen starke Fieberanfälle hervorrufen. Dabei erwies sich 2.4-Dinitrophenol (2.4-DNP) als besonders wirksam. Bei Gaben von 5 bis 40 mg pro kg Lebendgewicht konnten Atmungssteigerungen bis auf das Zehnfache gemessen werden. Höhere Gaben wirkten letal. Aus der Fülle der vielfach parallel erscheinenden Arbeiten sollen hier nur einige mit be-

sonders wichtigen allgemeinen Ergebnissen angeführt werden.

So konnten Schulte und Tainter² zeigen, daß die DNP-Wirkung vollkommen reversibel ist. Selbst häufig wiederholte subletale Gaben von DNP riefen an den verschiedensten Geweben (Niere, Leber, Nerven) keine dauernden histologischen Veränderungen hervor. Damit fand das DNP Eingang in die medizinische Praxis, wo es als Mittel für Entfettungskuren Verwendung fand. Besonders deutlich konnten Clowes und Krah^{3, 4} die Reversibilität der DNP-Wirkung bei Seeigeleiern zeigen. Neben einer starken Atmungssteigerung beobachteten sie bei Zusatz

* Hrn. Prof. Dr. F. Lynen und Hrn. Dr. H. Holzer vom Chem. Institut der Universität München bin ich für zahlreiche Ratschläge und kritische Diskussionen zu vorliegender Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

¹ W. C. Cutting u. C. Tainter, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 29, 1268 [1932].

² L. Schulte u. C. Tainter, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 31, 1163 [1934].

³ H. G. Clowes u. M. E. Krah, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 33, 477 [1935].

⁴ H. G. Clowes u. M. E. Krah, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 34, 665 [1936].

geringer DNP-Konzentrationen eine Teilungshemmung. Nach Übertragung der Eier in reines Seewasser fiel die Atmung wieder auf den Normalwert und die Eier entwickelten sich ohne Störung weiter. Gleichsinnige Beobachtungen berichten die Autoren auch von tierischen Gewebekulturen⁵.

Field und Mitarbb.^{6,7} prüften den Einfluß von DNP auf Hefe und untersuchten besonders die Abhängigkeit der DNP-Wirkung vom p_H -Wert. Sie führten die stärkere Wirksamkeit im sauren Bereich darauf zurück, daß das DNP in diesem Falle weniger dissoziiert ist als im alkalischen Bereich und die Wirksamkeit von der Konzentration der undissoziierten Molekel abhängig ist. Der Vergleich verschieden substituierter Phenole ergab ungefähr gleiche Wirksamkeit von 2,4-DNP, 4,6-*o*-Kresol, 2,4-Naphthol, 2,4-Cyclohexyl-phenol, 2,4-Cyclopentyl-phenol. Alle diese Substanzen bewirkten eine Atmungssteigerung um 110% bis 150%.

Die ersten Erklärungsversuche der DNP-Wirkung fußten auf der Möglichkeit, das DNP als Redoxkörper zu betrachten, der ähnlich wie das Methylenblau die Sauerstoffübertragung beschleunigen könnte. Krahll und Clowes⁸ sowie Greville und Stern⁹ konnten durch ihre Arbeiten diese Ansicht widerlegen. Rozoni und Ehrenfest¹⁰ kamen auf Grund von Versuchen mit Froschmuskelfgewebe zu der Ansicht, daß das DNP nicht an einem Teilprozeß der Atmung, sondern in die Phosphorylierungsprozesse, die den Zusammenhang zwischen Dissimilation und Assimilation herstellen, eingreift. Sie nahmen an, daß die Phosphokreatinsäure und die damit im Gleichgewicht stehende Adenosintriphosphorsäure (ATP) beschleunigt gespalten werden, ohne daß die dabei freigesetzte Energie physiologisch sinnvoll verwertet werden kann. Da aber im normalen Stoffwechsel die Dephosphorylierungsprozesse die begrenzenden Reaktionen sind, ist bei einer Aktivierung derselben eine Atmungssteigerung leicht verständlich.

