

WIRKUNG VON HEMMSTOFFEN  
DER DNS-, RNS- UND PROTEINSYNTHESE AUF WACHSTUM  
UND ANTHERIDIENBILDUNG IN PROTHALLIEN  
VON *ANEMIA PHYLLITIDIS* L.

H. SCHRAUDOLF

Botanisches Institut der Universität Gießen

Eingegangen am 10. Oktober 1966

EFFECT OF INHIBITORS OF DNA-, RNA-, AND PROTEIN  
SYNTHESIS ON GROWTH AND ANTHERIDIUM FORMATION  
IN *ANEMIA PHYLLITIDIS*

*Summary.* A number of inhibitors of DNA-, RNA-, and protein synthesis were applied to prothallia of *Anemia phyllitidis*, and their effects were investigated with regard to cell division and inhibition of antheridium formation (after induction by gibberellin A<sub>3</sub>). All compounds tested cause a significant inhibition of growth accompanied by teratologies typical for each inhibitor. Only 5-bromouracil proved to be inactive, even at a concentration of  $8 \times 10^{-4}$  m.

None of the inhibitors blocked the induction of the biplanar growth form in continuous light.

With the exception of 5-bromodeoxyuridine and 5-iododeoxyuridine all the antimetabolites investigated cause a significant lag in antheridium formation. The result of an analysis of this inhibition on the basis of the "critical cell number," (SCHRAUDOLF, 1966a) demonstrates that this time lag is clearly a direct consequence of the retardation of cell division caused by the inhibitors. There is no inhibition of the induction process proper. So therefore it appears highly improbable that antheridium induction in *Anemia* by gibberellins is based on a specific gene activation in the sense of JACOB and MONOD.

The results presented in this paper demonstrate that the production of a time lag in the realisation of a process of differentiation or morphogenesis is not sufficient evidence to permit definite conclusions to be drawn about the basic mechanism of induction; the effect of inhibition of cell division caused by the inhibitors must be excluded or at least taken in to account.

The possible function of gibberellins as "realisators" of already present but inactive m-RNA is discussed.

5-Bromo- and 5-iododeoxyuridine do not cause a time lag in antheridium formation; both inhibitors, however, cause a deformation of the cell pattern of the antheridia. The degree of this deformation depends on inhibitor concentration as well as on exposure time. Probably a competition exists between these halogen-substituted pyrimidines and thymidine for incorporation into DNA.

### Einleitung

Bei allen Vertretern der *Schizaeaceae* können die für die Auslösung der Antheridienbildung verantwortlichen, hormonalen Komponenten (Antheridogene: PRINGLE, 1961; Antheridiogene: NAEF, 1966) durch

Gibberelline vollkommen ersetzt werden (SCHRAUDOLF, 1962, 1964, 1966a und b). Eine quantitative Analyse der Auslösung der Bildung männlicher Sexualorgane am Farnprothallium durch diese Phytohormongruppe ergab den Nachweis einer strengen Korrelation zwischen der jeweils applizierten Gibberellinkonzentration und dem physiologischen Alter der Prothallien im Zeitpunkt der Anlage des ersten Gametangiums. Die Wechselbeziehung konnte in Form einer „kritischen Zellzahl“ definiert werden. Dieser Kennwert ist bei gegebener Phytohormonkonzentration und Konstanz der Kulturbedingungen unabhängig von der Steilheit der Wachstumskurven (SCHRAUDOLF, 1966a).

Durch diese Unabhängigkeit der kritischen Zellzahl von der jeweiligen Zellteilungsrate wird eine Unterscheidung innerhalb experimentell ausgelöster Hemmungen der Antheridienbildung möglich. Zeitliche Verzögerungen der Antheridienbildung, die unspezifisch oder ausschließlich auf Teilungshemmungen zurückzuführen sind, können von solchen unterschieden werden, deren Ursache im Determinationsprozeß selbst liegt.

Seit der Formulierung ihrer Vorstellungen über die Steuerung der Protein- bzw. Enzymsynthese durch JACOB und MONOD ist in einer ständig zunehmenden Zahl von Untersuchungen und an einem breiten Spektrum von Objekten versucht worden, auch die hormonal gesteuerten Differenzierungs- und Morphogenesevorgänge auf der Basis einer Aktivierung spezifischer Gene zu interpretieren (zuerst bei KARLSON, 1962). Inzwischen liegen auch für eine Reihe pflanzlicher Objekte Hinweise darauf vor, daß der Steuerung von Morphogenese oder Differenzierung durch Phytohormone derartige Prozesse zugrunde liegen können (VAN OVERBEEK, 1966). Da die Möglichkeit zur Unterscheidung einer cytotatischen und morphogenetischen Aktivität von Inhibitoren bei der Auslösung der Antheridienbildung am *Anemia*-Prothallium gegeben ist, schien es uns interessant, durch Applikation eines breiten Spektrums von Hemmstoffen der Protein-, DNS- und RNS-Synthese zu überprüfen, ob Gibberelline und mit ihnen die nativen Antheridogene als echte Induktoren bzw. Derepressoren dieses Morphogenesevorganges betrachtet werden dürfen. Dies um so mehr, da einerseits eine Reihe photomorphogenetisch gesteuerter Entwicklungsprozesse am Farngametophyten auf der Basis einer Genaktivierung erklärt wird (Lit. s. MOHR, 1965), zum andern, da für Gibberelline selbst eine echte Induktor- bzw. Derepressorwirkung bei der Amylasesynthese nachgewiesen werden konnte (VARNER and RAM CHANDBA, 1964).

#### Material und Methoden

Allgemeiner Versuchsansatz, Lichtbedingungen und Auswertung sind an anderer Stelle ausführlich beschrieben (SCHRAUDOLF, 1966a). Abänderungen sind bei den einzelnen Versuchen vermerkt.

Soweit nicht anders angeführt, wurden sämtliche Hemmstoffe schon dem Keimmedium zugesetzt. Im Falle des photolabilen Actinomycin D ist die Nährlösung über die ganze Versuchsdauer im Abstand von 24 Std gewechselt worden.

Von allen Hemmstoffbehandlungen wurden Wachstumskurven mit und ohne Gibberellinapplikation entsprechend Abb. 1 aufgenommen. Die Ergebnisse werden jedoch meist in Tabellen wiedergegeben.

Kennwerte für die Beeinflussung der Antheridienbildung sind die bis zur Anlage von Antheridien in 50% der Prothallien benötigte Zeit in Tagen und die jeweiligen kritischen Zellzahlen. Diese werden ermittelt, wenn 50% der Prothallienpopulation Antheridien angelegt oder ausgebildet haben. Sie entspricht der mittleren Zellzahl der Prothallien, die zu diesem Zeitpunkt das erste Antheridium anlegen (Einzelheiten: SCHRAUDOLF, 1966a).

Die jeweilige Beeinflussung des Teilungswachstums wird durch die mittleren Zellzahlen wiedergegeben. Die Bestimmung der Beeinflussung des Teilungswachstums erfolgte immer in gibberellinfreien Parallelansätzen, da Gibberelline selbst eine signifikante Wirkung auf die Teilungsrate ausüben (SCHRAUDOLF, 1966a).

Um die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Sporenpopulationen auszugleichen, wurde in Vorversuchen jeweils die Gibberellinkonzentration bestimmt, die zu kritischen Zellzahlen zwischen 10 und 15 führt. Dieser Zellzahlbereich hat den Vorteil, daß bei noch geringer Streuung und relativ kurzer Zeitdauer bis zum Einsetzen der Antheridienbildung, die Zellzahl doch hoch genug ist, eventuelle Verschiebungen mit genügender Genauigkeit zu erfassen. Die dazu jeweils benötigte Gibberellinkonzentration ist in den Legenden vermerkt. In den Tabellen angegeben sind die jeweiligen mittleren Fehler der Mittelwerte. Für die Berechnung der mittleren Zellzahl wurden mindestens 100 Prothallien ausgezählt, zur Bestimmung der kritischen Zellzahl mindestens 30 Prothallien, die der Definition der kritischen Zellzahl (SCHRAUDOLF, 1966a) entsprachen.

Die Bestimmung der Längen:Breitenverhältnisse erfolgte an jeweils 100 dreizelligen Prothallien. Gemessen wurde die Länge von der Protonemspitze bis zur Sporenaustrittsstelle und die größte Breite der mittleren Zelle in Mikrometereinheiten am ungefärbten Präparat.

Der mittlere Fehler des Quotienten Länge:Breite (L/B) wurde nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz ermittelt nach:

$$q = \pm \sqrt{\left(\frac{\Delta L}{B}\right)^2 + \left(\frac{-L \Delta B}{B^2}\right)^2}$$

Zwei Werte von Q können als signifikant verschieden angenommen werden, wenn die Differenz größer als 3  $m_d$  ist. Dabei gilt

$$m_d = \sqrt{q_1^2 + q_2^2}$$

*Chemikalien.* Bei der benutzten Gibberellinsäure handelt es sich um ein Präparat der Firma Fluka, Buchs.

5-Joddessoxyuridin, 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin stellte uns freundlicherweise die Firma Zellstoff-Waldhof, Mannheim-Waldhof, zur Verfügung. Actinomycin-D wurde uns durch die Firma Merck-Sharp und Dohme, Rahway N.J., überlassen.

Die anderen Hemmstoffe waren p.a. bzw. puriss. Substanzen verschiedener Handelsfirmen.

*Verwendete Abkürzungen.* Gibb = Gibberellin, IES =  $\beta$ -Indolylessigsäure, RNS = Ribonucleinsäure, DNS = Desoxyribonucleinsäure.

## Ergebnisse

*Proteinantimetaboliten*

Die Wirkung steigender Chloramphenicol-Konzentrationen auf das Teilungswachstum von *Anemia*-Prothallien mit und ohne gleichzeitigen Zusatz von Gibberellin A<sub>3</sub> zeigen Abb. 1 und Tabelle 1.

