

Compt. Rend. Soc. Biol. 143, 460 (1949). — [5] Kulescha, Z.: Compt. Rend. 228, 1304 (1949). — [6] Jagendorf, A. T.: Am. J. Botany 39, 546 (1952). — [7] Torrey, J. G.: Handbuch der Pflanzenphysiologie (Hrsg. W. Ruhland), Bd. XV/1, S. 1312. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965.

## Die Regulation der Isocitrat-Lyase bei Wassermelonenkeimlingen

BERTOLD HOCK

Institut für Biologie, Universität Tübingen

Isocitrat-Lyase (E. C. 4.1.3.1.) ist in Samen von *Citrullus vulgaris* Schrad. nicht nachweisbar. Ihre Aktivität steigt jedoch innerhalb der ersten 3 Tage nach Aussaat auf ein Maximum und fällt danach wieder steil ab [1, 2]. Aus Inhibitorversuchen wurde gefolgert [1], daß der Anstieg auf einer *de-novo*-Synthese des Enzymproteins beruht, welche nur bis zum Zeitpunkt des Maximums andauert. Der Abfall ergibt sich aus einer begrenzten Halbwertszeit des Enzyms. Diese Hypothese konnte nun durch Experimente gestützt werden, die den Einbau von Deuterium in das Enzym verfolgen. 1. Keimlinge wurden von Tag 0 an auf folgenden Medien (mit 0,8% Agar verfestigt) steril angezogen: H<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub>O (80 Vol.-%) und C-14-Proteinhydrolysat (1,25 µCi/ml). 3 Tage nach Aussaat wurde aus jedem Ansatz das Enzym ca. 50fach angereichert [2] (Bezeichnung: H<sub>2</sub>O-Enzym, D<sub>2</sub>O-Enzym und C-14-Enzym). Anschließend erfolgte im CsCl-Dichtegradienten eine Zentrifugation von H<sub>2</sub>O-Enzym + C-14-Enzym (Fig. 1a) und von D<sub>2</sub>O-Enzym + C-14-Enzym (Fig. 1b). Die Verschiebung des D<sub>2</sub>O-Enzyms (Dichte am

Peak, refraktometrisch bestimmt: 1,316) gegenüber dem H<sub>2</sub>O-Enzym (Dichte: 1,296) wird durch einen Vergleich mit dem C-14-Enzym deutlich und erklärt sich durch den Einbau von Deuterium in das Enzymprotein bei der *de-novo*-Synthese [3]. 2. Im Gegensatz hierzu wird nach Überschreiten des Aktivitätsmaximums kein Deuterium mehr in die Isocitrat-Lyase eingebaut: Keimlinge wurden von Tag 0 an auf H<sub>2</sub>O-Agar angezogen. 3½ Tage nach Aussaat wurden die Kotyledonen abgetrennt und aseptisch auf D<sub>2</sub>O- bzw. H<sub>2</sub>O-Agar übertragen. 5½ Tage nach Aussaat wurde wiederum von jedem Ansatz die Isocitrat-Lyase angereichert. C-14-Enzym hingegen wurde aus 3 Tage alten Keimlingen (angezogen auf 2,5 µCi/ml) gewonnen. Obgleich die Kotyledonen auch nach Tag 3½ D<sub>2</sub>O aufnehmen, ergibt eine Dichtegradienten-Zentrifugation von H<sub>2</sub>O-Enzym + C-14-Enzym und von D<sub>2</sub>O-Enzym + C-14-Enzym (Fig 1c) keine Unterschiede mehr. In beiden Fällen ist das Resultat identisch mit Fig. 1a.

Eingegangen am 21. Januar 1970

[1] Hock, B., Beevers, H.: Z. Pflanzenphysiol. 55, 405 (1966). — [2] Hock, B.: Planta 85, 340 (1969). — [3] Longo, C. P.: Plant Physiol. 43, 660 (1968). — [4] Brunk, C. F., Leick, V.: Biochim. Biophys. Acta 179, 136 (1969).

## Selektion in Gewebekulturen mit haploiden Zellen

H. BINDING, K. BINDING und J. STRAUB

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung  
Abteilung Straub, Köln-Vogelsang

Gewebekulturen, die haploide Zellen von Blütenpflanzen enthalten, bieten günstige Voraussetzungen für die Auslese von Zellen mit bestimmten Merkmalsänderungen. Auf engem Raum läßt sich nämlich eine große Zahl von Individuen, die der Selektion unterworfen werden sollen, halten, und wegen der Haploidie tritt eine genetische Änderung sogleich zutage. Allerdings muß sich die Auslese auf Merkmale beschränken, die sich unter den Bedingungen der Gewebekultur manifestieren können.

