

Werk

Titel: Botanica

Jahr: 1965

PURL: https://resolver.sub.uni-goettingen.de/purl?312899653_0010|log4

Kontakt/Contact

[Digizeitschriften e.V.](#)
SUB Göttingen
Platz der Göttinger Sieben 1
37073 Göttingen

✉ info@digizeitschriften.de

2/27

[ACTA F. R. N. UNIV. COMEN. X. - 2. BOTANICA XIII, 1965]

ACTA
FACULTATIS RERUM NATURALIUM
UNIVERSITATIS COMENIANAE

TOM. X.

FASC. II.

BOTANICA

PUBL. XIII.

1965

SLOVENSKE PEDAGOGICKE NAKLADATEESTVO BRATISLAVA

2

REDAKČNÁ RADA

Prof. dr. O. FERIANC
Doc. dr. J. FISCHER

Prof. inž. M. FURDÍK
Doc. dr. M. GREGUŠ, CSc.
Prof. dr. J. A. VALŠÍK

REDAKČNÝ KRUH BIOLOGIE

Doc. inž. agr. J. Dubovský, CSc.
Prof. dr. O. Ferianc
Doc. dr. J. Gulička, CSc.
Doc. dr. R. Herich
Prof. dr. L. Korbel
Doc. dr. J. Májovský
Doc. M. Mrciak, CSc.
Prof. dr. E. Pastýrik, člen korešpondent SAV
Doc. Št. Paulov, CSc.
Prof. dr. techn. inž. agr. I. Petrov
Doc. L. Šomšák
Prof. MUDr. et RNDr. J. A. Valšík, DrSc.

Просим обмена публикаций
Austausch von Publikationen erbeten
Prière d'échanger des publications
We respectfully solicit the exchange of publications
Se suplica el canje de publicaciones

Sborník Acta facultatis rerum naturalium universitatis Comenianae. Vydává Slovenské pedagogické nakladateľstvo v Bratislave, Sasínkova 5, čis. tel. 645-51. Povolilo Povereníctvo kultúry
číslo 2265/56-IV/1. — Tlač: Tisk, knižní výroba, n. p., Brno, provoz 1.

K-02*51047

Ein Beitrag zum Studium der Verhältnisse zwischen der Konzentration, der Wirkungsdauer und dem biologischen Effekt der Antifungalstoffe

M. ZEMANOVA

Die Tatsache, dass die Tiefe der Zerstörung der Mikrobenzelle die Funktion der Konzentration des toxischen Stoffes und dessen Wirkungsdauer darstellt, ist allgemein bekannt. In diesem Beitrag handelt es sich um die Charakteristik der erwähnten Erscheinung bei konkreten Stoffen, die von Vertretern bekannter Fungizide und Isothiocyansäureester dargestellt werden.

Wie es aus den Resultaten der vorhergehenden Arbeiten hervorgeht (4, 5), verhindert der Grossteil der beobachteten Antifungalstoffe in relativ niedrigen Konzentrationen (gewöhnlich unter 0,05 %) voll das Wachstum der ausgewählten Vertreter der Pilze, einschliesslich der Hefen, auf den entsprechenden Kultivationsnährböden. Diese Kenntnisse jedoch gelten in dem Falle, wenn der Antifungalstoff im Kultivationsmedium ständig anwesend ist. Es entsteht die Frage, was für eine Konzentration notwendig wäre, um in einem verhältnismässig kurzen Zeitraum die Mikroorganismen zu töten oder wenigstens deren Wachstum zu verhindern, resp. wie lange Zeit zum Erzielen dieses Effektes bei der Konzentration eines Stoffes notwendig ist, dessen Anwesenheit im Boden voll das Wachstum der Pilze verhindert (Grenzinhibitionskonzentration).

Die Lösung der erwähnten Probleme bringt nicht nur vom theoretischen Standpunkt aus interessante Kenntnisse, sondern sie ist auch von praktischem Wert. Vom Standpunkt der Ausnützung gesehen ist es manchmal sehr notwendig, dass der Fungizid eine rasche Liquidation der Pilzschädlinge herbeiführt. Dies gilt z. B. für die Volatilfungizide, die zum vorläufigen Schutz fertiger Erzeugnisse geeignet sind, sowie für jene Fungizide, die beim Schutz schnell und massiv schimmelnder Materialien gebraucht werden, als auch für Fungizide, die zum Schutz der Pflanzen vor einigen phytopathogenen Pilzen bestimmt sind.

Materialien und Methoden

Die Versuchsorganismen. In der Arbeit wurde der *Aspergillus niger* benützt, ein wichtiger Schädling vieler Materialien, dessen Kultur aus der Sammlung des Biologischen Instituts der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften in Prag stammt, und der Hefeorganismus

Candida albicans Pr 10, bei dem die Beeinflussung der Vermehrung leicht kontrollierbar ist (1). Diese Kultur stammt aus der Sammlung des Lehrstuhls für technische Mikrobiologie und Biochemie der Slowakischen technischen Hochschule in Bratislava. Beide Mikroorganismen wurden auf schrägem Malz—Agar gezüchtet.

Die Antifungalstoffe. Aus der Gruppe der organischen Quecksilberfungizide wurde Phenylmercuriacetat (benützte Abkürzung FMA) beobachtet, von den kupferhaltigen Fungiziden 8-Oxychinolat des Kupfers (Cu-8-OX), von den Phenolfungiziden 2,4,5-Trichlorphenylacetat (TCIFA), Pentachlorphenol (PCIF), o-Phenylphenol (OFF), p-Nitrophenol (PNF) und β -Naphthol (β -NAF), und aus der Gruppe der Isothiocyansäureester Allyl- (AI), Phenyl- (FI), p-Bromphenyl- (PBFI) und α -Naphthylisothiocyansäureester (α -NI). Die Isothiocyansäureester wurden am Lehrstuhl für organische Chemie der Slowakischen technischen Hochschule in Bratislava synthetisiert, PCIF, OFF und β -NAF wurden in Chemikalienhandlung besorgt, die übrigen Fungizide kommen aus dem Forschungsinstitut für agrochemische Technologie in Bratislava.

Vorgehen I. In Reagenzgläser von einer Grösse von 12×90 mm, in denen sich je 3 ml steriler physiologischer Lösung befanden, wurden je 0,05 ml der in Diäthylenglykol oder Äthanol aufgelösten Antifungalstoffe (bei den Kontrollen 0,05 ml reines Lösungsmittels) und 2 ml Sporensuspension, keimender Sporen oder Myzels des *Aspergillus niger* beigelegt. Die Resultate der Molarkonzentration der Stoffe sind in Tabelle 1 angeführt. Alle Antifungalstoffe wurden in der Konzentration $7,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l und einige auch in anderen Konzentrationen geprüft. Die Sporen des *A. niger* wurden aus einer 8-tägigen Kultur auf Malz—Agar genommen. Nachdem sie in physiologischer Lösung durchgeschwemmt, zentrifugiert und in reiner physiologischer Lösung resuspendiert wurden, fügte man sie in der Menge von 100 Millionen zu dem Inhalt der Reagenzgläser bei. Die keimenden Sporen wurden durch 12-stündige Kultivation im Wickerham-Nährboden (2) auf einem rotierenden Schüttelapparat bei einer Temperatur von 30°C gewonnen. Nach deren Durchschwemmung und Suspendierung in physiologischer Lösung wurden sie in einer Menge von 75 Millionen auf den Inhalt eines jeden Reagenzglases (cca 12 % der Sporen waren aufgekeimt, cca 30 % aufgequollen) zugefügt. Das Myzel wurde durch die in physiologischer Lösung durchgeführte Schwemmung und Suspendierung einer 22-stündigen Kultur des *A. niger* aus der Schüttelkultivation auf Wickerham-Nährboden gewonnen. Die auf ein Reagenzglas entfallende Trockensubstanz des Inoculums war 10 mg. Die Reagenzgläser wurden mit sterilen Gummipfropfen verschlossen und in horizontaler Lage auf eine Reziprok-Schüttelmaschine gelegt, so daß der Inhalt gut vermischt wurde. Die Temperatur bei der Präinkubation war 30°C . Nach 2, 10 und 24 Stunden weiter nach 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 und 14 Tagen der Präinkubation des *A. niger* mit den Antifungalstoffen wurden aus den Reagenzgläsern je 0,1 ml in Erlenmeyer-Kolben von einer Grösse von 100 ml versetzt, in denen sich je 20 ml Czapek-Dox-Nährlösung befand, und es wurde beobachtet, ob es zu einem Wachstum des *A. niger* (Inkubation bei 27°C) kommt. Nach der Versetzung der angeführten Menge in den Nährböden der Kolben wurden die Antifungalstoffe cca 200-mal verdünnt, in keinem Fall wurde im Nährboden die statische Inhibitionskonzentration des Antifungalstoffes erreicht.

Vorgehen II. In L-förmigen Reagenzgläser, die mit einem Metallverschluß geschlossen waren und je 9 ml steriler physiologischer Lösung enthielten, wurden je 0,1 ml der Lösungen der Antifungalstoffe in Äthanol (in die Kontrollreagenzgläser kam dieselbe Menge reines Äthanol) beigelegt und danach je 1 ml der suspendierten *Candida albicans*-Zellen. Die Zellen wurden aus einer 48-stündigen statischen Kultur in dem Nährboden Vita durch Zentrifugation, Schwemmung und Resuspendierung in physiologischer Lösung erhalten. Die resultierende Zellenkonzentration in den Reagenzgläsern war 5,5 Mill./ml. Von den Antifungalstoffen wurde PBFI und α -NI in der resultierenden Konzentration $1,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l und $7,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l geprüft. Die Reagenzgläser wurden bei einer Temperatur von 30°C auf der Reziprok-Schüttelmaschine geschüttelt. Nach 1, 5, 24 und 48 Stunden der Präinkubation der *C. albicans*-Zellen mit den Antifungalstoffen wurden aus diesen Reagenzgläsern je 0,05 ml in KPG-Proberöhrchen von einer Grösse von 9×150 mm versetzt, in denen je 5 ml steriles Nährbodens Vita (synthetischer Nährboden mit 6 Vitaminen, Quelle des Kohlstoffes ist Glucose, des Stickstoffes Ammoniumsulfat) (1) war. In jedem Reagenzglas befanden sich BCG-Metallkügelchen, die zum gleichmässigen Aufschütteln der Sedimente der Hefen beim Messen der Trübungsintensität dienen. Nach der Versetzung der *C. albicans*-Zellen in die Nährböden der Reagenzgläser wurden die Antifungalstoffe hundertfach verdünnt. Die Kultivation fand bei 27°C statt und die Vermehrung der *C. albicans* wurde mit Hilfe Lange-Photokolorimeters, Modell VII, mit einer adaptierten Einlage für die KPG-Proberöhrchen beobachtet. Die Intensität der Trübung wurde mit Werten der Extinktion charakterisiert, die zur Konstruktion der Wachstumskurven dienen.

Paralell mit diesem Versuch wurde ein anderer begonnen, bei dem die Vermehrung der *C. albicans* in KPG-Proberöhrchen in dem Boden Vita bei der Anwesenheit von Antifungalstoffen mit

einer resultierenden Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-3}$, $7,5 \cdot 10^{-4}$, $7,5 \cdot 10^{-5}$ und $7,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l festgestellt wurde. Als Inoculum wurde eine Suspension von *C. albicans*-Zellen benützt, die 5,5 Millionen Zellen/ml enthält. Die Intensität der Trübung wurde photokolorimetrisch festgestellt und die entsprechenden Wachstumskurven konstruiert.

Resultate

Die Bedeutung der Dauer der Präinkubation der Sporen, der keimenden Sporen und des Myzels von *Aspergillus niger* mit Antifungalstoffen, als auch die Bedeutung der Konzentration des zur Präinkubation benützten Antifungalstoffes ist aus den in Tabelle 1 zusammengefassten Resultaten klar ersichtlich. In der letzten Kolonne der Tabelle sind zum Vergleich auch die $ID_{1:0}$ -Werte angeführt, d. h. die niedrigsten molaren Konzentrationen der Stoffe, die zur vollkommenen Inhibition genügen, falls sie direkt den Kultivationsböden beigefügt werden (die flüssige Czapek-Dox-Lösung, geimpft mit einem Homogenat des Myzels und der Sporen des *A. niger*; das Resultat wurde nach Ablauf von 14, resp. 7 Tagen der Kultivierung abgezählt).

Die durch die Beeinflussung des Wachstums des Hefeorganismus *Candida albicans* durch Präinkubation mit Antifungalstoffen erzielten Resultate sind aus den Wachstumskurven aus Abbildung 1 und 2 ersichtlich. Abbildung 1 zeigt die Wachstumskurven der *C. albicans* nach verschieden langer Präinkubation mit p-Bromphenylisothiocyansäureester. In dem letzten Diagramm sind die Wachstumskurven aus dem Versuch, in dem der Antifungalstoff direkt in den Kultivationsboden beigefügt wurde. Auf Abbildung 2 sind die Resultate aus ähnlichen Versuchen mit α -Naphthylisothiocyansäureester.

Diskussion und Schlussfolgerungen

Aus den angeführten Versuchen, die auf die Demonstration der wechselseitigen Beziehungen zwischen der Konzentration, der Wirkungszeit und dem biologischen Effekt ausgewählter Antifungalstoffe auf Pilze, einschliesslich der Hefeorganismen, eingestellt waren, kann man einige zu erwartende Schlussfolgerungen ziehen. Sie hängen hauptsächlich mit dem Vergleich der Empfindlichkeit auf die geprüften Stoffe zwischen den Sporen, den keimenden Sporen und dem Myzel des *Aspergillus niger*. Bei einer gewissen Konzentration des Stoffes fordert die Inaktivierung der Sporen die längste Wirkungszeit, als mittel-empfindlich erwiesen sich die keimenden Sporen. Die keimenden Sporen sind dabei weniger empfindlich als das Myzel. Diese Tatsache konnte auch dadurch verursacht sein, dass in dem Inoculum der keimenden Sporen auch nichtkeimende Sporen anwesend waren.