Hatten bereits die Arbeiten mit Seegeleiern^{3,4} die starke Hemmwirkung des DNP auf die Zellver-

mehrung gezeigt, so gelang Clifton¹¹ der Nachweis der Synthesehemmung bei der Veratmung von Essig- und Buttersäure durch *Bacterium coli*. Während normalerweise nur ein Teil dieser Stoffe veratmet, der Rest aber eingebaut wird, ergibt sich bei Zugabe von DNP eine restlose Veratmung dieser Stoffe. Reiner und Spiegelmann¹² konnten den gleichen Effekt bei der Veratmung von Glucose durch Hefe zeigen. In diesem Falle wird auch die bereits eingebaute Glucose wieder mobilisiert. Dies zeigt sich, wenn das DNP erst nach der normalen Veratmung der Glucose zugesetzt wird. Es ergibt sich dann ein erneuter Anstieg der Atmung, bis der für die zugesetzte Glucose theoretisch errechnete Sauerstoffverbrauch erreicht ist. Darin unterscheidet sich die DNP-Wirkung von der Azid-Wirkung. Azid vermag nämlich nur eine restlose Veratmung der Glucose zu bewirken, wenn es gleichzeitig mit dieser geboten wird. Nachträgliche Zugabe führt zu keiner Mobilisierung des eingebauten Anteils. Die Hemmung der Stickstoffassimilation konnten in neuerer Zeit Winzler und Mitarbb.¹³ zeigen, und Spiegelmann¹⁴ stellte fest, daß die Adaptationsfähigkeit der Hefe an Galaktose und Maltose durch DNP vollständig gehemmt wird, woraus er auf die Hemmung der Eiweißsynthese durch DNP schließt.

Diese Beobachtungen ließen sich alle damit erklären, daß das DNP in den Phosphathaushalt eingreift. Man brauchte aber nicht unbedingt anzunehmen, daß dieser Eingriff in einer beschleunigten ATP-Spaltung besteht, sondern man konnte auch an eine Hemmung der Phosphorylierung denken. Lipmann und Loomis¹⁵ gelang bei Versuchen mit Kaninchen-nierenextrakt der Nachweis, daß die Phosphataufnahme durch DNP gehemmt wird, ohne daß eine Hemmung der Sauerstoffaufnahme erfolgt. Dehydrierung und Phosphorylierung sind also entkoppelt. In jüngster Zeit untersuchte Königsberger¹⁶ den Phosphathaushalt der Hefe unter Einwirkung von DNP besonders eingehend und kommt ebenfalls zu dem Schluß, daß das DNP nicht die Dephosphorylie-

⁵ M. E. Krahll u. H. G. Clowes, J. Amer. chem. Soc. 57, 1144 [1935].

⁶ J. Field, A. N. Martin u. S. M. Field, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 31, 56 [1934].

⁷ J. Field, A. N. Martin u. S. M. Field, Proc. exp. Biol. Med. 31, 996 [1934].

⁸ M. E. Krahll u. H. G. Clowes, J. biol. Chemistry 111, 355 [1936].

⁹ C. Greville u. G. Stern, Biochem. J. 29, 487 [1935].

¹⁰ E. Rozoni u. E. Ehrenfest, J. biol. Chemistry 115, 749 [1936].

¹¹ C. E. Clifton, Enzymol. 4, 246 [1937].

¹² J. Reiner u. S. Spiegelmann, J. cell. comp. Physiol. 30, 347 [1947].

¹³ R. J. Winzler, D. Burk u. V. du Vigneaud, Arch. Biochemistry 5, 25 [1944].

¹⁴ S. Spiegelmann, J. cell. comp. Physiol. 30, 315 [1947].

¹⁵ F. Lipmann u. W. F. Loomis, J. biol. Chemistry 173, 807 [1948].

¹⁶ s. auch F. Lynen u. R. Königsberger, Liebig's Ann. Chem. 50, im Druck. R. Königsberger, Diss. München 1949.

lungsgeschwindigkeit steigert, sondern bereits die Phosphorylierung hemmt.

