Über den Einfluss von Auxin auf die Stoffpermeabilität des Protoplasmas.

I. Mitteilung

von Yoshio MASUDA*

増田芳雄：原形質の溶質透過性に対するオーキシンの影響に就いて 第1報.

Eingegangen am Aug. 24, 1953

Einleitung

V. GUTTENBERG, BEYTHIEN und MEINL ('51, '52 a, b) haben gezeigt, dass die Wuchsstoffe auf die Wasser- und Zuckerpermeabilitätsverhältnisse von *Rhoeo discolor* einen auffälligen Einfluss ausüben. Sie hielten die Permeabilität für einen Faktor der Zellstreckung. Früher fasste auch VELDSTRA ('44) den Gedanken, dass die Wuchsstoffe geradezu Regulatoren der Plasmapermeabilität sind. Andererseits gibt es auch Meinungen, die auf die chemische Rolle des Auxins besonderen Wert legen.

Aber es ist jedenfalls von Bedeutung, die Permeabilitätsveränderungen als Anzeichen der durch das Auxin verursachten Strukturveränderungen des Protoplasmas näher zu untersuchen.

Im folgenden will ich den Einfluss des Heteroauxins auf die Permeabilität für Harnstoff und Glycerin des Protoplasmas von *Allium cepa* beschreiben. Ich wählte diese Substanzen, da sie allgemein angewandt werden, um die Permeabilitätsreihen zu bestimmen.

Material und Methode

Als Untersuchungsobjekt wurden die Zwiebelschuppenepidermiszellen von *Allium cepa* gewählt. Für die Versuchsreihen wurden nur die Zwiebelschuppen der zweiten Schicht verwendet, um den Zustand der Protoplasten in jeder Reihe immer in Übereinstimmung zu bringen.

Diese herausgeschnittenen Zwiebelschuppen von etwa 10 mm. Kantenlänge wurden in die Phosphatpufferlösung übertragen, darin etwa 30 Min. lang gebadet und aus dem Gewebe entlüftet. Dann wurden sie in die gepufferte Lösung von dem zu prüfenden Heteroauxin übertragen und darin 1 Stunde gebadet. Diese Behandlungen diente gleichzeitig als "Wässerung", welche die konvexe Plasmolyse leicht herbeiführt (HOFMEISTER, '35). Die Oberflächenepidermisplättchen von etwa 5 mm. Kantenlänge wurden von dem Zwiebelschuppenwürfel herausgeschnitten, und dabei wurde in acht genommen, dass die mechanische Kraft das Material nicht beeinflusst.

* Biologisches Institut, Ehime Universität, Matsuyama, Japan.

Diese Schnitte wurden ins Plasmolytikum übertragen, das dieselbe Konzentration des Heteroauxins wie bei der Vorbehandlung enthielt. Jedesmal wenn sie mikroskopiert wurden, wurden sie auf einen hohlgeschliffenen Objektträger mit einigen Tropfen des Plasmolytikums getragen, und nach der Messung in die Plasmolyselösung zurückgebracht.

Die Auswertung der Plasmolyse-Deplasmolyse machte ich nach der von V. GUTTENBERG und BEYTHIEN ('51) angewandten Methode, die auf den früheren Angaben von KACZMAREK ('29) beruht. Alle Zellen eines mikroskopischen Feldes wurden ausgezählt, und die plasmolysierten Zellen in Prozenten der Gesamtzellenzahl angegeben. Im Verlaufe der Plasmolyse erreichte ihr Wert mehr als 95, und schliesslich belief er sich bei der Deplasmolyse weniger als 5. Der Vergleich des Versuchs mit der Kontrolle wurde, nach DE HAAN ('35) und V. GUTTENBERG und BEYTHIEN ('51), durch die Bestimmung des Quotienten aus der Plasmolyse-Deplasmolysezeit der Kontrolle= T_k und des Versuches= T_v durchgeführt. Ist $T_k=T_v$, so ist der Quotient=1 und so hat die Versuchslösung keine besondere Wirkung. Die beschleunigende Wirkung des Stoffes wird durch einen Quotienten, der grösser als 1 ist, angezeigt, die hemmende durch einen, der kleiner als 1 ist (Tabelle 1).