Um eine schnelle Fungizidwirkung zu erreichen, ist beim Grossteil der geprüften Antifungalstoffe eine hohe Konzentration notwendig, und zwar auch eine zehn- bis hundertfache Konzentration von jener, die beim ständigen Kontakt für die Unterdrückung des Wachstums des Pilzes notwendig ist. So z. B. unterdrückt Pentachlorphenol und Trichlorphenylacetat das Wachstum des *A. niger* im Czapek-Dox-Nährlösung bereits bei einer Konzentration von $7,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l, um jedoch einen Fungizideffekt zu erreichen genügt nicht einmal eine 14-tägige Präinkubation bei hundertfach

erhöhter Konzentration. Bei 8-Oxychinolat des Kupfers blieb die zwanzigfache Konzentration vollkommen ohne Effekt. Nur Phenylmercuriacetat, der mit seiner Antifungalaktivität im Nährboden beiläufig dem Pentachlorphenol gleich, inaktivierte bei hundertfacher Konzentration sehr schnell die Sporen, die keimenden Sporen und das Myzel von *A. niger*. Bei einer zehnfachen Konzentration musste die

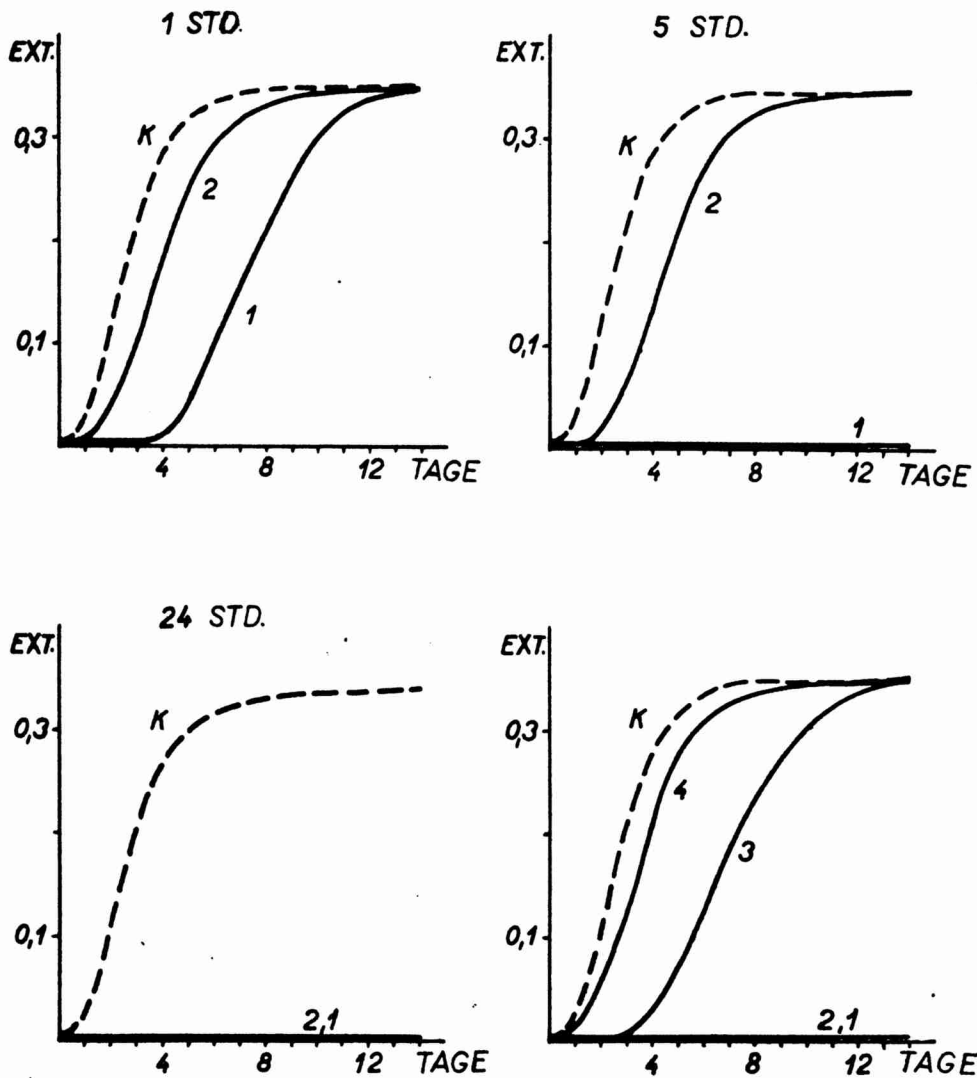


Abbildung 1. Wachstumskurven der *Candida albicans* im Nährboden Vita nach einer vorausgehenden 1, 5 und 24-stündigen Präinkubation mit p-Bromphenylisothiocyansäureester. Auf dem letzten Diagramm sind die Wachstumskurven der *C. albicans* im Nährboden Vita mit beigefügtem p-Bromphenylisothiocyansäureester. Konzentrationen: 1 ... $1,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, 2 ... $7,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, 3 ... $7,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, 4 ... $7,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l.

Wirkungszeit auf 24 Stunden verlängert werden, um die Inaktivierung der Sporen zu erreichen. Auch aus der Praxis ist der Phenylmercuriacetat als guter tilgender Antifungalstoff mit rascher Wirkung bekannt. Damit hängt auch seine Benützung im Obstbau beim Kampf gegen die Schädlinge der Gattung *Fusicladium* zusammen, besonders dann, wenn es bereits zu einer Infektion der Bäume gekommen war (3).

Die anderen geprüften Verbindungen, die wir zu den mittelstarken Antifungal-

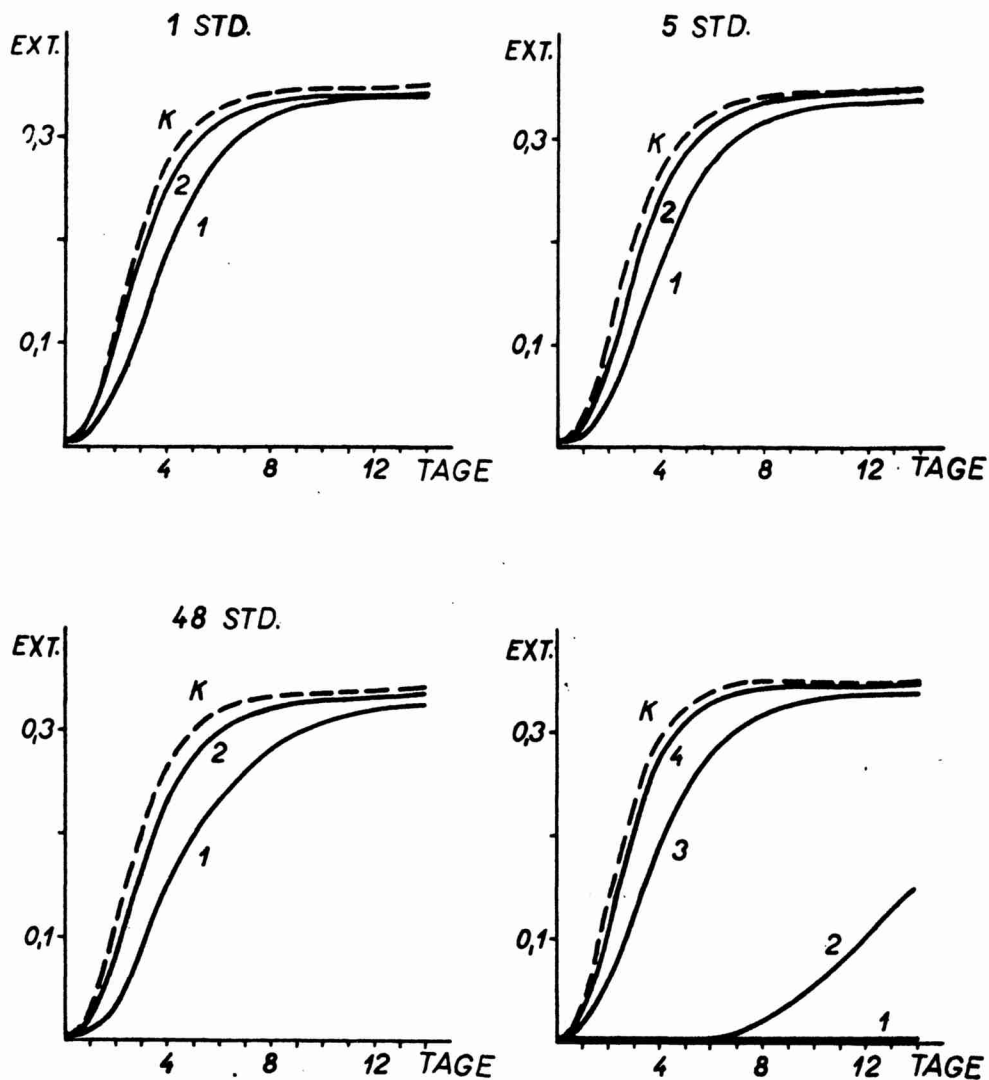


Abbildung 2. Wachstumskurven der *Candida albicans* im Nährboden Vita nach einer vorausgehenden 1, 5 und 24-stündigen Präinkubation mit α -Naphthylisothiocyansäureester. Auf dem letzten Diagramm sind die Wachstumskurven der *C. albicans* im Nährboden Vita mit beigefügtem α -Naphthylisothiocyansäureester. Konzentrationen wie bei Abb. 1.

Tabelle 1

Einfluß verschiedener Dauer der Präinkubation des *A. niger* mit Antifungalstoffen mit Konzentrationen von $7,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l und weiteren auf deren Überleben. Die geprobten Präinkubationsdauern: 2, 10 und 24 Stunden, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 und 14 Tage.

Stoff	Konzentration (Mol/l. 10^{-8})	Minimale Präinkubationsdauer, die zum Töten des <i>A. niger</i> genügend ist			ID ₁₀₀ (Mol/l. 10^{-5})*
		Sporen	Keimende Sporen	Myzel	
FMA	75 7,5 0,75	≈ 2 St. 24 St. > 14 Tg.	≈ 2 St. — —	≈ 2 St. — —	0,75
Cu-8-OX	75	> 14 Tg.	> 14 Tg.	> 14 Tg.	3,75
TCIFA	75	> 14 Tg.	> 14 Tg.	> 14 Tg.	0,75
PCIF	75	> 14 Tg.	> 14 Tg.	> 14 Tg.	0,75
OFF	150 75	> 14 Tg. > 14 Tg.	— > 14 Tg.	— > 14 Tg.	37,5
PNF	150 75	> 14 Tg. > 14 Tg.	— > 14 Tg.	— 2 Tg.	75
β-NAF	150 75	> 14 Tg. > 14 Tg.	— > 14 Tg.	— > 14 Tg.	75
PBFI	150 75	> 14 Tg. > 14 Tg.	— > 14 Tg.	— > 14 Tg.	37,5
α-NI	300 75	> 14 Tg. > 14 Tg.	— > 14 Tg.	— > 14 Tg.	75
FI	1200 600 300 150 75	6 Tg. 12 Tg. > 14 Tg. > 14 Tg. > 14 Tg.	— — — — > 14 Tg.	2 Tg. 6 Tg. 12 Tg. > 14 Tg. > 14 Tg.	150 (75)
AI	600 300 75	10 Tg. 12 Tg. 14 Tg.	— — 3 Tg.	— — 2 Tg.	300 (75)

*) Minimale Inhibitionskonzentration des Stoffes im flüssigen Czapek-Dox-Nährboden nach einer 14-tägigen Kultivierung. Die Angaben in Klammern repräsentieren die ID₁₀₀-Werte nach einer 7-tägigen Kultivierung. Dort, wo die Konzentration nicht angeführt ist, ist sie mit dem Wert, der nach 14 Tagen erreicht wurde, gleich (4, 5).

> ... auch die angeführte Zeit genügt nicht,

≈ ... die angeführte Zeit genügt, ev. auch eine kürzere (wurde nicht erprobt),

— ... wurde nicht erprobt.

stoffen zählen, inaktivierten bei den gebrauchten Konzentrationen das Wachstum des *A. niger* nicht (höhere Konzentrationen konnten wegen der schlechten Löslichkeit nicht erprobt werden). Eine Ausnahme bildet p-Nitrophenol, der nach einer 2-stündigen Präinkubation das Myzel inaktivierte, dies bei einer Konzentration, die, wenn sie direkt im Kultivationsboden anwesend ist, der Grenzinhibitionskonzentration gleicht. Die Sporen wurden unter diesen Bedingungen nicht inaktiviert.

Von den geprüften Derivaten der Isothiocyansäureester wurde auch bei einer 14-tägigen Präinkubation der Sporen des *A. niger* bei einer 300-fachen Konzentration des α -Naphthylisothiocyansäureesters und einer 150-fachen Konzentration des p-Bromphenylisothiocyansäureesters keine Wirkung erreicht. Die flüssigen und mit Wasser leicht zu vermischenden Derivate, wie Allyl- und Phenylisothiocyansäureester, ermöglichten auch die Prüfung der Wirkung bei sehr hohen Konzentrationen. Allylisothiocyansäureester inaktivierte die Sporen des *A. niger* in 14 Tagen, die keimenden Sporen in 3 Tagen und das Myzel in 2 Tagen, wenn zur Präinkubation die Konzentration $7,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l benützt wurde. Diese Konzentration bremst im Nährboden das Wachstum des *A. niger* bis zum siebenten Tag der Kultivation, am 14. Tag jedoch wird bereits ein Wachstum festgestellt. Das Wachstum entsteht wahrscheinlich deshalb, weil der Allylisothiocyansäureester aus dem mit einem Wattepfropfen verschlossenen Kultivationskolben verdampft. Bei dem Versuch mit der Präinkubation wurde das Absinken der Konzentration auf diese Weise dadurch verhindert, dass zum Verschliessen Gummipfropfen benützt wurden. Bei der Erhöhung der Konzentration des zur Präinkubation benützten Allylisothiocyansäureesters sinkt die Wirkungszeit ab, die zur Inaktivierung der Sporen notwendig ist. Der Phenylisothiocyansäureester erwies sich in diesen Versuchen als weniger wirksam als der Allylisothiocyansäureester.

Die bei den einzelnen Antifungalstoffen erzielten Resultate müssen auch mit der relativ niedrigen Löslichkeit mancher Stoffe im Wasser in Zusammenhang gebracht werden. Ferner können die Resultate der langdauernden Versuche durch die niedrige Stabilität in dem Wassermilieu oder durch das Ausdampfen mancher Antifungalstoffe beeinflusst werden, was ein Absinken der Konzentration in der Umgebung zur Folge hat.

Aus unseren Versuchen geht hervor, dass die ID_{100} -Werte, mit denen wir gewöhnlich die Antifungalwirkung der Stoffe charakterisieren, die niedrigsten Konzentrationen darstellen, die unter den gegebenen Bedingungen zum fungistatischen Effekt genügen. Ein fungizider Effekt binnen kurzer Zeit kann nur mit wesentlich höheren Konzentrationen erreicht werden. Zur genaueren Charakterisation der Antifungalstoffe wäre es daher notwendig, den Angaben über die ID_{100} -Werte noch Angaben über die fungizide Wirkung des Stoffes beizufügen.

Die Versuche mit dem Hefeorganismus *Candida albicans* ermöglichen nicht nur die Feststellung der zur 100%-igen Inaktivierung notwendigen Konzentration und der Präinkubationszeit, sondern ermöglichen auch die Beobachtung des Verlaufs der Vermehrung nach einer Präinkubation, bei der es nicht zur Tötung aller Zellen kam. Die teilweise Beschädigung der Zellen des Inoculums oder das Absinken der Zahl der vermehrungsfähigen Zellen wird am Verlauf der Vermehrung sichtbar, was mit Hilfe von Wachstumskurven leicht zu beobachten ist.

In den Versuchen mit p-Bromphenylisothiocyansäureester sehen wir, dass die Wachstumskurve der *C. albicans* nach einer einstündigen Präinkubation mit diesem Stoff bei der Konzentration $7,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l fast gleich mit der Wachstumskurve jener Kultur ist, die bei der Anwesenheit des p-Bromphenylisothiocyansäureesters

von einer Konzentration von $7,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l wächst, d. h. bei einer hundertfach niedrigeren Konzentration. Es kann angenommen werden, dass auch die Beschädigung beider Kulturen ähnlich sein wird. Eine einstündige Präinkubation bei der Konzentration $1,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l verursachte nur eine deutliche Verlängerung der lag — Phase, sonst jedoch änderte sich der Charakter der Vermehrung nicht: es veränderte sich weder die exponentielle Wachstumsgeschwindigkeit, noch die resultierende Zellenanzahl. Nach einer 5-stündigen Präinkubation bei einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l entstand kein Wachstum mehr und nach einer 24-stündigen Präinkubation auch bei der Konzentration $7,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l beobachteten wir keine Vermehrung.

Bei dem α -Naphthylisothiocyansäureester wurde auch bei einer 48-stündigen Präinkubation mit der Konzentration $1,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l keine volle Inhibition erreicht. Die Konzentration $7,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l beeinflusste die Vermehrung der *C. albicans* nur sehr schwach. Dieser Derivat ist weniger wirksam als der p-Bromphenylisothiocyansäureester, was sich sowohl bei einem langdauernden Kontakt, als auch bei der Präinkubation erweist.

Die Resultate aus den Versuchen mit der *Candida albicans* zeigen, dass die Hefeorganismen ein sehr vorteilhaftes Objekt zur tieferen Lösung dieser Problematik sein können.