Die bisher angeführten sowie fast alle anderen Arbeiten über DNP sind an tierischem Gewebe oder an Mikroorganismen durchgeführt worden. Dagegen liegen nur wenige und kurze Arbeiten mit höheren Pflanzen vor. Als erster zeigte wohl Plantefol¹⁷, daß DNP auch bei Pflanzengewebe Atmungssteigerung hervorruft. Weitere Angaben über Atmungssteigerung bei Avenakoleoptilen, Erbsenhypokotylen und Karottenblättern finden sich bei Bonner^{18, 19}, Kelly und Avery²⁰ und Stenlid²¹. In allen Fällen wurde nur die Sauerstoffaufnahme in Abhängigkeit von der DNP-Konzentration untersucht. Auch eine erst nach Abschluß vorliegender Arbeit veröffentlichte Untersuchung von Newcomb²², der mit pflanzlichen Gewebekulturen arbeitete, geht nicht über diese Fragestellung hinaus. Dagegen konnte Stenlid²³ bei Untersuchungen an Weizenwurzeln zeigen, daß DNP in den Konzentrationen, in denen es die Atmung steigert, die Glucoseaufnahme hemmt. Diese wichtige Feststellung soll später noch diskutiert werden.

Im Anschluß an eine kürzlich veröffentlichte Arbeit²⁴ über den Atmungsstoffwechsel in vitro kultivierter Maiswurzeln sollte in vorliegender Arbeit der Einfluß von DNP auf isolierte Maiswurzeln auf erweiterter Grundlage untersucht werden. Neben dem Sauerstoffverbrauch in verschiedenen Entwicklungsabschnitten der Wurzeln sollten auch das Längenwachstum, die Trockengewichtszunahme und der Stickstoffeinbau in Abhängigkeit von der DNP-Konzentration verfolgt werden, um so ein möglichst vollständiges Bild der physiologischen Wirkung dieses Stoffes entwerfen zu können. Dabei war es zunächst nötig, die DNP-Wirkung auf Wurzelgewebe eingehender zu untersuchen und deren Abhängigkeit vom p_H -Wert zu prüfen, da die bei Mikroorganismen gewonnenen Erfahrungen nicht ohne Bedenken auf höhere Pflanzen übertragen werden können.

A. Material und Methodik

Für die Versuche mit Karottengewebe wurden ausgewachsene Karotten der Sorte „Marktgärtner“ mit dem Mikrotom in 0,1–0,15 mm dicke Scheiben zerlegt. Diese Schnittdicke gewährleistet eine hinreichende Homogenisierung des Gewebes, so daß die Sauerstoffversorgung

optimal ist. Einleiten von reinem Sauerstoff verursachte keine Steigerung der Sauerstoffaufnahme.

Die Kultur der isolierten Maiswurzeln erfolgte auf einem Nährsalzagar unter Zusatz von 2% Glucose in Reagensgläsern. Die entsprechenden Mengen DNP wurden dem Nährboden vor dem Sterilisieren zugesetzt. Die Sauerstoffaufnahme wurde mit Hilfe der „direkten Methode“ nach Warburg bestimmt. Nähere Angaben über Kulturbedingungen und Atmungsmessung finden sich in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit²⁴.

Der p_H -Wert der Puffergemische wurde mittels eines Potentiometers und der Chinhydron-Elektrode bestimmt. Da sich der p_H -Wert des Puffers durch die relativ große Gewebemenge etwas verschob, wurde nach Abschluß jeder Atmungsmessung ein Teil desselben wieder aus den Atmungströgen herauspipettiert und nochmals das p_H bestimmt. Dieser Endwert wurde dann als der während der Atmungsmessung vorliegende eingesetzt, da Kontrollen zeigten, daß die Verschiebung schon in den ersten 10 Min. erfolgt.

Zur Trockengewichtsbestimmung wurden die Wurzeln in Wägegläsern überführt, 24 Stdn. bei 105°C getrocknet und bis zur Gewichtskonstanz im Exsiccator aufbewahrt.

Der organisch gebundene Stickstoff wurde mit einer Mikro-Kjeldahl-Anlage bestimmt. Kontrollen mit eingewogenem Harnstoff ergaben bei 0,5 mg Stickstoff eine Fehlergrenze von $\pm 5\%$. Im einzelnen wurde nach den Angaben von Klein²⁵ verfahren.