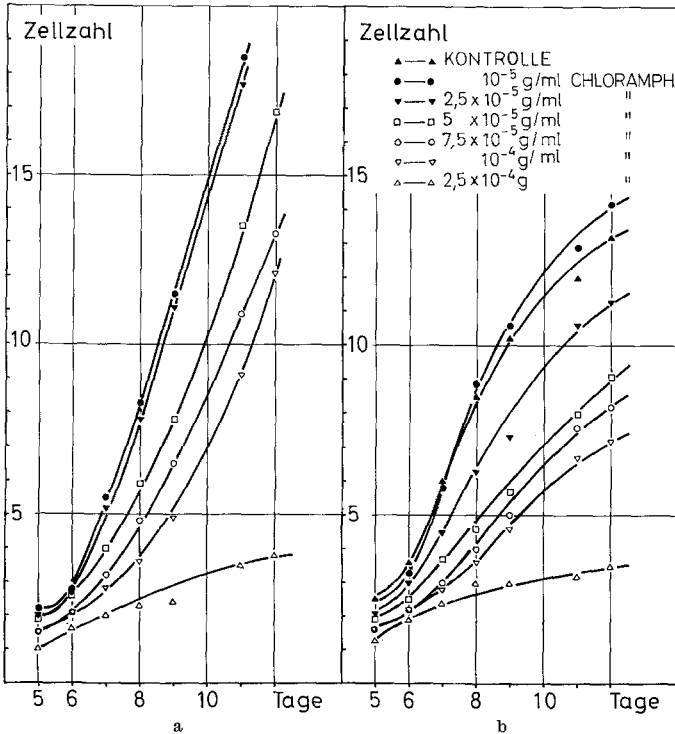


Abb. 1 a u. b. Wirkung steigender Konzentrationen von Chloramphenicol auf das Teilungswachstum. a Salzkontrolle; b mit Zusatz von Gibb A<sub>3</sub> ( $5 \times 10^{-6}$  g/ml).  $25 \pm 0,2^\circ$  C. Dauerweißlicht. Abszisse: Zeit in Tagen; Ordinate: mittlere Zellzahl

Zusatz von Chloramphenicol zum Keimmedium führt zu einer starken Reduktion der Teilungsrate. Diese wiederum ist begleitet von einer mit der Konzentration des Inhibitors zunehmenden Reduktion der Chloroplastengröße und des Chlorophyllgehalts. Bei den höchsten Chloramphenicol-Konzentrationen, die noch ein geringes Wachstum der Prothallien erlauben, sind die sich ausbildenden Prothalliumfäden nahezu farblos. Der andersartige Verlauf der Wachstumskurven in den Ansätzen mit Gibberellin ist ausschließlich durch die beginnende Umstimmung zur Antheridienbildung bedingt (SCHRAUDOLF, 1966 a).

Zusatz von Äthionin führt zu nahezu identischen Effekten. Obwohl bei der signifikanten Wachstumshemmung, welche durch beide Anti-

Tabelle 1. *Wirkung steigender Konzentrationen von Äthionin und Chloramphenicol auf Teilungswachstum, Zeitpunkt der Antheridienanlage und kritische Zellzahl. Dauereiweißlicht. 25 ± 0,2° C. Gibb A<sub>3</sub> 5 × 10<sup>-6</sup> g/ml*

Äthionin				Chloramphenicol			
Mol/l	Zellzahl nach 12 Tagen	Antheridienbildung in 50 % der Prothallien		Mol/l	Zellzahl nach 10 Tagen	Antheridienbildung in 50 % der Prothallien	
		Tage	Zellzahl			Tage	Zellzahl
0	17,5 ± 0,9	12	9,3 ± 0,5	0	19,5 ± 0,4	10	11,2 ± 0,3
10 <sup>-7</sup>	16,9 ± 0,7	12	8,0 ± 0,4	10 <sup>-5</sup>	19,2 ± 0,5	10	12,5 ± 0,3
5 × 10 <sup>-7</sup>	18,7 ± 1,0	12	7,7 ± 0,4	2,5 × 10 <sup>-5</sup>	17,7 ± 0,3	10	11,0 ± 0,4
10 <sup>-6</sup>	18,0 ± 0,9	13	7,4 ± 0,3	5 × 10 <sup>-5</sup>	13,8 ± 0,4	11	10,2 ± 0,5
5 × 10 <sup>-6</sup>	6,9 ± 0,3	14	7,9 ± 0,4	7,5 × 10 <sup>-5</sup>	11,0 ± 0,4	13	10,2 ± 0,3
10 <sup>-5</sup>	3,4 ± 0,2	22	7,0 ± 0,3	10 <sup>-4</sup>	9,2 ± 0,2	16	11,0 ± 0,3
				2,5 × 10 <sup>-4</sup>	3,5 ± 0,1	12	4,0 ± 0,1

metaboliten hervorgerufen wird, eine Hemmung der Proteinsynthese außer Zweifel steht, ist zumindest bei *Anemia*-Prothallien der von Hotta und OSAWA (1958) beschriebene morphogenetische Effekt einer Fixierung fädigen Wachstums nie zu beobachten.

Entsprechendes gilt für die durch Gibberellin ausgelöste Antheridienbildung. Unter der Einwirkung beider Hemmstoffe kommt es parallel zur Wachstumsverzögerung zu einer zeitlichen Hemmung in der Anlage von Antheridien, die bei Äthionin bis zu einer Verdoppelung der Dauer der vegetativen Phase führen kann (Tabelle 1). Bezogen auf den physiologischen Kennwert „kritische Zellzahl“ ist dagegen eine Hemmung dieses Zelldifferenzierungsprozesses durch Äthionin und Chloramphenicol nicht festzustellen.

Ebensowenig ist eine echte Hemmung nach Zusatz von 5-Methyltryptophan zum Keimmedium der Sporen gegeben. Zwar kommt es auch unter der Einwirkung dieses Inhibitors zu einer Verminderung der Teilungsrate, deren Ausmaß proportional mit der angewandten Hemmstoffkonzentration ansteigt und damit verbunden, zu einer Verzögerung der Antheridienbildung. Bezogen auf die kritischen Zellzahlen erweist sich aber auch diese scheinbare Hemmung als Folge der Beeinflussung des Teilungswachstums, die sich vollkommen unabhängig vom unbeeinflußt bleibenden Determinationsvorgang vollzieht (Tabelle 2, Abb. 2a).

Überraschenderweise zeigt Zusatz von 5-Methyltryptophan bei den Prothallien von *Anemia* eine morphogenetische Wirkung, die zumindest im äußeren Habitus weitgehend der durch IES oder Cumarin ausgelösten entspricht (SCHRAUDOLF, 1966c). Unter der Einwirkung des Aminosäureanalogen kommt es zu einer Störung der Polarität der Zellstreckung und damit verbunden zu einer Verschiebung der Längen-Breiten-Indices

der Prothalliumzellen (Tabelle 2). Gleichzeitig wird die Polarität der Spindelorientierung der ersten Zellteilungen gestört. Dadurch treten Längsteilungen schon in den ersten Entwicklungsstadien des Gametophyten auf. Die Umstimmung zum flächigen Wachstum erfolgt in frühesten Entwicklungsphasen des Prothalliums (Abb. 2 b).

Bei einer Konzentration von  $10^{-3}$  m erfaßt die Störung der Polaritätsverhältnisse schon die ersten Zellteilungen in der Sporenzelle. Unter

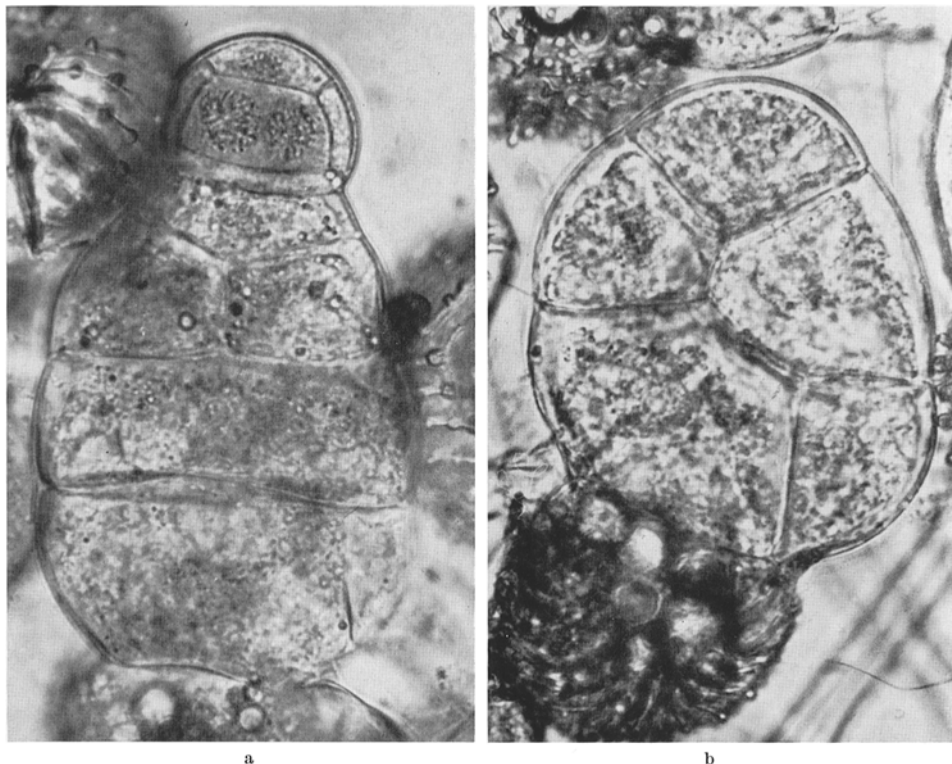


Abb. 2a u. b. Wirkung von 5-Methyltryptophan (Carminessigsäure). a Antheridienbildung am unter Einwirkung von 5-Methyltryptophan ( $5 \times 10^{-4}$  m) tetralogisch veränderten Prothallium. Gibb A<sub>3</sub>  $10^{-6}$  g/ml. b Frühzeitiges Einsetzen flächigen Wachstums bei Applikation von  $5 \times 10^{-4}$  m 5-Methyltryptophan

der Einwirkung des Hemmstoffes wird die Anlage der ersten Prothalliumzelle zunächst blockiert. An ihrer Stelle teilt sich eine weitere Rhizoidanlage ab. Es kommt zur Bildung von Zwillingrhizoiden aus der Sporenzelle. Der Rhizoidcharakter des zweiten entstandenen Rhizoids ist dabei oft verwischt. Im Gegensatz zum Primärrhizoid enthält es häufig Plastiden und zeichnet sich vor diesem meist auch durch einen erhöhten Plasmagehalt aus (Abb. 3). Erst bei einer weiteren Teilung der Sporen-