Literaturverzeichnis

1. Nemeč P., Drobnica L., Antoš K., Kristián P., Hulka A.: Antimikrobiálna účinnosť syntetických izotiokyanátov II. Niektoré aromatické izotiokyanáty, Biologické práce IV/9, SAV, Bratislava 1958.
2. Raper K. B., Thom Ch.: A Manual of the Penicillia, Baltimore 1949.
3. Zbírovský M., Myška J.: Insekticidy, fungicidy, rodenticidy, Praha 1957.
4. Zemanová M.: Antifungálne látky a ich využitie na ochranu materiálov (tropikalizácia), Disertationsarbeit, SAV, Bratislava 1962.
5. Zemanová M.: Problémy výskumu ochrany materiálov pred škodcami — hubami (ochrana fungicidmi), Acta F. R. N. Univ. Comen., Botan., 7: 337 (1962).

Adresse der Verf.:
Mikrobiologische Abteilung,
Lehrstuhl f. Pflanzenphysiologie
der Komenský-Universität
Bratislava, Odborárske nám. 12

Eingegangen am 24. IV. 1964

Príspevok k štúdiu vzťahov medzi koncentráciou, dobou pôsobenia a biologickým efektom antifungálnych látok

Zhrnutie

Skúmal sa vplyv rôznej doby predinkubácie spór, naklíčených spór a mycélia *Aspergillus niger* s jedenástimi antifungálnymi látkami v rôznej koncentrácii na dosiahnutie cidneho efektu. Výsledky sa porovnávajú s výsledkami, získanými v inhibičných pokusoch, v ktorých sa antifungálne látky pridávali do kultivačnej pôdy.

Ďalej sa skúmal vplyv rôznej doby predinkubácie buniek *Candida albicans* s dvoma antifungálnymi látkami na priebeh rozmnožovania sledovaného pomocou rastových kriviek.

К изучению отношений между концентрацией, времени воздействия и биологическим эффектом антифунгальных веществ

М. Земанова

Резюме

Наблюдалось влияние различно длинной преинкубации спор, прорастающих спор и мицеля *Aspergillus niger* с 11 антифунгальными веществами различной концентрации на достижение инактивации. Результаты были сравнены с результатами ингибиционных экспериментов, во время которых прибавлено антифунгальные вещества до питательной среды.

Далее наблюдалось влияние различно длинной преинкубации клеток *Candida albicans* с двумя антифунгальными веществами на ход умножения, при помощи кривых роста.

Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß einer verschieden langen Präinkubation der Sporen, der keimenden Sporen und des Myzels des *Aspergillus niger* mit elf Antifungalstoffe verschiedener Konzentration auf die Erreichung der Inaktivierung beobachtet. Die Resultate werden mit Resultaten aus den Inhibitionsversuchen verglichen, in denen die Antifungalstoffe in den Kultivationsnährboden beigefügt wurden.

Ferner wurde der Einfluß einer verschieden langen Präinkubation der Zellen der *Candida albicans* mit zwei Antifungalstoffen auf den Verlauf der Vermehrung mit Hilfe von Wachstumskurven beobachtet.

Eine mikrobiologische Methode zur Beurteilung der Stabilität der Antifungalstoffe im Wassermilieu

M. ZEMANOVA

Eines der wichtigsten Kriterien für die Brauchbarkeit der Antifungalstoffe in der Praxis, z. B. beim Schutz der Materialien von Schimmelpilzbefall, ist ihre Beständigkeit im Wassermilieu. Die Zerlegung der Stoffe im Wasser kann selbstverständlich auch mit Hilfe chemischer analytischer Methoden beobachtet werden. In unserem Fall, da wir diese Eigenschaft bei einer ganzen Serie von Antifungalstoffen bewerteten, wäre diese Aufgabe schwer zu bewältigen gewesen, und deswegen haben wir uns eine einfache Methode, die auf mikrobiologischem Prinzip beruht, ausgearbeitet. Der Vorteil dieser anderen Weise der Beurteilung der Stabilität der Antifungalstoffe besteht auch darin, dass die alternativen Zerlegungsprodukte, die eine antifungale Wirkung haben, mit chemischen Methoden nicht festgestellt werden.

Als Wassermilieu wurde direkt Czapek-Dox-Nährlösung benützt, die à 20 ml in Erlenmeyer-Kolben von einem Inhalt von 100 ml gefüllt und sterilisiert wurde. Von den beobachteten Antifungalstoffen wurden „Grundlösungen“ von mehreren Konzentrationen zubereitet (als Lösungsmittel wurde Diäthylenglykol, resp. Äthanol benützt), und im Verhältnis von 1 : 100 in den Nährboden beigelegt, d. h. 0,2 ml auf einen Kolben. Die Stoffe wurden in diesem Wassermilieu eine gewisse Zeit exponiert (3, 14, 21, und 40 Tage). Da uns auch der Einfluss der Expositionstemperatur auf die Stabilität der Stoffe interessierte, liessen wir die eine Serie der so vorbereiteten Kolben bei der Temperatur im Laboratorium (18—20 °C) exponieren, und die andere Serie bei 37 °C. Nach der Exposition wurde der Nährboden in den Kolben mit einem Homogenat der aussporulierten Haut des *Aspergillus niger* geimpft (14-tägige Kultur aus der statischen Kultivation auf Czapek-Dox-Nährlösung, mit Hilfe des Turmix in physiologischer Lösung homogenisiert, Trockensubstanz des Inoculums 2,8 mg pro Kolben). Die Kontrollkolben wurden ohne der vorausgehenden Exposition (in Tabelle 1 mit 0-Expositionstagen gekennzeichnet) geimpft. Alle geimpften Kolben wurden bei einer Temperatur von 27 °C inkubiert und in einigen Intervallen (5, 10 und 14 Tage) wurde das Wachstum des *A. niger* in den einzelnen Kolben bewertet.

Auf die beschriebene Weise bewerteten wir die Stabilität einer grösseren Anzahl bekannter als auch neuer Antifungalstoffe (1). An dieser Stelle werden als Beispiel

Tabelle 1
Die Stabilität der Antifungalstoffe im Wassermilieu (Czapek-Dox-Nährboden), die nach der Änderung der Grenzinhibitionskonzentration für *Aspergillus niger* beurteilt wurde.*)

Antifungalstoff	Resultierende Konzentration im Nährboden Mol/l · 10 ⁻⁶	Expositionszeit in Tagen	Exposition bei der Temperatur					
			im Laboratorium			37 °C		
			Wachstum von <i>A. niger</i> in Tagen					
			5	10	14	5	10	14
Phenylmercuriacetat	3,75	0	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—
		14	—	—	—	—	—	—
		21	—	—	—	—	—	—
	0,75	0	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	××	××	××
		14	—	—	—	×××	×××	×××
	0,375	0	×	×	××	×	×	××
		21	—	—	—	×××	×××	×××
8-Oxychinolat des Kupfers	3,75	0	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—
		14	—	—	—	—	—	—
		21	—	—	—	—	—	—
	40	—	—	—	—	—	—	
0,75	0	×	×	××	×	×	××	
2, 4, 5-Trichlorphenylacetat	7,5	0	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—
		14	—	—	—	—	—	—
		21	—	—	—	—	—	—
	3,75	0	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—
		14	—	—	—	—	—	—
		21	—	—	—	—	—	—
	0,75	0	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—
		14	—	—	—	—	—	—
		21	—	—	—	—	—	—
0,375	0	×	×	××	×	×	××	
	3	—	—	—	×	×	×	
	14	—	—	—	×××	×××	×××	
	21	—	—	—	×××	×××	×××	
p-Nitrophenol	75	0	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—
		14	—	—	—	—	—	—
		21	—	—	—	—	—	—
	40	—	—	—	—	—	—	
37,5	0	×××	×××	×××	×××	×××	×××	

Fortsetzung d.Tab. 1

Antifungalstoff	Resultierende Konzentration im Nährboden Mol/l · 10 ⁻⁵	Expositionszeit in Tagen	Exposition bei der Temperatur					
			im Laboratorium			37 °C		
			Wachstum von <i>A. niger</i> in Tagen					
			5	10	14	5	10	14
Tetramethylthiuramdisulfid	300	0	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—
		14	—	—	—	—	—	—
		21	—	—	—	—	—	—
		40	—	—	—	—	—	—
	150	0	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—
		14	—	—	—	—	—	—
		21	—	—	—	××	×××	×××
40	—	—	—	×××	×××	×××		
75	0	—	×	×	—	×	×	
2-Mercapto-benzthiazol	300	0	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—
		14	—	—	—	—	—	—
		21	—	—	—	—	—	—
		40	—	—	—	—	—	—
	150	0	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—
		14	—	—	—	×	×	×
		21	—	—	—	×	×	×
40	—	×	×	×	×	×		
75	0	—	—	×	—	—	×	
Phenylisothiocyansäureester	600	0	—	—	—	—	—	—
		3	×	×	×	×	×	×
		14	×	×	×	×	×	×
		21	×	×	×	×	×	×
		40	×	×	×	×	×	×
	300	0	—	—	—	—	—	—
		3	×	×	×	×	×	×
		14	×	×	×	×	×	×
		21	×	×	×	×	×	×
	40	×	×	×	×	×	×	
	150	0	—	—	—	—	—	—
		3	×	×	×	×	×	×
		14	×	×	×	×	×	×
		21	×	×	×	×	×	×
	40	×	×	×	×	×	×	
	75	0	—	×	×	—	×	×

Die Bewertung des Wachstums:

- ... kein Wachstum,
- × ... schwaches Wachstum,
- ×× ... mittelstarkes Wachstum,
- ××× ... starkes Wachstum.

*) Als Grenzinhibitionskonzentration bezeichnen wir die niedrigste der geprüften Konzentrationen des Antifungalstoffes, die noch die volle Inhibition des Wachstums von *A. niger* hervorruft.

nur die Resultate der Untersuchungen von manchen Stoffen angeführt und diese sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Aus den Resultaten in Tabelle 1 geht hervor, dass die Grenzinhibitionskonzentration bei manchen Antifungalstoffen nach deren Exposition in Wasserlösungen dieselbe wie in frischen Wasserlösungen ist, d. h. dass sie unter den beobachteten Verhältnissen genügend stabil sind (resp. dass die alternativen Zerlegungsprodukte beiläufig dieselbe Antifungalaktivität aufweisen). Zu diesen Stoffen gehören z. B. p-Nitrophenol und 8-Oxychinolat des Kupfers, und bei der Exposition bei Labor-temperatur auch Phenylmercuriacetat und Tetramethylthiuramdisulfid.

Bei anderen Antifungalstoffen wird infolge der Exposition im Wassermilieu die Grenzinhibitionskonzentration erhöht, dies grösstenteils rascher bei höherer Expositionstemperatur. Höchstwahrscheinlich geht es hier um die Zerlegung der Stoffe auf nichtwirkende Produkte, es kann jedoch auch das Ausdampfen in Frage kommen (dies könnten wir z. B. dadurch verhindern, daß wir außer Wattepfropfen noch Cellophan oder Gummipfropfen zum Schliessen der Kolben verwenden). Von den beobachteten Antifungalstoffen bemerken wir diese Erscheinung schon bei der Exposition bei Labortemperatur z. B. bei Phenylisothiocyansäureester und Mercapto-benzthiazol, und bei der Exposition bei 37 °C auch bei Trichlorphenylacetat, Phenylmercuriacetat und Tetramethylthiuramdisulfid. Die Änderung der Grenzinhibitionskonzentration ermöglicht es die Stufe der Zerlegung des Stoffes abzuschätzen. Z. B. bei Trichlorphenylacetat wurde nach einer 40-tägigen Exposition bei 37 °C die Erhöhung der Grenzinhibitionskonzentration von dem Wert $7,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l auf $7,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l festgestellt. Im Kolben mit Trichlorphenylacetat mit einer Konzentration von $7,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l mußten wenigstens 10 % des Stoffes in seiner wirksamen Form erhalten geblieben sein. Zerlegen konnten sich also höchstens 90 % der beigefügten Menge. Im Kolben mit der Anfangskonzentration des Trichlorphenylacetats $3,75 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, der 40 Tage lang bei 37 °C exponiert wurde, kam es zu keiner Unterdrückung des Wachstums des eingepfropften Testorganismus. In diesem Falle mußte sich mehr als 80 % des Stoffes zerlegt haben. Wenn wir die Intensität des Wachstums des *Aspergillus niger* in diesem Kolben und in dem Kontrollkolben mit $3,75 \cdot 10^{-6}$ Mol/l Trichlorphenylacetat vergleichen, können wir annehmen, daß es mehr als 90 % waren.

Literaturverzeichnis

1. Zemanová M., Antifungálne látky a ich využitie na ochranu materiálov (tropikalizácia), Dissertationsarbeit, SAV, Bratislava 1962

Adresse der Verfasserin:
Mikrobiologische Abteilung,
Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie
der Komenský-Universität
Bratislava, Odborárske nám. 12

Eingegangen 24. 4. 1964

Mikrobiologická metóda pre posúdenie stability antifungálnych látok vo vodnom prostredí

M. Zemanová

Súhrn

Opisuje sa jednoduchá metóda vhodná pre orientačné posúdenie stability antifungálnych látok vo vodnom prostredí. Metóda je založená na sledovaní zmeny prahovej inhibičnej koncentrácie antifungálnej látky pre *Aspergillus niger* následkom expozície látky vo vodnom prostredí.

Микробиологический метод определения стабильности антифунгальных веществ в водной среде

М. Земанова

Резюме

Описывается несложный метод, подходящий для ориентировочной оценки стабильности антифунгальных веществ в водной среде. Метод заключается в наблюдении перемены концентрации граничной ингибиции антифунгального вещества у *Aspergillus niger* вследствие экспозиции вещества в водной среде.

Zusammenfassung

Eine einfache Methode wird beschrieben, die sich zur orientativen Bewertung der Stabilität der Antifungalstoffe im Wassermilieu eignet. Die Methode beruht auf der Beobachtung der Veränderung der Grenzinhibitionskonzentration des Antifungalstoffes für *Aspergillus niger* infolge der Exposition des Stoffes im Wassermilieu.

Study of New Protective Fungicides for Use in Cellulose-nitrate Lacquers

M. ZEMANOVÁ

For the protection and decoration of the surface of some wooden articles, e. g. furniture, we apply lacquers. This term refers to coatings in which the essential ingredient is cellulose-nitrate or cellulose-acetate. For that purpose we use in our country cellulose-nitrate lacquer C 1008 which is prepared in such a way, that its coatings can be brought by means of sharp burnishing and varnishing to a high lustre. It is used for lacquering of furniture, pianos, wireless-cabinets and similar articles. For office, laboratory and second-class furniture, for the interiors of furniture etc. one can apply cellulose-nitrate lacquer C 1010 which contains a large proportion of rosins, its coatings are lustrous indeed, but they cannot be further polished. It is also more brittle than the first one. The lacquer C 1015 is used for lacquering parqueted floors, linoleum, ski etc. It contains slowly volatile solvents and may be applied with a brush.

When wooden articles protected by means of the above mentioned lacquers are brought into such temperature and humidity conditions which foster the growth of fungi, a deterioration of the lacquers may take place, as since a long time it is a well-known fact that cellulose-nitrate lacquers are not fungi resistant (5, 6, 7). Those defects often happen on our articles exported to tropical and subtropical regions and even occur frequently already during the transport or storing. It seems that of the two conditions: high temperature and humidity, the latter plays the more important role, as mildew has been noticed even in cold-storage rooms. The greatest effect of fungi is to ruin the decorative appearance of the coatings, although the defacement of surfaces is not the only ruinous result of the attack by these organisms. Impairment of physical properties or even destruction of organic coatings has been known to occur, but this is not the general rule. The number of different genera of fungi which might produce defacement of coatings is very high. These organisms are capable of utilizing certain ingredients of coatings as food. It may be the nitro-cellulose itself and also plasticizers and rosins from which many are susceptible to biological attack (2, 5). In the same way dust, grease and several impurities caught on the surface of the coating may offer suitable nutrients to fungi. The fungi can be removed from the mildewed surfaces e. g. with a damp rag indeed, but on the surface of the film there persists a permanent damage in the form of a microscopic

defect caused by the secretions of fungi (Fig. 1 a, b) and the result of which is the loss of lustre.