Tabelle 1. Der Verlauf der Plasmolyse-Deplasmolyse in der 0.4 Mol. Harnstofflösung. Die plasmolysierten Zellenzahlen werden in Prozenten der Gesamtzellen angegeben. 18°C.

Zeit	Behandelt mit 10^{-7} Mol. H. A.	Kontrolle
10 Min.	> 95%	> 95%
130	30.8	"
150	22.8	48.6
170	14.3	30.6
180	< 5%	—
190		21.2
200		11.7
210		< 5%

$$T_k/T_v = 210/180 = 1.17.$$

Es ist allgemein anerkannt, dass die Bedingungen, wie Temperatur, Licht und pH, die Permeabilität auffällig beeinflussen. V. GUTTENBERG und BEYTHIEN ('51) stellten mit *Rhoeo discolor* fest, dass die Temperatur auf die Deplasmolysezeit weitgehenden Einfluss hat, und zwar dass bei 2°C die Protoplasten zerstört werden, 10°C und 16°C hemmend wirken und etwa 25°C das Optimum ist. Daher versuchte ich bei 20–25°C von Raumtemperatur, und beobachtete mit dem durch CuSO_4 -Lösung gefilterten Lichte, um die überflüssige Hitze zu vermeiden und das Licht einheitlich zu halten. DRAWERT ('52) kam zu dem Schlusse, dass bei den Oberepidermiszellen der Schuppenblätter von *Allium cepa* pH 6.5–7.0 das Maximum der Wasserpermeabilität ist. Früher zeigte auch SEEMANN ('50), dass bei *Spirogyra* und *Cladophora*

das Maximum der Wasserpermeabilität etwa bei dem Neutralpunkt liegt. Also verwendete ich die Phosphatpufferlösung von pH 6.8, um die Stoffpermeabilität beim Wasserpermeabilitätsmaximum zu prüfen.

Als Auxin wurde beta-Indoleessigsäures Kalium (Heteroauxin: im folgenden mit H. A. abgekürzt) der Firma Takeda verwendet.

Versuchsergebnisse

I. Tabelle 1 stellt ein Beispiel der Bestimmungen von T_k , T_v und deren Quotienten dar. Hier war die Konzentration der Harnstofflösung 0.4 Mol. Die Änderungen der Permeabilität für Harnstoff durch das H. A. zwischen 10^{-2} und 10^{-9} Mol. werden in Fig. 1 gestellt.

Fig. 1. Die Abhängigkeit der Permeabilität für Harnstoff von den verschiedenen H. A.-Konzentrationen. 20–25°C.

folgenden also versuchte ich mit den Konzentrationen 10^{-3} und 10^{-8} Mol., und als die mittlere mit der Konzentration 10^{-5} Mol. Als Plasmolytikum wurden 0.33 Mol. Harnstoff- und Glycerinlösungen verwendet (Fig. 2).

Auch hier bewirkte die 10^{-3} Mol. H. A.-Lösung eine starke Hemmung, aber die 10^{-8} Mol. eine starke Förderung, und zwar bei dieser Konzentration wird die Permeabilität für Glycerin stärker erhöht als für Harnstoff.

III. Um das Resultat zu bestätigen, dass bei Zusatz von 10^{-8} Mol. H. A. die Permeabilität für Glycerin stärker als für Harnstoff erhöht wird, ist es erforderlich, die osmotisch gleichwertigen Glycerin- und Harnstofflösungen mit einander zu vergleichen.

Die 0.443 und 0.542 Mol. Glycerinlösungen, die durch die Gefrierpunktmessungen

Hier bewirkt die H. A.-Konzentration 10^{-2} Mol. eine Zerstörung des Protoplasmas. Die Konzentration 10^{-3} Mol. bewirkt eine sehr starke Permeabilitätshemmung. Bei Zusatz von H. A. zwischen 10^{-4} und 10^{-8} Mol. beobachtet man eine steigende Förderung der Permeabilität, und die Konzentration 10^{-8} Mol. hat die maximale Wirkung, während die 10^{-9} Mol. fast wirkungslos bleibt.