Wir berichten von einem Versuch, in dem auf Resistenz gegen Streptomycin erfolgreich selektiert wurde (Versuche von K. Binding). Haploides Gewebe von *Petunia hybrida* wächst auf Murashige-Agar [1] gut. Setzt man ihm 0,05% Streptomycin zu, dann sistiert das Wachstum nahezu vollständig. Nach 6—7 Wochen erscheinen aber in derartigen Kulturen an einzelnen Gewebeklumpen stark proliferierende Zellen, die sich jeweils zu kräftigem Kallus entwickeln (Fig. 1). Dieser wurde zerkleinert. Auf Streptomycin-haltigem Agar wachsen die Teilstücke zu neuen Kulturen heran, die sich von den normalen haploiden Gewebekulturen auf Streptomycin-freiem Agar nicht unterscheiden. Die eingetretene genetische Änderung betrifft die Resistenz gegen Streptomycin, nicht etwa die Bedürftigkeit an dem Antibiotikum, da das selektierte Gewebe auf Streptomycin-freiem Medium normal gedeiht.

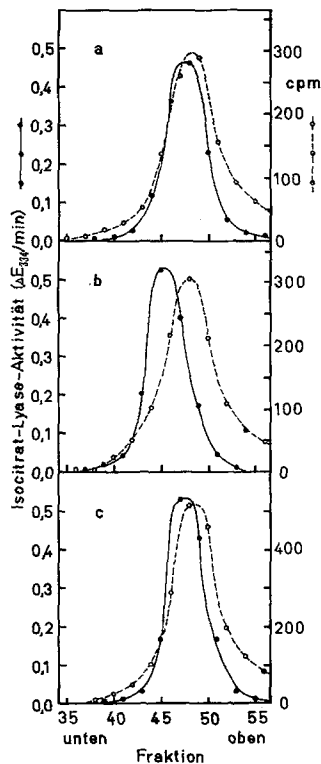


Fig. 1 a—c. Lokalisation der Isocitrat-Lyase im CsCl-Dichtegradienten nach 38 Std Zentrifugation bei 40000 Upm (Beckman L2 65 B, Rotor SW 56, 1 °C). Das Gradientengemisch wurde in 2 Schichten einpipettiert [4]: Untere Schicht (2 ml): K-Phosphatpuffer, pH 7,1 (2 mM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), CsCl (1,65 g). Obere Schicht (2 ml): K-Phosphat und MgCl<sub>2</sub> wie oben, CsCl (0,42 g), Enzym (Menge in Extinktionseinheiten, Test s. [2]): 4,1 ΔE<sub>333</sub>/min H<sub>2</sub>O- (bzw. D<sub>2</sub>O-) Enzym + 0,7 ΔE<sub>333</sub>/min C-14-Enzym. Herkunft der Enzyme: a Kotyledonen von Keimlingen, die von Tag 0 bis 3 auf H<sub>2</sub>O (●—●—●) bzw. C-14 (○—○—○) angezogen wurden. b Kotyledonen von Keimlingen, die von Tag 0 bis 3 auf D<sub>2</sub>O (●—●—●) bzw. C-14 (○—○—○) angezogen wurden. c Keimlinge von Tag 0 bis 3½ auf H<sub>2</sub>O angezogen, Kotyledonen anschließend auf D<sub>2</sub>O übertragen, Enzymreinigung an Tag 5½ (●—●—●). C-14-Enzym wie a und b. — Nach Zentrifugation wurden durch Anstechen der Röhrcen Fraktionen von je 1 Tropfen (ca. 0,05 ml) gesammelt und alternierend auf Enzymaktivität und Radioaktivität (Beckman, Szintillationszähler) getestet