The protection of organic coatings against the attack of fungi may be attained by the incorporation of the proper fungicides. Much work has been done abroad in the study of several hundred candidate fungicides for this purpose (e. g. 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14). Practice indicates that the most suitable of these fungicides are the chlorinated phenols, copper-8-quinolinolate, salicylanilide and phenylmercuric compounds such as phenylmercuric-salicylate, -acetate, -oleate, -stearate etc. (2, 5). Chlorinated phenols and salicylanilide are usually employed in the proportion of 5 to 10 percent, copper-8-quinolinolate approximately 1 percent, and phenylmercurics between 0.05 and 1.5 percent. The choice of fungicide is dependent, among other things, on the future destination of the coating. For instance, for lacquers on furniture the mercurics are not recommended because of their high toxicity to man. Some do not approve either the application of pentachlorophenol which is not quite harmless to human health where the coatings for furniture, parqueted floors, interiors of wooden huts etc. are concerned. The use of coloured fungicides is also limited. For white and transparent films copper-8-quinolinolate cannot be used because of its unpleasant yellowish-greenish colour. Some fungicides are too expensive or difficult to procure. For these and further reasons the search for new and more proper fungicides is still actual.

Experimental

In this paper are summed up the results of laboratory experiments on the protection of the cellulose-nitrate lacquer C 1008 by means of six fungicides. Three of them are well-known and already used for the protection of materials chemicals, another three are the derivatives of isothiocyanates that presented in our earlier experiments a very good antifungal activity against harmful fungi by their addition directly into the liquid medium where the fungi were cultivated (9, 15, 16).

Materials and methods

Lacquer. In our experiments we used the cellulose-nitrate lacquer C 1008 and, for its thinning the suitable thinner C 6000, both prepared in Chemolak n. p. at Horné Orešany.

Fungicides. We obtained phenylmercuric-acetate and copper-8-quinolinolate from the Research Institute of Agricultural Chemistry at Bratislava, pentachlorophenol from the Research Institute of Wood at Bratislava and the derivatives of isothiocyanates from the Chair of Organic Chemistry of the Faculty of Chemistry, Slovak Polytechnical University at Bratislava.

Fungi. For the infection of specimens were used 23 species of fungi which are known to take part in the deterioration of coatings and other materials. It was *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. amstelodami*, *A. versicolor*, *Penicillium cyclopium*, *P. brevi-compactum*, *P. chrysogenum*, *P. rugulosum*, *Alternaria tenuis*, *Stachybotrys atra*, *Myrothecium verrucaria*, *Cladosporium herbarum*, *Trichoderma viride*, *Neurospora sitophila*, *Curvularia palescens*, *Pullularia sp.*, *Chaetomium globosum*, *Paecilomyces varioti*, *Memnoniella echinata*, *Stemphylium sp.* and *Sporotrichum sp.* They come from the culture collection of the Biological Institute of the Czechoslovak Academy of Sciences at Prague and were isolated from the mildewed materials. They were cultivated on malt extract agar slants.

Preparation of the specimens. Tested fungicides were dissolved in the thinner C 6000 which the lacquer was thinned with. p-Bromophenyl-, p-dimethylaminophenyl- and 1-naphthyl-isothiocyanate and also pentachlorophenol were tested at the concentrations of 3 and 10 percent, copper-8-

-quinolinolate at 0.5 and 2.0 percent and phenylmercuric-acetate at 0.01, 0.1 and 0.5 percent on the content of filmproducing constituents, i. e. dried weight. The lacquer with the addition of fungicides, as well as the control without them were laid on the microscopic base slides by soaking. Then the slides with the lacquer were dried at laboratory temperature for three weeks. The specimens were prepared in triplicate.

Test of tropicalisation. The fungi from the malt extract agar slants were scraped down into 500 ml of malt extract (3° Bahling) which contained 0.2 percent agar. Spore and mycelium suspension was homogenized (turmix, 3 minutes) and then sprayed by means of a fine atomizer on the surface of the specimens and that in the quantity of 1.5—2.0 ml on the area of 1.0 square decimetre. The specimens were immediately placed in Petri dishes on glass supports, closed with covers and glued up with an adhesive paper. On the bottom of Petri dishes there was water to ensure sufficient relative humidity of the air. The dishes were put into an incubator at the temperature of 30 °C and 90—100 percent relative air-humidity. After 20 and 60 days the specimens were observed with regard to possible mouldiness and other accidental changes of the lacquer. Besides after 60 days the dishes were opened, the fungi removed with a damp rag from the surface of the specimens and the films of lacquer were examined under the microscope.

Results

The results of our experiments on the protection of the lacquer C 1008 with chosen fungicides and isothiocyanates are summarized in Table 1.

The controls of non-protected lacquer were clearly overgrown with fungi both on the 20th and on the 60th day of the test. A rather thick mycelium was formed and some species slightly sporulated. After removing them we could see on the film of the lacquer, under the microscope, a clear corrosion, as is presented in Figure 1 a, b.

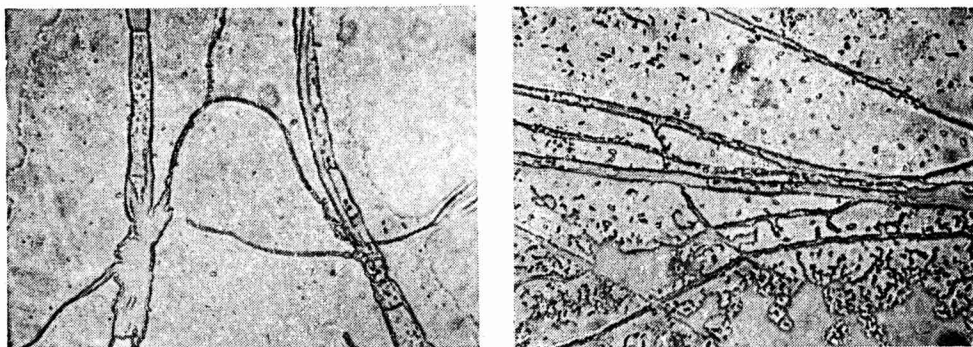


Figure 1 a, b. Corrosion of the surface of the non-protected lacquer C 1008 caused by fungi (enlarged about 100 times)

Figure 2 represents the specimens protected by means of p-dimethylamino-phenyl-isothiocyanate. While the control, under the conditions of test, mildewed quite well, the lacquer protected with 3 or 10 percent of this antifungal substance remained completely free of fungal vegetation. In the case of p-bromophenyl-isothiocyanate only the concentration at 10 percent was effective, but there developed the crystallisation of the p-bromophenyl-isothiocyanate in the lacquer during the drying period, as we can see on the third specimen in Figure 3.

Table 1.

Protection of cellulose-nitrate lacquer C 1008 with fungicides (incorporation by means of thinner)

Fungicide	Content in percent	Intensity of growth of fungi after*)		Corrosion of the surface of the film after 60 days	Remarks
		20 days	60 days		
p-Bromophenyl-isothiocyanate	10.0	0	0	—	orange colour, crystals
	3.0	2	2	+	—
p-Dimethylamino-phenyl-isothiocyanate	10.0	0	0	—	dark-brownish colour
	3.0	0	0	—	very pale brownish colour
1-Naphthyl-isothiocyanate	10.0	2	2	—	brown-reddish colour
	3.0	2	2	+	very pale reddish colour
Pentachlorophenol	10.0	0	1	—	yellowish colour
	3.0	1	2	—	—
Copper-8-quinolinolate	2.0	2	2	—	pale greenish colour
	0.5	2	2	—	—
Phenylmercuric-acetate	0.5	0	0	—	—
	0.1	0	1	—	—
	0.01	0	2	—	—

*) 0 — no growth
 1 — slight growth
 2 — growth the same as in the control

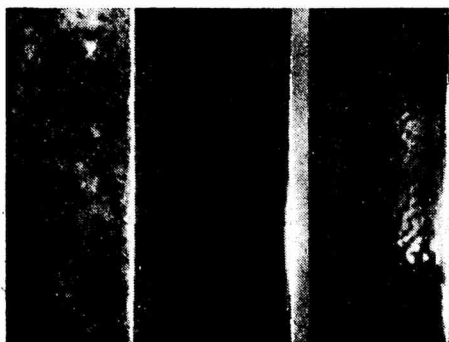


Figure 2. Protection of the lacquer C 1008 with p-dimethylaminophenyl-isothiocyanate (control, p-dimethylaminophenyl-isothiocyanate at 3 and farther at 10 percent)

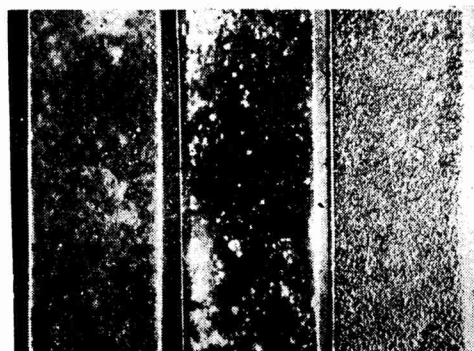


Figure 3. Protection of the lacquer C 1008 with p-bromophenyl-isothiocyanate (control, p-bromophenyl-isothiocyanate at 3 and farther at 10 percent)

Discussion and conclusions

We know from practice that the protection of lacquers and other coatings, relatively high concentrations of protective fungicides are necessary. This knowledge was also confirmed by the results of our experiments. According to the evaluation, after 60 days of duration of the test, the growth of fungi was completely inhibited only on the specimens of lacquer protected with 10 percent p-bromophenyl-isothiocyanate, 3 and 10 percent p-dimethylaminophenyl-isothiocyanate and 0.5 percent phenylmercuric-acetate. Pentachlorophenol in the concentration of 10 percent and phenylmercuric-acetate in the concentration of 0.1 percent protected lacquer coatings against fungi only partially. Other fungicides in the tested concentrations were not effective.

The intensity of growth of fungi on the lacquer surface was on the 60th test day generally the same as on the 20th day. In some cases it slightly increased. The concentration of fungicides was there evidently not sufficient or gradually dwindled and after a transitory time of inhibition the growth of fungi became stronger. According to our experience with testing the lacquers and other materials, we consider that the correct orientation about the protective effectiveness of a fungicide for lacquers by means of our test-method is obtained by taking into consideration the state found after 60 days of the test.

Besides the controls, the corrosive effects of fungi on the lacquer surface were registered only in the lacquer with 3 percent p-bromophenyl-isothiocyanate and further 1-naphthyl-isothiocyanate. In several instances the corrosion didn't take place even in the case where the specimens were strongly overgrown with fungi. There, the protective fungicides presented in the lacquer coating prevented the fungi from corroding the lacquer and thus from utilizing its ingredients for their nutrition.

In some cases the inoculum didn't grow at all on the specimens. It is possible that some fungicides may get partly, by means of diffusion, or in volatile form, from the lacquer into the thin layer of malt extract suspension of spores and homogenized mycelium which was sprayed on the specimens surfaces, and cause there the inhibition of fungi growth.

Besides the suspension of spores and mycelium in malt extract, we also used for infection of specimens in our earlier experiments the suspension prepared in water. However the control specimens of cellulose-nitrate lacquer sprayed with water suspension of fungi mildewed very slightly and slowly and we were not able to appreciate correctly the protective effectiveness of the tested fungicides. The spray of specimens with inoculum prepared in diluted malt extract is further nearer to the conditions in practice where the lacquer coatings are always soiled with some organic impurities.

We observed in the case of several from the tested fungicides, either just after their incorporation, or later, the colour changes of the lacquer, e. g. the ingredient of 10 percent p-bromophenyl-isothiocyanate caused the orange colouring of the lacquer, of 2.0 percent copper-8-quinolinolate the greenish colouring etc. At copper-8-quinolinolate and pentachlorophenol the fungicide itself is coloured, at tested isothiocyanates some of their decomposition products are coloured. A very weak brownish colouring of the lacquer with 3.0 percent p-dimethylaminophenyl-isothiocyanate is not considered by us as a defect, if the lacquer is to be used for surface preparation of brown furniture.

As to the antifungal effectiveness phenylmercuric-acetate seems to be the best

fungicide, as in the concentration of 0.5 percent it fully inhibited the growth of harmful fungi. Concentration of 0.1 percent was also quite strongly effective and the corrosion of the lacquer film didn't take place. The disadvantageous property of this fungicide, as it was already mentioned, is its toxicity to man. Pentachlorophenol was effective in our experiments in a concentration above 10.0 percent. It added to the lacquer a pale yellowish colouring. Copper-8-quinolinolate in the quantity of 2.0 percent didn't inhibit the growth of fungi, but we observed no corrosive deterioration of the film surface. Its greenish colouring is not desirable. We should certainly obtain better results with the soluble form of this fungicide which is now successfully used abroad (e. g. the commercial preparations Cunilate, Quindex etc. (4, 10)).

From the group of isothiocyanates which were for the first time tested as protective antifungal agents for the cellulose-nitrate lacquer, p-dimethylaminophenyl-isothiocyanate was the best, as it fully inhibited the fungi and prevented the corrosion of the lacquer surface at the concentration of 3.0 percent. It seems to be a very promising substance for the protection of cellulose-nitrate lacquers and has to be examined in further experiments. p-Bromophenyl-isothiocyanate was effective at the concentration of 10.0 percent, but crystals developed in the lacquer. The concentration of 3.0 percent was without clear antifungal effect, but also without crystallisation. May be that a concentration might be found halfway between the two which would fully inhibit fungi without crystallising. 1-Naphthyl-isothiocyanate was still less effective than p-bromophenyl-isothiocyanate.

References

1. Anonym: Plaste u. Kautschuk 8: 324 (1957)
2. Blahnik R., Zánová V.: Mikrobiální koroze, Praha 1963
3. Findlay W. P. K.: J. Oil and Colour Chemists' Assoc. 23: 217 (1940)
4. Goldfarb S.: Amer. Paint J. 41: 94 (1956)
5. Greathouse G. A., Wessel C. J.: Deterioration of Materials, Washington 1954
6. Klens P. F., Lang J. F.: J. Oil and Colour Chemists' Assoc. 39: 887 (1956)
7. Meier K., Schmidt H.: Farbe u. Lack 62: 469 (1956)
8. Nedey G.: Peint. Pigm. Vern. 31: 791 (1955)
9. Nemeč P., Drobnica L., Antoš K., Kristián P., Hulka A.: Antimikrobiálna účinnosť syntetických izotiokyanátov II. Niektoré aromatické izotiokyanáty, Biologické práce SAV, Bratislava 1958
10. Owen L. A.: Can. Paint and Varnish Mag. 28: 54 (1954)
11. Ruggeri S.: Paint Varnish Production 30: 12 (1950)
12. Vicklund R. E., Manowitz M.: Paint Manuf. 24: 345 (1954)
13. Vicklund R. E., Manowitz M., Bagdon V. J., Manderfield F. M.: Amer. Paint J. 35: 58 (1950)
14. Whaley W. M., Clark L., Leonard J. M.: An Examination of Toxic Agents for Fungicidal Coating Materials, I, II, III, U. S. Naval Research Laboratory Report P-2518, 2611, 2626 (1945)
15. Zemanová M.: Acta F. R. N. Univ. Comen., Botan. 7: 337 (1962)
16. Zemanová M.: Antifungálne látky a ich využitie na ochranu materiálov, Dissertation work, Slovak Academy of Sciences, Bratislava 1962

Do redakcie dodané 15. XII. 1964

Adresa autora: Oddelenie mikrobiológie Katedry fyziológie rastlín Univerzity Komenského, Bratislava, Odborárske nám. 12

Summary

In this paper are summarized the results of laboratory experiments on the protection of cellulose-nitrate lacquer C 1008 against fungal deterioration with six fungicides. Three of them are well-known and already used for protection of materials chemicals and we tested them for the reason

of possible comparison. Another three are the derivatives of isothiocyanates with a very good antifungal activity against harmful fungi. They were tested as protective fungicides for lacquers for the first time. The results obtained with pentachlorophenol, copper-8-quinolinolate and phenylmercuric-acetate were similar to data found in literature. From the tested derivatives of isothiocyanates the best was p-dimethylaminophenyl-isothiocyanate which at the concentration of 3.0 percent on the content of filmproducing substituents protected completely the lacquer against mildewing and corrosive surface changes during 60 days of tropicalisation test. p-Bromophenyl-isothiocyanate seems to be less suitable for the protection of tested lacquer and 1-naphthyl-isothiocyanate appeared little effective.