II. Aus diesem Versuch geht es klar hervor, dass die Konzentration 10^{-8} Mol. die Permeabilität stark erhöht und die Konzentration 10^{-3} Mol. dieselbe hemmt. Im fol-

mit 0.450 bzw. 0.550 Mol. Harnstofflösungen isotonisch bestimmt wurden, wurden hergestellt. Die beiden Versuchsfälle (Tabelle 2 A, B), die unter verschiedenen Temperaturen und mit den verschiedenen Zwiebeln durchgeführt wurden, zeigten, dass die Permeabilität für Glycerin und für Harnstoff, trotzdem die absoluten Werte der Plasmolyse-Deplasmolysezeit in jedem Falle schwankten, ungefähr gleich war, sofern ihre Zellen der H. A.-Wirkung nicht ausgesetzt werden. Und es ist zu bemerken, dass die Permeabilität für Glycerin durch die Behandlung mit 10^{-8} Mol. H. A. immer stärker erhöht wird als für Harnstoff.

Fig. 2. Die Abhängigkeit der Permeabilität für Glycerin und Harnstoff von den verschiedenen H. A.-Konzentrationen. 25°C.

Tabelle 2. A: Der Vergleich der Plasmolyse-Deplasmolysezeiten in 0.443 Mol. Glycerin- und 0.450 Mol. Harnstofflösung B: Derselbe in 0.542 und 0.550 Mol.

A. 25°C

Kontrolle			Behandelt mit 10^{-8} H. A.		
Harnstoff	Glycerin	Verhältnis	Harnstoff	Glycerin	Verhältnis
140 Min.	140	1.00	100	80	1.25
70	75	0.93	60	50	1.20
90	90	1.00	50	40	1.25
110	110	1.00			
Mittelwert		0.98 ± 0.012	Mittelwert		1.23 ± 0.011

B. 29–30°C

Kontrolle			Behandelt mit 10^{-8} H. A.		
Harnstoff	Glycerin	Verhältnis	Harnstoff	Glycerin	Verhältnis
120 Min.	120	1.00	185	155	1.19
160	165	0.96	160	135	1.19
150	155	0.97	115	90	1.28
			150	130	1.15
Mittelwert		0.98 ± 0.026	Mittelwert		1.20 ± 0.062

Diskussion

Nach der Methode der Plasmolyse-Deplasmolyse geht es hervor, dass das H. A. auf die Stoffpermeabilität der Zwiebelschuppenepidermiszellen von *Allium cepa* einen grossen Einfluss hat. Auf Grund dieser Ergebnisse will ich weiter den Mechanismus in Betracht ziehen, wie das H. A. auf die Permeabilität wirkt.

Es ist bekannt, dass die Protoplasmaoberflächen gewissermassen durch die Plasmolyse beeinträchtigt werden, und dass die Plasmolyse-Permeabilität, die durch die Plasmolyse-Deplasmolyse bestimmt wird, nicht immer die normale Permeabilität darstellen kann (WEBER, '32). Wenn man aber die Permeabilität für verschiedenartige Substanzen vergleichend prüft, so wird die Auffassung betont, dass die Plasmolyse-Permeabilität mit der normalen ziemlich übereinstimmt (HUBER und SCHMIDT, '34). Da hier die gleichartigen Materialien, die mit oder ohne H. A. behandelt werden, miteinander verglichen werden, kann man auch die Plasmolyse-Permeabilität bis zu einem gewissen Grade als die Änderung der normalen Permeabilität, wenigstens die der Protoplasmastruktur, ansehen.