B. Versuchsergebnisse

a) Abhängigkeit der Wirkung des 2,4-DNP vom p_H der Außenlösung

Je 0,5 g Karottengewebe (Frischgewicht) wurden in die mit 2,7 ccm $m/20$ -Phosphatpuffer beschickten Atmungströge gegeben und die Sauerstoffaufnahme während der ersten Stunde gemessen. Dann wurden in 6 Trögen 0,3 ccm entsprechend konzentrierter Lösungen von 2,4-DNP zupipettiert, so daß die in den Kurven angegebenen Endkonzentrationen vorlagen. Ein Trog blieb zur Kontrolle ohne Zusatz. Im Verlauf von 3 Stdn. wurde dann in halbstündigem Abstand die Sauerstoffaufnahme bestimmt und die Mittelwerte der 2. bis 6. halben Stunde mit dem Ausgangswert verglichen. Die 1. halbe Stunde nach dem Zusatz blieb unberücksichtigt, da hier die Reaktion erst anlief und die Werte schwankten. Die folgenden Ablesungen zeigten dagegen sehr konstante Werte. Das Kontrollmanometer wies während der insgesamt 4-stdg. Versuchsdauer in der Regel keine nennenswerten Schwankungen auf, so daß sich Korrekturen

¹⁷ L. Plantefol, Ann. Physiol. et Physicochim. Biol. 8, 127 [1932].

¹⁸ J. Bonner, Amer. J. Bot. 36, 323 [1949].

¹⁹ J. Bonner, Amer. J. Bot. 36, 429 [1949].

²⁰ S. Kelly u. G. S. Avery, Amer. J. Bot. 36, 421 [1949].

²¹ G. Stenlid, Physiol. Plant. 2, 61 [1949].

²² E. H. Newcomb, Amer. J. Bot. 37, 264 [1950].

²³ G. Stenlid, Physiol. Plant. 2, 350 [1949].

²⁴ O. Kandler, Z. Naturforsch. 5b, 203 [1950].

²⁵ G. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, Wien-Heidelberg 1931.

erübrigen. In Abb. 1 sind die Kurven für die Atmungssteigerung verschiedener DNP-Konzentrationen bei verschiedenem p_H dargestellt. Dabei ist die in der ersten Stunde gemessene Normalatmung als 100% gesetzt.

Die Kurven zeigen den gleichen Verlauf wie die bei tierischem Gewebe und bei Hefe. Charakteristisch ist der steile Kurvenverlauf in der Nähe der Maxima und die starke Abhängigkeit vom p_H . Letztere kann

Abb. 1. Atmungssteigerung bei Karottengewebe in Abhängigkeit von der Konzentration des 2,4-DNP. Kurve 1: p_H 7,4; Kurve 2: p_H 6,8; Kurve 3: p_H 6,5; Kurve 4: p_H 6,0; Kurve 5: p_H 5,6.

Abb. 2. Atmungssteigerung bei Karottengewebe in Abhängigkeit von der Konzentration des DNPH (berechnet aus Abb. 1).

sowohl von der unterschiedlich starken Dissoziation des DNP bewirkt werden, als auch auf Permeabilitätsänderungen, die durch die veränderten p_H -Verhältnisse hervorgerufen werden, beruhen. Für die bakteriostatische Wirkung des DNP konnten Cowles und Klotz²⁶ nachweisen, daß nur die Konzentration des undissoziierten DNP (in den folgenden Formeln und Tabellen als DNPH bezeichnet) entscheidend ist. Daß dies auch in vorliegendem Falle so ist, beweist folgende Berechnung. Nach dem Massenwirkungsgesetz gilt:

$$\frac{[\text{DNP}^-] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{DNPH}]} = K; [\text{DNP}^-] + [\text{DNPH}] = [\text{DNP}].$$

²⁶ P. B. Cowles u. J. N. Klotz, J. Bact. 56, 277 [1948].

p_H	Mol/DNPH
5,6	$10^{-6,58}$
6,0	$10^{-6,5}$
6,5	$10^{-6,55}$
6,8	$10^{-6,5}$
7,4	$10^{-6,6}$

Tab. 1. Zusammenstellung der aus den Kurven der Abb. 1 errechneten optimalen Konzentrationen des undissoziierten DNP.