Tabelle 2. Wirkung von 5-Methyltryptophan. Messung der Länge und Breite an dreizelligen Prothallien. Gibb A<sub>3</sub> 10<sup>-6</sup> g/ml. Tabellenwerte und Versuchsbedingungen entsprechen Tabelle 1

Mol/l	Zellzahl nach 11 Tagen	Antheridienbildung in 50 % der Prothallien	
		Tage	Zellzahl
0	21,3 ± 0,5	11	15,9 ± 0,5
10 <sup>-6</sup>	22,7 ± 0,3	11	16,1 ± 0,6
5 × 10 <sup>-6</sup>	18,7 ± 0,6	12	16,7 ± 0,7
10 <sup>-5</sup>	14,7 ± 0,5	13	16,5 ± 0,9
5 × 10 <sup>-5</sup>	6,0 ± 0,2	17	18,9 ± 0,9
10 <sup>-4</sup>	4,7 ± 0,2	>22	—
5 × 10 <sup>-4</sup>	1,3 ± 0,1	>22	—

Mol/l	Länge (L)	Breite (B)	L/B
0	34,5 ± 1,2	11,8 ± 0,2	2,83 ± 0,10
5 × 10 <sup>-6</sup>	35,0 ± 0,5	14,4 ± 0,3	2,45 ± 0,06
10 <sup>-5</sup>	31,1 ± 0,8	15,4 ± 0,4	2,02 ± 0,07
5 × 10 <sup>-5</sup>	29,0 ± 0,8	17,0 ± 0,4	1,71 ± 0,07
10 <sup>-4</sup>	24,4 ± 0,6	18,2 ± 0,3	1,34 ± 0,04
10 <sup>-4</sup> + 10 <sup>-6</sup> g/ml Gibb A <sub>3</sub>	27,4 ± 0,5	20,1 ± 0,4	1,36 ± 0,03

zelle kommt es zur Anlage einer Prothalliumzelle, deren Wachstum unter der Einwirkung dieser hohen Hemmstoffkonzentration allerdings gehemmt bleibt.

Der von Hotta und Osawa für Methyltryptophanzusatz beschriebene Morphogeneseblock kann auch bei differenzierter Abstufung der Inhibitorkonzentration bei Prothallien von *Anemia phyllitidis* nicht aufgelöst werden.

#### RNS- und DNS-Antimetaboliten

Mit Ausnahme von 5-Bromuracil (s. Tabelle 11) bewirkt Zusatz aller überprüften Antimetaboliten des RNS- und DNS-Stoffwechsels signifikante Wachstumshemmungen. Diese sind teilweise von beträchtlichen morphogenetischen Effekten begleitet.

*Mercaptopurin und Thioguanin.* Typisch für die Einwirkung hoher Konzentrationen von 6-Mercaptopurin (10<sup>-6</sup>m und 5 × 10<sup>-6</sup> m) ist die Bildung von Regeneraten aus der Sporenzelle und die Anlage von zahlreichen Verzweigungen am Prothallium (Abb. 4).

Das Teilungswachstum ist bis zu einer unteren Konzentration von 10<sup>-6</sup> m signifikant gehemmt, die Anlage von Antheridien bis zu 7 Tagen verzögert (Tabelle 3). Trotz dieser zeitlichen Verschiebung stimmen die

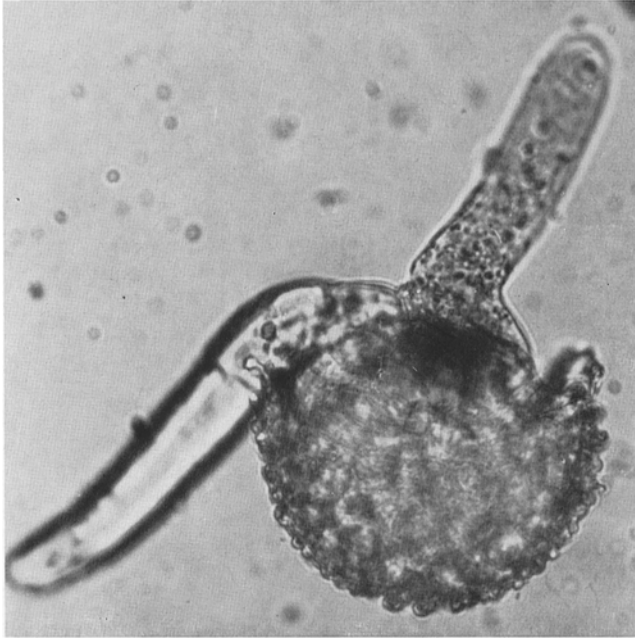


Abb. 3. Aufhebung der Polarität der keimenden Spore und Bildung eines Zwillingrhizoids unter der Einwirkung von  $10^{-8}$  m 5-Methyltryptophan (Carminessigsäure)

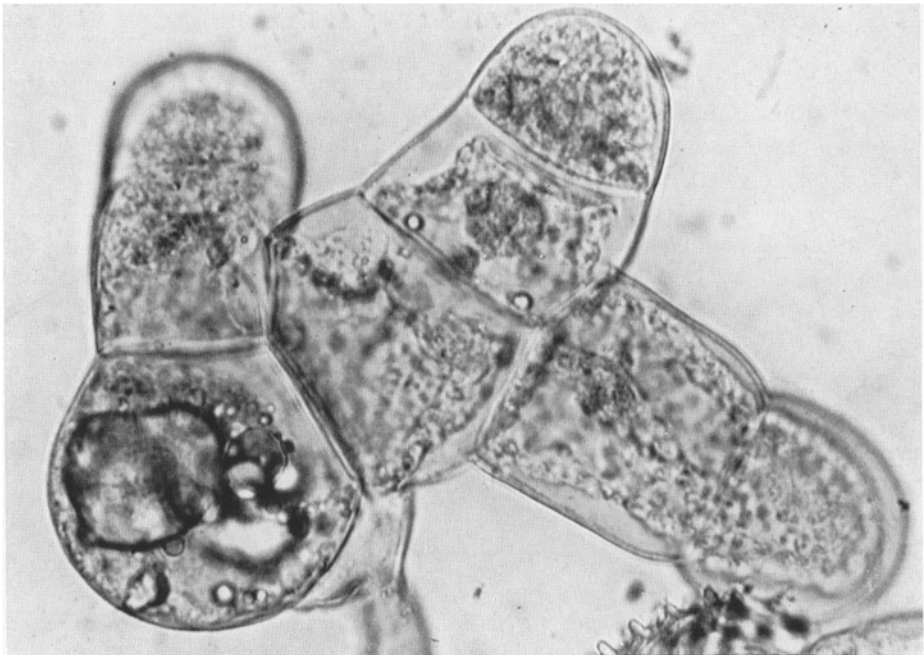


Abb. 4. Prothallienverzweigung und Regeneration aus der Sporenzelle unter Einwirkung von 6-Mercaptopurin ( $5 \times 10^{-6}$  m) (Carminessigsäure)



Tabelle 3. *Wirkung von 6-Mercaptopurin. Tabellenwerte und Versuchsbedingungen entsprechen Tabelle 1.  $2,5 \times 10^{-6}$  g/ml Gibb  $A_3$* 

Mol/l	Zellzahl nach 9 Tagen	Antheridienbildung in 50 % der Prothallien	
		Tage	Zellzahl
0	$13,7 \pm 0,6$	9	$11,6 \pm 0,3$
$5 \times 10^{-7}$	$14,3 \pm 0,5$	9	$10,3 \pm 0,4$
$10^{-6}$	$13,0 \pm 0,5$	10	$10,2 \pm 0,4$
$5 \times 10^{-6}$	$3,9 \pm 0,5$	14	$11,6 \pm 0,7$
$10^{-5}$	$3,4 \pm 0,2$	16	$12,4 \pm 0,6$

kritischen Zellzahlen und damit das physiologische Alter der Prothallien im Zeitpunkt der Antheridienanlage in Kontrolle und behandelten Ansätzen überein.

Die Wirkung von 6-Thioguanin entspricht weitgehend den durch 6-Mercaptopurin ausgelösten Effekten.

*8-Azaguanin.* Für 8-Azaguanin ist bei Bakterien und Mäusezellen, aber auch durch Hotta u. Mitarb. (1959) bei Farnzellen Einbau in die RNS-Fraktion nachgewiesen worden. Es hemmt in hoher Konzentration ( $10^{-5}$  m) das Teilungswachstum bei gleichzeitiger Störung der Zellpolarität. Eine Hemmung der Antheridieninduktion ist nicht nachzuweisen (Tabelle 4).

Tabelle 4. *Wirkung von 8-Azaguanin. Tabellenwerte und Versuchsbedingungen entsprechen Tabelle 1. Gibb  $A_3$   $5 \times 10^{-6}$  g/ml*

Mol/l	Zellzahl nach 11 Tagen	Antheridienbildung in 50 % der Prothallien	
		Tage	Zellzahl
0	$17,5 \pm 0,4$	11	$9,3 \pm 0,5$
$5 \times 10^{-6}$	$17,9 \pm 0,8$	11	$8,9 \pm 0,6$
$10^{-5}$	$4,3 \pm 0,4$	14	$5,5 \pm 0,4$

Bei langanhaltender Behandlung treten vereinzelt teratologische Antheridienformen auf. Dabei handelt es sich meist um eine weitgehende Reduktion des spermatogenen Gewebes, die bis zu einem totalen Abortus und dem Auftreten vergrüner, infertiler Gametangien führen kann.

*5-Fluoruracil.* Diese Verbindung wirkt in einem streng definierten Konzentrationsbereich hemmend auf das Teilungswachstum. Bei noch relativ niedrigen Konzentrationen wird die Keimung vollkommen unterdrückt. Gleichzeitig werden die Dimensionen der ersten Zellen des noch fädigen Prothalliums beträchtlich zugunsten der Zelllänge verschoben. Häufig schwellen dabei die einzelnen Zellen am apikalen Ende keulig an (Abb. 5a).

