

Die Auslösung von Entwicklungsvorgängen durch Wirkstoffe*)

Von Prof. Dr. ALFRED KÜHN, Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem

(Eingr. 17. März 1939)

Die Grundlage jeder Entwicklung ist das Wachstum, die Vermehrung der lebendigen Substanz, die Vergrößerung der Einzelzellen und ihre Vermehrung durch Teilung. Immer ist Formbildung mit dem Wachstum verknüpft oder schließt sich daran an. Das Wachstum ist Mittel und Widerspiel der Formbildung. Der Gegensatz von Wachstum und Formbildung wird am sinnfälligsten, wenn man Zellen aus dem Keim eines warmblütigen Wirbeltiers herausnimmt und in Gewebekultur hält. In einem geeigneten Nährmedium, Blutserum und Embryonalextrakten, wachsen z. B. Stückchen von Bindegewebe aus einem Hühnerembryo unter Teilung ihrer Zellen in etwa 2 Tagen auf die doppelte Masse heran. Sehr eindrucksvoll führt die Bewegungs- und Teilungsvorgänge der Zellen in einer wachsenden Gewebekultur die Mikrokinematographie unter Zeitraffung vor Augen. Wenn man die Gewebekultur zerteilt und ihre Stücke regelmäßig in neues Nährmedium überführt, so läßt sich das Gewebe unbegrenzt mit ungehemmter Geschwindigkeit fortzüchten. Ihr zufolge könnte ein Gewebestückchen von $\frac{1}{10}$ Milligramm Ausgangsgewicht in weniger als einem halben Jahr zu einer Masse heranwachsen, die einen Würfel von 1 km Seitenlänge erfüllt — einen Raum, den etwa die gesamte heute lebende Menschheit einnehmen würde. Das Wachstum in einer Gewebekultur ist chaotisch, ohne Maß, ohne Ordnung und Richtung. Die erste Leistung, die ein Keim bei seiner Gestaltung zu vollbringen hat, ist die Bändigung und Ordnung des Wachstums und der Vermehrung seiner Zellen.

Das veranschauliche ein Beispiel: Wenn an der Oberfläche eines jungen Keims eine Gliedmaße sich zu bilden beginnt, setzt eine örtliche Zellenvermehrung ein. Ein Auswuchs springt vor, von Epithel überzogen und von embryonalem Bindegewebe erfüllt, und bald wachsen Blutgefäße hinein. Er nimmt im Vorwachsen eine bestimmte Gestalt an. Im Innern ordnen sich die Zellen zu Organanlagen: Säulen von dichter liegenden Bindegewebszellen formen die ersten Anlagen der Skelettstücke der Gliedmaßen, Zellenzüge bilden die Muskeln vor. Hier vollziehen sich die Zellteilungen in räumlich geordneten Verbänden mit abgestufter Geschwindigkeit. Als weitere Schritte der Formbildung treten nun histologische Differenzierungen auf: Die Zellen der Skelettanlagen bilden sich in Knorpelzellen um und scheiden die Zwischensubstanz ab, welche den Knorpel kennzeichnet. Unter weiterer Vermehrung der nunmehr differenzierten Zellen wird die Gestalt der einzelnen Skelettstücke weiter ausgeformt. Später setzt dann an ihnen ein eingreifender Umbildungsvorgang ein: Der Knorpel wird aufgelöst, abgebaut und allmählich durch neu aufgebauten Knochen ersetzt.

Entwicklungsgeschichtliche Grundvorgänge, wie sie dieses Beispiel zeigt, geordnetes Wachstum, Bildung von Zellgruppen als Organanlagen, histologische Differenzierung der Einzelzellen, Ausformung der Organanlagen in bestimmte Gestalten, Umbildung von Geweben, folgen in allen Entwicklungsabläufen der Tiere und in entsprechender Weise, wenn auch mit anderen Teilstrukturen, bei den Pflanzen in bestimmter Reihenfolge aufeinander. Und in

jedem Falle führen diese Vorgänge zu den arteigentümlichen Organisationsmerkmalen. Die entwicklungsphysiologische Frage lautet nun: Wodurch werden Ort und Zeit des Eintritts der Einzelvorgänge, und wodurch wird ihre Verlaufsart bestimmt? Welcher Mittel bedient sich der Organismus, um ein bestimmtes Entwicklungsgeschehen in seinen Teilen zu erzielen?

Wir gehen von drei ein knappes Menschenalter zurückliegenden Entdeckungen aus, die zeigten, daß bestimmte Entwicklungsvorgänge durch Wirkstoffe hervorgerufen werden; zwei beziehen sich auf Grundvorgänge der Zellteilung und des Wachstums von Pflanzen, die dritte auf eine komplizierte Umformung des Gesamtkörpers bei Wirbeltieren.

Der Berliner Botaniker *Haberlandt* stellte in seinen Studien zur Physiologie der Zellteilung (1913—1921) fest, daß in Zellen pflanzlicher Dauergewebe, die sich normalerweise nicht mehr teilen, z. B. in Scheibchen von Kohlrabi- oder Kartoffelknollen, Blattgeweben oder Haaren, Zellteilungen eintreten können, wenn den Zellen Stoffe von verletzten oder absterbenden Zellen zufließen (Abb. 1). Es gibt also Stoffe, die Zellteilungen auslösen. *Haberlandt* nannte sie nach ihrer Herkunft Wundhormone.

Die zweite Entdeckung knüpft an die altbekannte Tatsache an, daß wachsende Keimlinge sich zum Licht hinkrümmen durch stärkere Streckung der nicht belichteten Seite (Abb. 2a). Schon *Ch. Darwin* hatte (1880/81) festgestellt, daß bei den Keimlingen von Gräsern die äußerste, 1—2 mm lange Spitze der Sprossscheide oder „Koleoptile“ den Lichtreiz aufnimmt: Wird die Spitze mit einem Stanniolkäppchen abgedeckt, so unterbleibt bei einseitiger Belichtung die Krümmung (Abb. 2b). Wird nur die Spitze einseitig beleuchtet, so krümmt sich die Koleoptile (Abb. 2c). 1910 schnitt nun der Pflanzenphysiologe *Boysen-Jensen* in Kopenhagen die Koleoptilenspitze ab und klebte sie mit 10%iger Gelatine wieder auf den Stumpf und fand, daß der Anstoß zur Krümmung von der belichteten Spitze durch die Gelatine hindurch auf den Stumpf übertragen wird (Abb. 2d). Er schloß daraus, daß der Anstoß zur Lichtkrümmung ein Stoff ist, der

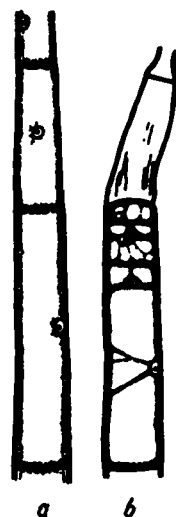


Abb. 1. Haar von *Coleus* (tropische Lippenblütler). a) unverletzt, b) nach Zerschneiden der oberen Zellen, wodurch in der unteren Zelle wiederholte Teilungen ausgelöst werden. (Nach *Haberlandt* 1921.)



Abb. 2. Schema zum Nachweis der Aufnahme des Lichtreizes durch die Koleoptilenspitze und eines das Streckungswachstum bewirkenden Stoffes; in a—d Belichtung von rechts, e ohne Belichtung.

*) Vorgetragen im Harnack-Haus der Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften am 22. Februar 1939.

von der Spitze abwärts zu den sich streckenden Teilen wandert. Hiermit war der Grund zu der Wuchsstoff-Forschung gelegt, die sich dann vor allem in dem Utrechter Forscherkreis um den Botaniker *F. W. Went* und den Chemiker *Kögl* entfaltet hat. *Went* fand (1926) den Wirkstoff aus abgeschnittenen Koeptilenspitzen in Agarwürfeln auf und löste mit diesen, indem er sie einseitig auf einen Koeptilensumpf aufsetzte, dieselbe Krümmung wie durch eine einseitig belichtete Spitze aus (Abb. 2e). *Kögl* u. Mitarb. klärten (1933) die Konstitution des Wirkstoffs auf, nachdem als Massenmaterial für seine Gewinnung eine ausgiebigere Quelle als Koeptilenspitzen (im Menschenharn) gefunden worden war. Wir wissen jetzt, daß nicht nur die Reizkrümmungen, sondern wichtige Vorgänge des Wachstums der höheren Pflanzen überhaupt von dem pflanzlichen Wuchshormon Auxin gesteuert werden: das Streckungswachstum unterhalb der Sproßspitze (Abb. 3a, J_2 — J_3) und das sekundäre Dickenwachstum der ausgestreckten Sproßteile (Abb. 3a, J_1). Das Streckungswachstum erfolgt durch Zellverlängerung (Abb. 3b—d).