Setzt man für K die Dissoziationskonstante des 2,4-DNP = $8 \cdot 10^{-5}$, für H^+ die Wasserstoffionenkonzentration und für DNPH die aus den Kurven der Abb. 1 ersichtlichen optimalen DNP-Mengen ein, so ergibt sich die molare Konzentration des DNPH, welche maximale Förderung verursacht. Tab. 1 enthält die Ergebnisse dieser Berechnung, wie sie sich bei Auswertung der Kurven aus Abb. 1 ergeben. Mit guter Übereinstimmung ergibt sich, daß unabhängig vom p_H -Wert der Außenlösung eine Konzentration von $10^{-6,5}$ -molar DNPH maximale Atmungssteigerung bewirkt. Es erweist sich also auch hier die ganze Molekel als wirksam, während die Konzentration des Ions gleichgültig ist. Außerdem ist damit auch bewiesen, daß die Permeabilität des Plasmas durch die verwendeten Puffer nicht beeinflusst wurde. Auf Grund dieses Befundes läßt sich eine p_H -unabhängige Kurve für die Wirksamkeit der verschiedenen DNPH-Konzentrationen errechnen. Sie ist in Abb. 2 dargestellt.

b) Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Nitrophenole

Da für Pflanzengewebe noch keine vergleichenden Untersuchungen über die Wirksamkeit verschiedener Nitrophenole vorliegen, sollten folgende Versuche zeigen, ob sich die an tierischem Gewebe und Mikroorganismen gemachten Erfahrungen übertragen lassen. Ebenfalls mit Karottengewebe und gleicher Methodik wie oben wurden die 3 Mononitrophenole untersucht und die Ergebnisse in Abb. 3 kurvenmäßig dargestellt. *p*-Nitrophenol erweist sich als sehr wirksam. Die optimale Konzentration liegt aber um 3 Zehnerpotenzen höher als die des 2,4-DNP, wenn man die undissoziierte Form in Rechnung stellt. Die beiden anderen Isomeren zeigen nur sehr geringe Wirkung.

Von den Dinitrophenolen wurden außer dem 2,4-DNP auch noch das 2,5-DNP und 2,6-DNP geprüft und als kaum wirksam befunden. Abb. 4 gibt die entsprechenden Kurven wieder. Die physiologische

Wirksamkeit der Nitrophenole scheint also an die *para*-Stellung geknüpft zu sein, wie dies ältere Autoren wiederholt betonten. Wesentliche Unterschiede im Verhalten von tierischem und pflanzlichem Gewebe bestehen nicht. Verschieden sind nur die absoluten Beträge der Atmungssteigerung, die bei tierischem Gewebe mehrere hundert Prozent erreichen können.

c) Beeinflussung des Wachstums isolierter Maiswurzeln durch 2.4-DNP

Nach diesen Vorarbeiten konnte dazu übergegangen werden, den Einfluß von 2.4-DNP auf den Entwicklungsablauf ganzer Organe, in unserem Falle der isolierten Maiswurzeln, zu studieren. Zunächst galt es zu klären, ob und in welchen Zeiträumen das 2.4-DNP in die unverletzte Wurzel aufgenommen wird. Zu diesem Zweck wurden je fünf 20 mm lange Maiswurzeln in die mit 3 ccm Nährlösung und verschiedenen DNP-Konzentrationen beschickten Atmungströge übertragen und die Sauerstoffaufnahme in Intervallen von mehreren Stunden gemessen. In Abb. 5 ist die Atmungssteigerung gegenüber den Kontrollgefäßen in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Kurven zeigen die sehr langsame Aufnahme des DNP. Durch die Dauerwirkung werden aber wesentlich höhere Werte erreicht als in den bisher beschriebenen Kurzversuchen. Der steile Abfall der Kurven nach 24 Stdn. beruht vermutlich auf der inzwischen eingetretenen Schädigung des Plasmas. Am Ende des Versuches erschienen die Wurzeln stark gelb angefärbt und hatten glasiges Aussehen.