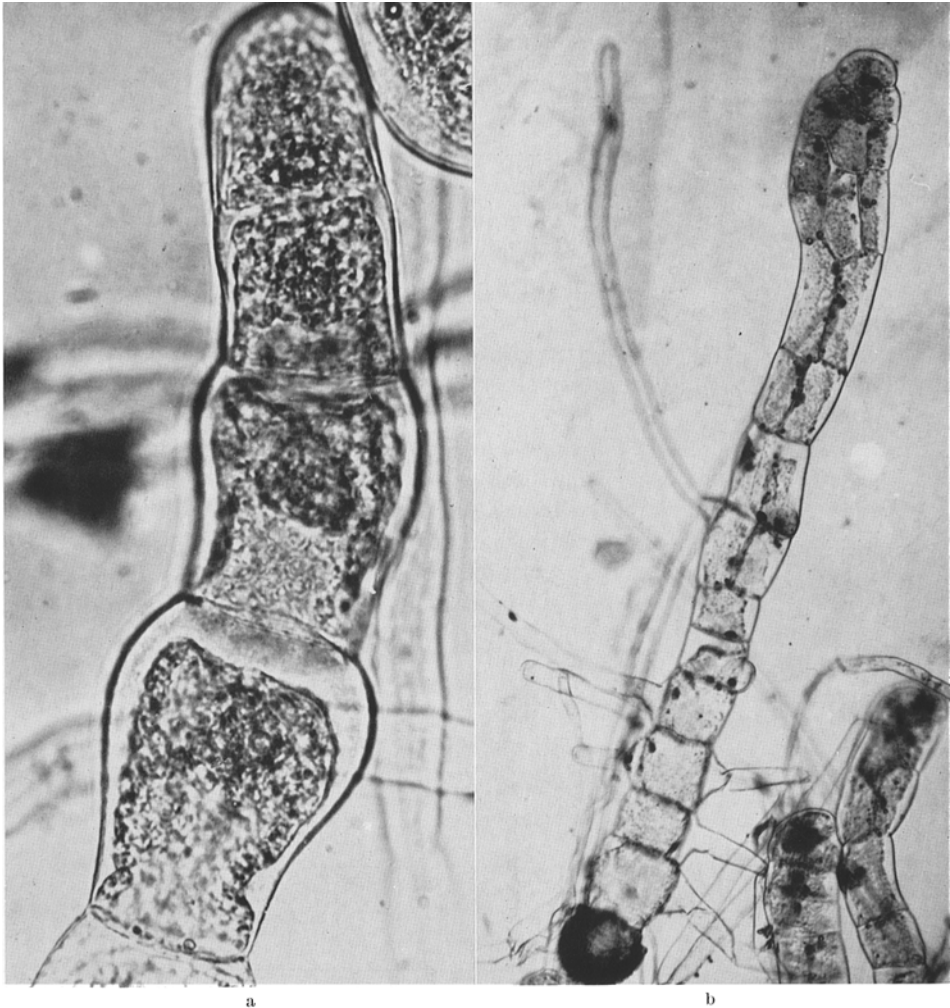


Abb. 5 a u. b. Wirkung von 5-Fluoracil ( $5 \times 10^{-6}$  m). a Verschiebung der Längen- Breitenverhältnisse im fädigen Prothallium und keuliges Anschwellen der Apikalenden. b Zweidimensional gewachsenes Prothallium mit stark verlängertem Umriß nach 15 Tagen Kultur auf 5-Fluoracil

Trotz dieser Verschiebung der Längen-Breitenindices kommt es zu keiner Fixierung der eindimensionalen Wuchsform. Zwar bilden sich unter der Einwirkung des Inhibitors Gametophyten mit stark in die Länge gezogenem Umriß aus, der Zeitpunkt der ersten Längsteilung einer Prothallienzelle und damit der Übergang zu flächigem Wachstum vollzieht sich jedoch bei einer mittleren Zellzahl, die sich statistisch nicht von denjenigen der Kontrollprothallien unterscheiden läßt (Abb. 5b).

Trotz der Hemmung des Teilungswachstums und der daraus resultierenden zeitlichen Verzögerung der Antheridienbildung ist eine Hemmung der Gametangieninduktion an Hand der kritischen Zellzahlen nicht nachzuweisen (Tabelle 5).

Tabelle 5. *Wirkung von 5-Fluoruracil. Tabellenwerte und Versuchsbedingungen entsprechen Tabelle 1. Gibb A<sub>3</sub> 2,5 × 10<sup>-6</sup> g/ml*

Mol/l	Zellzahl nach 9 Tagen	Antheridienbildung in 50 % der Prothallien	
		Tage	Zellzahl
0	11,8 ± 0,4	9	9,9 ± 0,4
2 × 10 <sup>-5</sup>	11,2 ± 0,4	9	9,5 ± 0,3
3 × 10 <sup>-5</sup>	7,6 ± 0,4	10	10,4 ± 0,3
4 × 10 <sup>-5</sup>	6,3 ± 0,4	12	11,4 ± 0,4
5 × 10 <sup>-5</sup>	4,3 ± 0,3	15	10,8 ± 0,5

*5-Fluordesoxyuridin.* Das Nucleosid des 5-Fluoruracils erweist sich noch in Konzentrationen wirksam, die eine Zehnerpotenz unterhalb des effektiven Konzentrationsbereichs der Base liegen (Tabelle 6). Damit wird wahrscheinlich, daß 5-Fluoruracil primär nach Glykosidierung via Desoxyuridinphosphorylase in den Nucleinsäurestoffwechsel eingreift und daß die Ursache der Wirkung beider Verbindungen auch im Farnprothallium in einer Hemmung der Thymidylsynthetase zu suchen sein wird.

Tabelle 6. *Wirkung von 5-Fluordesoxyuridin im Vergleich mit der von 5-Fluoruracil und 5-Joddesoxyuridin. Tabellenwerte und Versuchsbedingungen entsprechen Tabelle 1. Gibb A<sub>3</sub> 2,5 × 10<sup>-6</sup> g/ml*

Mol/l	Zellzahl nach 9 Tagen	Antheridienbildung in 50 % der Prothallien	
		Tage	Zellzahl
<b>5-Fluordesoxyuridin</b>			
0	13,6 ± 0,3	9	9,4 ± 0,2
10 <sup>-7</sup>	11,1 ± 0,3	9	10,3 ± 0,4
5 × 10 <sup>-7</sup>	8,9 ± 0,2	9	10,0 ± 0,2
10 <sup>-6</sup>	9,7 ± 0,2	9	9,9 ± 0,3
5 × 10 <sup>-6</sup>	2,2 ± 0,1	>17	—
<b>5-Joddesoxyuridin</b>			
10 <sup>-4</sup>	4,5 ± 0,2	11	5,9 ± 0,2
<b>5-Fluoruracil</b>			
10 <sup>-5</sup>	11,7 ± 0,4	9	11,0 ± 0,3
5 × 10 <sup>-5</sup>	2,0 ± 0,2	17	—

Thymidin selbst hemmt in Konzentrationen über  $10^{-5}$  m das Teilungswachstum der Prothallien (Tabelle 7). Damit ist die für eine Aussage über den Wirkort der halogenierten Inhibitoren wichtige Aufhebung einer eventuellen kompetitiven Hemmung der Thymidylsynthese unmöglich. Bei Zusatz von Thymin in entsprechenden Konzentrationen war eine Hemmung nicht gegeben.

Tabelle 7

*Wirkung von Thymidin. Tabellenwerte und Versuchsbedingungen entsprechen Tabelle 1*

Mol/l	Zellzahl nach 6 Tagen
0	$4,1 \pm 0,1$
$5 \times 10^{-5}$	$2,9 \pm 0,1$
$10^{-4}$	$2,2 \pm 0,1$
$2,5 \times 10^{-4}$	$2,2 \pm 0,1$
$5 \times 10^{-4}$	$2,3 \pm 0,2$
$7,5 \times 10^{-4}$	$1,8 \pm 0,2$

Eine Blockierung des flächigen Wachstums der Prothallien und eine Hemmung der durch Gibberellin ausgelösten Antheridienbildung ist auch bei Applikation von 5-Fluor-desoxyuridin nicht nachzuweisen.

*Actinomycin D.* Actinomycin D führt erwartungsgemäß zu einer starken Hemmung des Teilungswachstums und einer damit verknüpften Verzögerung im Zeitpunkt der Antheridienanlage. Dennoch ist keine direkte

Wirkung auf den Induktionsvorgang selbst gegeben: Die kritischen Zellzahlen entsprechen denen der Kontrollprothallien (Tabelle 8).

Tabelle 8. *Wirkung von Actinomycin D. Tabellenwerte und Versuchsbedingungen entsprechen Tabelle 1. Gibb A<sub>3</sub>  $2,5 \times 10^{-6}$  g/ml*

g/ml	Zellzahl nach 10 Tagen	Antheridienbildung in 50 % der Prothallien	
		Tage	Zellzahl
0	$17,0 \pm 0,6$	10	$12,8 \pm 0,4$
$5 \times 10^{-5}$	$15,6 \pm 0,4$	11	$14,4 \pm 0,4$
$10^{-4}$	$11,5 \pm 0,3$	12	$13,2 \pm 0,5$
$5 \times 10^{-4}$	$4,4 \pm 0,2$	14	$13,5 \pm 0,4$

Die Wachstumshemmung durch Actinomycin D unterscheidet sich in ihrer Kinetik deutlich von der anderer Hemmstoffe. Während bei letzteren der Hemmung vornehmlich eine Verschiebung im Zeitpunkt des Eintritts der logarithmischen Wachstumsphase zugrunde liegt (Abb. 1), kommt es bei Zusatz von Actinomycin D zu einer Keimungsverzögerung. Nach Überwindung dieser Hemmung entspricht die Wachstumsgeschwindigkeit den Kontrollen (Abb. 6).