Štúdium nových ochranných fungicídov pre použitie do nitrolakov

Súhrn

Práca zhrnuje výsledky laboratórnych pokusov s ochranou nitrolaku C 1008 proti znehodnoteniu hubami pomocou šiestich fungicídov. Tri z nich sú známe a pre ochranu materiálov už používané chemikálie a skúšali sa z dôvodov možného porovnania. Ďalšie tri sú deriváty izotiokyanátov s veľmi dobrou antifungálnou účinnosťou proti škodlivým hubám. Testovali sa prvýkrát ako ochranné fungicídy pre laky. Výsledky získané s pentachlórfenolom, 8-hydroxychinolinátom mednatým a fenylmerkuriacetátom sú podobné údajom v literatúre. Zo skúmaných derivátov izotiokyanátov najlepší bol p-dimetylaminofenyl-izotiokyanát, ktorý v koncentrácii 3,0 % na obsah filmotvorných zložiek chránil lak úplne pred plesnivením a korozívnymi povrchovými zmenami počas 60 dní tropikalizačného testu. p-Brómofenyl-izotiokyanát sa zdá byť menej vhodným pre ochranu skúmaného laku a 1-naftyl-izotiokyanát sa ukázal ako málo účinný.

Изучение новых охраных фунгицидов для их применения нитролака

М. Земанова

Р о з ю м е

В работе приводятся результаты лабораторных экспериментов с охраной нитролака С 1008 против обесцвечиванию грибами при помощи шести фунгицидов. Из них три известные и для охранения материалов применяемые химикалии были подвергнуты испытанию для эвентуального сравнения. Три последующие — это дериваты изотиокцианатов с очень хорошей антифунгальной действенностью против вредным грибам. Они были тестированы воервые как охранные фунгициды лаков. Результаты полученные с пентахлорфенолом, 8-гидроксихинолином медным и фенилмеркуриацетатом походят на данные, приводимые в литературе. Из обследуемых дериватов из отиокцианатов самым лучшим оказался р-диметиламинофенил-изотиокцианат, который в концентрации 3,0 % на содержание фильмотворных элементов охранял лак вполне пред плесней и коррозней проявляемой изменениями поверхности в течение 60 дней тропикализационного теста. р-Бромфенил- изотиокцианат кажется менее уместными для охранения обследуемого лака и 1-нафтил-изотиокцианат оказался слабо действительным.

Influence of colchicine on nucleolar structures

R. HERICH

We have observed already in our earlier papers dealing with the effect of colchicine on the nucleolus (Herich 1963), that as a result of prolonged treatment (48—76 hours) by higher concentrations of colchicine (0.1—0.5 per cent) a deformation and fragmentation of the nucleoli takes place while at the same time on the cell nuclei often no morphological changes are to be observed.

In more detailed observations on the effect of colchicine on nucleolar structures an interesting relationship between the nucleolar structures and cell division was discovered.

In the present paper the results which have been obtained are described.

Material and methods

Our experiments were carried out with seedlings of *Cannabis sativa* L. After reaching a length of 2 cm the roots of the seedlings were immersed in 0.01, 0.1 and 0.5 % solutions of colchicine of a temperature of 25 °C. The solutions were permanently aerated. The controls grew under the same conditions in distilled water. Every twelve hours 1.5 mm long roots tips were taken for cytological analysis. Lewitzky's solution was used for fixation. Some of this material was prepared as sections by the paraffin method and some as squashes. For the staining of nucleolar structures Heidenhains' iron hematoxylin was used (Herich 1965).

Results and discussion

In our studies of the structure of the interphase nucleolus (Herich 1963a, 1964, 1965, 1965a) we succeeded in obtaining a more detailed picture on its structure as Estable and Sotelo (1951, 1954). We have shown, that in the amorphous matter of the nucleolus not only one structure "the nucleolonema" as it was described by Estable and Sotelo (1951, 1954) is to be found, but two clearly distinguishable structures of different biochemical and probably also of different genetical singi-

ficance can be observed. A brief description of the structures observed by us, which were preliminarily designed as structures A, B and C, was presented in our previous papers.

In young nucleoli, soon after their differentiation, structure A, as well as structure B can be observed. In this initial stage of the nucleolus structure A filling out the greater part of the nucleolus, structure B has either a thread-like shape or it resembles the shape of a small chromosome. During the interphase the primarily differentiated substance of structure B grows considerably. Structure C does not occur in young nucleoli immediately after differentiation, but is formed only during the interphase. The volume of this structure gradually increases so that immediately before cell division the nucleoli are nearly completely filled out by it. Under the action of factors inhibiting cell division the growth of substance of this structure is slowed down (Herich 1964a, 1965a).

After shorter treatment (12—24 hours) with lower doses of colchicine (0.01 per cent) when the cells are still dividing but defects of cell division are already to be observed, structure C is differentiated but to a lesser extent as in the nucleoli of the controls. In the nucleoli of cells treated in this manner the volume of the surface structure A increases and the growth of the volume of structure B is somewhat slowed down.

When cells are treated for longer periods of time with higher concentrations of colchicine i.e. after treatment which causes the germs to stop growth and the division

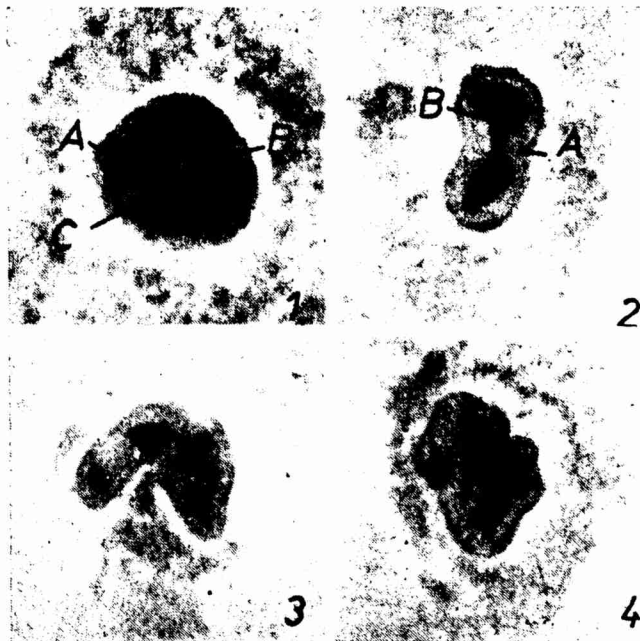


Fig. 1. Nucleolar structures in the nucleoli of untreated control germs, *Cannabis sativa*, oca 3800 \times ;

Fig. 2—4. The influence of colchicine on the nucleolus and its structures, *Cannabis sativa*, oca 3800 \times ; for details see text.

of cells is also stopped altogether, in the nucleoli structure C cannot be found (Fig. 1—4). After treatment of this kind the nucleoli are often highly deformed and fragmented. The greater part of their volume is occupied by the structure A. Structure B although present, occupies only a smaller volume as under normal conditions and by the treatment with colchicine the growth of substance of this structure is also slowed down.

The inhibitory influence of colchicine on the growth of germs is reflected by defects or even complete suppression of cell division on one hand and on the other hand by a gradual decrease or even complete disappearance of structure C.

Based on the behaviour and on the process of growth of structure C in permanent and dividing tissues as well as on observations of the effect of treatment by factors inhibiting the division of cells (Herich 1964a) we presume the structure C to play an important role in the initiation of mitosis. It is possible that the duration of the interphase of meristematic cells is in some connection or even conditioned by the intensity of growth of this structure.

We are yet unable to tell anything more concrete about the relation of this structure to cell division. But the question arises whether the decrease of the volume of this structure taking place after a short application of lower concentrations of colchicine is not in connection with, or does not conditionate, the destruction of the spindle which also takes place after treatment by colchicine. According to our opinion this connection is very probable. Němec has pointed to the probable connection between the nucleolus and the spindle as early as in 1910.

Concerning the relation of the rest of the nucleolar structures, i.e. of structures A and B to cell division we do not exclude the possibility of them having a certain influence on this process. This is valid mainly for structure B which could be in a certain relation to the chromosomes. Although structure A is rather important from the metabolic point of view, it is probable that it is in no essential connection with cell division. As soon as a cell is subjected to unfavourable life conditions and cell division is stopped altogether, (high doses of X — rays, treatment with various growth inhibiting substances) an increase of the size of structure A going hand in hand with a decrease of size of the rest of the nucleolar structures takes place. It is clear that these morphological changes are the result of the changed metabolism of the nucleolus. Work on these lines is in progress.

Summary

The paper deals with the influence of colchicine on nucleolar structures of the nucleoli of the root tips of *Cannabis sativa*. It was observed that as a result of prolonged treatment by higher concentrations of colchicine, when cell division is stopped altogether, a deformation of the differentiation of the nucleolar structures takes place. The influence of colchicine is reflected by defects or even complete stoppage of cell division on one hand and on the other hand by a gradual decrease or even complete disappearance of structure C.

References

1. Estable, C. et J. Sotelo: Una nueva estructura celular: el Nucleolonema. *Publ. Inst. invest. cien. biol.*, 1: 105—126, 1951.
2. Estable, C. et J. Sotelo: The behaviour of nucleolonema during mitosis. *Symp. at the VIIIth Congress of Cell Biol., Leiden, Series B, Nr. 21: 170—190, 1954.*
3. Herich, R.: Influence of colchicine on nucleoli. *Caryologia*, 2: 521—523, 1963.
4. Herich, R.: New Facts on the Structure of the Nucleolus. *Naturwissenschaften*, 50: 625—626, 1963 a.
5. Herich, R.: The nucleolus structure. I. Structure of the interphase nucleolus. *Cytologia (Tokyo)*, 1964 (in the press).
6. Herich, R.: The action of X-rays on the differentiation and development of nucleolar structures in relation to cell division. *Flora*, 1964 a (in the press).
7. Herich, R.: Specific staining of nucleolar structures with iron hematoxylin. *Acta F.R.N. Univ. Comen.*, 1965 (in the press).

8. Herich, R.: The significance of nucleolar structures for cells division. Acta F.R.N. Univ. Comen., 1965 a (in the press).
9. Němec, B.: Das Problem der Befruchtungsvorgänge und andere zytologische Fragen. Berlin, Verlag von Gebrüder Borntraeger, 1910.

Do redakcie dodané 8. 11. 1964

Adresa autora:

Katedra fyziológie rastlín Univerzity Komenského,
Bratislava, Odborárske nám. 12.

Пôsobenie kolchicínu na nukleolárne štruktúry

R. Herich

Сúhrн

Práca sa zaoberá vplyvom kolchicínu na nukleolárne štruktúry jadierok z koreňových vrcholkov *Cannabis sativa*.

V jadierku boli popísané tri nukleolárne štruktúry, predbežne označené, ako štruktúra A, B a C. V mladých jadierkach, tesne po ich diferenciacii nachádza sa štruktúra A a štruktúra B. Štruktúra A zaujíma prevažnú časť objemu jadierka. Štruktúra B má vláknitý tvar, alebo tvar malého chromozómu. Pôvodne diferencovaná hmota štruktúry B počas interfázy postupne narastá. Štruktúra C sa v mladých jadierkach nevyskytuje. Diferencuje sa až počas interfázy. Jej hmota sa v priebehu interfázy postupne znižuje, takže jadierka, tesne pred delením jadra, sú touto štruktúrou takmer celkom vyplnené. Štruktúra A, ktorá v mladých jadierkach zaujíma prevažnú časť objemu jadierka, vytvára v týchto jadierkach iba pomerne tenkú, povrchovú vrstvu.

Bolo pozorované, že pôsobenie kolchicínu prejavuje sa na jednej strane poruchami bunečného delenia až jeho úplným zabrzdnením (pri dlhšom pôsobení vyšších koncentrácií kolchicínu) na druhej strane postupným ubúdaním hmoty štruktúry C až jej úplným vymiznutím z jadierok (pri zabrzdnení bunečného delenia).

Vychádzajúc z doterajších údajov o nevyhnutnosti jadierka pre bunečné delenie, predpokladáme že prítomnosť, množstvo hmoty, ako i intenzita narastania hmoty štruktúry C úzko súvisí, respektíve podmieňuje delenie buniek, ako i intenzitu tohto delenia.

Действие колхицина на нуклеолярные структуры

Р. Герих

Резюме

В работе говорится о влиянии колхицина на нуклеолярные структуры из корневых верхушек *Cannabis sativa*.

Описаны три нуклеолярные структуры в ядрышке, меченные предварительно как структура А, В и С. В молодых ядрышках, сразу после их дифференциации находится структура А и структура В. Структура А занимает большую часть объема ядрышка. Структура В имеет волокнистую форму или вид малой хромосомы. Первоначально дифференцированная материя структуры В в течение интерфазы постепенно нарастает. Структура С в молодых ядрышках не встречается, она дифференцируется только во время интерфазы. Ее вещество в течение интерфазы постепенно умножается, так что ядрышка перед самым делением ядра почти вполне выполнены этой структурой. Структура А, занимавшая у молодых ядрышек большую часть объема ядрышка, создает в этих ядрышках лишь сравнительно тонкий поверхностный слой.

Наблюдением было установлено, что действие колхицина проявляется с одной стороны помехами клеточного деления вплоть до его полного заторможения (при более длинном воздействии высших концентраций колхицина), а с другой стороны постепенной убылью вещества структуры С до ее полного отсутствия в ядрышках (при заторможении клеточного деления).

Исходя из нынешних данных о необходимости ядрышка для клеточного деления предполагается, что наличие, количество матери и интенсивность нарастания вещества структуры С тесно вяжется, respektívno обуславливает клеточное деление и его интенсивность.

The significance of nucleolar structures for cells division

R. HERICH

The relation of the nucleolus to cell division is now in the center of interest of numerous cytologists and biochemists. Although the studies of this relationship are only in a more or less elementary stage most of the accumulated data indicate that the nucleolus is essential for the normal course of the mitosis and cell division (Mazia 1961, McLeish 1954, Philip and Haskins 1931 and others).

Mazia (1961) compiling the recent results of studies the relation of the nucleolus to cell division states: "The nucleolus is essential to the preparation for division, but its contributions have been completed by some point in prophase". Discussing the significance of the nucleolus for the prophase he mentions the following three possibilities: "1) The nucleolar substance moves on to the chromosome threads, participates in their mitotic behavior, and is carried by them into the daughter nuclei; 2) part or all of the nucleolar substance makes a contribution to the forming spindle; 3) there is an interchange of ribonucleoproteins and possibly other materials between nucleus and cytoplasm during mitosis".

The opinion, that for the normal course of cell division the presence of certain substances produced by the nucleolus is essential express many papers (Kiknadze 1961, Fujii 1954, 1955 and others). For instance Fujii (1955) concludes, that upon the initiation of mitosis, zinc or some zinc compound passes from the nucleolus into the chromosomes and possibly also into the spindle, and is acting by controlling the physical changes of these structures during the course of the mitosis.