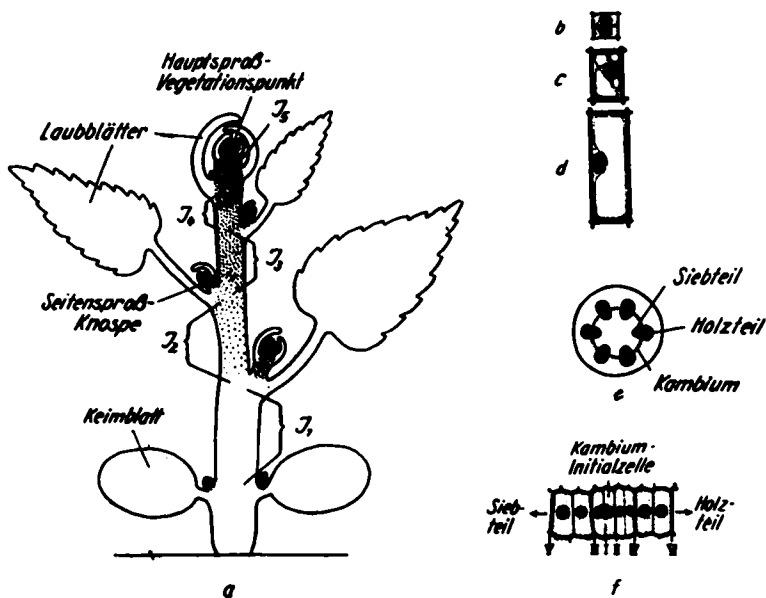


Abb. 3. a) Schema einer dikotylen Pflanze. J_1 — J_3 nacheinander gebildete Internodien (Stengelglieder zwischen den Blattansätzen). Schwarz embryonale Sproßspitzen, punktiert Streckungsgebiete; b) embryonale Zellen aus der Sproßspitze; c) d) sich streckende Zellen aus dem darunterliegenden Gebiet; e) schematischer Querschnitt durch den Sproß; f) Schema einer Radialreihe des Kambiums, folgeweise Abtellung von Zellen nach innen und nach außen von der Initialzelle des Kambiums; I, II, III usw. die als letzte, zweitletzte, drittletzte usw. gebildete Wand.

Diese wird ausgelöst durch Auxin, das von der Endknospe (dem Vegetationspunkt und seinen embryonalen Blättern) gebildet und im Sproß abwärts geleitet wird. Das sekundäre Dickenwachstum geschieht durch Zellteilungen im Kambium, einer dünnen zylindrischen, im Sproßquerschnitt ringförmigen Schicht embryonaler Zellen, die im Sproß zwischen den Holzteilen und den Siebteilen der Gefäßbündel und zwischen diesen durch das Grundgewebe verläuft (Abb. 3e). Die in der Mitte der Kambiumzone liegenden „Initialzellen“ teilen von sich abwechselnd nach innen und nach außen Zellen ab, die heranwachsen und sich weiter teilen (Abb. 3f). Von den so gebildeten Zellen differenzieren sich dann die außerhalb des Kambiumrings liegenden Zellen zu Elementen des Siebteils, innerhalb gelegene zu solchen des Holzteils. Die Teilungsbereitschaft der Kambiumzellen wird „aktiviert“ durch Wuchsstoffzufluß von den austreibenden Seitensprossen und wachsenden Blättern.

1912 beobachtete der Amerikaner *I. F. Gudernatsoch* bei Fütterungsversuchen mit Kaulquappen, daß diese Froschlaven durch Fütterung mit Schilddrüse zu verfrühter Metamorphose in die Landform veranlaßt werden (Abb. 4a, b). Damit wurde ein auffallender tierischer Formwechselvorgang ein Gegenstand der Hormonphysiologie. Ja, der „Kaulquappentest“ ist für die Auffindung der wirksamen Schilddrüsenstoffe von großem Wert geworden. Die Metamorphose der Amphibien ist ein Differenzierungsablauf, der alle Organe, Haut, Atmungs-, Kreislauf-, Verdauungsorgane und Skelett grundlegend ändert. Larvenanteile, wie der Ruderschwanz und die Kiemen, werden eingeschmolzen, neue Organe, wie die Beine, werden gebildet. Diese Vorgänge sind an die Tätigkeit der Schilddrüse gebunden: Im normalen Entwicklungsverlauf steigt unmittelbar vor der Metamorphose die Absonderungstätigkeit der Schilddrüse, die bis dahin noch wenig entwickelt war, plötzlich stark an. Nimmt man die Schilddrüse aus einer Larve heraus, so verwandelt sie sich nicht. Sie ist aber wieder dazu imstande, wenn man ihr die Schilddrüse einer anderen Larve einsetzt oder ihr Schilddrüsensubstanz oder den inzwischen aufgefundenen wirksamen Stoff, das Thyroxin, zuführt. Dieses zeigt seine Wirkung noch in einer Verdünnung von 1:500 000 000.

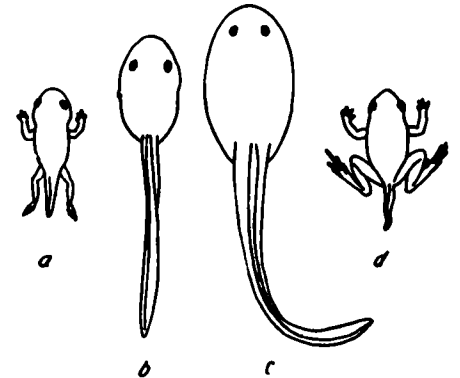


Abb. 4. Beeinflussung der Frosch-Metamorphose durch Hormone. a) Durch Thyroidea-fütterung beschleunigte Umwandlung; b) gleich alte unbehandelte Kaulquappe; c) durch Thymus-fütterung an der Verwandlung verhinderte Riesenschildkröte; d) gleich altes junges Fröschen mit kleinem Schwanzrest.

Hier haben wir alle Kennzeichen einer Hormonwirkung: Hormone sind Botenstoffe zwischen bestimmten Sendern und bestimmten Empfängern, die auf die Botschaft antworten, bestimmte, in sehr kleinen Mengen wirkende chemische Reizstoffe, die von bestimmten Zellen gebildet werden und in bestimmten anderen Zellen bestimmte Reaktionen auslösen. Die vierfache Spezifität — des

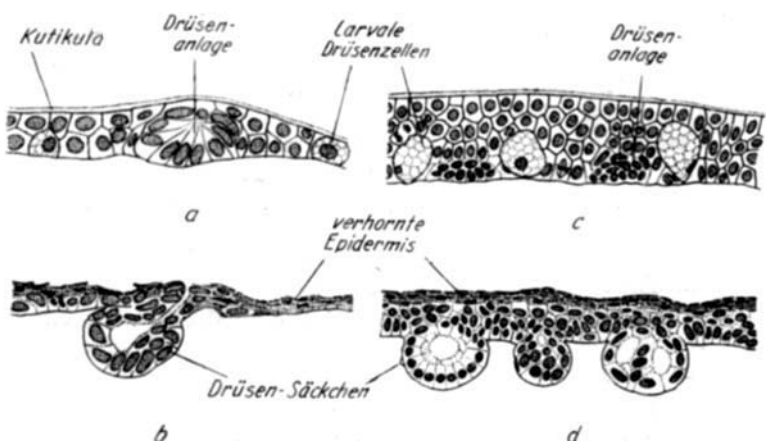


Abb. 5. Metamorphoseveränderungen der Salamander-Oberhaut. a), b) Oberhaut des ersten, normalerweise noch im Uterus eingeschlossenen Larvenstadiums nach künstlicher Geburt und dreiwöchigem Aufenthalt im Wasser, a) ohne Hormonbehandlung, b) nach Thyroxineinspritzung; c), d) Haut der geburtstüchtigen Larve nach 2 Wochen Aufenthalt im Wasser; c) ohne Hormonbehandlung; d) nach Thyroxineinspritzung. (Nach O. Kuhn 1932.)

Stoffes, des Erzeugers, des Empfängers und seiner Reaktionsweise — ist in unserem Beispiel verwirklicht.