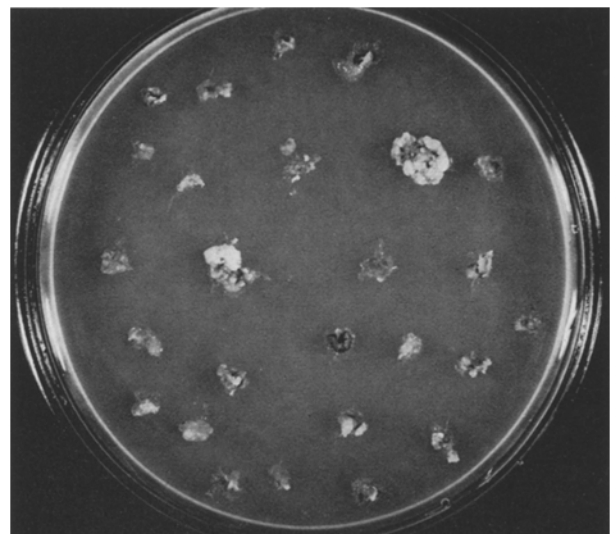


Fig. 1. Kallusteile von haploider *Petunia hybrida* auf Murashige-Agar mit 0,05% Streptomycin. An zwei Gewebestücken wächst resistenter Kallus heran

Die Streptomycin-resistenten Kulturen von *Petunia* ( $2n = 14$ ) enthalten Zellen mit 7, 14, 28 und mehr Chromosomen. Das normale Kallusgewebe von „haploider“ *Petunia* führt die gleichen Zahlen. In derartigen Kulturen läßt sich die Sproßbildung mit Hilfe modifizierter Medien auslösen.

Eingegangen am 29. Dezember 1969

[1] Murashige, T., Skoog, F.: *Physiol. plantarum* 15, 473 (1962).

## The Mitotic Apparatus A Possible Site of Action of Gibberellic Acid

M. FRAGATA\*

Sudbury, Ontario/Canada

Gibberellic acid has the ability to stimulate cytokinesis [1]. It has been demonstrated, furthermore, that its regulatory role is exerted at the gene level [2] most probably during the transcription of the DNA template. In this paper evidence of an interaction between gibberellic acid and the mitotic inhibitor colchicine will be presented in coleoptiles of wheat seedlings. It will be shown, moreover, that this finding is an indication that the gibberellin might be active during the development of the fibers of the mitotic apparatus.

Seeds of *Triticum aestivum* L. em. Thell. var. Rescue were germinated on moist filter paper, then incubated in the dark at 24 °C. Samples of 20 seedlings with coleoptiles 1 mm long were treated with distilled water or a 2.0 mM aqueous solution of colchicine for periods from fifteen minutes to six hours. The colchicine-treated seedlings were then incubated in distilled water or a 0.2 mM aqueous solution of gibberellic acid.

**Results.** It has been observed [3] that high concentration of colchicine prevents the elongation of coleoptiles of *Gramineae*. Fig. 1 (left) shows that the growth of the coleoptile of wheat seedlings — pretreated *in vivo* during one hour with colchicine — is inhibited. However, the coleoptile grows faster when the seedlings are transferred into a medium containing gibberellic acid instead of water. In addition, Fig. 1 (right) indicates clearly that the gibberellin reverses partially the colchicine-induced inhibition of coleoptile elongation. More-

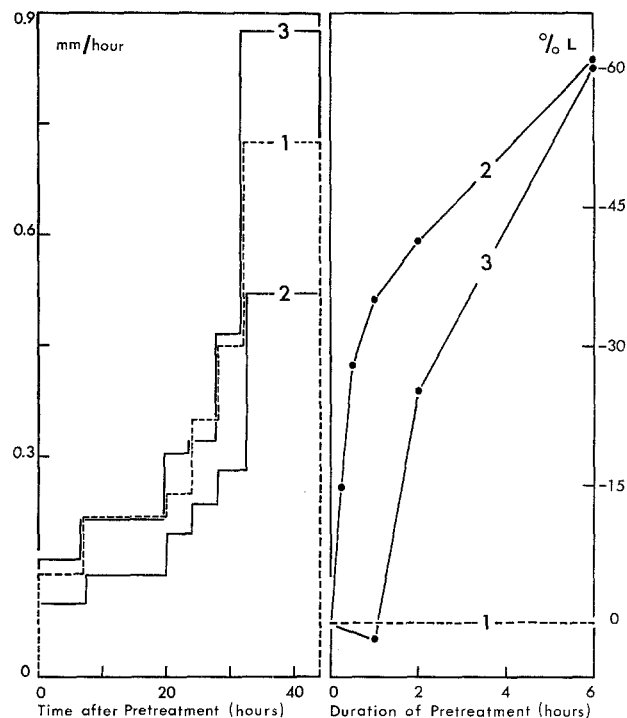


Fig. 1. Left: Effect of post-treatment on the rate of coleoptile elongation (mm/hour). Duration of pretreatment: 1 hour. Right: Effect of pretreatment on the growth of the coleoptile. Duration of post-treatment: 20 hours. % L coleoptile elongation as percentage of the control (1). — Pretreatment: (1) water; (2, 3) colchicine (2.0 mM). Post-treatment: (1, 2) water; (3) gibberellic acid (0.2 mM)

over, the growth inhibition rates which are attained after six hours of pretreatment — high level of colchicine in the tissues — would seem to show that a competitive interaction may exist between colchicine and gibberellic acid. This suggests that these substances may be active at the same or nearby sites in the cell. Besides, it predicts a new essential mechanism of action of the gibberellin.