This statement is valid for the nucleolus as an entity. When studying various nucleolar structures the question arises which of them is so closely related to cell division. No data on the importance or on the influence of "the nucleolonema" described by Estable and Sotelo (1951, 1954) on cell division are known to us.

In our former papers (Herich 1963, 1964) we have pointed to the existence of three clearly distinguishable nucleolar structures and have preliminarily designed these structures as structures A, B and C.

In this paper the significance of these nucleolar structures for cell division is discussed.

Material and methods

We have studied the structure of the nucleolus in cells of root tips of *Phaseolus vulgaris*, *Cannabis sativa*, *Lupinus polyphyllus*, *Vicia faba*, *Lilium candidum* and on cells of Ehrlich's ascites carcinoma. For fixation was used alcohol—chloroform (2 : 1 by volume), Lewitzki's fixative and alcohol—formol—acetic (30 : 15 : 1 by volume). Some of this material was prepared as sections by the paraffin method and some squashes. Staining was done with Heidenhain's iron hematoxylin, Feulgen reaction, methyl green—pyronin and basic fuchsin—picro—indigocarmin. Nucleic acids were removed from the sectioned tissue by hydrolysis in 5 per cent perchloric acid at 60 °C for 10 minutes.

Results and discussion

I. The differentiation and morphological build-up of nucleolar structures of meristematic plant cells

According to our recent observations in the first place structure B, than structure A and in the last phase structure C is differentiated.

Soon after the formation of young nucleoli the structure A filling out the greater part of the nucleolus, as well as structure B can be observed. In this initial stage structure B has either a thread-like shape or it resembles the shape of a small

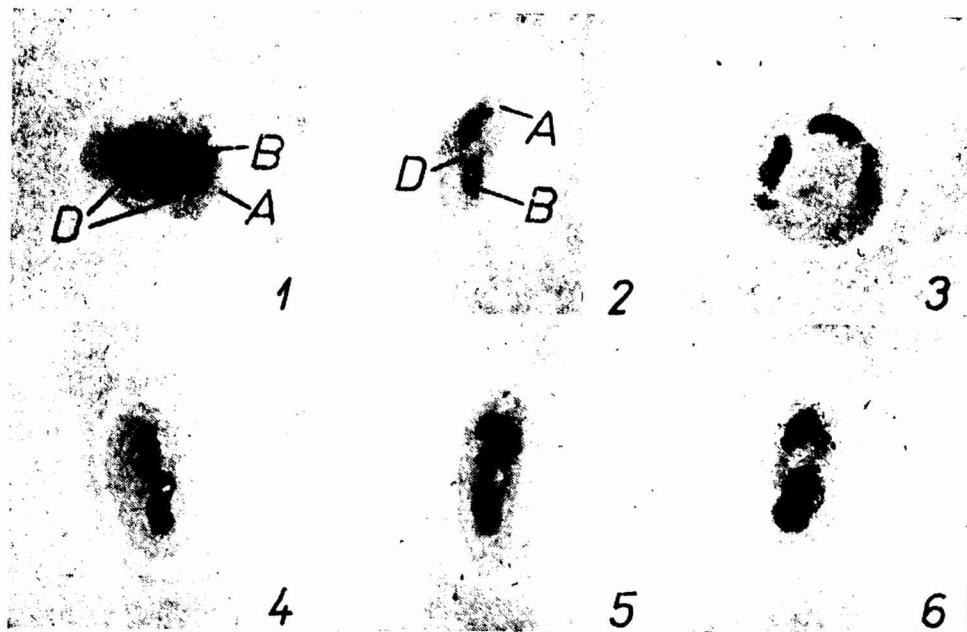


Fig. 1—6. Various initial shapes of nucleolar structures, *Cannabis sativa*, cca 4300× ;
For details see text.

chromosome (Fig. 1—6). The differences in the differentiation of structure B according to our opinion depends on or is conditioned by the different physiological determination of the nucleoli. Structure B contain a certain amount of DNA.

It can be seen in both cases that the substance of this structure is not homogenous but contains one or more heterogenous segments preliminarily desinged as segments D.

The volume of the substance of structure B increases during the interphase (Fig. 8—10). We are of the opinion that the observed growth of the substance of structure B taking place during the interphase is in connection with the increase of DNA in the nucleus which also takes place during the interphase and conditionates the transition of the cell into the stage of mitosis. During mitosis the substance of structure B is evenly spread out on the surface of the chromosomes and is evenly distributed into both daughter cells. As this structure was observed in the pollen mother cells, both in the pollen grains and in the pollen tubes we are of the opinion that this structure have a certain genetical significance, probably in connection with plasmatic heredity. It is possible, that this structure is even the direct carrier of this heredity. In our older investigations (Herich 1964) we have observed an interesting relation between the nucleoli and cytoplasmic male sterility. Defects in the formation of nucleoli of pollen grains of maize with cytoplasmic male sterility were observed.

Among all nucleolar structures structure C is differentiated last. The differentiation takes place in the near vicinity of the segments D (Fig. 7). During the interphase a gradual growth of structure C takes place so that in meristematic cells this structure can fill out the greater part of the nucleolus (Fig. 8—10). In such a case structure A forms only a very thin layer and structure B is spread out in various ways (sometimes in the form of a coil) on the surface of structure C.

When we are dealing with the thread-like type of structure B with several segments D the substance of structure C can be differentiated into several formations of various size. During the growth of the thread-like structures B its substance can be coiled in various ways thus forming various irregular formations.

In various types of tissues different amounts of substance of structure C are present. When comparing nucleolar structures of permanent and dividing tissues a very intensive growth of structure C can be observed, this structure, as has been already mentioned occupying the greater part of the volume of the nucleolus, structure A forming only a very thin surface layer. In nucleoli of permanent tissues structure C is present only in a much smaller amount. The greatest part of the volume of the nucleolus is occupied by structure A.

As we have already mentioned, structure C is the last to be differentiated. It does not occur in young nucleoli after cell division and is differentiated close to the segments D of structure B only during the interphase. The substance of this structure gradually grows during the interphase (Fig. 7—10). It is possible that the duration of the interphase of meristematic cells is in some connection (or even conditioned) by the intensity of growth of this structure.

When cells are acted upon by inhibitory substances and slowing down of the growth (cell division) takes place an increase of the size of structure A going on account of the sizes of structures B and C is observed. The increase of the size of structure B and C is substantially slowed down by inhibitory factors.

In our studies of influence of X-radiation on the cell (Herich 1964) we have observed, that radiation exhibits an influence not only upon chromosomes but its

influence can be clearly observed also in the differentiation and development of various nucleolar structures. 24 hours after the irradiation of germs of hemp by a dose of 10.000 r we have observed a striking decrease of the substance of struc

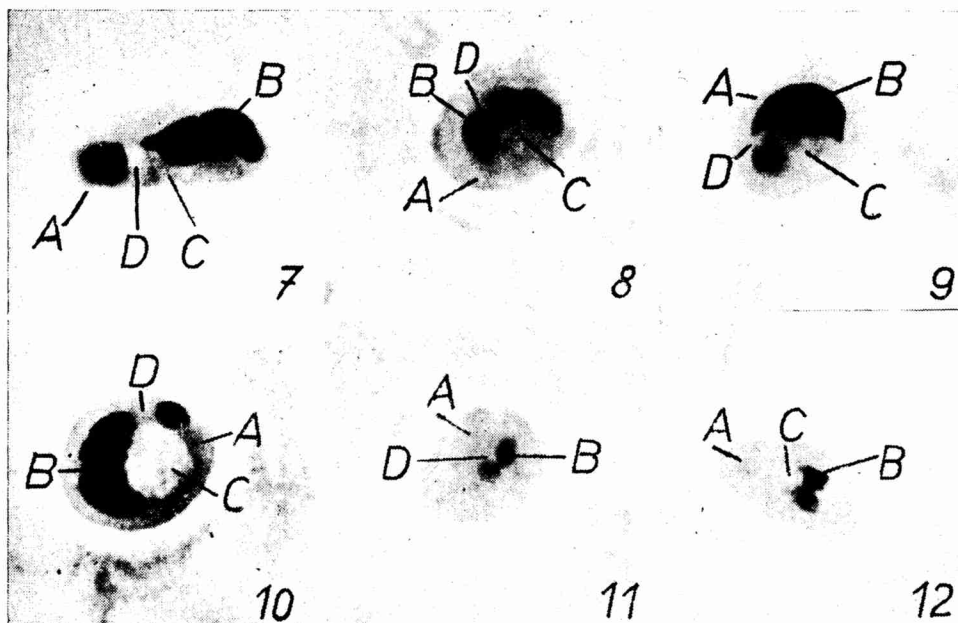


Fig. 7. The beginning of differentiation of structure C, *Vicia faba*, cca 3500 \times ;
 Fig. 8—10. The process of growth of the substance of structures B and C, *Cannabis sativa*, cca 3800 \times ;
 Fig. 11—12. Nucleolar structures of nucleoli of *Cannabis sativa* germs 24 hours after irradiation by a dose of 10 000 r, cca 3500 \times .

ture B and even more striking decrease of the substance of structure C which was completely absent in many nucleoli. The substantial part of the volume of the nucleolus was filled out by structure A (Fig. 11—12).

According to our studies carried out up to now it can be said that the presence of structure C is indispensable for cell division. When this structure disappears or if it is present only in a substantially smaller amount the cell is not able to divide.

II. The differentiation and morphological build-up of nucleolar structures of Ehrlichs' ascites carcinoma cells

It can be said that the differentiation and build-up of nucleolar structures of Ehrlichs' ascites carcinoma cells is in general analogous to that of meristematic plant cells (Fig. 13—16). Structure B is differentiated in the form resembling a chromosome and contains one, or several segments D. Structure C also starts to differentiate in the near vicinity of these segments of structure B. The volume of structure C successively increases during the interphase and gradually fills out nearly the whole nucleolus.

Our data on the intensive growth of the substance of structure C in the nucleolus of Ehrlich's ascites carcinoma cells are confirmed by the findings of Bernhard et al. (1955) who have studied the structure of nucleoli of normal and cancer cells

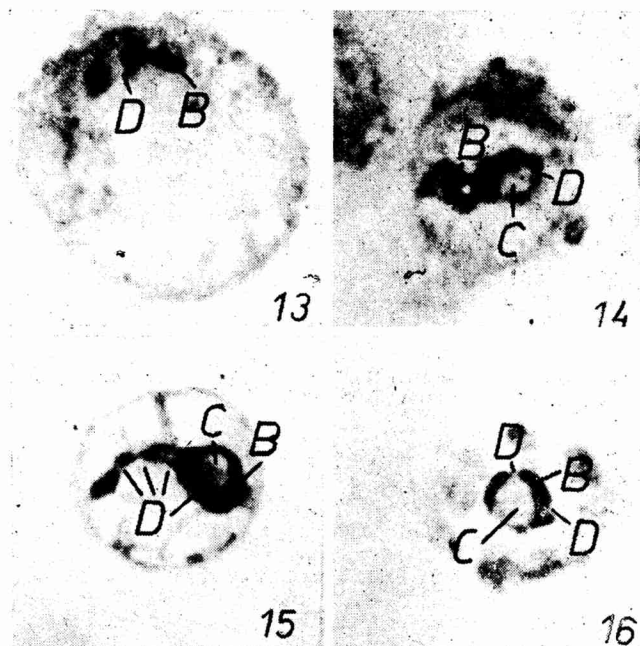


Fig. 13—16. Nucleolar structures in Ehrlich ascites carcinoma cells, cca 2300 \times .

with an electron microscope. These authors have also observed that in some carcinoma cells e. g. in Ehrlich's carcinoma the amorphous substance (which is identical with our structure C) can occur in a highly increased amount. They conclude: "Si la taille du nucléole de la cellule maligne est presque toujours très augmentée, sa structure fine reste la même. Elle a un aspect réticulé, avec ou sans masse homogène. Il y a des exceptions à cette règle: dans la tumeur d'Ehrlich, par exemple, la "pars amorpha" prédomine et souvent existe seule. Nous ne savons pas encore si un nucléole purement filamenteux peut élaborer entre ses mailles la substance homogène, s'il peut s'homogénéiser entièrement pendant certaines phases de son activité, ou s'il est, dans certains cas, homogène d'emblée".

In our studies the basic substance of the nucleolus was, as has been already mentioned, preliminarily designed as structure A and we presume the thread-or net-like structure and the amorphous structure to be identical with our structures B and C, respectively. When comparing the results of our studies with the results of Bernhard et al. (1955) we may state that these results are in good agreement and practically identical with ours. It was proved by electronmicroscopic studies that in the basic substance of the nucleolus beside thread-like or net-like structures also the existence of a certain amount of an amorphous substance can be clearly distinguished.

On the other hand our studies already indicate that the shape of nucleolar structures can vary, probably depending on the physiological function of the cell and nucleus. Beside this depending on their stage of evolution the form of the nucleolar structures can vary even in individual nucleoli. This is the reason why we do not consider it correct to anticipate a single constant, universal build-up of nucleolar structures for all organisms and their various tissues in all the cells at all times.

Summary

In the paper three fundamental nucleolar structures preliminarily designed as structure A, B and C are described. A brief description of their differentiation, morphological build-up and relation to cell division is presented.

It was observed, that the differentiation and morphological build-up of nucleolar structures of Ehrlich's ascites carcinoma cells is in general analogous to that of meristematic plant cells.

References

1. Bernhard, W., A. Bauer, A. Gropp, F. Haguenu et Ch. Oberling: L'ultrastructure du nucléole de cellules normales et cancéreuses. *Exptl. Cell Research*, 9: 88—100, 1955.
2. Estable, C. et J. Sotelo: Una nueva estructura celular: el Nucleolonema. *Publ. Inst. invest. cien. biol.*, 1: 105—126, 1951.
3. Estable, C. et J. Sotelo: The behaviour of nucleolonema during mitosis. *Symp. at the VIIIth congress of Cell Biol.*, Leiden, Ser. B, Nr 21: 170—190, 1954.
4. Fujii, T.: Presence of zinc in nucleoli and its possible role in mitosis. *Nature*, 178: 1108—1109, 1954.
5. Fujii, T.: Observations on the Behavior of Zinc during Mitosis in Fresh Staminal Hair Cells of *Tradescantia*. *J. Fac. Sci. Tokyo Univ.*, VII: 327—334, 1955.
6. Herich, R.: New Facts on the Structure of the Nucleolus. *Naturwissenschaften*, 50: 625—626, 1963.
7. Herich, R.: The nucleolus structure. I. Structure of the interphase nucleolus. *Cytologia (Tokyo)*, 1964 (in the press).
8. Herich, R.: Nucleoli and Cytoplasmic Male Sterility. *Z. Vererbungsl.*, 1964a (in the press).
9. Herich, R.: The action of X-rays on the differentiation and development of nucleolar structures in relation to cell division. *Flora*, 1964b (in the press).
10. Kiknadze, I. I.: On interaction between the nucleolus and chromosomes. *Citologija (Moskva)*, 3: 3—19, 1961.
11. Mazia, D.: *The Cell*, Vol. III., Acad. press, New York, London, 1961.
12. McLeish, J.: The consequences of localised chromosome breakage. *J. Heredity*, 8: 385—405, 1954.
13. Philip, J. and C. L. Haskins: The cytology of *Matthiola incana* R. B. R. especially in relation to the inheritance of double flowers. *J. Genet.*, 24: 359—404, 1931

Adresa autora:
Katedra fyziologie rastlin Univerzity Komenského,
Bratislava, Odborárske nám. 12

Do redakcie dodané 8. XI. 1964

Význam nukleolárných štruktúr pre delenie buniek

R. Herich

Súhrn

V práci sa opisujú tri základné nukleolárne štruktúry, predbežne označené ako štruktúra A, B a C. Podáva sa stručná charakteristika týchto štruktúr, ich diferenciacia, morfológická stavba a vzťah k deleniu buniek.