Für die Ordnung des Entwicklungsgeschehens ist weiterhin unentbehrlich, daß zur rechten Zeit die wirkenden Stoffe ausgesandt werden und daß rechtzeitig die Empfängergewebe ihre Reaktionsbereitschaft erlangen. Das läßt sich gut an den Metamorphoseveränderungen der Amphibienhaut veranschaulichen: Die Haut der jungen Larve eines Salamanders besteht aus 2 Zellschichten (Abb. 5a). Beim Einsetzen der Metamorphose wird die Oberhaut vielschichtig durch rege Zellteilungen in der untersten Zellschicht (Abb. 5c), und beim Übergang zum Landleben verhörnen die obersten Zellschichten. Ferner verschwinden die larvalen Drüsenzellen, und die Anlagen der Drüsensäckchen der Landform bilden sich aus. Diese Vorgänge können sehr beschleunigt werden, wenn man einer älteren Wasserlarve Thyroxin einspritzt (Abb. 5d). Läßt man aber Thyroxin auf sehr junge Larven einwirken, so reagiert die Epidermis unharmonisch mit einer Teilreaktion, nämlich Verhornung, die alle vorhandenen Zellschichten erfaßt und so die Oberhaut wachstumsunfähig macht (Abb. 5b); in einen Hornsack eingeschlossen gehen die Larven zugrunde. Erst in einem bestimmten Entwicklungsstadium gewinnt also die Epidermis die Fähigkeit, sich durch Zellteilungen zu verdicken, was Voraussetzung für die normale Hautumwandlung ist.

Während eine übermäßige Zuführung von Schilddrüsenhormon zu einer überstürzten Metamorphose führt, bewirkt Fütterung mit Thymusdrüse vermehrtes Wachstum und Ausbleiben der Metamorphose. Die so behandelten Froschlärven wuchsen zu Riesenskualquappen heran (Abb. 4c), während die gleich alten Kontrolltiere sich in kleine Fröschen verwandelten (Abb. 4d). Die Hormone der beiden Drüsen mit innerer Sekretion, Schilddrüse und Thymus, wirken also antagonistisch auf den Entwicklungsverlauf.

Im Falle des Thyroxins bewirkt ein bekanntermaßen den Stoffwechsel vielseitig beeinflussendes Hormon auch als „morphogenetisches“ oder Formbildungshormon den Übergang von einer Entwicklungsstufe zu einer anderen. Richtung und Verlaufsart der Veränderung sind in den reagierenden Geweben vorbestimmt.

Einen Schritt weiter führen Versuche an der Insektenmetamorphose. Schnürt man eine erwachsene Schmetter-

lingsraupe, die kurz vor der Verpuppung steht, quer durch, so verpuppt sich das Vorderende, während das Hinterende unverpuppt bleibt (Abb. 6b). Ebenso verliert eine ganze Raupe die Verpuppungsfähigkeit, wenn man ihr das Gehirn herausnimmt. Sie stirbt dann aber nicht rasch ab, sondern kann als „Dauerraupe“ wochen-, ja monatelang weiterleben unter Verbrauch des angesammelten Fettvorrats. Setzt man der Dauerraupe das Gehirn einer anderen erwachsenen Raupe irgendwo in den Leib, so kann Verpuppung eintreten (Kahn u. Piepho 1936, Plagge 1938). Das Gehirn bewirkt die Verpuppung also nicht als nervöses Zentralorgan, sondern als Spender eines Stoffes, eines Verpuppungshormons, das in oder am Gehirn liegende Zellen erzeugen und an das Blut abgeben.

Schnürt man ausgewachsene Raupen durch, wenn das Verpuppungshormon sich schon im Körper ausgebreitet hat, so verpuppt sich auch das Hinterende (Abb. 6c). Wird das Hinterende abgeschnürt, wenn die Ausscheidung des Verpuppungshormons schon begonnen hat, so können „Teilpuppen“ auftreten: Nur einzelne, besonders für das Hormon empfindliche Hautstellen machen die Verpuppungsveränderungen durch. In einzelnen Blasen wird die Raupenhaut abgehoben, und in dem Dauerraupekörper stehen einzelne Flecken von Puppenhaut (Abb. 6d). Die Haut reagiert also nicht als Ganzes, sondern jede Hautstelle spricht an nach ihrer Empfindlichkeit.

Hieran schließt sich ein schönes Experiment, das meinem Mitarbeiter Piepho (1938) gelungen ist: Schneidet man ein Stückchen aus der Raupenhaut, die aus dem lebenden Epithel und einer von ihm abgeschiedenen Deckschicht, der Kutikula, besteht, heraus und steckt es einer anderen Raupe in die Leibeshöhle, so wächst von seinem Rande das Epithel unter zahlreichen Zellteilungen aus und schließt sich zu einem Bläschen, u. zw. so, daß die Epithelunterseite nach außen gekehrt ist (Abb. 7a, b). Die Raupenkutikula liegt also nach dem Innern des Bläschens zu. Gegenüber einer Körperoberfläche ist also das Epithel des eingepflanzten Gebildes oder „Implantats“ topographisch verkehrt, physiologisch ist es aber richtig orientiert; denn es kehrt seine Basis dem Blut des Wirtes zu. Dieses Implantatbläschen, das aus einem kleineren Stück eingepflanzten „Stammepithels“ und einem größeren

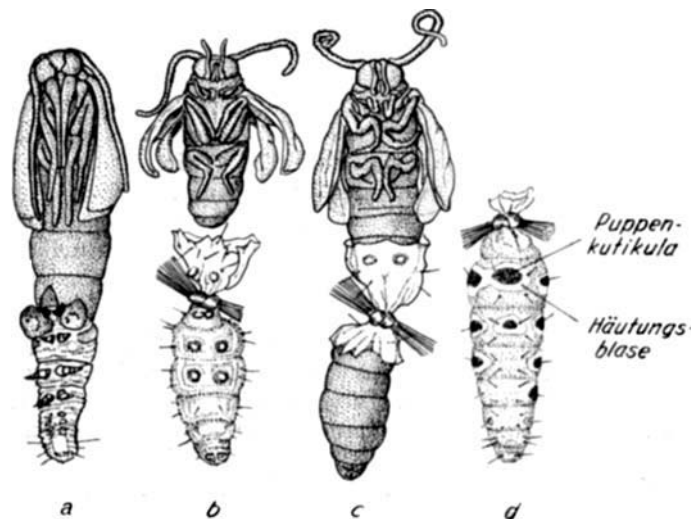


Abb. 6. Auslösung der Verpuppung durch ein aus dem Kopf stammendes Verpuppungshormon. a) Frisch geschlüpfte normale Puppe, Raupenhaut noch nicht vollständig abgestreift; b) Schnürung einer erwachsenen Raupe vor, c) nach Ausscheidung des Verpuppungshormons; d) Hinterende einer während der Ausscheidung des Verpuppungshormons durchgeschnürten Raupe.

(Nach Kahn u. Piepho 1935.)

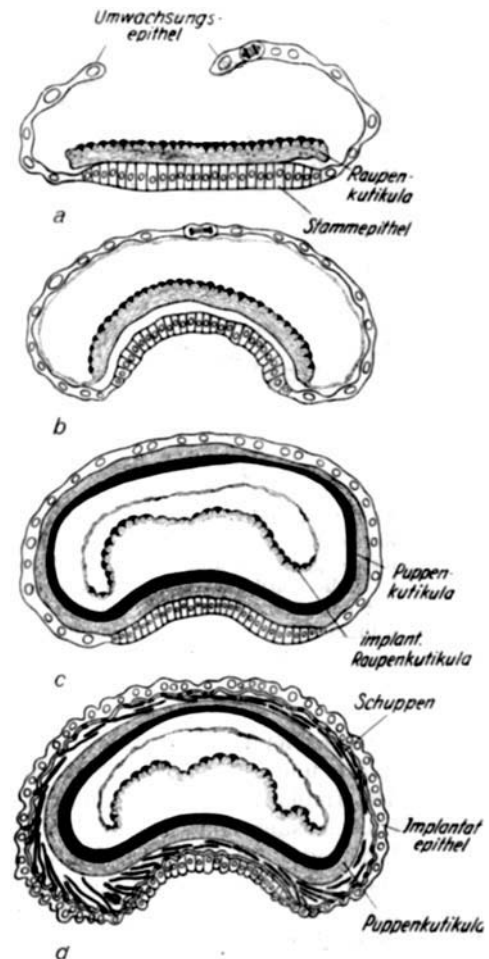


Abb. 7. Entwicklung eines Implantats von Raupenhaut nach Einstecken in eine Raupe des letzten Stadiums. Schematische Schnitte. a), b) Bildung des Umwachsungsepithels, Umbildung des Implantats in ein Bläschen; c) Bildung von Puppenkutikula während der Verpuppung des Wirts; d) vollständig metamorphisiertes Implantat aus dem fertig entwickelten Wirt.