Werden Prothallien, die zunächst im Standardweißlichtfeld auf einfacher Salzlösung angezogen worden sind, nach Erreichen einer mittleren Zellzahl von  $2,55 \pm 0,1$  für 24 bzw. 48 Std auf eine Actinomycin D-Lösung ( $10^{-4}$  g/ml) übertragen, kommt es spätestens 48 Std nach Beginn der Actinomycinbehandlung zu einer signifikanten Reduktion der Teilungsrate in den mit Hemmstoff behandelten Prothallien. Werden

jeweils im Anschluß an die Hemmstoffbehandlung die Versuchsgruppen für 5 Std auf Gibberellin A<sub>1</sub> ( $5 \times 10^{-5}$  g/ml) übertragen, anschließend mehrfach gewaschen und auf reines Salzmedium überführt, kommt es trotz der starken Hemmung des Teilungswachstums in allen Versuchsgruppen zur Ausbildung normaler Antheridien (Tabelle 9).

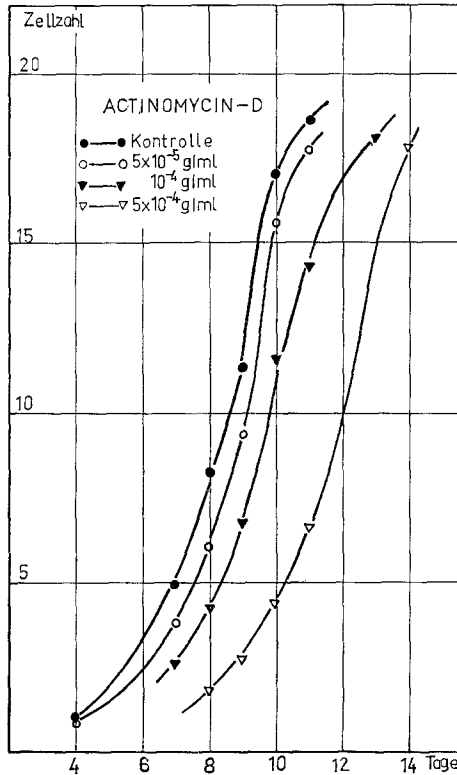


Abb. 6. Wirkung steigender Konzentrationen von Actinomycin D auf das Teilungswachstum des Gametophyten. Ansätze ohne Gibberellinzusatz. Abszisse: Zeit in Tagen; Ordinate: mittlere Zellzahl

Tabelle 9. Wachstumshemmung und Antheridienbildung (% A = % Antheridien-tragende Prothallien) nach Applikation von  $10^{-4}$  g/ml Actinomycin D und Gibb A<sub>1</sub> Abbott ( $5 \times 10^{-5}$  g/ml) an 10 Tage alte Prothallien. Zeitpunkt der Gibb-Applikation 24 bzw. 48 Std nach der Hemmstoffbehandlung. Versuchsbedingungen entsprechen Tabelle 1

Vorbehandlung Actinomycin D		% W	% A
24 Std	Kontrolle	100	67
	Actinomycin D	79	82
48 Std	Kontrolle	100	74
	Actinomycin D	64	44

Damit ist auch bei Actinomycin D die Sensibilität des Teilungswachstums gegenüber dem Inhibitor größer als die Empfindlichkeit der Antheridieninduktion. Eine Blockierung der m-RNS-Synthese durch Actinomycin ist allem Anschein nach ohne Einfluß auf die Auslösung der Antheridienbildung.

Erst nach langanhaltender, kontinuierlicher Hemmstoffbehandlung treten teratologische Antheridienformen auf. Dabei bilden sich vornehmlich Gametangien mit reduzierter Spermatozoidenzahl.

Trotz der hohen Hemmstoffkonzentration ist auch hier der Übergang zum zweidimensionalen Wachstum nicht blockiert. Längsteilungen der Prothallienzellen können bei mittleren Zellzahlen beobachtet werden, die sich nicht von denen der Kontrollen unterscheiden. Häufig sind dagegen die schon bei der Applikation von Thioguanin und Mercaptopurin beschriebenen Verzweigungen aus basalen Prothalliumzellen. Im Gegensatz zur Wirkung dieser Verbindung treten jedoch in diesem Falle keine Sekundärprothallien durch Regeneration der Sporenzelle auf.

Signifikant gehemmt dagegen ist bei Zusatz dieses Antimetaboliten in Konzentrationen um  $10^{-4}$  g/ml das Streckungswachstum des Primär-rhizoids.

*Isoadenin*. Auch Zusatz von Isoadenin [4-Aminopyrazolo (3,4-d)-pyrimidin] führt primär zu Teilungshemmungen in den wachsenden Prothallien. Trotz zeitlicher Verzögerung ist keine Blockierung der Antheridienbildung gegeben (Tabelle 10). In verstärktem Maß bilden

Tabelle 10. Wirkung von Isoadenin auf a) Wachstum, Zeitpunkt der Antheridienbildung und kritische Zellzahl. Gibb  $A_3$   $5 \times 10^{-6}$  g/ml. b) die Ausbildungsform der Antheridien.  $2,5 \times 10^{-5}$  g/ml Isoadenin,  $5 \times 10^{-6}$  g/ml Gibb  $A_3$ .  $n$  = Anzahl der jeweiligen Prothallienformen. Versuchsbedingungen entsprechen Tabelle 1

g/ml	Zellzahl nach 10 Tagen	Antheridienbildung in 50% der Prothallien	
		Tage	Zellzahl
0	$20,3 \pm 0,5$	10	$12,4 \pm 0,5$
$2,5 \times 10^{-6}$	$17,9 \pm 0,5$	11	$12,1 \pm 0,5$
$5 \times 10^{-6}$	$13,9 \pm 0,6$	12	$12,1 \pm 0,5$
$7,5 \times 10^{-6}$	$12,1 \pm 0,6$	12	$12,1 \pm 0,4$
$10^{-5}$	$9,1 \pm 0,4$	14	$12,1 \pm 0,3$
$2,5 \pm 10^{-5}$	$3,6 \pm 0,1$	26	$11,4 \pm 0,4$

Ausbildungsform	$n$	%
Vergrünt	38	12
Spermatozoiden weniger als 8	19	6
Antheridien mit „Kappen“	5	2
Normale Antheridien	226	74

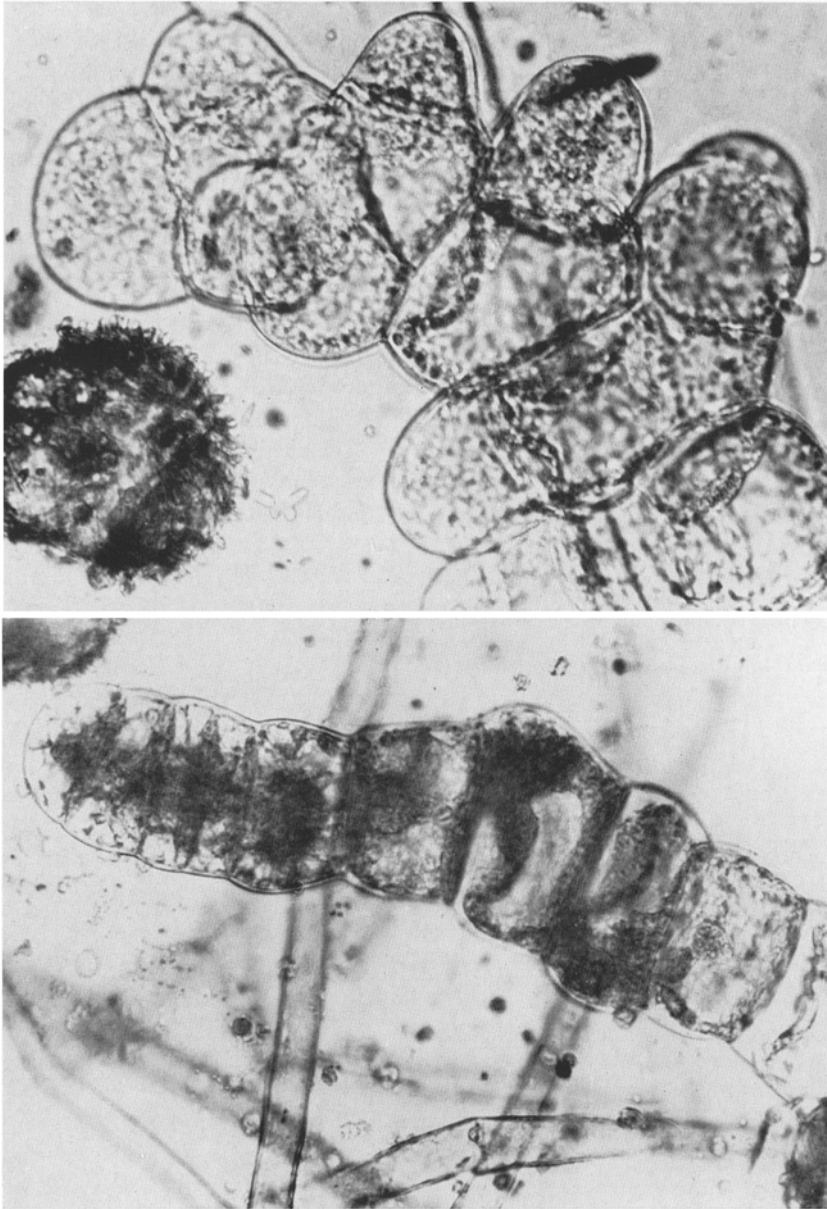


Abb. 7 a u. b. Wirkung von Isoadenin auf Wachstum und Antherideubildung (Carminessigsäure), a Unter dem Einfluß des Inhibitors ( $10^{-6}$  m) erhöhte Zellzahl beim Übergang zum zweidimensionalen Wachstum. b Prothallium mit zahlreichen Verzweigungsanlagen bei gleichzeitiger Applikation von Isoadenin ( $5 \times 10^{-6}$  m) und Gibb  $A_3$  ( $5 \times 10^{-6}$  g/ml)

sich aber teratologische oder unvollkommen ausgebildete Antheridien, die sich primär durch eine weitgehende Reduktion des spermatogenen Gewebes auszeichnen. Relativ häufig sind die vereinzelt auch spontan

auftretenden Gametangien mit kappenartig aufsitzender Deckelzelle (Tabelle 10, SCHRAUDOLF, 1963: Abb. 8). Über die bisher beschriebenen Effekte der angeführten Antimetaboliten des Purin- bzw. Pyrimidin-stoffwechsels hinaus zeigt Isoadenin auch spezifische Wirkungen auf die Morphogenese der Prothallien. So ist die Zellzahl beim Übergang zum zweidimensionalen Wachstum gegenüber der Kontrolle leicht erhöht, allerdings meist nur durch eine zusätzliche Segmentierung schon angelegter Zellen (Abb. 7a, Apikalzone des Prothalliums). Von einer Fixierung des eindimensionalen Wachstums im Sinne von Hotta und Osawa kann jedoch auch bei Applikation dieses Hemmstoffes nicht gesprochen werden. Dagegen kommt es bei gleichzeitiger Einwirkung von Isoadenin und Gibberellin zu einer beträchtlichen Störung des Entwicklungsmusters der Prothallien. Der Umriß des Gametophyten wird mehr oder weniger stark durch eine Vielzahl von Verzweigungsanlagen verwischt, diese lassen sich häufig auf reduzierte Antheridien zurückführen (Abb. 7b). Damit besteht eine weitgehende Analogie zwischen der Isoadeninwirkung und Anzucht im Dauerhellrot (SCHRAUDOLF in Vorbereitung).