Bolo pozorované, že diferenciacia a morfológická stavba nukleolárných štruktúr buniek Ehrlichovho ascitického carcínómu je analogická ako v meristematických bunkách rastlín.

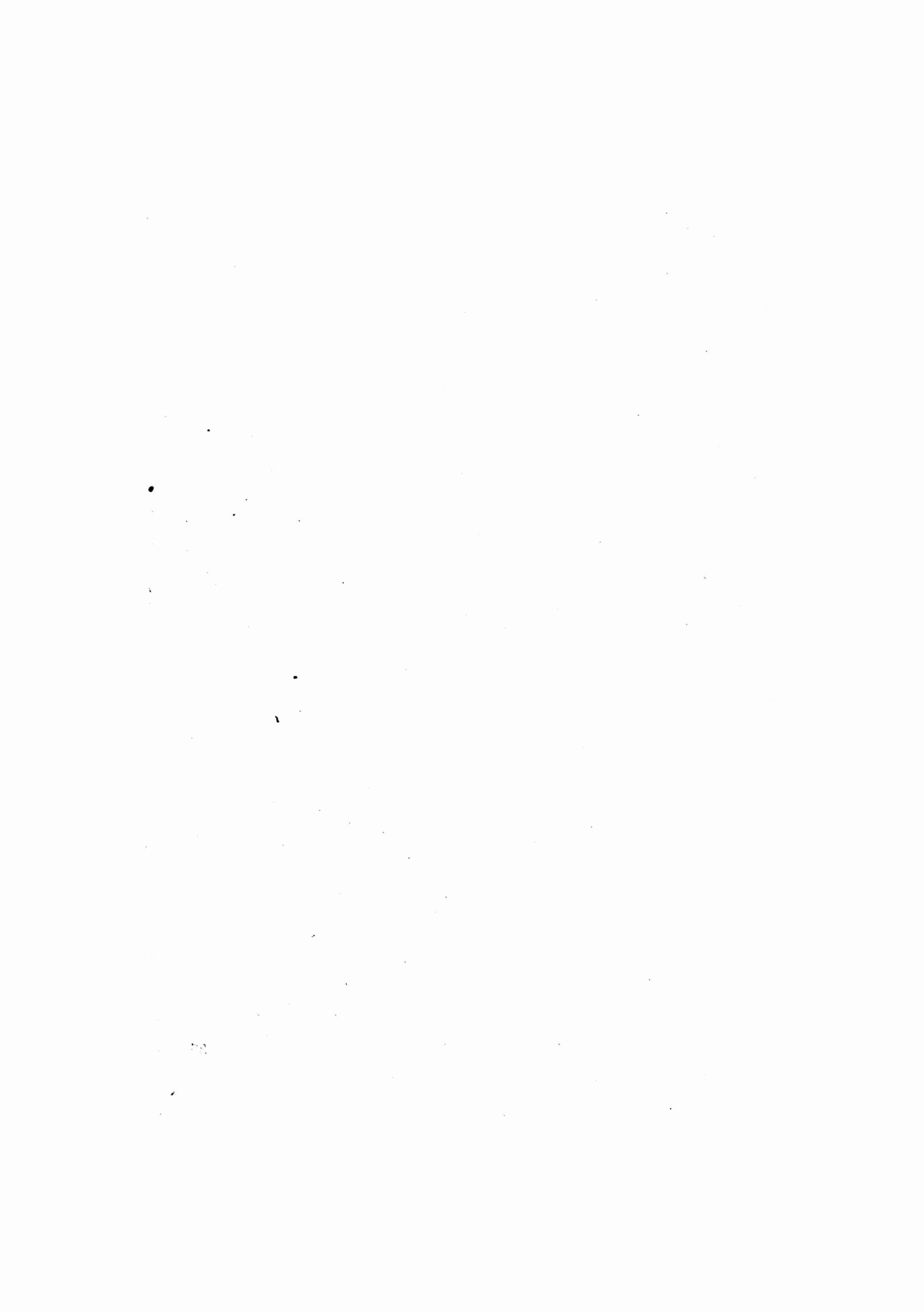
Значение нуклеолярных структур для клеточного деления

Р. Герих

Резюме

В работе описываются три основные нуклеолярные структуры, предварительно обозначенные как А, В и С. Приводится сжатая характеристика этих структур, их дифференциация, морфологическое строение и их отношение к делению клеток.

Наблюдения показали, что дифференциация и морфологическое строение нуклеолярных структур клеток асцитического карцинома Эрлиха является аналогической как и в меристематических клетках растений.



Specific staining of nucleolar structures with iron hematoxylin

R. HERICH

According to Estable and Sotelo (1951) the nucleolus consists of two components, the nonstructural amorphous substance "pars amorpha", in which the second component, the thread-like "nucleolonema" is located. Estable and Sotelo (1952) have described several methods for the identification of the nucleolonema. By these methods certain structures of the nucleolus can be observed, but not clearly enough, to make the details of these structures. In our studies of nucleolar structures we have used hematoxylin for the staining of the nucleoli. The result was astonishing. Not only that we have obtained detailed pictures of the structure of the nucleolus, but it became clear, that the nucleolus consists of three fundamental structures.

According to our observations, the so called "nucleolonema" is not homogenous structure, but consists of two biochemically different components. On grounds of these findings we do not consider the expression "nucleolonema" as a correct name for both of the components mentioned. To avoid misunderstandings and possible interchanges of the various structures described in our paper, we preliminarily designate them as structures A, B and C. The location of these structures in the nucleolus can be seen in the photographs presented.

The staining procedure evolved is as follows:

1. The material is fixed either in Lewitzki's fixative, or in fixing fluid consisted of three parts of 95 % alcohol to one part chloroform, or in some other fixing fluid for the fixing of nucleoli. Depending on the kind of fixation employed and on the kind of material, the specimens are fixed a duration from 12 to 24 hours. The material is dehydrated in tertiary butyl alcohol and embedded in paraffin wax. Sections are cut at 5 μ and attached to albumenized slides.

2. Mordanting is done in a 4 % solution of ferric ammonium sulphate for 2—5 hours. The sections are thoroughly washed for 5 min in running tap-water and then rinsed with distilled water.

3. Stained in 0.5 % aqueous hematoxylin. 30—36 hours is the optimum time. The excess of stain is washed off with water.

4. The sections are destained in 1.5 % ferric ammonium sulphate. The nucleoli are intensely stained by hematoxylin, their destaining proceeds slowly from the beginning and has to be followed microscopically. As soon as structures start to

emerge in the nucleoli, the destaining procedure has to be broken off as the destaining of these structures proceeds fairly rapidly. Especially rapid is the destaining of the structure A.

5. The sections are washed for 1 hour in running tap-water and dehydrated in alcohol, cleared with xylene and mounted in Canada balsam or synthetic resin by the usual techniques.

6. Permanent squashes are prepared according to the method of Murin (1960).

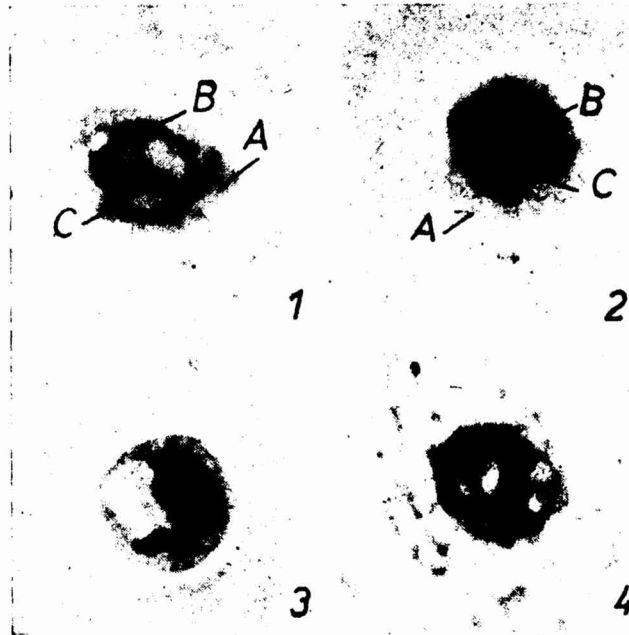


Fig. 1—4. Various formations of the nucleolar structures in an advanced stage of development. For details see text.

By the described method of staining we succeeded in studying also the course of the differentiation of the various nucleolar structures as well as their morphological composition. The technic appears to be highly specific for the study nucleolar structures and for the study of the cyclic behavior of the nucleolar structures during cell division.

We will discuss the differentiation, the morphological build-up and the significance of various nucleolar structures in more detail in separate papers.

The described method has been applied to a number of different species and tissues and seems to be universally applicable.

Summary

A simple method for the staining of nucleolar structures is described. The material is fixed in Lewitzki's fluid or in some other fixing fluid for the fixing of nucleoli and stained with Heidenhain's iron hematoxylin. The differentiation is carried out in a 1.5 % solution of ferric ammonium sulphate.

By this method three different structures can be clearly distinguished in the nucleolus. As a detailed picture of the structure of the nucleolus can be obtained with this method, it is especially suitable for studies of nucleolar structures, their differentiation and morphological build-up.

References

- Estable C. and Sotelo, J. R., 1951: Una nueva estructura celular: el nucleolonema. Publ. Inst. Inv. Cien. Biol., Montevideo, 1: 105—126.
Estable, C. and Sotelo J. R., 1952: Technical procedures for the study of the nucleolonema. Stain Techn., 27: 307—312.
Murín, A., 1960: Substitution of Cellophane for Glass Cover to Facilitate Preparation of Permanent Squashes and Smears. Stain Techn., 35: 351—353.

Adresa autora:

Katedra fyziológie rastlín Univerzity Komenského,
Bratislava, Odborárske nám. 12 (Czechoslovakia).

Do redakcie dodané 8. XI. 1964

Špecifické farbenie nukleolárnych štruktúr železitým hematoxylinom

R. Herich

Súhrn

Opisuje sa jednoduchá metóda farbenia nukleolárnych štruktúr. Material sa fixuje Lewitzkého fixačnou tekutinou, prípadne inou fixačnou tekutinou fixujúcou jadierka. Na farbenie sa používa Heidenhainov železitý hematoxylin. Optimálna doba farbenia je 30—36 hodín. Diferenciácia sa robí v 1,5 % roztoku síranu železito-amónneho.

Pomocou tejto metódy možno v jadierku jasne rozlíšiť tri štruktúry. Metóda je obzvlášť vhodná pre štúdium štruktúry jadierka, keďže pri jej použití získava sa detailný obraz o nukleolárnych štruktúrach. Uvedenou metódou sa nám podarilo preštudovať taktiež priebeh diferenciácie jednotlivých nukleolárnych štruktúr, ako aj ich morfológickú stavbu.

Специфическое крашение нуклеолярных структур при помощи железистого гематоксилина

Р. Герих

Резюме

Описывается несложный метод крашения нуклеолярных структур. Материал фиксируется при помощи жидкости Левитцкого, эвентуально другой жидкости, фиксирующей ядрышка. При крашении применяется железистый гематоксилин по Хейденхайну (Heidenhain). Оптимальный срок крашения составляет 30—36 часов. Дифференциация проводится в 1,5% растворе железисто-амонного сульфата.

С помощью того метода можно различить в ядрышке три структуры. Метод особенно удобный для изучения структуры ядрышка, так как при его применении получается детальный образ нуклеолярных структур. Применением приведенного метода нам удалось изучить также процесс дифференциации отдельных нуклеолярных структур и их морфологическое строение.

Exist a nucleolar membrane?

R. HERICH

It is generally believed that nucleoli do not have a surface membrane. Very few data on the existence of a nucleolar membrane were published up to now (Cajal 1903, Callan 1952, Pfeiffer 1955, Rieger und Michaelis 1958). For instance Rieger and Michaelis (1958) in the definition of the nucleolus about the existence of nucleolar membrane says: „Der Nukleolus ist ein dichter, abgerundeter, mit einer elastischen Membran versehener, in der Regel optisch homogener, endonukleärer Körper, der pro Zelle in Ein- oder Mehrzahl auftritt.“

According to Pfeiffer (1955) the surface layers of nucleoli of the leucocytes “are built up by a foil consisting of protein leptones parallel with the surface and of enclosed lipid molecules, that is to say, the surface layer of the nucleolus appears as a spherical skin with constant expansions in all tangential directions”.

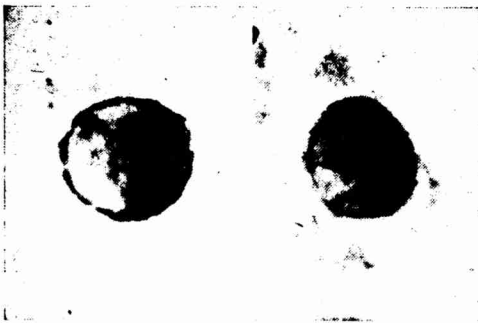


Fig. 1—2. Accumulation of the stain in the surface layer of nucleoli, *Cannabis sativa*, cca 4000 \times .

We have studied the existence of a nucleolar surface membrane in cell of root tips of *Cannabis sativa*. For fixation was used Lewitzki's fixative. Staining was done with Heidenhain's iron hematoxylin. Differentiation was carried out very carefully in a 1,5 % solution of ferric ammonium sulphate.

The nucleoli are intensely stained by hematoxylin. Hematoxylin stains the whole nucleolus intense black. When the nucleoli are precisely differentiated an intense

accumulation of the stain was observed in the surface layer indicating the possible existence of a surface membrane.

Summary

In surface layer of the nucleoli of root tips of *Cannabis sativa* some evidence for the existence of a nucleolar membrane was observed.

References

1. Cajal, R. S.: Un sencillo método de coloracion del reticulo protoplásmico y sus efectos en los diversos organos nerviosos. Trabs. Lab. Inv. Biol. Madrid, 2, 129, 1903.
2. Callan, H. G.: A general account of experimental work on amphibian oocyte nuclei. Symp. of the Soc. f. Exp. Biol., Cambridge, 1952.
3. Pfeiffer, H. H.: Zentrifugen- und polarisationsmikroskopische Untersuchungen am Nucleolus in vitro. Exptl Cell Research, 9, 319, 1955.
4. Rieger, R., A. Michaelis: Genetisches und cytogenetisches Wörterbuch. Springer. Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg, 1958.

Adresa autora:
Katedra fyziologie rastlín Univerzity Komenského,
Bratislava, Odborárske nám. 14

Do redakcie dodané 14. XI. 1964

Existuje nukleolárna membrána?

R. Herich

Súhrn

V povrchovej vrstve jadriok z koreňových vrcholov *Cannabis sativa* pozorovali sa určité náznaky existencie nukleolárnej membrány.

Существует ли нуклеолярная мембрана?

Р. Герих

Резюме

В поверхностном слое ядрышек из корневых верхушек *Cannabis sativa* наблюдались определенные признаки наличия нуклеолярной мембраны.

Množstvo a veľkosť prieduchov — ich vplyv na transpiráciu

A. BENČAŤOVÁ

Úvod a problematika

Práca, ktorú uvádzame, nadväzuje na článok „Príspevok k štúdiu vodného režimu konopí“, Benčaťová (1963) a dopĺňa charakter vodného režimu konopí z hľadiska anatomického. Pozorované sú v nej prieduchy a ich vplyv na transpiráciu. Maksimov (1952) a iní autori pripisujú prieduchom schopnosť transpiráciu regulovať. Sledovali sme množstvo a veľkosť prieduchov opäť u dvoch odrôd konopí Šumperských a Rastislavických, na dvoch stanovištiach Bratislava (Botanická zahrada) a Mlyňany.