Teil von neugebildetem „Umwachsepithel“ besteht, hat sich nun als vorzügliches Reagens auf hormonale Einflüsse, die vom Wirt ausgehen, erwiesen. Wenn der Wirt sich verpuppt, macht auch das Implantat die Verpuppungsveränderungen durch. Wie das Körperepithel sich

hin gleiches Hormon bewirkt einen Übergang von einem Entwicklungszustand in einen anderen. Bei den Insekten mit vollständiger Verwandlung setzt sich aber die Metamorphose aus mehreren einschneidenden Wandlungen zusammen, und jede Entwicklungsphase wird hormonal ausgelöst. Schnürt man eine junge Puppe hinter dem Brustabschnitt quer durch, so bildet nur das Vorderende die fertige Schmetterlingsorganisation aus, das Hinterende bleibt eine „Dauerpuppe“. Heilt man ein solches Hinterende aber mit einer anderen Puppe so zusammen, daß ein Blutaustausch stattfindet, so tritt in ihm die Imaginalausbildung ein. Durch diesen „Parabioseversuch“ wurde zuerst (durch Bodenstein 1938) die Wirksamkeit eines Imaginalhormons wahrscheinlich gemacht. Im selben Sinne spricht die vollkommene Verwandlung der bläschenförmigen Implantate in der Leibeshöhle in gleichem Schritt mit dem Wirt.

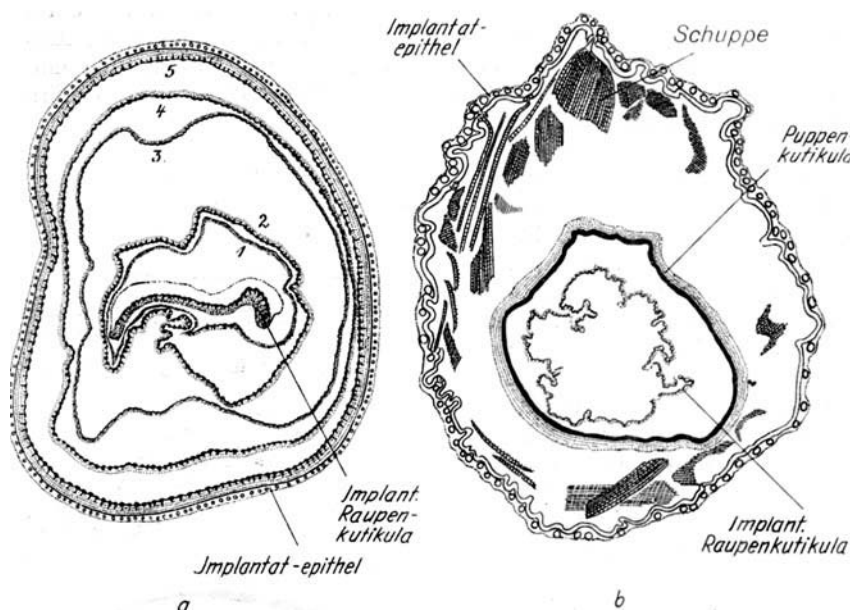


Abb. 8. Schnitte durch Implantate von Raupenhaut; a) von der erwachsenen Raupe in eine junge und nach zweimaliger Häutung nochmals in eine junge Raupe gebracht und im zweiten Wirt bis zum letzten Raupenstadium gelassen. 1—5 die Kutikulen von überzähligen Raupenhäutungen, die jeweils gleichzeitig mit dem Wirt ausgeführt wurden; b) Haut eines eben aus dem Ei geschlüpften Räumchens in eine erwachsene Raupe eingepflanzt und mit dem Wirt verpuppt und in Schmetterlingshaut verwandelt. (Nach Piepho 1938.)

von der letzten Raupenkutikula abhebt, die teilweise aufgelöst und dann abgestreift wird, so stößt das Epithel des Implantats die Raupenkutikula und das von dem Umwachsepithel gebildete dünne Chitinhäutchen ins Innere des Bläschens ab (Abb. 7c). Wenn an der Körperoberfläche des Wirts die Puppenkutikula abgeschieden wird, so scheidet auch das Implantat eine typische zweischichtige Puppenkutikula ab (Abb. 7c). Diese bildet eine völlig geschlossene Kapsel, in welcher die Raupenkutikula eingeschlossen ist. Wenn dann in der Puppe das Hautepithel des Wirts sich von der Puppenhülle abhebt und die Schmetterlingsschuppen bildet, so hebt sich das Epithel des Implantats von der Puppenkutikulakapsel ab und bildet eine typische beschuppte Schmetterlingshaut aus (Abb. 7d). Aus dem implantierten Hautstück entsteht also ein kleines Stück umgekehrten Schmetterlings im Innern des Wirts. Die Verwandlungen des Implantats werden durch den Zufluß der Hormone vom Wirtskörper ausgelöst. In einer Dauerraupe leben die Implantatbläschen solange wie der Wirt, verwandeln sich aber nicht.

Die Metamorphosenhormone sind nicht artspezifisch: Implantatbläschen von einer Schmetterlingsart werden im Körper einer anderen Art zur Metamorphose gebracht. Ja, sogar in ganz verschiedenen Insektenordnungen ist dasselbe Metamorphosenhormon wirksam: Aus jungen Schmetterlingspuppen ließ sich ein Extrakt gewinnen, der Verpuppungserscheinungen in „Dauermaden“ von Fliegen hervorruft, die, wie die Dauerraupe, durch Abschnüren des Vorderendes erhalten wurden (Plagge u. Becker 1938).

Das von der Insektenmetamorphose Geschilderte scheint der Wirkung des Thyroxins in der Amphibienmetamorphose zu gleichen: Ein über eine große systematische Gruppe

Auch die Vorgänge der Raupenhäutung werden hormonal bedingt: Bringt man ein Stück Raupenhaut in einen Wirt, der noch weitere Raupenhäutungen durchmacht, so bildet auch das Implantat nach Abstoßen seiner Raupenkutikula eine neue Raupenkutikula. Wird ein Hautstück aus einer erwachsenen Raupe in eine junge Raupe eingepflanzt, so häutet sie sich noch mehrmals mit dem Wirt. Ist dieser erwachsen, so kann man das Implantat herausnehmen und es wieder in eine junge Raupe stecken und es so zu zahlreichen (Abb. 8a), durch fortgesetzte Wiederholung des Verfahrens wahrscheinlich unbegrenzt vielen Raupenhäutungen mit seinem jeweiligen Wirt veranlassen.

Auch Wiederholung der Verpuppungsvorgänge ist möglich: Implantiert man ein Stück Haut von einer jungen Puppe in eine erwachsene Raupe zurück, so wird vom Epithelrand her ein Bläschen gebildet, wie von Raupenhaut, und wenn der Wirt sich verpuppt, wird nach dem Bläscheninnern zu wieder eine Puppenkutikula abgeschieden (Abb. 9a). Dieser erneute Vollzug eines Vorgangs, der normalerweise nur einmal erfolgt, ist überraschender als die fortgesetzte Wiederholbarkeit der sowieso mehrmals eintretenden Raupenhäutung. Noch unerwarteter aber war, daß sogar die Imaginalkutikula mit ihren Schuppen, die ja normalerweise den Falter bis zu seinem Tode bedeckt, im Implantat noch einmal abgehäutet wird, wenn man ein Hautstück mit gebildeten Schuppen aus einer alten Puppe in eine ganz junge Puppe zurückverpflanzt. Allerdings ist es noch nicht gelungen, ein zweites Mal Schuppenbildung zu erzwingen; die in der Puppe noch einmal gebildete Kutikula ist atypisch.

Nicht nur die Wiederholung eines Entwicklungsvorgangs ist möglich; man kann auch Entwicklungsphasen überschlagen: Die Haut eines eben aus dem Ei geschlüpften Räumchens kann sich als Implantat in einer erwachsenen Raupe sofort mit dem Wirt verpuppen (Abb. 8b); die ganze Raupenentwicklung mit ihren 4—5 Häutungen fällt aus.

Bei den Insekten werden also mehrere verschiedene Entwicklungsschritte durch mehrere, nacheinander auftretende Hormone ausgelöst. Dasselbe Hautstück hat mehrere Entwicklungsmöglichkeiten; welche davon eintritt, wird durch die Natur der Hormone bestimmt, die im Augenblick auf das Hautstück wirken.

Wahrscheinlich finden in der Insektenentwicklung auch Wirkstoffantagonismen statt, wie wir sie bei den Wirbeltieren kennenlernten (Thyreidea-Thymus).