*5-Bromdesoxyuridin und 5-Joddesoxyuridin.* Für beide Verbindungen ist bei tierischen Zellen und Bakterien ein Einbau in DNS nachgewiesen

Tabelle 11. *Wirkung von 5-Bromdesoxyuridin im Vergleich mit 5-Joddesoxyuridin und 5-Bromuracil auf A) Wachstum, Zeitpunkt der Antheridienbildung und kritische Zellzahl (vgl. Tabelle 1). B) die Ausbildungsform der Antheridien*

*n* = Ausbildung normal; *n* Sptz. < 8 = Ausbildung normal, jedoch weniger als 8 Spermatozoiden; A. terat. = Musterbildung gestört; A. verg. = vergrünte Antheridien, Muster mehr oder weniger einem vegetativen Seitenlappen entsprechend. Angaben in Prozent der ausgezählten Antheridien. Gibb A<sub>3</sub> 1,5 × 10<sup>-5</sup> g/ml. Versuchsbedingungen entsprechen Tabelle 1.

A			B				
Mol/l	Zellzahl nach 10 Tagen	Antheridienbildung in 50 % der Prothallien		<i>n</i>	<i>n</i> Sptz. < 8	A. terat.	A. verg.
		Tage	Zellzahl				
5-Bromdesoxyuridin							
0	15,6 ± 0,5	10	12,2 ± 0,5	100	—	—	—
5 × 10 <sup>-6</sup>	16,8 ± 0,7	10	11,3 ± 0,5	94	3	—	3
10 <sup>-5</sup>	13,9 ± 0,6	10	6,7 ± 0,3	42	14	14	30
5 × 10 <sup>-5</sup>	8,3 ± 0,2	10	6,2 ± 0,3	45	—	25	30
10 <sup>-4</sup>	5,8 ± 0,2	11	5,8 ± 0,2	23	2	32	43
5-Joddesoxyuridin							
10 <sup>-4</sup>	6,6 ± 0,2	11	6,3 ± 0,3	43	9	26	22
5-Bromuracil							
10 <sup>-4</sup>	18,6 ± 0,5	10	15,3 ± 0,4	100	—	—	—
8 × 10 <sup>-4</sup>	14,2 ± 0,5	10	9,9 ± 0,3	100	—	—	—



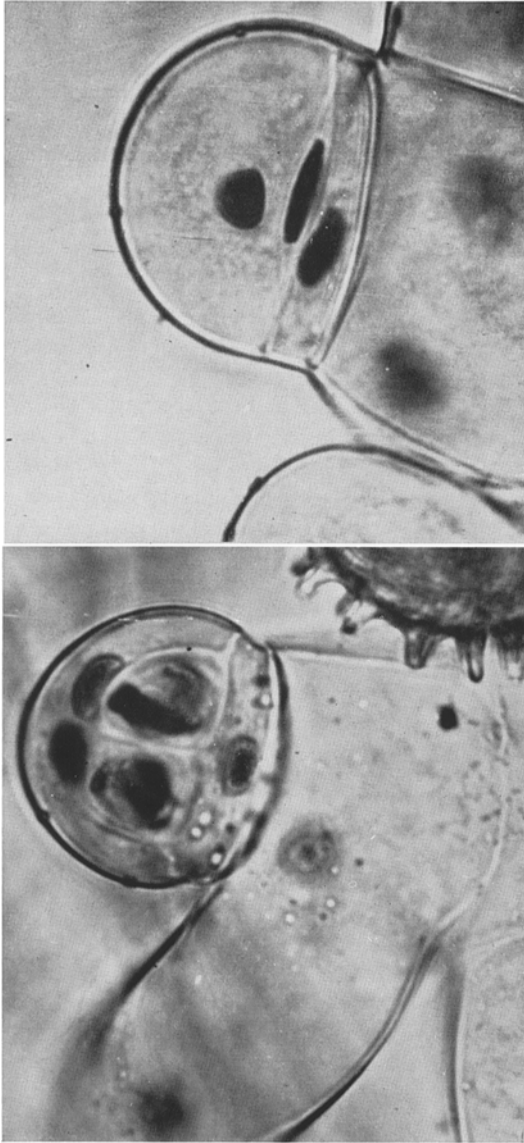


Abb. 8a u. b. Wirkung von 5-Joddesoxyuridin ( $10^{-4}$  m) bei gleichzeitiger Applikation von Gibb A<sub>1</sub> ( $2,5 \times 10^{-6}$  m). Reduktion des spermatogenen Gewebes. (Carmalnessigsäure mit Chloralhydrat). a Antheridium mit nur 4 Spermatozoiden, b Antheridium mit auf den Status einer Inseförmigen Zelle degeneriertem spermatogenem Gewebe

worden. Sie hemmen, wenn auch bei höheren Konzentrationen als die entsprechende Fluorverbindung, das Wachstum der Prothallien. Der Zeitpunkt der Antheridienbildung wird kaum beeinflusst, die kritischen Zellzahlen sind gegenüber den Kontrollansätzen sogar erniedrigt. Eine Hemmung der Auslösung der Antheridienbildung ist nicht gegeben (Tabellen 11 und 12).

In noch stärkerem Maß als bei Zusatz von Isoadenin wird dagegen das Antheridienmuster unterdrückt. Unter der Einwirkung von 5-Jod-desoxyuridin, etwas stärker noch von 5-Bromdesoxyuridin, bilden sich an Stelle intakter Antheridien alle Übergangsstadien zwischen diesen und vegetativen Verzweigungsanlagen, die sich teilweise nur noch durch ihr Dreizellmuster als den Antheridien homologe Zellgruppen erkennen lassen (Abb. 8—10). Ihre Identifizierung als Gametangien wird noch

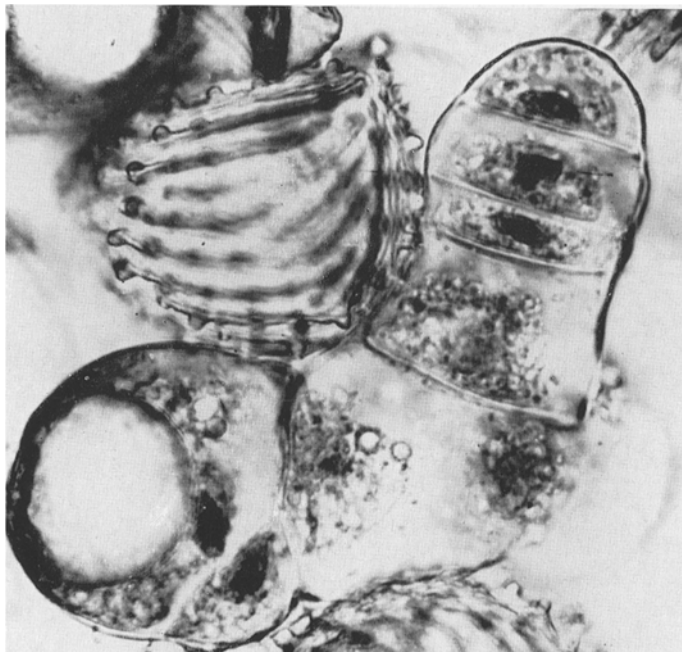


Abb. 9. Reduktion des Antheridiums auf den Status eines dreizelligen Seitenlappens unter der Einwirkung von  $10^{-4}$  m 5-Joddesoxyuridin. Gibb  $A_3$   $5 \times 10^{-6}$  g/ml. (Carminessigsäure)

Tabelle 12. Wirkung von 5-Joddesoxyuridin. Bezeichnungen entsprechen Tabelle 11. Gibb  $A_3$   $2,5 \times 10^{-6}$  g/ml

A			B				
Mol/l	Zellzahl nach 10 Tagen	Antheridienbildung in 50% der Prothallien		n	n Sptz. <8	A. terat.	A. verg.
		Tage	Zellzahl				
0	$15,2 \pm 0,5$	10	$11,0 \pm 0,7$	100	—	—	—
$5 \times 10^{-6}$	$13,8 \pm 0,4$	10	$11,8 \pm 0,6$	100	—	—	—
$10^{-5}$	$12,3 \pm 0,5$	10	$10,3 \pm 0,3$	99	1	—	—
$5 \times 10^{-5}$	$9,0 \pm 0,3$	9	$5,7 \pm 0,3$	46	16	11	27
$10^{-4}$	$7,6 \pm 0,3$	9	$4,9 \pm 0,2$	36	27	6	31