Für Kulturversuche kamen diese starken Konzentrationen natürlich nicht in Frage. Es mußte versucht werden, das Ansteigen der Atmungsförderung möglichst zu verlangsamen, so daß nur eine ganz allmähliche Steigerung des Stoffwechsels erfolgte und nicht sofort grobe Schädigungen auftraten. In einem Vorversuch wurde zunächst nur das Längenwachstum in Abhängigkeit von der DNP-Konzentration beobachtet. Von 3 Reihen Wurzelkulturen, die je 10 Einzelkulturen umfaßten, blieb eine ohne Zusatz, während die anderen $m/100\,000$ - bzw. $m/600\,000$ -2.4-DNP enthielten. Bei einem p_H des Nährbodens von 5,5 entspricht dies einer Konzentration an DNPH von $10^{-6.4}$ bzw. $10^{-7.1}$ -molar. Gemessen wurde der tägliche Zuwachs. Die Durchschnittswerte der jeweils 5 längsten Wurzeln einer Reihe sind in Abb. 6 kurvenmäßig dargestellt. In beiden Fällen von DNP-Zusatz liegt die Wachstumsgeschwindigkeit in den beiden ersten Tagen über den Kontrollwerten, sinkt aber bei der

Abb. 3. Atmungssteigerung bei Karottengewebe in Abhängigkeit von der Konzentration der drei Mononitrophenole. Kurve 1: *p*-Nitrophenol; Kurve 2: *o*-Nitrophenol; Kurve 3: *m*-Nitrophenol.

Abb. 4. Atmungssteigerung bei Karottengewebe in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedener Dinitrophenole. Kurve a: 2.4-DNP; Kurve b: 2.5-DNP; Kurve c: 2.6-DNP.

Abb. 5. Atmungssteigerung bei Maiswurzeln durch Zugabe verschiedener 2.4-DNP-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit. Kurve 1: $m/6000$ -2.4-DNP; Kurve 2: $m/10\,000$ -2.4-DNP. p_H 6,5.

stärkeren Konzentration sehr rasch unter diese ab, während sie bei der schwächeren Konzentration 10 Tage darüber bleibt. Erst dann tritt auch hier eine leichte Hemmung auf.

Ob es sich bei dieser Wachstumssteigerung nur um eine Förderung des Streckungswachstums handelte oder ob auch eine Vermehrung der organischen Substanz erfolgte, sollte eine größere Versuchsreihe entscheiden. Von 7 Reihen mit je 10 Wurzeln blieb eine ohne Zusatz, während die übrigen verschiedene Konzentrationen an 2.4-DNP enthielten. Nach 14-tägiger Kulturdauer wurden die 5 längsten Wurzeln jeder

Abb. 6. Tageslicher Längenzuwachs isolierter Maiswurzeln bei Zusatz verschiedener Konzentrationen 2,4-DNP in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Kurve 1: Kontrolle; Kurve 2: $m/600\,000$ -2,4-DNP; Kurve 3: $m/100\,000$ -2,4-DNP.

Abb. 7. Beeinflussung von Atmung und Wachstum isolierter Maiswurzeln in Abhängigkeit von der DNPH-Konzentration. Kurve 1: Atmungsintensität; Kurve 2: Gesamtlänge; Kurve 3: Trockengewicht; Kurve 4: Stickstoffgehalt.

Abb. 8. Beeinflussung von Atmung und Wachstum isolierter Maiswurzeln durch 2,4-DNP in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Kurve 1: Atmungsintensität; Kurve 2: Trockengewicht; Kurve 3: Gesamtlänge; Kurve 4: Stickstoffgehalt.