Die Haut des Implantatbläschens erscheint nach den bisher geschilderten Versuchen als der Spielball der Wirtshor-

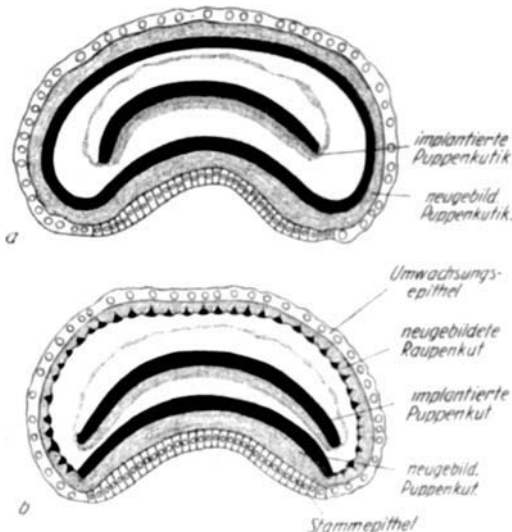


Abb. 9. Schematische Schnitte durch Implantate von Puppenhaut. a) Nach Einstecken in eine erwachsene Raupe, nochmalige Bildung von Puppenkutikula gleichzeitig mit dem Wirt; b) nach Einstecken in eine jüngere Raupe; das Umwachsungsepithel bildet Raupenkutikula, das Stammepithel wieder Puppenkutikula während der Raupenhäutung des Wirts.

mone; aber das ist sie doch nicht ganz: *Piepho* hat Hautstücke aus der jungen Puppe zurückgebracht in junge Raupen. Wenn der Wirt nun eine Raupenhäutung durchmacht, so schließt sich ihm das Umwachsungsepithel an; das Stammepithel, dessen Zellen sich schon einmal verpuppt hatten, reagierte zwar auch auf das Raupenhäutungshormon, aber nicht mit Bildung einer neuen Raupenkutikula, sondern mit nochmaliger Verpuppung. Durch den Vollzug der Verpuppung ist also die Reaktionsmöglichkeit der Epithelzellen eingeschränkt worden; die zuletzt vollzogene Reaktion können sie wiederholen; zu einer früheren ließen sie sich nicht wieder veranlassen. Die von dem Stammepithel ausgewachsenen Zellen haben jedoch diese Reaktionsbeschränkung nicht übernommen; sie sind durch das Auswachsen wieder voll reaktionsfähig geworden. Für die Antwort auf einen Hormonreiz ist also die Vorgeschichte der Empfängerzellen entscheidend.

Die phasenspezifischen Metamor-

phosenhormone der Insekten bestimmen, welche Stufe der Entwicklung eintritt, aber nicht, was für ein Körperteil aus einem Hautstück hervorgeht. Wenn Wirkstoffe bewirken sollen, daß an einem bestimmten Ort ein bestimmtes Organ angelegt wird, können sie nicht durch den allgemeinen Blutumlauf verteilt werden. Organlokalisierende Wirkstoffe müssen in einer bestimmten räumlichen Anordnung gebildet und nur bestimmten Stellen zugeführt werden. Hierfür kennen wir Beispiele aus der Entwicklung der Wirbeltiere, vor allem der Amphibien.

Durch außerordentlich folgerichtig durchgeführte Transplantationsversuche zwischen jungen Molchkeimen wies *Spemann* (1918—1924) nach, daß die Bildung der „Achsenorgane“ des Keims, d. h. des Zentralnervensystems, der Grundlage der Wirbelsäule (der Chorda) und der Anlagen der Muskelsegmente durch eine Wirkung ausgelöst wird, die von einem bestimmten Keimteil ausgeht. Abb. 10 zeigt die Entwicklungsvorgänge, welche zur Bildung jener Organanlagen führen. Von der Wand der Keimblase (Abb. 10a) wird im Vorgang der „Gastrulation“ der Urdarm eingestülpt (Abb. 10b). Sein Dach bildet die Anlage der Chorda (Abb. 10c). Rechts und links vom Urdarmdach erstrecken sich zwischen der Urdarmwand (dem Entoderm) und der Hautschicht (dem Ektoderm) die Mesodermflügel; später trennt sich die Chordaanlage vom Urdarm, dessen Wände sich unter ihr schließen (Abb. 10d). Die oberen, der Chorda näheren Teile des Mesoderms gliedern sich in hintereinanderliegende Abschnitte, die Ursegmente der Muskulatur (Abb. 10f, g). Das Zentralnervensystem entsteht im Ektoderm des Rückens über dem Urdarmdach als eine verdickte Platte, die von zwei Randwülsten begrenzt wird (Abb. 10d, e). Dann biegt sich die Nervenplatte zu einer Rinne ein (Abb. 10f) und schließt sich zu einem Rohr (Abb. 10g).

Überpflanzt man nun ein Stück der oberen Urmundlippe (Abb. 10b) in oder unter die Bauchhaut eines anderen

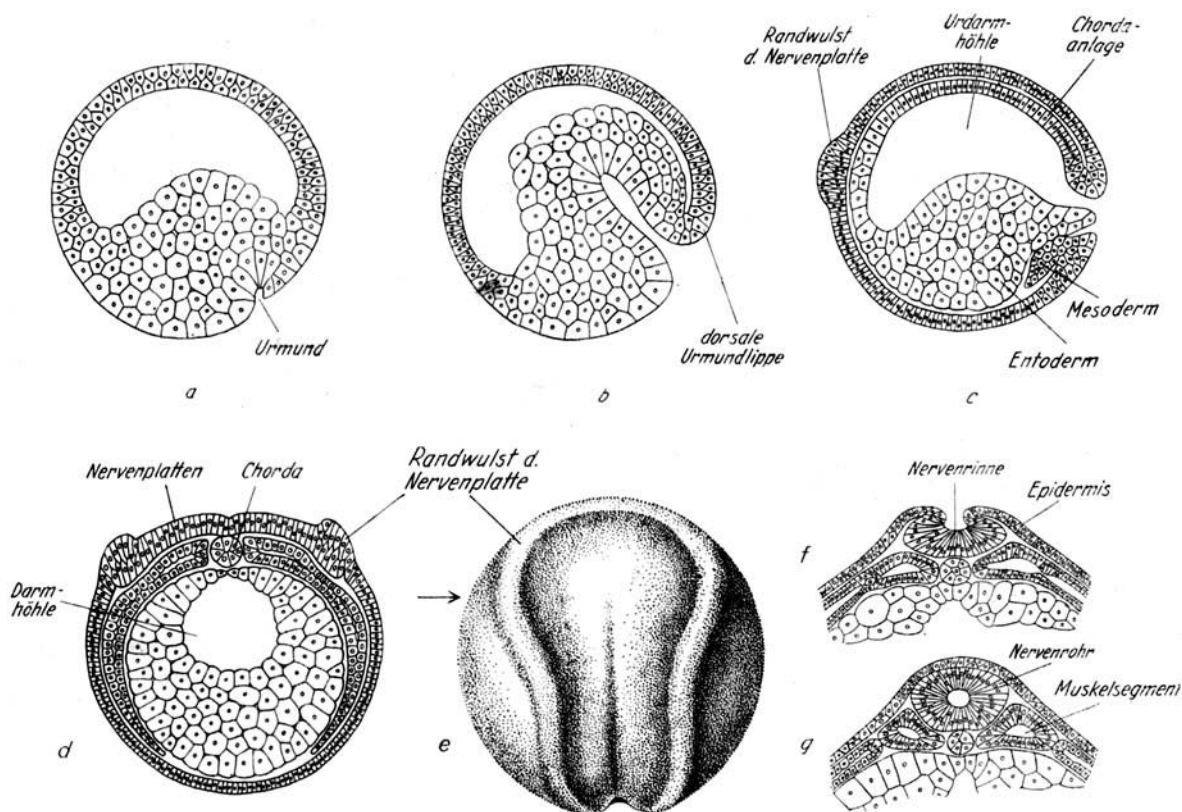


Abb. 10. Bildung der Keimblätter und Organanlagen bei einem Molch, schematisch. a) — c) Längsschnitte durch Keime während der Einstülpung des Urdarms (Gastrulation); d) Querschnitt durch ein älteres Keimstadium (Neurula) während der Bildung der Anlage des Nervensystems; e) Rückenansicht eines solchen Keimes (→ Schnitttrichtung von d); f, g) Querschnitte durch den Rückenteil älterer Keime.