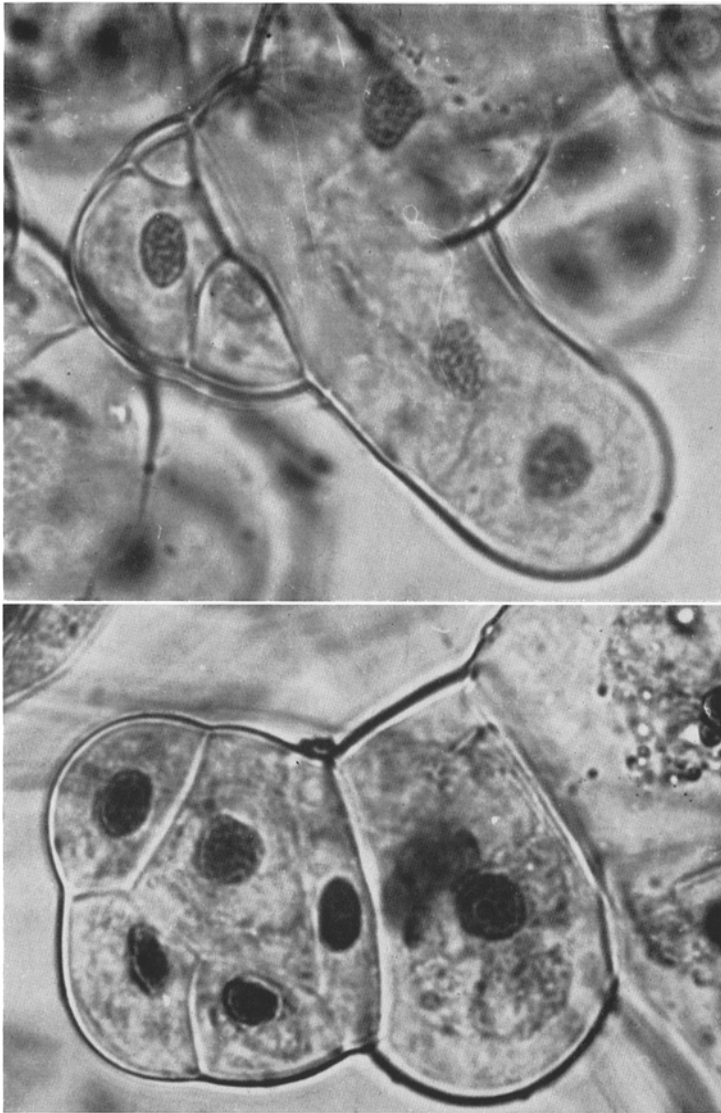


Abb. 10 a u. b. Wirkung von 5-Joddesoxyuridin ( $10^{-4}$  m) auf die Ausbildung des Antheridienmusters (Carminessigsäure mit Chloralhydrat). a Ausbildung infertiler Antheridien mit vermehrten Wandzellen (Osmundatyp). b Regeneration eines Protonems aus der Stützelle eines infertilen Antheridiums

dadurch erschwert, daß in diesen im Gegensatz zum fertilen Antheridium die vegetative Potenz nicht erlischt. Es kommt zu weiteren Zellteilungen und Segmentierungen. Dabei entstehen häufig Muster, die an Antheridien des primitiveren *Osmundatyps* erinnern (Abb. 10a). Kommt es darüber hinaus zu einem regeneratartigen Austreiben einzelner Zellen des teratologischen Prothalliums (Abb. 10b), so lassen sich in den

entstehenden Prothallienauswüchsen kaum noch als Gametangien homologe Organe identifizieren.

Auch unter der Einwirkung von Jod- und Bromdesoxyuridin entstehen flächig ausgebildete Gametophyten. Die Wirkung beider Inhibitoren prägt sich vornehmlich in der Musterbildung der sich entwickelnden Antheridien aus.

Entsprechend den Versuchen mit Actinomycin führt auch eine Vorbehandlung mit Brom- bzw. Joddesoxyuridin (bis zu 12 Tagen) und nachträgliche Applikation von Gibberellin nicht zu einer Hemmung der Antheridieninduktion.

Die starke Hemmwirkung, die Thymidin auf Prothallien von *Anemia* ausübt (Tabelle 7), verhindert eine Reversion auch der durch diese Purinanaloga verursachten Hemmung.

### Diskussion

Jede Diskussion über den primären Wirkort und Wirkungsmechanismus des Gibberellins in der beschriebenen Reaktion wird dadurch erschwert, daß als einziges Maß zur Bestimmung der Induktionswirkung die Ausbildung der Antheridien selbst dienen muß. Dabei ist unwahrscheinlich, daß die Anlage eines Gametangiums in toto von der Präsenz des auslösenden Hormons abhängt. Wahrscheinlicher sind Gibberelline und entsprechend auch die Antheridogene nur „trigger“-Substanz eines einleitenden Prozesses, durch den dann in einer autoregulatorischen Sequenz die letztlich zur Bildung des intakten Sexualorgans führenden Prozesse aufgerufen werden.

Entsprechend den von WERZ (1966) beschriebenen Vorgängen bei der Hutbildung von *Acetabularia* wird auch die Antheridienbildung bei *Anemia* durch eine typische Zellwandausstülpung eingeleitet, die schon vor der zur Bildung der Antheridienmutterzelle führenden Mitose einsetzt (SCHRAUDOLF, 1963). Das Plasma dieser vegetativen Zelle muß demnach schon in dieser Interphase die für die primären Prozesse der Antheridienbildung notwendigen Informationen erhalten und zum Teil realisiert haben.

Solange ein histochemischer oder physiologischer Nachweis dieser primären Veränderungen aussteht, ist eine Abgrenzung der spezifisch vom Gibberellin bzw. Antheridogen ausgelösten Reaktion nicht möglich. Damit kann aber auch eine Unterscheidung zwischen Hemmstoffen des Induktionsprozesses und solchen, die Folgereaktionen beeinflussen, nicht getroffen werden.

Zusätzlich wird der Beweis für die „trigger“-Natur des Phytohormons dadurch erschwert, daß Gibberellin eine überaus stabile Verbindung im Zellstoffwechsel zu sein scheint (z. B. McCOMB, 1964). Die damit verbundene lange Halbwertszeit des Gibberellins hat zur Folge, daß

alle Versuche, mit Antimetaboliten des DNS-, RNS- und Proteinstoffwechsels die Ausbildung der Antheridien zu hemmen, unter der kontinuierlichen Einwirkung der induzierenden Verbindung ablaufen müssen. Im Gegensatz zu Experimenten zur Photomorphogenese oder zur Induktion mit einem physiologisch instabilen Hormon, muß im Fall der Auslösung der Antheridienbildung durch Gibberelline der Hemmstoff einem anhaltenden Aufruf zur Zelldifferenzierung entgegenwirken.

Unter diesen spezifischen Bedingungen scheint keine der bislang als Inhibitor von Determinationsprozessen bekannte Verbindung in der Lage zu sein, die Antheridienanlage im *Schizaeaceen*-Gemetophyten zu unterdrücken oder signifikant zu hemmen.

Zwar führen alle Hemmstofftypen als Folge der gestörten bzw. verminderten Protein- und Nucleinsäuresynthese zu einer Reduktion des Teilungswachstums und einer damit verbundenen zeitlichen Verzögerung der Antheridienbildung. Die im gehemmten Zustand mit verminderter Rate ablaufenden Prozesse folgen aber dem durch das determinierende Hormon festgelegten Muster: Antheridien bilden sich trotz signifikanter Hemmung der physiologischen Gesamtaktivität zum „korrekten“ Zeitpunkt.

Die Frage nach der molekularbiologischen Grundlage der hormonalen Auslösung der Antheridienbildung im Farnprothallium ist damit aus den hier vorgelegten Ergebnissen nicht eindeutig zu beantworten. Die Unwirksamkeit eines so breiten Spektrums von Inhibitoren legt zunächst die Deutung nahe, daß dem auslösenden Hormon weniger die Rolle eines Derepressors bzw. Induktors der Synthese neuer m-RNS zukommt, als daß unter der Einwirkung des Gibberellins die Realisierung und Ausprägung bereits von der DNS abgerufener Information möglich wird.

Zur Zeit häufen sich Angaben über die dazu unerläßliche Existenz von m-RNS mit großen Halbwertzeiten (SENGER und LEDER, 1966). NAKAZAWA und TANNO (1965) machen deren Präsenz auch in Farnprothallien wahrscheinlich. Daß derartige stabile m-RNS für den Ablauf von Entwicklungsprozessen verantwortlich sein kann, die durch spezifische Inhibitoren (speziell Actinomycin-D) nicht blockierbar sind, wird zumindest für die frühen Entwicklungsphasen des Echinodermeneis angenommen (MARKS u. Mitarb., 1964; MONROY u. Mitarb., 1965). SPIRIN und BELTZINA (1964, 1965) führten für durch Inhibitoren der Nucleinsäuresynthese nicht blockierbare Information den Begriff „Informosom“ ein.

Die Möglichkeit, daß die Antheridienbildung eventuell durch Aktivierung derartiger präformierter Information erfolgen kann, gewinnt durch Ergebnisse, die wir in jüngster Zeit an *Polypodium crassifolium* gewonnen haben, an Gewicht. Bei dieser Species erfolgt nach Bestrahlung mit Dunkelrot oder nach einer Dunkelpause von mehr als 36 Std die Antheridienbildung direkt aus der Spore. Auch hier ist die Antheridienbildung nicht durch Actinomycin D blockierbar, wohl aber die

Ausbildung des spermatogenen Gewebes. Im Gegensatz zu *Anemia* scheint hier ein Teil der zur Antheridienbildung notwendigen Information neu aufgerufen und damit dem Eingriff des Inhibitors zugänglich zu werden.

Aus der spezifischen Wirkung einzelner Inhibitoren ergeben sich jedoch schon jetzt Anhaltspunkte für ihren Eingriffsort. So macht die weitgehende Übereinstimmung der durch Applikation von 5-Methyltryptophan erzielten Effekte mit den bei Zusatz von IES erzielten (SCHRAUDOLF, 1966c) wahrscheinlich, daß Wachstumshemmung und Veränderung der Zellproportionen weitgehend auf eine Bildung von 5-Methylindolylessigsäure zurückgehen. In insterilen Ansätzen ist eine derartige Oxydation des Aminosäurederivats zu erwarten. 5-Methylindolylessigsäure selbst übertrifft im allgemeinen im Biotest die Aktivität der IES (PILET, 1961). Die morphogenetische Wirkung von 5-Methyltryptophan auf *Anemia* ist damit weniger einer Hemmung der Proteinsynthese oder einer Veränderung der Proteinzusammensetzung als einem Auxineffekt zuzuschreiben.