Reihe aus dem Agar herausgenommen, in die mit entsprechender Nährlösung und 2,4-DNP-Konzentration beschickten Atmungströge übertragen und die Sauerstoffaufnahme gemessen. Anschließend wurden noch Trockengewicht und Stickstoffgehalt bestimmt. Abb. 7 zeigt eine Zusammenstellung der Kurven für Längenwachstum, Atmungsintensität, Trockengewicht und organisch gebundenem Stickstoff in Abhängig-

keit von der verwendeten 2,4-DNPH-Konzentration. Die Normalwerte sind wieder mit 100% angesetzt.

Die Kurven beweisen überzeugend, daß durch das 2,4-DNP alle Wachstums- und Stoffwechselvorgänge beeinflußt werden. Eigenartig erscheint die Tatsache, daß der stärksten Förderung des Längenwachstums die stärkste Hemmung des Stickstoffeinbaues entspricht. Dies kann auf einer durch die Versuchsanordnung bedingten Täuschung beruhen. Wie Abb. 6 zeigt, ist das Längenwachstum nur in den ersten Tagen gefördert. Der in diesem Zeitraum erzielte Vorsprung der Gesamtlänge gegenüber der Kontrolle bleibt natürlich noch einige Tage erhalten, auch wenn die Wachstumsgeschwindigkeit bereits abgesunken ist. Nimmt man nun beim Stickstoffeinbau ein ähnliches Verhalten an, nur mit dem Unterschied, daß die anfängliche Förderung gering ist und die Hemmung rascher einsetzt, so kann es durchaus zu dem paradoxen Fall kommen, daß das Längenwachstum gefördert, die Substanzvermehrung aber gehemmt erscheint.

Diese Vermutung wurde in einer Versuchsreihe geprüft, in der die einzelnen Faktoren in Abhängigkeit von der Kulturdauer untersucht wurden. Von 2 Reihen mit je 30 Einzelkulturen erhielt eine einen Zusatz von 2,4-DNP, so daß sich die in Abb. 7 als optimal erscheinende Endkonzentration von $10^{-7,1}$ -m. DNPH ergab. Die andere Reihe diente als Kontrolle. In Abständen von 6 Tagen wurden nun je 5 Wurzeln entnommen und die üblichen Daten bestimmt. Deren Beträge in % der zu 100% angesetzten Kontrolle sind in den Kurven der Abb. 8 zusammengefaßt.

Die Kurven bestätigen die oben ausgesprochene Vermutung. Während des allmählichen Anstiegs der Atmungsintensität innerhalb der ersten 6 Tage erfolgt neben dem verstärkten Längenwachstum auch eine erhöhte Substanzvermehrung. Der Stickstoffeinbau erfährt dann eine sehr starke Hemmung und der Gesamtstickstoffgehalt sinkt wesentlich rascher ab als Gesamtlänge und Trockengewicht. Die Sauerstoffaufnahme (bei allen Messungen nicht auf Trockengewicht, sondern auf Stickstoff bezogen) steigert sich im Laufe der ersten 18 Tage laufend, sinkt aber dann stark ab. Vermutlich ist zu diesem Zeitpunkt die Schädigung des Eiweißes schon so weit fortgeschritten, daß der größte Teil des Stickstoffs in Abbauprodukten vorliegt. Wäre es möglich, die Atmung nicht, wie in unserem Falle, auf organisch gebundenen Stickstoff, sondern auf die Menge des aktiven Fermentsystems zu beziehen, so ergäbe sich wahrscheinlich eine Atmungssteigerung bis zum Zelltod.