Keimes vor oder während der Urdarminstülpung (Abb. 11a), so entwickelt sich das Implantat zu den Teilen der Chorda und des Mesoderms, welche es an seinem Ort gebildet hätte, und es beeinflusst die Umgebung so, daß aus ihm und Teilen des Wirts eine überzählige sekundäre Embryonalanlage

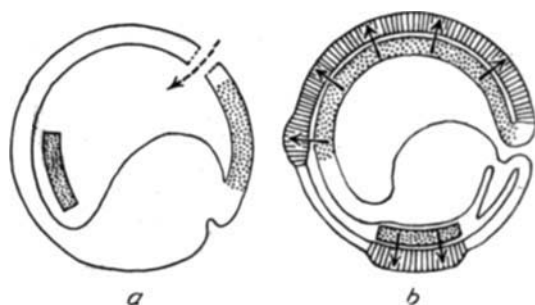


Abb. 11. Schema der Organisator-Implantation. a) Einstecken eines Stücks dorsaler Urmundlippe in die Keimblasenhöhle eines anderen Keimes am Anfang der Gastrulation; b) Lage des Implantats nach Ablauf der Gastrulation und Induktionswirkung des Urdarmdachs und des Implantats (Pfeile). Punktirt dorsale Randzone und daraus hervorgehendes Urdarmdach (Chordaanlage), gestrichelt die primäre Nervenplatte des Wirtskeims und die in der Bauchhaut induzierte Nervenplatte.

entsteht. Über dem Implantat wird die Bildung einer zweiten Nervenplatte (Abb. 11b) und weiterhin eines Nervenrohrs (Abb. 12a) veranlaßt. Äußerlich hebt sich die sekundäre Embryonalanlage als zweiter Rücken heraus, der oft in ein Schwänzchen ausläuft (Abb. 12b). In dem das Implantat umgebenden Wirtsgewebe wird die Bildung weiterer Chordateile, von Muskelsegmenten und anderen mesodermalen Organen (Vornierengängen) und einer sekundären Darmhöhle ausgelöst (Abb. 12a). Die sekundäre Embryonalanlage kann beträchtliche Größe und einen hohen Grad der Ausbildung der Körperteile (Kopf, Schwanz, Gliedmaßenknospen) und der inneren Organisation erreichen, so daß der Keim als Doppelbildung erscheint (Abb. 12c, vgl. die normale junge Larve Abb. 12d). Das Material der dorsalen Urmundlippe, das sich bei der Gastrulation zum Urdarmdach einstülpt (vgl. Abb. 10a—d, 11a, b), erweist sich durch diese Versuche als „Organisator“.

der in dem benachbarten Keimesmaterial Organanlagen „induziert“.

Diese „Induktionswirkung“ vollzieht sich offenbar durch ein chemisches Mittel, das von dem Urdarmdach abgegeben wird: Auch ein durch Hitze, Gefrierenlassen, Alkohol, Aceton, Äther abgetötetes Stück Urdarmdach ruft, unter das Ektoderm eines jungen Keims gebracht, die Bildung eines Nervenrohrs hervor. Überraschenderweise können auch andere Keimsteile, die lebend nicht induzieren, abgetötet diese Wirkung ausüben; und aus Organen verschiedener Tiergruppen können induzierende Stoffe durch geeignete Behandlung frei werden. Es ist bisher nicht gelungen, einen spezifischen Induktionsstoff aufzufinden. Durch eine Reihe von Stoffen, vor allem durch verschiedene flüssige Fettsäuren, auch pflanzlicher Herkunft, lassen sich schöne Nervenrohrinduktionen erzielen. Der Erfolg mit Präparaten synthetischer Ölsäuren (Abb. 13) schließt die bei Organextrakten mögliche Beimengung eines aus Zellen stammenden unbekannten spezifischen Wirkstoffs aus. Nucleinsäurepräparate erwiesen sich ebenfalls als wirksam.

Dieses Ergebnis ist zunächst eine Enttäuschung: Dieselben Reaktionen der lebenden Zellen können also durch mehrere, unter sich sehr unähnliche Stoffe hervorgerufen werden. Diese Überraschung kommt nicht vereinzelt; wir kennen sie aus der Wuchsstoffforschung: Das Wuchshormon aller höheren Pflanzen ist höchstwahrscheinlich das Auxin. Es wurde aber noch ein anderer, dem Auxin chemisch gar nicht ähnlicher Stoff aufgefunden, der annähernd gleich stark, bis zu einer Verdünnung von 1:1000000000, auf die Zellstreckung und auch auf das Kambiumwachstum wirkt. Er entsteht im Stoffwechsel von Pilzen und Bakterien und wurde Heteroauxin genannt. In viel geringerem Grade, d. h. in viel höheren Konzentrationen, nicht auf alle Reaktionen und nicht auf alle Versuchspflanzen wirken auch noch einige andere Verbindungen. Auch auf dem Gebiete der hormonalen Auslösung der Geschlechtsmerkmale hat sich ergeben, daß neben den in ihrem chemischen Aufbau spezifischen Sexualhormonen ein ganz anders zusammengesetzter, körperfremder Stoff weitgehend dieselbe Wirkung wie das weibliche Sexualhormon hat.

Diese Erscheinung, daß dieselbe Reaktion durch ganz verschiedene Mittel erzielt, bildlich gesprochen, dasselbe

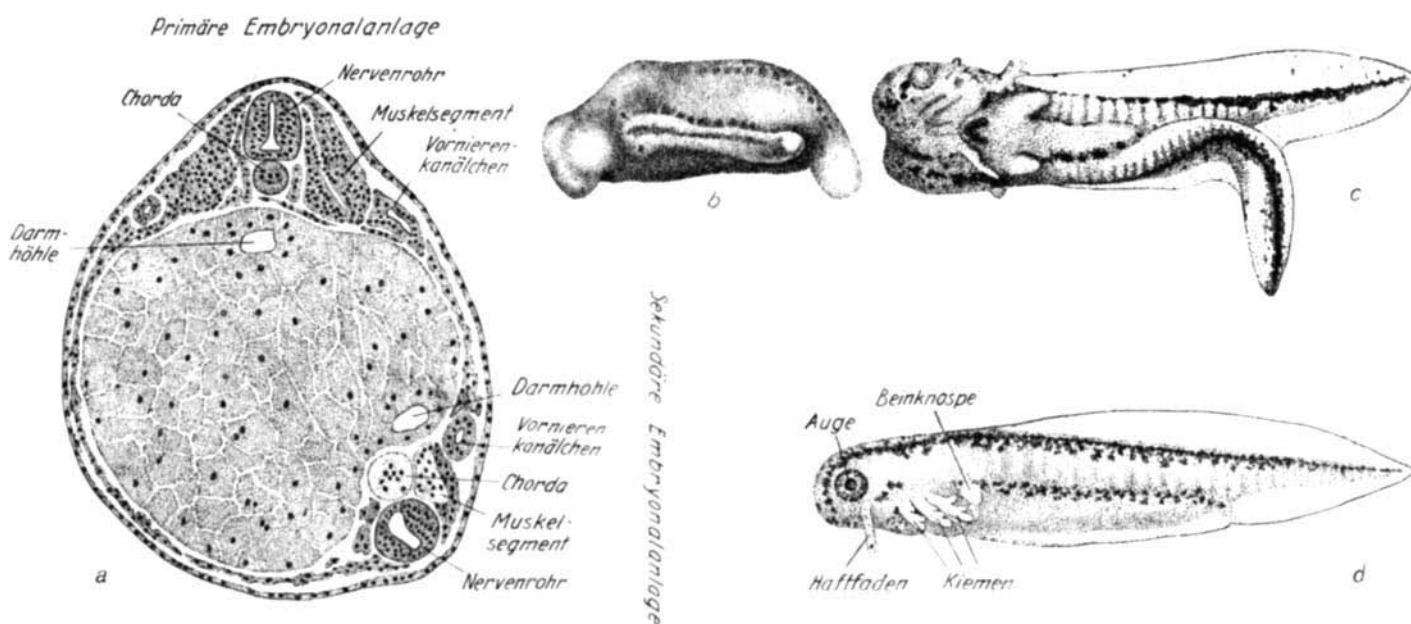


Abb. 12. a), b) Molchkeim, dem während der Gastrulation ein Stück dorsaler Urmundlippe in die linke Seite eingepflanzt worden war, (Nach Spemann u. H. Mangold 1924.) a) Querschnitt durch die Mitte des Keims; b) Ansicht von der linken Seite; c) Molchlarve mit einer durch ein Stück dorsaler Urmundlippe induzierten sekundären Embryonalanlage auf der Bauchseite (nach Holtfreter 1933); d) normale Molchlarve zum Vergleich.