Es gibt zwei Permeabilitätstheorien, d. h. die Poren- und die Lipoidpermeabilität, welche auf Grund der Protoplasmastruktur den Mechanismus des Durchtrittes der Stoffe (hauptsächlich der Nichtelektrolyte) erklären. Nach den Messungen von COLLANDER und BÄRLUND ('33) ist der Verteilungskoeffizient von Äther: Wasser für Glycerin etwas höher als der für Harnstoff, aber der Verteilungskoeffizient von Olivenöl: Wasser für diesen ist höher als für jenes. Es ist unbekannt, welchem Lösungsvermögen des Äthers oder des Olivenöls das der Plasmaoberfläche der hier benutzten *Allium*-Zellen näher steht. COLLANDER und BÄRLUND ('33) meinten, dass der höhere Wert des Harnstoffes gewissermassen auf der Verbindung der Amidogruppe desselben mit der freien Fettsäure, die das Olivenöl in sich enthält, beruht. Auf Grund der vergleichenden Permeabilitätsmessungen mit einigen Stoffen erklärt SCHMIDT ('39) eine Erniedrigung der Harnstoffpermeabilität der in der Trockenkultur gehaltenen Pflanzen durch eine Entquellung der Plasmagrenzschicht, die mit der hydrophilen Kolloid gebildet wird, und er erklärt auch eine Erhöhung der Permeabilität für Glycerin derselben mit einer Veränderung der Lipoidlöslichkeit der Grenzschicht. Wenn ich mich an diese Meinung anschliesse, wird die mit H. A.-Behandlung hervorgerufene stärkere Erhöhung der Permeabilität für Glycerin als die der für Harnstoff durch das H. A. mit seiner gewaltigeren Beeinflussung auf die Lipoidphase als auf die Eiweissphase erklärt. Aber nach meinen Versuchsergebnissen und meiner daran anschliessenden Überlegung erleidet die Lipoidphase des Plasmas etwas stärkere Umwandlung durch das H. A. als dessen Eiweissphase.

Wenn das H. A. auf die Protoplasamembran direkt wirkt, dann kann die Tatsache, dass die Substanzen, die die Auxin-Aktivität haben, im allgemeinen oberflächenaktiv sind (VELDSTRA, '44), diese Auffassung begründen. Es gibt aber auch eine Möglichkeit, dass die Strukturveränderung der Plasmamembran ein sekundäres Resultat der Zellenmetabolismusveränderung ist.

Die Versuche wurden im pflanzenphysiologischen Institut der Universität zu Kyoto angefangen und im unseren Institut zum Schlusse gebracht. Hier sei es mir gestattet, meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Joji ASHIDA, für seine Anregung und ständige Anleitung den besten Dank auszusprechen. Ebenso danke ich Herrn Jiro KATO für seine wertvolle Unterstützung bei der Arbeit.

Zusammenfassung

1. Die Permeabilität der Zwiebelschuppenepidermiszellen von *Allium cepa* für Harnstoff und Glycerin wird durch 10^{-8} Mol. Heteroauxin deutlich erhöht und durch 10^{-3} Mol. gehemmt.

2. Bei Zusatz von 10^{-8} Mol. Heteroauxin wird die Permeabilität für Glycerin stärker erhöht als die für Harnstoff. Daraus ergibt sich, dass die Lipoidphase, wie die Eiweissphase, der Protoplasmamembran durch die physiologische Konzentration des Heteroauxins beeinflusst wird.

Literatur

COLLANDER, R. und BÄRLUND, H.: Acta. Bot. Fenn. 11 (1933). DE HAAN, Iz.: Protoplasma. 24 (1935). DRAWERT, H.: Planta. 41-1 (1952.) V. GUTTENBERG, H. und BEYTHIEN, A.: Planta. 40-1 (1951). V. GUTTENBERG, H. und MEINL, G.: Planta. 41-1 (1952a). V. GUTTENBERG, H. und MEINL, G.: Planta. 41-2 (1952b). HOFMEISTER, Dr. L.: Biblioth. Bot. 113 (1935). HUBER, B. und SCHMIDT, H.: Protoplasma. 20 (1934). KACZMAREK, A.: Protoplasma. 6 (1929). SCHMIDT, H.: Protoplasma. 33 (1939). SEEMANN, F.: Protoplasma. 39 (1950). VELDSTRA, H.: Enzymologia. 11 (1944). WEBER, F.: Protoplasma. 15 (1932).