C. Diskussion

Die angeführten Versuche zeigen den tiefgreifenden Einfluß des 2,4-DNP auf den gesamten Stoffwechsel und beweisen erneut, daß der Angriffspunkt nur an einer zentralen Stelle und nicht an einem Teilprozeß der Atmung liegen kann. Offensichtlich bewirkt das in die Zellen eindringende 2,4-DNP zunächst eine Steigerung des gesamten Stoffwechsels. Allerdings ist dieser einseitig zugunsten der Dissimilation verschoben und damit der „synthetische Wirkungsgrad“ der Zelle herabgesetzt. Trotzdem kommt es aber bei schonender Einwirkung noch zu einem Anstieg der Absolutwerte an Trockengewicht und Eiweiß. Eine besondere Förderung erfährt das Streckungswachstum und ganz allgemein die Differenzierung. Dies kommt deutlich in der gesteigerten Nebenwurzelbildung zum Ausdruck, wie sie Abb. 9 zeigt*. In gleicher Richtung liegt auch der Befund Weinbergers, den Avery und Bindloß²⁷ mitteilen, daß das Bespritzen von Bäumen mit 2,4-DNP die Winterruhe um 14 Tage verkürzt. Angesichts dieser Tatsache erscheint es fraglich, ob man die DNP-Wirkung mit der einfachen Annahme einer Entkoppelung von Dehydrierung und Phosphorylierung erklären kann. Seit den Untersuchungen Königsbergers¹⁶ ist es zwar nicht mehr zweifelhaft, daß das DNP den Phosphathaushalt beeinflusst, aber der Verf. kommt selbst zu dem Schluß, daß sich nicht alle Beobachtungen mit Phosphorylierungshemmung erklären lassen.

Im Gegensatz zu diesen Erscheinungen der Differenzierungsbeschleunigung lassen sich die Befunde von Stenlid²³, daß die Glucoseaufnahme gehemmt wird, leichter durch eine Phosphorylierungshemmung erklären. Die Glucose kann ja bekanntlich nur in

* Die in Abb. 9 dargestellten Wurzeln entstammen einer Versuchsreihe, die besonders deutliche Unterschiede aufwies. Die Wachstumsförderung durch 2,4-DNP war innerhalb der zahlreichen, zur Sicherung der oben angeführten Befunde ausgeführten Parallelreihen in ihren absoluten Beträgen sehr verschieden, in jedem Falle aber deutlich.

phosphorylierter Form in den Stoffwechsel einbezogen werden. Bei Einwirkung von DNP kommt es zwar zu einem beschleunigten Abbau der zelleigenen Reserven, aber die zur Aufnahme der Glucose notwendigen Phosphorylierungen werden unterdrückt. Eigene Beobachtungen an *Chlorella*, die später in anderem Zusammenhang veröffentlicht werden sollen, weisen in gleiche Richtung. Nur bei ausgehungerten *Chlorella*-Suspensionen vermag DNP eine Atmungsförderung hervorzurufen, während bei Glucosefütterung nur die Hemmwirkung der starken Konzentrationen erhalten bleibt, die Förderung der schwachen Konzentrationen dagegen völlig fehlt. Dies läßt ebenfalls nur den Schluß zu, daß DNP vorwiegend die „endogene“ und nicht die „Substrat“-Atmung fördert. Bei den Versuchen an Hefe wurde allerdings auch eine Atmungssteigerung bei Anwesenheit von Glucose gemessen, sie betrug aber nur etwa 30%¹⁶. Der Einfluß auf die „endogene Atmung“ der Hefe ist in den mir bekannten Arbeiten leider nicht untersucht. Es ließe sich aber durchaus denken, daß die Atmungssteigerung auch bei der Hefe vorwiegend auf Kosten der Reservestoffe geht und eine Steigerung des Glucoseumsatzes nur vorgetauscht wird. Diese Frage ließe sich klären, wenn neben der Sauerstoffaufnahme auch die Abnahme der Glucosekonzentration in der Außenlösung verfolgt würde, wie dies Stenlid²³ bei Weizenwurzeln ausführte.

Die durch stärkere Konzentrationen bzw. längere Einwirkungsdauer hervorgerufenen Synthesehemmungen sind ohne weiteres mit der Annahme einer Phosphorylierungshemmung erklärbar. Gerade dadurch, daß das DNP ermöglicht, zwischen Energiegewinn und Energieverwertung einen Keil zu treiben, wird es für den Physiologen in Zukunft zu einem wichtigen Mittel werden, wenn es gilt, den Übergang von der Stoffwechsel- zur Entwicklungsphysiologie zu schaffen. Seine volle Bedeutung wird es allerdings erst dann erhalten, wenn es gelungen sein wird, den genauen Reaktionsmechanismus zu klären.

²⁷ G. S. Avery u. J. E. Bindloss, *Hormones and Horticulture*, New York 1947.