Schloß von verschiedenen Schlüsseln geschlossen werden kann, scheint auf den ersten Blick das spezifische Wirkstoffverhältnis zu beeinträchtigen. Aber für das natürliche Getriebe des Organismus kann die Spezifität völlig gesichert sein: In einem Betriebe sind die Räume durchaus

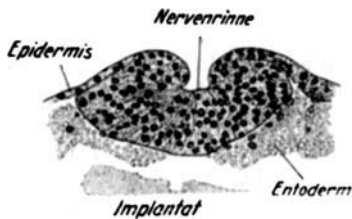


Abb. 13. Induktion einer Nervensystemanlage in einem Molchkeim durch eine in 5%igem Agar aufgenommene synthet. Ölsäure. (Nach G. Fischer 1935.)

gesichert, wenn sie durch Spezialschlösser schließbar sind, die jeweils nur von einem bestimmten 'der innerhalb des Betriebes gebrauchten Schlüssel geschlossen werden. Daß irgendwo anders ein Schlüssel vorhanden ist, der das eine oder andere Schloß jenes Betriebes auch schließt, ist harmlos, wenn es nur ganz unwahrscheinlich ist, daß dieser Schlüssel einmal in jenes Schloß gesteckt wird. Für den Organismus ist ein Stoff ein spezifischer ent-

wicklungsphysiologischer Wirkstoff, wenn er nicht dauernd und überall im allgemeinen Stoffwechsel, sondern unter besonderen Entwicklungsbedingungen in einem Entwicklungsverlauf zu bestimmter Zeit an einer bestimmten Stelle auftritt und eine bestimmte, auf ihn zugeschnittene Wirkung hat.

Es ist durchaus möglich, daß die unspezifischen Stoffe, mit denen wir bisher im Amphibienkeim die Differenzierung von Nervenrohren hervorgerufen haben, alle „Nachschlüssel“ sind, und daß das natürliche Induktionsgeschehen mit spezifischen hochwirksamen Stoffen arbeitet, die wir

noch nicht kennen. Dafür mag sprechen, daß die natürlichen Induktoren jedenfalls viel ausgiebigere und spezialisiertere Erfolge haben: Unsere chemischen Mittel lösen zwar Nervenrohrbildungen aus, aber nie zusammenhängende Organkomplexe, wie ein Stück lebender dorsaler Urmundlippe (Abb. 12). Und verschiedene Teile der dorsalen Urmundlippe oder des aus ihrem Material hervorgehenden Urmunddaches üben regional verschiedene Induktionsleistungen aus. Bringt man jeweils unter die gleiche Stelle der Bauchhaut einmal ein Stück vorderes (Abb. 14b), ein anderes Mal ein Stück hinteres Urmunddach (Abb. 14c),

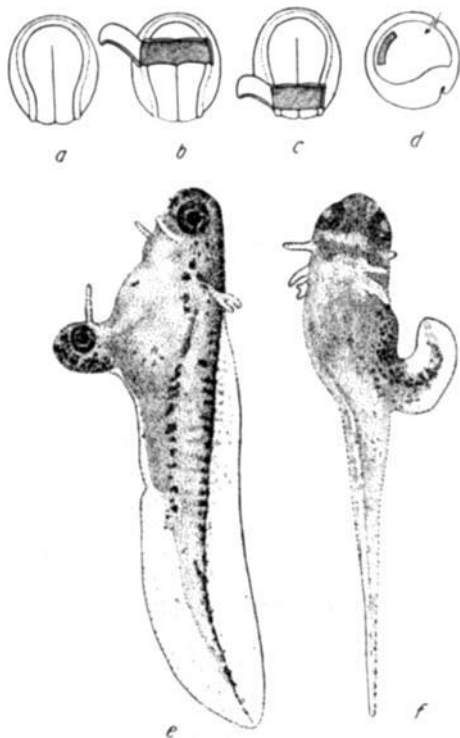


Abb. 14. Implantation verschieden weit vom Vorderende entfernter Stücke des Urmunddachs eines Keims im Neurulastadium in Keime im Beginn der Gastrulation. a) Rückenansicht des Spenderkeims; b), c) ein Stück der Nervenplatte wird aufgeschnitten und ein vorderer (b), oder hinterer (c) Teil des Urmunddachs wird bloßgelegt und d) in einen Keim zu Beginn der Gastrulation hineingesteckt; e), f) Larven, e) nach Implantation eines Stücks vorderen (wie b), f) hinteren Urmunddachs (wie c). (Nach O. Mangold 1933.)

so induziert das erste einen Kopf mit Gehirn, Augen, Nasen, Gehörorgan (Abb. 14e); das zweite induziert ein hinteres Rumpf- und Schwanzstück mit Rückenmark, Muskulatur und Flossensaum (Abb. 14f). Die verschiedenen Organisatorabschnitte sind also leistungsspezifisch, und wenn ihre Wirkungsweise chemisch ist, müssen ihre wirkenden Stoffe spezifischer sein als die bisher bekannten induzierenden Chemikalien.

Aber ebenso wie die tierischen und pflanzlichen Hormone sind die Induktoren nicht artspezifisch: Ein artfremdes Stück dorsaler Urmundlippe kann in einem Wirtkeim wirken: Ja sogar der Organisator aus einem Frosch- oder Krötenkeim kann in einem Molchkeim eine sekundäre Embryonalanlage hervorrufen. Die hervorgerufene Organisation entspricht stets der Natur des reagierenden Materials. Besonders schlagend wird dies bewiesen durch Gewebetausch zwischen Arten mit sehr verschiedenen Einzelorganen: Die Molchlarven haben auf ihren Kiefern Zähne, die Froschlarven Hornscheiden. Pflanzte man nun in die Gesichtsgegend eines jungen Molchkeims ein Stück Bauchhaut eines Froschkeims, so bildet dieses Hautimplantat

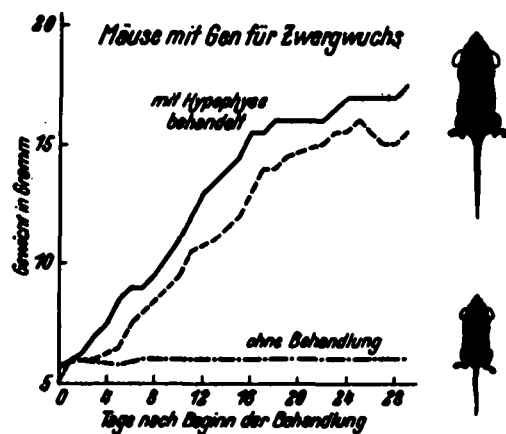


Abb. 15. Erblicher Mangel der Bildung von Hypophysenvorderlappenhormon bei Mäusen. (Nach Smith u. McDowell 1930/31.)

unter der Induktionswirkung der Umgebung ortsgemäß eine Mundbucht und Mundbewehrung, und entsprechend der Natur der Froschhaut erhält die Molchlarve ein Froschmaul mit einem Hornkiefer.

Die Formbildungsreaktionen sind also artspezifisch. Die Reaktion, die durch Induktionsreize ausgelöst wird, wird gesteuert von den Erbanlagen des reagierenden Stücks, genau so wie die Metamorphosereaktionen der Insekten auf das Metamorphosehormon entsprechend den Erbanlagen der reagierenden Art verlaufen: Das Metamorphosehormon aus dem Schmetterling macht aus der Fliegenmade eine Fliegenpuppe; das Implantatbläschen bildet auch im artfremden Wirt Schuppen von der Form und Farbe seiner Art.

Die Bildung bestimmter Wirkstoffe in bestimmten Zellen muß aber auch ihrerseits im Erbgefüge begründet sein. In der letzten Zeit mehrten sich die Fälle, in denen wir die Wirkung einzelner Erbanlagen oder „Gene“ als spezifische Entstehungsbedingungen für die Bildung bestimmter Wirkstoffe aufweisen können.