Materiál a metodika

Za účelom pozorovania prieduchov, ich množstva a veľkosti sme listy odoberali v tom istom čase, ako bola sledovaná intenzita transpirácie, I., IV., VI., IX. list. Listy sme fixovali priamo na políčku do fixačného roztoku:

1 % kyselina chrómová 3 ml,

10 % formaldehyd 17 ml.

Dva dni sme ich nechali vo fixačnom roztoku, potom premyli destilovanou vodou a ďalšie dva dni ostali v destilovanej vode. Po dôkladnom premytí boli konzervované do 6 % formaldehydu, pretože pre nedostatok času mohli byť spracované až v zimnom období. Keďže sme prieduchy pri bežných metódach (Wollfova — odtlačková, pri jednoduchom reze žiletkou atď.) pre veľké množstvo trichómov nemohli pozorovať, použili sme čerstvo pripravený Javelov roztok, kde boli listy pozbavené chlorofylu. Pre dôkladnejšiu prehľadnosť listu boli dané do nezriedeného glycerolu na 30 minút.

Časť preparátov sme vyhodnotili priamo v glycerole. Pre možnosť kontroly sme pripravili u všetkých odberov trvalé preparáty, zalievané do glycerol-želatíny. Pre pozorovanie sme odoberali vrchol, stred a bázu u I. listu. U ďalších dlanito 5—7-sečných listov tiež vrchol, stred a bázu stredného listku.

Veľkosť prieduchov sme merali okulárovým mikrometrom a prepočítali na

objektívne hodnoty. Na vyhodnocovanie sme brali priemer z 50 meraní. Priemer množstva prieduchov sme počítali z 20 zorných polí.

Výsledky

A — stanovište Bratislava (Botanická záhrada)

a) Šumperské konope

Prieduchy sme pozorovali u I., IV., VI. a IX. listu. Množstvo a veľkosť prieduchov u konopí Šumperských sú uvedené v tabuľke 1. Značne je odlišný I. list, ktorý má nízky počet prieduchov, no v porovnaní so IV., VI. a IX. listom sú oveľa väčšie. Postupne k mladším listom veľkosť prieduchov klesá a stúpa počet.

Tabuľka 1

List	Veľkosť prieduchov			Množstvo prieduchov na 39,3 μ^2		
	vrchol	stred	báza	vrchol	stred	báza
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
I	38,4	42,4	42,4	6,7	6,2	5,8
IV	30,8	31,6	31,2	12,5	11,9	10,8
VI	22,8	22,8	23,2	14,1	14,3	11,5
IX	21,6	22,4	23,2	16,1	17,0	16,3

b) Rastislavické konope

U rastislavických konopí sme pozorovali o niečo nižšie množstvo prieduchov, veľkosť je tiež menšia ako u konopí Šumperských. IX. list má najvyšší počet prieduchov, zároveň sú najmenšie. U I. listu je závislosť opačná.

Tabuľka 2

List	Veľkosť prieduchov			Množstvo prieduchov na 39,3 μ^2		
	vrchol	stred	báza	vrchol	stred	báza
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
I	35,6	38,4	41,6	7,9	7,5	6,5
IV	30,0	30,8	31,6	11,2	11,0	10,3
VI	22,4	22,8	23,6	13,9	13,0	11,4
IX	21,2	22,4	23,2	15,4	15,0	14,8

B — stanovište Mlyňany

a) Šumperské konope

Prieduchy sme pozorovali u I., VI., VII. a IX. listu. Medzi jednotlivými listami

sú rozdiely v množstve a veľkosti prieduchov väčšie ako v predošlých prípadoch. Prieduchy I. listu sú tiež v porovnaní s ostatnými najväčšie. Výsledky uvádzame v tabuľke 3.

Tabuľka 3

List	Veľkosť prieduchov			Množstvo prieduchov na 39,3 μ^2		
	vrchol	stred	báza	vrchol	stred	báza
	\bar{x}	\bar{x}	x	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
I	34,8	34,8	37,6	7,0	6,6	6,6
VI	26,8	27,6	28,0	15,0	14,0	11,0
VII	26,0	26,8	27,6	17,0	15,0	13,0
IX	23,6	24,0	25,6	19,0	18,0	15,0

b) *Rastislavické konope*

Prieduchy sme sledovali u tých istých listov ako u Šumperských konopí. V rámci danej odrody sa závislosť medzi jednotlivými listami javí rovnaká, ale celkové hodnoty množstva a veľkosti sú nižšie ako u Šumperských konopí.

Tabuľka 4

List	Veľkosť prieduchov			Množstvo prieduchov na 39,3 μ^2		
	vrchol	stred	báza	vrchol	stred	báza
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
I	31,6	35,2	36,4	6,8	6,6	6,3
VI	24,4	24,0	24,8	13,0	10,0	9,0
VII	24,0	24,8	25,2	15,0	13,0	11,0
IX	22,8	24,4	25,2	18,0	16,0	14,0

Pri porovnávaní výsledkov dvoch uvedených odrôd dosahujú vyššie hodnoty veľkosti aj množstva prieduchov Šumperské konope. Hodnoty v rámci uvedených stanovísk sú približne rovnaké.

Diskusia

Pretože prieduchy sú jedným z hlavných vnútorných faktorov transpirácie Slavík (1958), Maksimov (1952), Hartel (1947) a iní, sme sledovali ich veľkosť a množstvo v niektorých fenofáz súčasne s transpiráciou. Na to, aby sme mohli dávať intenzitu transpirácie do priameho vzťahu s prieduchmi, je potrebné súčasne pozorovať stupeň otvorenosti zatváraných buniek. Najvhodnejšia metóda pre štúdium otvorenosti zatváraných buniek prieduchu v teréne je Wolfova odtlačková

Wolf (1954). Táto metóda by danej úlohe vyhovovala. No túto metódu ani ostatné sme použiť nemohli pre veľké množstvo trichómov, ktoré úplne zabraňovali zvliekaniu pokožky z listu. Pri použití dosť drastického roztoku (Javelov roztok) sme nemohli pozorovať len veľkosť a množstvo prieduchov.

To, že prieduchy vystupujú ako jeden z dôležitých vnútorných faktorov transpirácie, by sme na základe našich výsledkov tiež mohli potvrdiť. Nasvedčujú tomu vyššie hodnoty veľkosti a množstva prieduchov u odrody Šumperské konope, a práve u tejto odrody bola aj vyššia intenzita transpirácie, Benčaťová (1963).

Maksimov (1952) sledoval intenzitu transpirácie v závislosti od množstva prieduchov. Do úvahy bral len stomatárnu transpiráciu, pretože kutikulárna transpirácia je vraj len maličké percento stomatárnej. Podobne Slavík (1954) v opísanej Ivanovovej metóde uvádza prepočet intenzity transpirácie na jednotku plochy, zdôrazňujúc pritom, že značne vyššie percento zastupuje práve stomatárna transpirácia. Predpokladáme preto, že zvýšenú intenzitu transpirácie Šumperských konopí mohli zvýšiť aj prieduchy, ich zvýšená veľkosť a množstvo.

Značné rozdiely v množstve a veľkosti prieduchov medzi I. až IX. listom vyplývajú zo zákona Zalenského, Němec, Pastýrik (1956).

Záver

Práca sa zaoberá veľkosťou a množstvom prieduchov na listoch niektorých internódií u *Cannabis sativa* a ich vplyvu na intenzitu transpirácie.

Z práce vyvodzujeme tieto uzávery:

1. Odroda Šumperských konopí dosahuje vyššie hodnoty veľkosti a množstva prieduchov ako odroda Rastislavických konopí a aj vyššie hodnoty intenzity transpirácie, Benčaťová (1963).
2. Veľkosť prieduchov klesá od najnižšie inzerovaného listu na osi k najvyššie inzerovanému a stúpa ich množstvo.

Literatúra

1. Benčaťová A.: Príspevok k štúdiu vodného režimu konopí (*Cannabis sativa* L.). Acta F. R. N. Univ. Comen. VIII, 5—6., Botan. 1963.
2. Härtel O.: Über die pflanzliche Kutikulartranspiration und ihre Beziehungen zur Membranquellbarkeit. Sitzungsber. d. mathem. naturw. Kl. d. Akad. Wiss. Wien, Abd. I. 156—157. 1947.
3. Maksimov N. A.: Izbrannye raboty po zasuchoustojčivosti i zimostojkosti rastenij. Izd. Akad. Nauk SSSR, 1952.
4. Němec B., Pastýrik E.: Všeobecná botanika. Bratislava 1956.
5. Slavík B.: Rostliny a stanovištní vlhkost. Praktikum fytoecologie, ekologie, klimatologie a půdoznalectví 227—326, Praha 1954.
6. Slavík B.: The Influence of Water Deficit on Transpiration Physiologia Plantarum 11: 524—536, 1958.
7. Wolf I.: Mikroskopická technika. Praha 1954.

Adresa:
Katedra fyziologie rostlin Univerzity Komenského,
Bratislava, Odborárske nám. 12.

Do redakcie dodané 8. XI. 1964

**Число и величина устьиц — их влияние на транспирацию
(у *Cannabis sativa* L.)**

А. Бенчатъова

Резюме

В работе обсуждается величина и множество устьиц на листьях некоторых интернодий у *Cannabis sativa* и их влияние на интенсивность транспирации.

Из работы вытекают следующие выводы:

1. Порода шумперских конопель достигает более высоких стоимостей и большого количества устьиц чем порода растиславицких конопель, причем проявляется также более высокая интенсивность транспирации. (Бенчатъова 1963.)

2. Величина устьиц в направлении от самого низкопомещенного листка на оси к самому высокому уменьшается, причем их количество повышается.

**Die Zahl und Grösse der Durchlüftungsorgane (Atmungswurzeln) und ihr Einfluss
auf die Transpiration (bei *Cannabis sativa* L.)**

A. Benčáfová

Zusammenfassung

Die Arbeit berichtet über die Grösse und Zahl der Blätterstomata bei manchen Internodien der *Cannabis sativa* und über ihren Einfluss auf die Transpirationsintensität.

Aus der Arbeit gehen folgende Schlüsse hervor:

1. Schumberger Hanfsorte erreicht in ihrer Grösse, wie auch in der Zahl der Blätterstomata höhere Werte als Rastislavitzer Sorte. Sie erreicht höhere Werte auch in der Transpirationsintensität (Benčáfová 1963).

2. In der Richtung von dem auf der Achse niedrigstinsertierten zum höchstinsertierten Blatt vermindert sich die Grösse der Blätterstomata, vergrößert sich aber ihre Zahl.

ACTA FACULTATIS
RERUM NATURALIUM UNIVERSITATIS COMENIANAE
BOTANICA

Vydalo Slovenské pedagogické nakladateľstvo v Bratislave — Schv. vým. SÚKK 1549/I-64 —
Náklad 1020 — Rukopis zadany 26. novembra 1964 — Vytlačené v júni 1965 — Papier 5153-01,
70×100, 70 g — Vytlačil TISK, knižní výroba, n. p., Brno, provoz 1 — Tlačené zo sadzby
Monotype písmom Times — K-02*51047

03/15

Celý náklad prevzala Ústredná knižnica PFUK Šmeralova 7.

67-417-65

ACTA FACULTATIS RERUM NATURALIUM UNIVERSITATIS COMENIANAE

sú fakultný zborník určený na publikovanie vedeckých prác interných a externých učiteľov našej fakulty, interných a externých aspirantov a našich študentov. Absolventi našej fakulty môžu publikovať práce, v ktorých spracúvajú materiál získaný za pobytu na našej fakulte. Redakčná rada si vyhradzuje právo z tohto pravidla urobiť výnimku.

Práce musí odporučiť katedra. Práce študentov musí odporučiť študentská vedecká spoločnosť a príslušná katedra.

Publikovať možno v jazyku slovenskom alebo českom, prípadne v ruskom alebo anglickom, francúzskom alebo nemeckom. Práce podané na publikovanie majú byť písané strojom na jednej strane papiera, ob riadok, tak aby jeden riadok tvorilo 60 úderov a na stránku prípadlo 30 riadkov. Rukopis treba podať dvojmo a upraviť tak, aby bolo čo najmenej chýb a preklepov. Nadmerný počet chýb zdražuje tlač a ide na účet autora.

Rukopis upravte tak, že najprv napíšete názov práce, pod to meno autora. Pracovisko, pokiaľ je na našej fakulte, sa neuvádza. Iba tam, kde je viac spolupracovníkov a niektorý z nich je z mimofakultného pracoviska, uvádzajú sa všetky pracoviská. Aj tam, kde práca bola vypracovaná na dvoch pracoviskách, treba ich obidve uviesť.

Fotografie treba podať na čiernom lesklom papieri a uviesť meno autora, zmenšenie a text pod obrázok. Kresby treba urobiť tušom na priehladnom papieri (pauzák) alebo na rysovacom papieri a taktiež uviesť meno autora, zmenšenie a text pod obrázok.

Každá práca musí mať resumé v ruskom a niektorom západnom jazyku. K prácam, publikovaným v cudzom jazyku, načím pripojiť resumé v slovenskom (českom) jazyku a v jazyku západnom v prípade publikácie v ruskom jazyku, alebo v ruskom jazyku v prípade publikácie v jazyku západnom. *Nezabudnite pri resumé uviesť vždy názov práce a meno autora v rovnakom poradí ako v základnom texte.* Za správnosť prekladu zodpovedá autor.

Autori dostávajú stĺpcové a zalomené korektúry, ktoré treba do 3 dní vrátiť. Rozsiahlejšie zmeny priebehu korektúry idú na farchu autorského honoráru. Každý autor dostane okrem príslušného honoráru i 50 separátov.

Redakčná rada.

Zemanová M.: Príspevok ke štúdiu vzťahu medzi koncentráciou, dobou pôsobenia a biologickým efektom antifungálnych látok	1
Zemanová M.: Mikrobiologická metóda na pôsobenie stability antifungálnych látok vo vodnom prostredí	11
Zemanová M.: Štúdium nových ochranných fungicidov pre použitie do nitrolakov .	17
Herich R.: Pôsobenie kolchicínu na nukleolárne štruktúry	25
Herich R.: Význam nukleolárnych štruktúr na delenie buniek	29
Herich R.: Špecifické farbenie nukleolárnych štruktúr železitým hematoxylinom. .	37
Herich R.: Existuje nukleolárna membrána?	41
Benčat'ová A.: Množstvo a veľkosť prieduchov — ich vplyv na transpiráciu . .	43

Земанова М.: К изучению отношений между концентрацией премений воздействия и биологическим эффектом антифунгалных веществ	1
Земанова М.: Микробиологический метод определения стабильности антифунгалных веществ в водной среде	11
Земанова М.: Изучение новых охранных фунгицидов для их применения нитролака	17
Герих Р.: Действие колхицина на нуклеоларные структуры	28
Герих Р.: Значение нуклеоларных структур для клеточного деления	29
Герих Р.: Специфическое крашение нуклеоларных структур при помощи железного гепатоксилина	37
Герих Р.: Существует ли нуклеоларная мембрана?	41
Бенчат'ова А.: Число и величина устьиц — их влияние на транспирацию . .	43

Zemanová M.: Ein Beitrag zum Studium der Verhältnisse zwischen der Konzentration, der Wirkungsdauer und dem biologischen Effekt der Antifungalstoffe . . .	1
Zemanová M.: Eine mikrobiologische Methode zur Beurteilung der Stabilität der Antifungalstoffe im Wassermilieu	11
Zemanová M.: Study of New Protective Fungicides for Use in Cellulose-nitrate Laquers	17
Herich R.: Influence of colchine on nucleolar structures	25
Herich R.: The significance of nucleolar structures for cells division	29
Herich R.: Specific slaining of nucleolar structures with iron hematoxylin	37
Herich R.: Exist a nucelolar membrane?	41
Benčat'ová A.: Die Zahl und Grösse der Durchflüchtungsorgane und ihr Einfluss auf die Transpiration	43