On the one hand, colchicine is active at low concentration as a promoter of cell division [4] likely through a mechanism similar to the gibberellin-induced  $\alpha$ -amylase biosynthesis [5]. The foregoing and the demonstration that colchicine binds *in vitro* to DNA molecules [6] are an indication that gibberellic acid and colchicine may interact during the transcription of the DNA template. Another hypothesis is that gibberellic acid competes with colchicine during the development of the fibers of the mitotic apparatus. Colchicine suppresses the spindle formation during mitosis [3]: this substance binds to sub-unit protein of microtubules of the mitotic apparatus [7] thus preventing the completion of the nuclear division. The gibberellin, moreover, could have access to the spindle monomers, or to the centromere. This assumption — if proved to be correct — may shed new insight into the hormonal mechanisms of cellular differentiation. Further investigations on this problem will be undertaken.

Received November 6, 1969 and January 5, 1970

\* This work has been conducted at the Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Canada. Present author's address: 507 Ash St., Sudbury, Ontario, Canada. A research grant from the National Research Council of Canada is gratefully acknowledged.

[1] Sachs, R. M., Bretz, C., Lang, A.: *Exp. Cell Res.* 18, 230 (1959). — [2] Chrispeels, M. J., Varner, J. E.: *Plant Physiol.* 42, 1008 (1967). — [3] Eigsti, O. J., Dustin Jr., P.: *Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry*. Ames: Iowa State College Press 1955. — [4] Fragata, M.: *Experientia*, in press. — [5] Varner, J. E., Chandra, G. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 52, 100 (1964). — [6] Ilan, J., Quastel, J. H.: *Biochem. J.* 100, 448 (1966). — [7] Shelanski, M. L., Taylor, E. W.: *J. Cell Biol.* 34, 549 (1967).

## Endodyogenie bei *Frenkelia spec.* (Sporozoa)

O. KEPKA

Zoologisches Institut der Universität Graz\*

E. SCHOLTYSZEK\*\*

Zoologisches Institut der Universität Bonn  
Protozoologische Arbeitsgruppe

Endodyogenie (= innere Knospung) ist bisher nur aus drei Gattungen der Sporozoen: *Toxoplasma*, *Besnoitia* und *Sarcocystis*, bekannt. Die Vermehrungsweisen des systematisch noch unsicheren M-Organismus (= *Frenkelia spec.*) sind unbekannt. Nach lichtmikroskopischen Untersuchungen [1]

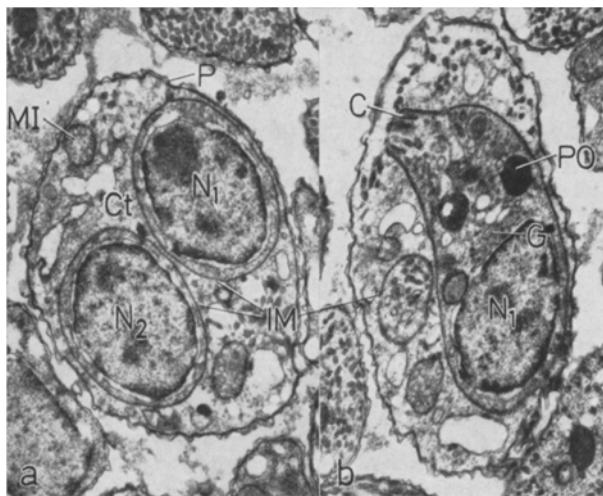


Fig. 1. Dünnschnitte durch Zysten von *Frenkelia spec.* aus dem Hirn von Rötelmäusen. a) Querschnitt durch einen Endodyocyt. b) Schrägschnitt durch einen Endodyocyt. (Vergr. 14100 $\times$ ). IM innere Schicht der Pellicula; N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub> Nuclei der Tochterzellen; Ct Cytoplasma der Mutterzelle; P zweischichtige Pellicula der Mutterzelle; MI Mitochondrium; C Conus; G Golgiapparat; PO Paariges Organell