Bei Säugetieren wurde die Abhängigkeit eines für die Entwicklung wichtigen Hypophysenhormons von einer Einzelerbanlage im Zellkern, einem bestimmten Gen, entdeckt: Bei einer Mäuserasse wird erblicher Zwergwuchs durch die Abänderung oder „Mutation“ eines Gens hervorgerufen. Spritzt man den Zwergen täglich Gewebe vom Hirnanhang normaler Tiere ein, so wird die Entwicklungsstörung behoben (Abb. 15). Ein ganz ähnliches

Beispiel kennen wir durch *Emmy Stein* (1939) von Pflanzen: Eine Zwerggrasse der Tomate wird zu normaler Entwicklung gebracht, wenn man ihren Sproß auf eine normale Pflanze aufpfropft, von der ihr Stoffe zufließen, die der Mutationsrasse infolge eines Erbdefektes fehlen. Wir kennen auch schon genbedingte Wirkstoffe bei Pflanzen, die, wie die Metamorphosenhormone bei Tieren, den Übergang zu einer neuen Entwicklungsphase herbeiführen: Beim Bilsenkraut gibt es ein- und zweijährige Rassen, die sich in einem Genpaar unterscheiden (*Melchers* 1937). Pflöpft man blühreife Reiser der einjährigen Rasse neben die Vegetationspunkte nicht blühreifer (erstjähriger) der zweijährigen Rasse, so werden diese zum Schossen und Blühen veranlaßt. Umgekehrt kommen auch erstjährige Reiser der zweijährigen Rasse auf den einjährigen als Pflöpfungunterlage zum Blühen. Hierdurch ist erwiesen, daß ein die Blütenbildung auslösender Stoff von der zweijährigen Pflanze in die einjährige übertritt. Dieser Stoff ist nicht artspezifisch. Er kann auch von anderen Arten oder Gattungen (z. B. Tabak) zugeführt werden, wenn sich blühreife Reiser auf die einjährige Bilsenkrautrasse transplantieren lassen.

Auch die hormonale Steuerung der Insektenmetamorphose konnte schon zu einzelnen Erbanlagen in Beziehung gesetzt werden: Bei einer Mutationsrasse der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) tritt die Verpuppung sehr verzögert oder gar nicht ein, so daß ein großer Teil der Tiere als Larven abstirbt. Durch Transplantation einer über dem Gehirn der Larve gelegenen „Verpuppungsdrüse“ aus normalen Tieren in solche der Mutationsrasse wird in diesen die Verpuppung ausgelöst (*Hadorn* 1937). Eine bestimmte Erbanlage ist also die Vorbedingung für die normale Ausbildung der Verpuppungsdrüse und die Bildung des Metamorphosehormons. In gewissem Sinn bildet ein pflanzliches Gegenstück hierzu eine Rasse des Löwenmäulchens, die einen unverzweigten Längenwuchs aufweist und die Fähigkeit zur Blütenbildung ganz verloren hat; ihre Individuen sind vegetative Dauersprosse geworden, entsprechend den zur Weiterentwicklung unfähigen Taufliegen-Larven. Sie können aber durch Pflöpfung auf normale Pflanzen zur Blütenbildung kommen (*E. Stein*). Die Zeit ist wohl nicht mehr fern, in der man die Stoffe in die Hand bekommen wird, welche die Blütenbildung auslösen.

In rascher Folge mehren sich die Entdeckungen von Wirkstoffen, durch welche die Organismen ihre Entwicklungsvorgänge steuern. Wir sehen vielfach in großen Organismengruppen dieselben Wirkstoffe verwandt, um entsprechende Vorgänge hervorzurufen, wie das Thyroxin, die Sexualhormone bei den Wirbeltieren, Metamorphosenhormone bei Insekten, das Auxin und Blütenbildung auslösende

Stoffe bei Pflanzen. Wir sehen, daß die Bildung von Wirkstoffen von bestimmten Einzelerbanlagen abhängig ist. Aber rätselhaft steht uns noch die Spezifität der Reaktion gegenüber. Wir wollen nun wissen, warum auf denselben auslösenden Stoff die eine Pflanze mit der Bildung einer Löwenmaulblüte, die andere mit einer Tabakblüte antwortet, warum eine Zelle mit den einen Erbanlagen auf einen Wirkstoff froschgemäß, eine Zelle mit anderen Erbanlagen molchgemäß antwortet. Wie bewirken die Erbanlagen die Spezifität der Reaktion? Geschieht dies auch auf chemischem Wege? Und gibt es für uns einen Weg, auch in dieses Geschehen experimentell einzudringen? Das ist die Frage, die sich jetzt dringend erhebt.

Es ist wie immer: Wir besteigen einen Berg und gewinnen eine weite Aussicht; aber dahinter erhebt sich ein Gebirge mit höheren Spitzen; hinter jedem gelösten Problem steigt für den Forscher eine Fülle neuer, schwererer auf — zu seiner Pein und zu seinem Glück!

Schriftenverzeichnis.

(Es enthält nur einige zusammenfassende Darstellungen mit ausgiebigen Literaturangaben und einzelne Arbeiten, auf die besonders Bezug genommen ist.)

- Fischer, F. G.*, Zur chemischen Kenntnis der Induktionsreize in der Embryonal-Entwicklung. Verh. D. Zool. Ges. 1935.
Haberlandt, G., Zur Physiologie der Zellteilung. S.-B. preuß. Akad. Wiss., Physik.-math. Kl. Berlin. I. 1913, II. 1914, VI. 1921.
Hadorn, E., Hormonale Kontrolle der Pupariumbildung bei Fliegen. Naturwiss. 25, 681 [1937].
Kahn, A., Zur Entwicklungsphysiologie der Schmetterlingsmetamorphose. Ber. VII. Internat. Entomologenkongr. Berlin 1938.
Kuhn, O., Über morphogenetische Schilddrüsenhormonwirkungen in frühen Entwicklungsstadien. Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. 1933.
Mangold, O., Probleme und Ergebnisse bei der Erforschung der individuellen Entwicklung. D. Biologie. 1936.
Melchers, G., Versuche zur Genetik und Entwicklungsphysiologie der Blühreife. Biol. Zbl. 56 [1936].
Otto, K., Die Wachstumsstoffe im Leben der höheren Pflanzen. Braunschweig 1937.
Piepho, H., Über den Determinationszustand der Vorpuppenhypodermis bei der Wachsmotte *Galleria mellonella* L. Biol. Zbl. 59 [1939].
Schulze, W., Der Einfluß der inkretorischen Drüsen und des Nervensystems auf Wachstum und Differenzierung. Handb. d. norm. u. path. Physiol. 16, II/1 [1930].
Spemann, H., Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung. Berlin 1936.
Smith u. McDowell, The differential effect of hereditary mouse dwarfism on the anterior-pituitary hormones. Anat. Rec. 50 [1931].
Stein, E., Über einige Pflöpfungversuche mit erblichen, durch Radiumbestrahlung erzeugten Varianten von *Antirrhinum majus*, *Antirrhinum siculum* und *Solanum lycopersicum*. Biol. Zbl. 59 [1939].
Went, F. W., u. *Thimann, K. V.*, Phytohormones. New York 1937. [A. 28.]

Analytisch-technische Untersuchungen

Zur Frage der Citronensäurelöslichkeit von Naturphosphaten (Apatiten)

Von Prof. Dr. A. SCHLEEDE, Dr. B. MEPPEN u. Dr. O. B. JØRGENSEN. Anorg.-chem. Institut T. H. Berlin

Eingeg. 11. März 1939

Seitdem die sog. weicherartigen Rohphosphate zur direkten Düngung empfohlen werden, ist man bemüht, eine Laboratoriumsmethode zur Ermittlung ihrer Düngewirkung zu finden. Die für die Bewertung von Thomas-mehl angewandte Bestimmung der Citronensäurelöslichkeit nach *Wagner*¹⁾ darf angesichts der verschiedenen Bindungsformen der Phosphorsäure: im Thomas-mehl als Silicocarnotit, in den Rohphosphaten als Fluor- und Hydroxylapatit, nicht kritiklos auf andere Phosphate übertragen

werden, wovon auch von *Wagner*²⁾ ausdrücklich gewarnt wird. In zahlreichen Untersuchungen wurde im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Thomas-mehlen nur eine sehr schlechte oder keine Übereinstimmung der Citronensäurelöslichkeit der Rohphosphate mit den in Vegetationsversuchen erzielten Ergebnissen festgestellt. Auch andere Methoden, die rein empirische Abänderungen der *Wagnerschen* Vorschriften darstellen, erzielen keine besseren Ergebnisse³⁾.

¹⁾ 5 g Thomas-mehl werden mit 500 cm³ 2%iger Citronensäure bei Zimmertemperatur $\frac{1}{2}$ h geschüttelt; die nach dieser Zeit in Lösung gegangene Phosphorsäure wird bestimmt.

²⁾ *P. Wagner*, Chemiker-Ztg. 18, 1153 [1894], 21, 905 [1897].

³⁾ So wurde z. B. von *G. S. Robertson* u. *F. Dickinson* (J. Soc. chem. Ind., Chem. & Ind. 48, 59 [1923]) vorgeschlagen, anstatt 5 g Rinwaage nur 1 g anzuwenden.