Im Gegensatz zu 5-Fluordesoxyuridin ist für 5-Brom- und 5-Joddesoxyuridin bei Bakterien und Säugerzellen ein Einbau in die DNS nachgewiesen (BROKMAN und ANDERSON, 1963). Für höhere Pflanzen wurde ein Einbau tritiierten Joddesoxyuridins in die Chromosomen von *Vicia faba* bewiesen (SMITH und KUGELMAN, 1961), ein Einbau in die DNS für *Arabidopsis* wahrscheinlich gemacht (BROWN, 1962).

Der hohe Prozentsatz auftretender Teratologien und die weitgehende Reduktion des Antheridiums bis auf den Status eines dreizelligen, vegetativen Seitenlappens (Abb. 9) erlauben den Schluß, daß es auch in Prothalliumzellen von *Anemia* unter der Einwirkung dieser Verbindungen zu Transitionen kommt, d.h. daß Thymidinorte der DNS durch 5-Brom- bzw. 5-Joddesoxyuridin ersetzt werden. Die entstehenden Gametangienteratologien müssen als Folge der daraus resultierenden Störung der Matrizeneigenschaft der DNS verstanden werden.

Ob die im *Anemia*-Gametophyten den brom- und jodsubstituierten Pyrimidinen analoge Wirkung des Isoadenins (4-Amino-3,4-d-pyrazolopyrimidin) ebenfalls auf einen bevorzugten Einbau dieses Inhibitors in die DNS zurückgeführt werden kann, ist noch offen. Diesem Inhibitor wird zwar primär eine Hemmung der Neusynthese der Purine zugeschrieben (BOOTH und SARTORELLI, 1961), doch ist vereinzelt auch ein Einbau in die Nucleinsäuren beobachtet worden (BENNETT jr. u. Mitarb., 1962).

Die bei *Anemia* beobachtete Herabsetzung der Zellteilungsrate durch Thymidin bei gleichzeitiger Unwirksamkeit von Thymin ist schon für tierische Gewebe beschrieben worden (KASTEN u. Mitarb., 1965) und wird auf eine Blockierung der DNS-Synthese zurückgeführt. Die Unwirksamkeit von 5-Bromuracil (Tabelle 11) erklärt sich aus der Strukturanalogie mit Thymin. Ob ein Einbau der freien Basen bei anderen

Farnarten möglich ist, und ob die von KRESSEL (1965) beschriebenen Hemmungen der Antheridienbildung und Förderung der Archegonienanlage durch 5-Bromuracil als Indiz für eine Glykosidierung gedeutet werden können, soll durch stoffwechselphysiologische Analysen geklärt werden.

Die hier vorgelegten Versuche dienen vornehmlich einer ersten Klärung der Prozesse, die der hormonalen Auslösung der Antheridienbildung im Farnprothallium zugrunde liegen. Die dabei anfallenden Ergebnisse geben darüber hinaus Anlaß zu einigen einschränkenden Bemerkungen über die bislang zur Steuerung des Flächenwachstums im Gametophyten vorliegenden Ergebnisse. Da es in keinem unserer Versuche gelang, unter Dauerlichtbedingungen das eindimensionale Wachstum der jungen *Anemia*-Prothallien zu fixieren, dürfen die Angaben von Hotta und Osawa (1958), Nakazawa und Tanno (1965) und Rhagavan (1965), die über eine Blockierung des Übergangs zur zweidimensionalen Wachstumsphase des *Polypodiaceen*-Prothalliums durch Hemmstoffe der Protein- bzw. Nucleinsäuresynthese berichten, zumindest nicht verallgemeinert werden. Bei der Applikation dieser Verbindungen kommt es zu nicht unerheblichen Hemmungen des Teilungswachstums (z. B. Rhagavan, 1965), die nur teilweise berücksichtigt worden sind. Gerade die an *Anemia* gewonnenen Ergebnisse machen aber deutlich, daß zeitlichen Verzögerungen von Differenzierungsprozessen ohne gleichzeitige Berücksichtigung der Zellteilungsrate bei der Interpretation von Hemmstoffversuchen auf der Basis einer Aktivierung spezifischer Gene nur ein geringer Aussagewert zukommt.

Die Untersuchungen waren durch Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Bundesministeriums für wissenschaftliche Forschung möglich, Fräulein I. Puls danke ich für ihre sorgfältige Mitarbeit.

### Literatur

- BENNETT jr., L. L., D. SMITHERS, C. TEAGUE, H. T. BAKER, and P. SUTTS: Some effects of 4-aminopyrazolo-(3,4-d)-pyrimidine on purine metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **11**, 81—92 (1962).
- BOOTH, B. A., and A. C. SARTORELLI: 4-Aminopyrazolo-(3,4-d)-pyrimidine: An inhibitor of the synthesis of purines and proteins in Ehrlich ascites cells. *J. biol. Chem.* **236**, 203—206 (1961).
- BROCKMAN, R. W., and E. P. ANDERSON: Pyrimidine analogues. In: *Metabolic Inhibitors* (eds. R. M. HOCHSTER and J. H. QUASTEL), p. 239—285. New York: Academic Press 1963.
- BROWN, J. A. M.: Effect of thymidine analogues on reproductive morphogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Nature (Lond.)* **196**, 51—53 (1962).
- HOTTA, Y., and S. OSAWA: Control of differentiation in the fern gametophyte by amino acid analogs and 8-azaguanine. *Exp. Cell Res.* **15**, 85—94 (1958).
- — and T. SAKAKI: Ribonucleic acid differentiation of the gametophyte of a polypodiaceous fern. *Develop. Biol.* **1**, 65—78 (1959).

- KARLSON, P.: Morphogenese und Metamorphose der Insekten. Coll. Ges. Physiol. Chem. **13**, 101—126 (1962).
- KASTEN, F. H., F. F. STRASSER, and M. TURNER: Nucleolar and cytoplasmatic ribonucleic acid inhibition by excess thymidine. Nature (Lond.) **207**, 161—164 (1965).
- KRESSEL, M.: Antheridien- und Archegonienbildung bei *Microlepidia spelunca* (L.) Moore. Z. Pflanzenphysiol. **53**, 366—368 (1965).
- MACCOMB, A. J.: The stability and movement of gibberellic acid in pea seedlings. Ann. Bot. **28**, 669—687 (1964).
- MARKS, P. A., E. R. BURKA, F. M. CONCONI, W. PERL, and R. A. RIFKIND: Polyribosome dissociation and formation in intact reticulocytes with conservation of messenger ribonucleic acid. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **53**, 1437—1443 (1965).
- MOHR, H.: Die Steuerung der Entwicklung durch Licht am Beispiel der Farn-gametophyten. Ber. dtsh. bot. Ges. **78**, 54—68 (1965).
- MONROY, A., R. MAGGIO, and A. M. RINALDI: Experimentally induced activation of the ribosome of the unfertilized sea urchin egg. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **54**, 107—111 (1965).
- NAEF, U.: On dark germination and antheridium formation in *Anemia phyllitidis*. Physiol. plantarum **19**, 1079—1088 (1966).
- NAKAZAWA, S., and N. TANNO: Concentration gradients of RNA in fern protonema in relation to m-RNA. Naturwissenschaften **52**, 457 (1965).
- OVERBEEK, J. VAN: Plant hormones and regulators. Science **152**, 721—731 (1966).
- PILET, P.: Les phytohormones de croissance, p. 241. Paris: Masson & Cie. 1961.
- PRINGLE, R. B.: Chemical structure of antheridogen A, a specific inducer of the male sex organ in certain fern species. Science **133**, 173—187 (1961).
- RHAGAVAN, V.: Action of purine and pyrimidine analogs on the growth and differentiation of the gametophytes of the fern *Asplenium nidus*. Amer. J. Bot. **52**, 900—910 (1965).
- SCHRAUDOLF, H.: Die Wirkung von Phytohormonen auf Keimung und Entwicklung von Farnprothallien: I. Auslösung der Antheridienbildung und Dunkelkeimung bei *Schizaeaceen* durch Gibberellinsäure. Biol. Zbl. **81**, 731—740 (1962).
- Einige Beobachtungen zur Entwicklung der Antheridien von *Anemia phyllitidis*. Flora (Jena) **153**, 282—290 (1963).
- Relative activity of the gibberellins in the antheridium induction in *Anemia phyllitidis*. Nature (Lond.) **201**, 98—99 (1964).
- Die Wirkung von Phytohormonen auf Keimung und Entwicklung von Farnprothallien: II. Analyse der Wechselbeziehung zwischen Gibberellinkonzentration, Antheridienbildung und physiologischem Alter der Prothalliumzellen von *Anemia phyllitidis*. Planta (Berl.) **68**, 335—352 (1966a).
- Die Wirkung von Phytohormonen auf Keimung und Entwicklung von Farnprothallien: IV. Die Wirkung von unterschiedlichen Gibberellinen und von Allogibberinsäure auf die Auslösung der Antheridienbildung bei *Anemia phyllitidis* und einigen *Polypodiaceen*. Plant and Cell Physiol. **7**, 277—289 (1966b).
- Wirkung von IES, Cumarin und sogenannten „Antigibberellinen“ auf die Auslösung der Antheridienbildung in *Anemia phyllitidis* durch Gibberelline. Z. Pflanzenphysiol. im Druck (1966c).
- SINGER, F. M., and P. LEDER: Messenger-RNA: An evaluation. Ann. Rev. Biochem. **35**, 195—230 (1966).
- SMITH, H. H., and B. H. KUGELMAN: Incorporation of tritiated base analogs into plant chromosomes. Rad. Res. **14**, 504 (1961).



- SPIRIN, A. S., N. V. BELITZINA i M. A. AITKHOZIN: Informationnye RNK v rammen embriogeneze. Zh. Obshch. Biol. **25**, 321—338 (1964).
- — Informationnye ribonukleinovye v rammen embriogeneze. Usp. sovrem. Biol. **59**, 187—204 (1965).
- VARNER, J. E., and G. RAM CHANDRA: Hormonal controle and enzyme synthesis in barley endosperm. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **52**, 100—106 (1964).
- WERZ, G.: Primärvorgänge bei der Realisation der Morphogenese von *Acetabularia*. Planta (Berl.) **69**, 53—57 (1966).

Dr. H. SCHRAUDOLF  
Botanisches Institut der Universität  
63 Gießen, Senckenbergstraße 17—21